

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

**EFFET DE LA MÉLATONINE SUR LE STRESS DU RETICULUM
ENDOPLASMIQUE INDUIT PAR UNE HYPOXIE/REOXYGENATION
DANS LES CELLULES BEWO, UN MODÈLE DE TROPHOBLASTE
HUMAIN**

Par
Philippe WONG-YEN

Mémoire présentée pour l'obtention du grade de
Maître des Sciences, M.Sc
Maîtrise en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Pr Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Pre Marie Cohen
Université de Genève

Directeur de recherche

Pre Cathy Vaillancourt
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je remercie, les membres du comité, le Pre Jacques Bernier, la Dre Marie Cohen et la Pre Cathy Vaillancourt, de consacrer de leur temps à l'évaluation de mon mémoire.

Je te tiens à remercier particulièrement ma directrice de recherche Cathy Vaillancourt, pour ta gentillesse, ta disponibilité, tes conseils, pour avoir su me redonner de la motivation et avoir toujours cru en moi. Tu fais partie de ces personnes qui m'ont permis d'avancer toujours plus loin... Merci de m'avoir donnée l'opportunité de faire partie de cette grande famille.

Ma team mélatoninergique : spéciale dédicace à Josianne, pour toute ton aide et pour avoir marché à mes côtés sur ce long chemin sombre et obscur des WB, on se rappellera toute notre vie de cette CHOPinette ! Que la force soit avec toi ! Lucas, pour ton écoute, ton soutien, ta joie de vivre et ton rire reconnaissable dans tout l'INRS. Eugênia, pour ton soutien tout au long de cette maîtrise et ma partenaire de beuverie. Marlène, pour ta grande aide dans les expériences, tes conseils et ton sourire.

Tous mes collègues de travail : Laetitia, pour tous ces squattages dans ton bureau, ces moments de fous rires et mon aide-mémoire pour les prénoms ;) Marc, pour tous ces moments passés au café, tes encouragements et ton aide pour mes statistiques. Andrée-Anne, pour avoir été le meilleur maître de stage et pour notre petit rayon de soleil, Léo. Hélène pour le petit bout de femme que tu es, hihi ! Joey, pour tous tes bons conseils dans Destiny et les prochains... Ahmed pour ton aide.

Finalement, je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire, les stagiaires et toutes les personnes de l'institut qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de maîtrise.

RÉSUMÉ

La mélatonine est produite par les cellules trophoblastiques et protège le placenta contre le stress oxydatif induit par une hypoxie/réoxygénation. L'hypoxie/réoxygénation est impliquée dans la physiopathologie de complications de la grossesse telle que, la prééclampsie. Le stress du réticulum endoplasmique induit la réponse aux protéines mal repliées (UPR) afin de rétablir l'homéostasie ou induit la mort par apoptose. Cependant, le rôle de la mélatonine sur la régulation du stress du réticulum endoplasmique induit par une hypoxie/réoxygénation dans les trophoblastes n'a jamais été étudié. L'hypothèse de recherche est que la mélatonine protège les cellules trophoblastiques du stress du réticulum endoplasmique induit par une hypoxie/réoxygénation. Les objectifs sont de : 1) Déterminer si l'hypoxie/réoxygénation active le stress du réticulum endoplasmique et les voies PERK et IRE1 α dans les cellules de choriocarcinomes placentaires BeWo, un modèle de trophoblaste vilieux humain ; 2) Déterminer si la mélatonine renverse les effets de l'hypoxie/réoxygénation sur le stress du réticulum endoplasmique et les voies PERK et IRE1 α dans les cellules BeWo. Les résultats montrent que l'hypoxie/réoxygénation active le stress du réticulum endoplasmique par une augmentation significative de GRP78 (P = 0,0172), PERK (P = 0,0379), IRE1 α (P = 0,0293), ATF4 (P = 0,0479), CHOP (P = 0,0319) et TRAF2 (P = 0,0130), sans effet sur NF κ B et I κ B. La mélatonine en condition de normoxie augmente significativement GRP78 (P = 0,0510), PERK (P = 0,0094), IRE1 α (P = 0,0514), P-eIF2 α (P = 0,0471) et ATF4 (P = 0,0060), sans effet sur CHOP, TRAF2, NF κ B et I κ B. Ces résultats indiquent que la mélatonine ne renverse pas l'effet de l'hypoxie/réoxygénation, mais mime son effet, dans les cellules BeWo. Cette étude démontre pour la première fois que l'hypoxie/réoxygénation et la mélatonine active de manière similaire le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules de choriocarcinomes placentaires humaines BeWo, activant majoritairement la voie PERK et l'apoptose, sans effet sur la voie de l'inflammation IRE1 α . Ces données combinées à nos résultats précédents suggèrent que la mélatonine favorise la survie cellulaire des cellules normales, en diminuant le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique et les voies apoptotiques tandis que dans les cellules tumorales (BeWo), elle a un effet prooxydant en augmentant l'apoptose, le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique et une diminution des enzymes antioxydantes. En conclusion, cette étude montre que les cellules BeWo ne sont pas un bon modèle pour étudier l'effet protecteur de la mélatonine dans les cellules trophoblastiques normales en condition d'hypoxie/réoxygénation, mais elles sont un bon modèle pour étudier l'effet thérapeutique de la mélatonine dans les cancers placentaires.

Mots-clés : Stress du réticulum endoplasmique ; Hypoxie/réoxygénation ; Prééclampsie ; Syncytiotrophoblaste ; Cytotrophoblaste vilieux ; Mélatonine.

ABSTRACT

Melatonin is produced by trophoblastic cells and protects the placenta against oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. Hypoxia/reoxygenation is implicated in the pathophysiology of pregnancy disorders such as preeclampsia. Endoplasmic reticulum stress induces unfolded protein response proteins (UPR) in order to restore homeostasis or to induce death by apoptosis. However, the role of melatonin in the regulation of endoplasmic reticulum stress induced by hypoxia/reoxygenation in trophoblasts has never been studied. The research hypothesis is that melatonin protects trophoblastic cells from the endoplasmic reticulum stress induced by hypoxia/reoxygenation. The objectives are to: 1) Determine whether hypoxia/reoxygenation activates the endoplasmic reticulum stress and the PERK and IRE1 pathways in placental choriocarcinoma cells BeWo, a model of human villous trophoblast; 2) Determine whether melatonin reverses the effects of hypoxia/reoxygenation on the endoplasmic reticulum stress and the PERK and IRE1 α pathways in BeWo cells. The results show that hypoxia/reoxygenation activates endoplasmic reticulum stress by increasing significantly GRP78 ($P = 0.0172$), PERK ($P = 0.0379$), IRE1 α ($P = 0.0293$), ATF4 ($P = 0.0479$), CHOP ($P = 0,0319$) et TRAF2 ($P = 0,0130$) expression and shows no effect on NF κ B and I κ B. Similar to hypoxia/reoxygenation, 1 mM melatonin under normoxic condition significantly increases GRP78 ($P = 0.0510$), PERK ($P = 0.0094$), IRE1 α ($P = 0.0514$), P-eIF2 α ($P = 0.0471$), and ATF4 ($P = 0.0060$) and has no effect on CHOP, TRAF2, NF κ B and I κ B. These results indicate that melatonin does not reverse the effect of hypoxia/reoxygenation but mimics its effect in BeWo cells. This study demonstrates for the first time that hypoxia/reoxygenation and melatonin similarly activate endoplasmic reticulum stress in BeWo human placental choriocarcinoma cells, mainly by activating the PERK pathway and apoptosis, with no effect on the inflammation pathway IRE1 α . This data combined with our previous results suggest that melatonin promotes cellular survival of normal cells by decreasing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptotic pathways, whereas in tumour cells (BeWo) it has a pro-oxidative effect increasing apoptosis, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and decreasing antioxidant enzymes. In conclusion, this study shows that BeWo cells are not a good model for studying the protective effect of melatonin in normal trophoblastic cells under hypoxia/reoxygenation conditions, but they are a good model for studying the effect of treatment of melatonin in placental cancers.

Keywords: Endoplasmic reticulum stress ; Hypoxia/reoxygenation ; Preeclampsia ; Syncytiotrophoblast ; Villous cytotrophoblaste ; melatonin.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | iii |
| RÉSUMÉ | v |
| ABSTRACT | vi |
| LISTE DES TABLEAUX | ix |
| LISTE DES FIGURES..... | xi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 1 |
| CHAPITRE 1 : INTRODUCTION..... | 2 |
| 1.1 Le placenta humain | 2 |
| 1.1.1 Rôle du placenta..... | 2 |
| 1.1.2 Structure du placenta | 2 |
| 1.1.3 Syncytialisation..... | 4 |
| 1.1.4 Homéostasie du trophoblaste villos..... | 5 |
| 1.1.5 Stress oxydatif et trophoblaste | 7 |
| 1.1.6 Prééclampsie (PE)..... | 8 |
| 1.1.7 Hypoxie/réoxygénation (H/R)..... | 10 |
| 1.1.8 Stress oxydatif, apoptose et inflammation placentaire..... | 10 |
| 1.1.9 Stress du réticulum endoplasmique | 11 |
| 1.1.10 La voie <i>unfolded protein response</i> (UPR)..... | 12 |
| 1.2 Mélatonine | 15 |
| 1.2.1 Rôle..... | 15 |
| 1.2.2 Récepteurs à mélatonine | 16 |
| 1.2.3 Mélatonine et grossesse..... | 16 |
| 1.2.4 Mélatonine et grossesses pathologiques | 17 |
| 1.2.5 Effet antioxydant de la mélatonine | 18 |
| 1.2.6 Mélatonine et stress du RE..... | 21 |
| CHAPITRE 2 : HYPOTHESE ET OBJECTIFS..... | 23 |
| CHAPITRE 3 : METHODOLOGIE | 24 |

| | | |
|--------------------------------------|--|---|
| 3.1 | Matériels..... | 24 |
| 3.2 | Culture des cellules BeWo | 24 |
| 3.3 | Traitement | 25 |
| 3.4 | Immunobuvardage de type western | 25 |
| 3.5 | Analyse statistique | 26 |
| CHAPITRE 4 : RESULTATS | | 29 |
| 4.1 | Effet de l'hypoxie/réoxygénation (H/R) et de la mélatonine sur l'expression des protéines GRP78, PERK et IRE1 α de la voie UPR | 29 |
| 4.2 | Effet de l'H/R et de la mélatonine sur la voie de signalisation PERK | 33 |
| 4.3 | Effet de l'H/R et de la mélatonine sur la voie de signalisation IRE1 α | 35 |
| CHAPITRE 5 : DISCUSSION | | 37 |
| CHAPITRE 6 : CONCLUSION..... | | 42 |
| CHAPITRE 7 : Références | | 45 |
| ANNEXE..... | | Erreur ! Le signet n'est pas défini. |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|---|
| Tableau 1.1 : Principaux facteurs modulant la fusion des cytotrophoblastes villos et la formation du syncytiotrophoblaste..... | 7 |
|--|---|

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1.1: Représentation schématique de la villosité chorale à l'interface foeto-maternelle. | 3 |
| Figure 1.2: Voies de différenciation du trophoblaste humain. | 4 |
| Figure 1.3.: Différenciation morphologique et biochimique du trophoblaste vilieux. | 7 |
| Figure 1.4: Renouvellement du trophoblaste vilieux | 8 |
| Figure 1.5: Différence entre l'implantation placentaire dans une grossesse normale et dans une grossesse compliquée par la prééclampsie. | 9 |
| Figure 1.6: Modèle d'hypoxie et réoxygénation pour des cultures primaires de cytotrophoblastes vilieux..... | 11 |
| Figure 1.7: Voie de signalisation de l'UPR. | 14 |
| Figure 1.8: Cascade antioxydante de la mélatonine. | 19 |
| Figure 1.9: Effet protecteur de la mélatonine de manière récepteur-dépendant et -indépendant | 20 |
| Figure 3.1: Représentation schématique du protocole expérimentale. | 27 |
| Figure 4.1: Effet de l'hypoxie/réoxygénation et de la mélatonine sur l'expression de la protéine GRP78..... | 30 |
| Figure 4.2: Effet de l'hypoxie/réoxygénation et de la mélatonine sur l'expression de la protéine PERK..... | 31 |
| Figure 4.3: Effet de l'hypoxie/réoxygénation et de la mélatonine sur l'expression de la protéine IRE1 α | 32 |
| Figure 4.4: Effet de l'hypoxie/réoxygénation (H/R) et de la mélatonine sur l'expression des protéines eIF2 α , ATF4 et CHOP de la voie PERK. | 34 |
| Figure 4.5: Effet de l'hypoxie/réoxygénation (H/R) et de la mélatonine sur l'expression des protéines TRAF2, NF κ B et I κ B de la voie IRE1 α | 36 |
| Figure 5.1: Schéma récapitulatif des voies de l'UPR activées suite au traitement en H/R et avec de la mélatonine dans les cellules BeWo. | 41 |
| Figure 6.1: Représentation schématique de l'effet de l'H/R et la mélatonine sur le stress du RE dans les cellules BeWo. | 43 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AANAT. : Aralkylamine N-acétyltransférase
AFMK. : N1-acétyl-N2-formyl-5-méthoxykynuramine
AMK. : N1-acétyl-5-méthoxykynuramine
AP-1. : Protéine activatrice 1
ARE. : Elément de réponse antioxydante
Ask1. : Apoptosis – regulating kinase 1
ATF4. : Activating transcription factor 4
ATF6. Activated transcription factor 6
Ca²⁺. : Calcium
CG. : Cellule géante
CHOP. : C/EBP homologous protein
DR5. : Death receptor 5
eIF2 α . : Eukaryotic translation initiation factor 2
ERAD. : ER-associated degradation
ERO1.: ER oxidore-ductine 1
ERSE-1. : ER stress-reponse elements
evCTB. : Cytotrophoblaste extravilleux
FAD. : Flavin-adenine dinucleotide
GSH. Glutathion
H/R. : Hypoxie/réoxygénation
HIF-1 α . Hypoxia inducible facteur-1 alpha
HIOMT. : Hydroxyindole-O-méthyltransférase
HLA. : Antigène des leucocytes humains
HO-1. : Heme oxygenase 1

hPL. Hormone lactogène placentaire

I κ B. : Inhibitor of kappa B

IKK. : Inhibitor kappa-B kinase

IP₃R. : Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor

IRE1. : Inositol-requiring transmembrane linase/endonuclease 1

MT3. : Quinone reductase

NF κ B. : Nuclear factor-kappaB

NRF2. : Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2

PARP. : Poly(ADP-ribose) polymerase

PDI. : Protéine disulfure isomérase

PE. Prééclampsie, Prééclampsie

PERK. : PKR-like ER kinase

pGH. Hormone de croissance placentaire

RE. : Réticulum endoplasmique

RNS. : Espèces réactives de l'azote

ROCK1. : Rho-associated coiled-coil protein kinase 1

ROR/RZR. : Retinoid orphan receptor et retinoid Z receptor

ROS. : Espèces réactives de l'oxygène

S1P. : site-1 protein

S2P. : site-2 protease

SAPK/JNK. : Stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal kinases

STB. : Syncytiotrophoblaste

sXBP1. : XBP1 clivé

TNF- α . : Facteur de nécrose tumorale

TRAF2. : Tumor necrosis factor-2

UPR. : Réponse aux protéines mal repliées

vCTB. : Cytotrophoblaste vilieux

XBP1. : X box-binding protein 1

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Le placenta humain

1.1.1 Rôle du placenta

Le placenta humain est un organe autonome et transitoire. Il est impliqué dans les échanges de gaz et de nutriment entre la mère et le fœtus et permet d'éliminer les déchets. De plus, il possède une importante activité endocrine, en produisant différentes hormones associées à la grossesse (telles que l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) et l'hormone lactogène placentaire (hPL)), des facteurs de croissance, et protège le fœtus contre le rejet par le système immunitaire maternelle (al-Lamki *et al.*, 1999, Aplin, 1991, Le Bouteiller, 2001, Malassine, 2001, Morrish *et al.*, 1987, Teasdale *et al.*, 1985). Toutes ces fonctions jouent un rôle important dans la protection et le développement du fœtus, ainsi que le bon déroulement de la grossesse.

1.1.2 Structure du placenta

Chez les primates supérieurs, le placenta est de type hémonochorial caractérisé par une invasion des cellules trophoblastiques dans la décidue et le myomètre (Malassine *et al.*, 2003). Les villosités choriales sont les unités structurales du placenta humain et sont de deux types : les villosités crampon et les villosités flottantes. Les premières situées à la plaque basale permettent l'implantation au début de la grossesse, alors que les seconds baignent librement dans la chambre intervillieuse et permettent de contrôler la croissance placentaire, ainsi que les échanges transplacentaires (Fig.1.1) (Alsat *et al.*, 1999).

La fécondation d'un spermatozoïde et d'un ovule entraîne, suite à plusieurs divisions cellulaires, la formation d'un blastocyste dont les faces internes et externes sont composées respectivement d'embryoblastes et de cellules trophoblastiques. Ces dernières sont à l'origine de la formation du placenta (Budhrajia *et al.*, 2006, Cartwright *et al.*, 2010, Diedrich *et al.*, 2007, Tuuli *et al.*, 2011). Le développement placentaire se fait en trois étapes : prélacunaire, lacunaire et vilieux. Durant ces différents stades, le blastocyste s'implante dans l'épithélium utérin par une activité protéolytique et le trophoctoderme se différencie en deux types cellulaires : les

cytotrophoblastes villos (vCTB) et les cytotrophoblastes extravilloux (evCTB) qui présentent des phénotypes et des fonctions différentes (Fig.1.2).

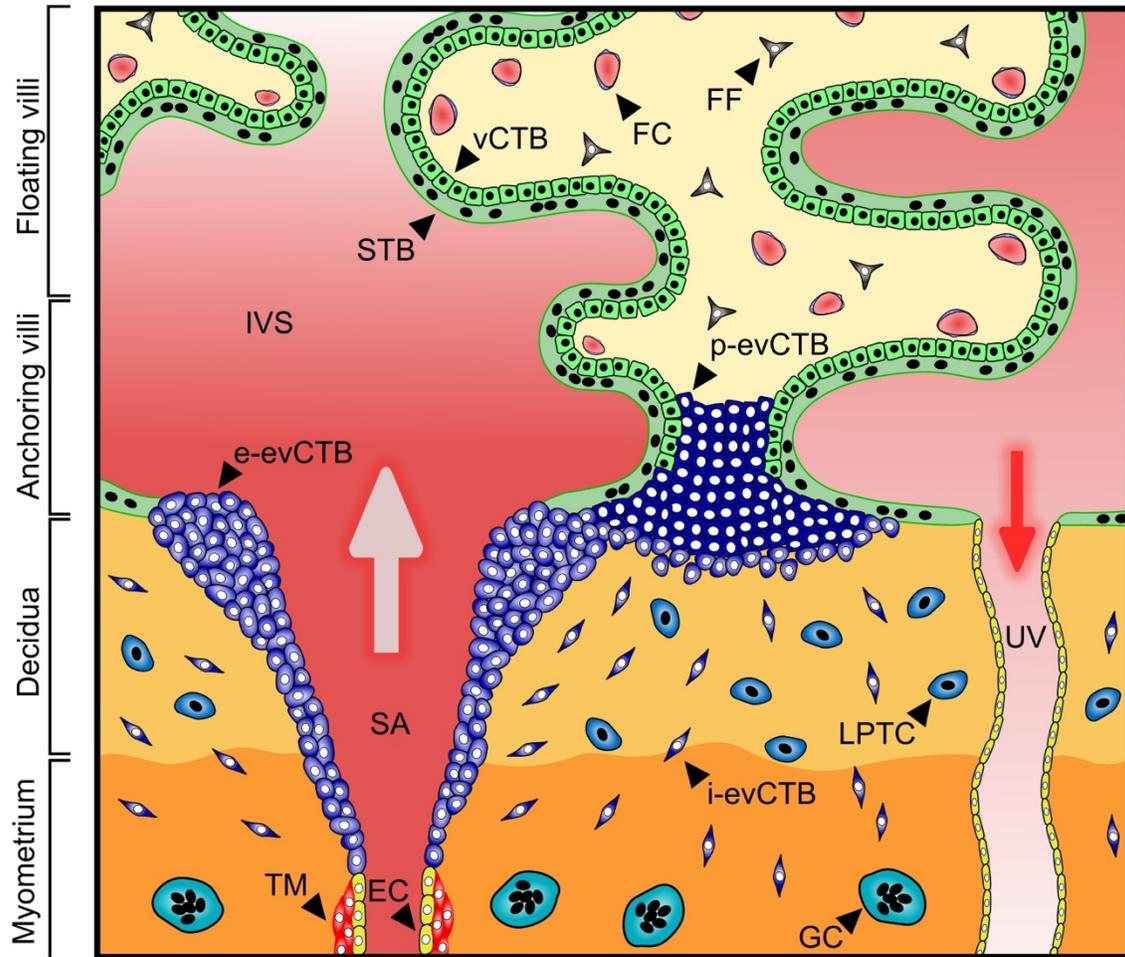


Figure 1.1: Représentation schématique de la villosité crampon à l'interface foeto-maternelle. Les cytotrophoblaste extravilloux (evCTB) prolifèrent et envahissent la décidua afin de remodeler les artères spiralées. Ces changements entraînent l'augmentation du flux sanguin dans l'espace intervilloux (IVS). Durant la phase d'invasion, les evCTB se différencient d'un phénotype épithélial en phénotype endothélial (EC). La villosité flottante est composée de cytotrophoblastes villos (vCTB) qui prolifèrent et fusionnent pour former le syncytiotrophoblaste (STB) qui est en contact direct avec le sang maternel. e-evCTB (cytotrophoblaste extravilloux endovasculaire), FC : capillaire fœtal ; FF : fibroblaste fœtal ; GC : cellule géante; LPTC : grande cellule polygonale trophoblastique ; i-evCTB (cytotrophoblaste extravilloux invasif), p-evCTB (cytotrophoblaste extravilloux prolifératif) ; SA : artère spiralée utérine ; TM : tunique musculaire ; UV : veine utérine. Tirée de (Lanoix *et al.*, 2012b)

Tout au long de la grossesse, les vCTB mononuclées fusionnent et se différencient en syncytiotrophoblaste (STB) multinuclée non prolifératif (Black *et al.*, 2004, Huppertz *et al.*, 1999, Yusuf *et al.*, 2002). Le STB compose les villosités flottantes afin de former une barrière qui permet le contact direct avec le sang maternel. Ceci permet les échanges gazeux et de nutriment entre la mère et le fœtus. De plus, le STB acquiert une activité endocrine et sécrète une grande quantité d'hormones polypeptidiques (hCG, hPL, l'hormone de croissance

placentaire (pGH), ...) et de stéroïdes (estrogène, progestérone, glucocorticoïdes, ...) (Crosley *et al.*, 2013, Malassine *et al.*, 2003, Orendi *et al.*, 2010). Cette fonction endocrine est essentielle au bon déroulement de la grossesse. L'absence de l'antigène des leucocytes humains (HLA-G) de classe I au niveau du STB le protège contre un rejet du système immunitaire maternel (Loke *et al.*, 2000). Les colonnes de evCTB, situées à la base de la villosité crampon, acquièrent un phénotype invasif et se propage dans la décidue et le myomètre. Cette invasion du lit placentaire permet aux evCTB de se différencier en cellules géantes (CG) (Fig.1.2) (Aplin, 1991, Graham *et al.*, 1992). Il a été démontré que les CG produisent la hCG et la hPL, tout comme le STB, ce qui leurs suggèrent un rôle endocrine dans le maintien de la grossesse (al-Lamki *et al.*, 1999). De plus, les evCTB remodelent aussi les artères spiralées maternelles en remplaçant les cellules endothéliales pour augmenter la taille et diminuer la résistance des artères (Cartwright *et al.*, 2010, Ji *et al.*, 2013, Kaufmann *et al.*, 2003). Ceci a pour résultat d'augmenter l'apport en sang au niveau du placenta et soutien le développement du fœtus.

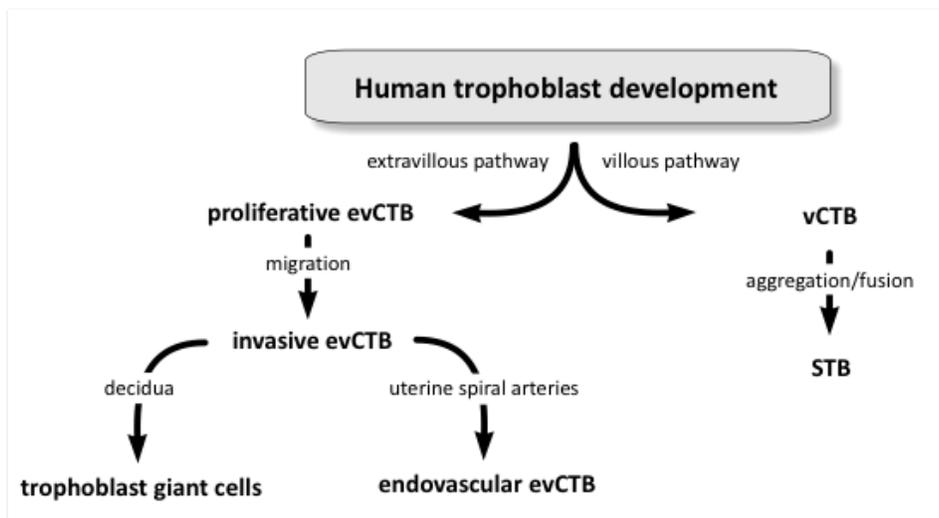


Figure 1.2: Voies de différenciation du trophoblaste humain. Les cytotrophoblastes se différencient en cytotrophoblaste villositaire (vCTB) et extravillous (evCTB). Les vCTB prolifèrent et fusionnent afin de former le syncytiotrophoblaste (STB). Les evCTB envahissent la décidue et les artères spiralées afin de se différencier en cellules trophoblastiques géantes (CG) et evCTB endovasculaires. Tirée de (Vaillancourt, Lanoix et al. 2009).

1.1.3 Syncytialisation

In vivo, les premières découvertes de la fusion et de la différenciation des vCTB en STB ont été faites par Richart en 1961, en utilisant l'incorporation de la [³H]-thymidine (Richart, 1961). Par la suite, une étude a été portée sur l'isolation et la purification des vCTB afin de permettre la différenciation, *in vitro*, des vCTB en culture primaire (Kliman *et al.*, 1986). En effet,

la technique développée par Kliman *et al.*, utilise la digestion enzymatique séquentielle à partir de trypsine et DNase suivie d'une purification des vCTB sur un gradient de Percoll discontinu. *In vitro*, le sérum foetal bovin est un facteur nécessaire pour permettre la fusion (différenciation morphologique) et la différenciation biochimie des vCTB fraîchement isolées en STB après 72 h de mise en culture (Kliman *et al.*, 1986) (Fig.1.3). Après 96 h, on observe une diminution de la survie ainsi qu'une apoptose des cellules (Crocker *et al.*, 2001). La différenciation biochimique se caractérise par la production d'hormones spécifiques telles que la hCG, la hPL, le neuropeptide Y et la leptine (Kliman *et al.*, 1986, Midgley *et al.*, 1963, Morrish *et al.*, 1987, Senaris *et al.*, 1997). Les voies intrinsèque et extrinsèque sont impliquées dans cette mort cellulaire, mais des études ont montré que la voie intrinsèque est retrouvée majoritairement et qu'elle est induite lors de stress oxydatifs et pendant des variations du niveau d'oxygène au niveau du placenta, tel que l'hypoxie (Crocker *et al.*, 2001, Heazell *et al.*, 2008, Hung *et al.*, 2010, Kar *et al.*, 2007, Lanoix *et al.*, 2012c).

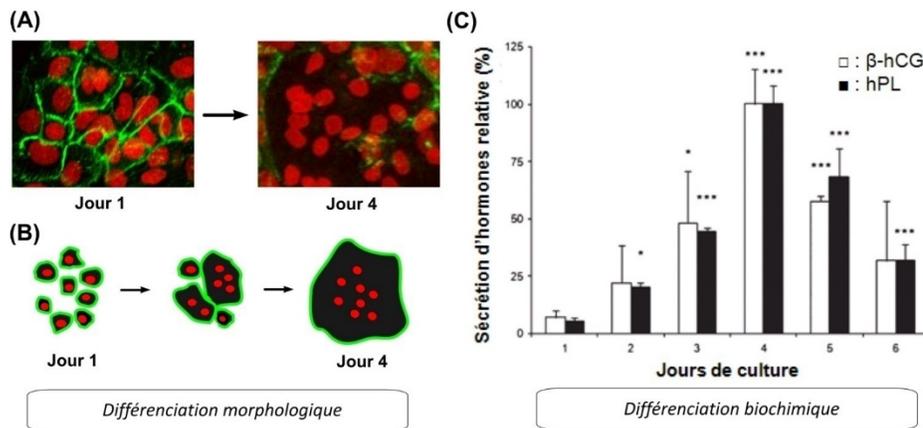


Figure 1.3: Différenciation morphologique et biochimique dans des cultures primaires de trophoblaste villositaire de placenta humain à terme. (A) Différenciation morphologique (fusion) marquage de la desmoplakine (vert) et des noyaux (rouge, iodure de propidium) par microscopie confocale après un et quatre jours de culture (400X). (B) Représentation schématisée de la différenciation morphologique *in vitro*. (C) Différenciation biochimique, sécrétion de la sous-unité β de l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (β -hCG ;) et de l'hormone lactogène placentaire (hPL) d'un à 6 jours de culture. Les données représentent la sécrétion relative \pm SEM comparée à la sécrétion à quatre jours de culture (sécrétion maximale). *P < 0,05 ; ***P < 0,001 comparé au premier jour de culture. Modifiée de Modifié de (Vaillancourt *et al.*, 2009)

1.1.4 Homéostasie du trophoblaste villositaire

La syncytialisation des vCTB en STB est un processus complexe et hautement régulé. Afin de maintenir l'homéostasie et préserver leurs contenus cellulaires (protéines, acides nucléiques, lipides, organelles, etc.), le STB meurt par apoptose pour permettre une régénération permanente et rapide par les vCTB sous adjacentes tout au long de la grossesse (Fig.1.4) (Huppertz *et al.*, 1999, Yusuf *et al.*, 2002). De plus, de nombreuses études ont identifié des facteurs et mécanismes qui stimulent ou inhibent ce processus de fusion et syncytialisation (Tableau 1.1). Par contre, une altération du taux d'apoptose et de la synthèse/sécrétion d'hormones entraîne une perturbation de l'homéostasie du STB. En fait, ce phénomène est impliqué dans plusieurs complications de la grossesse comme les fausses couches, le retard de croissance intra-utérin (RCUI), les accouchements prématurés, la prééclampsie (PE) et les maladies trophoblastiques gestationnelles (Evain-Brion, 2001, Jauniaux *et al.*, 2010, John *et al.*, 2012, Norwitz, 2006).

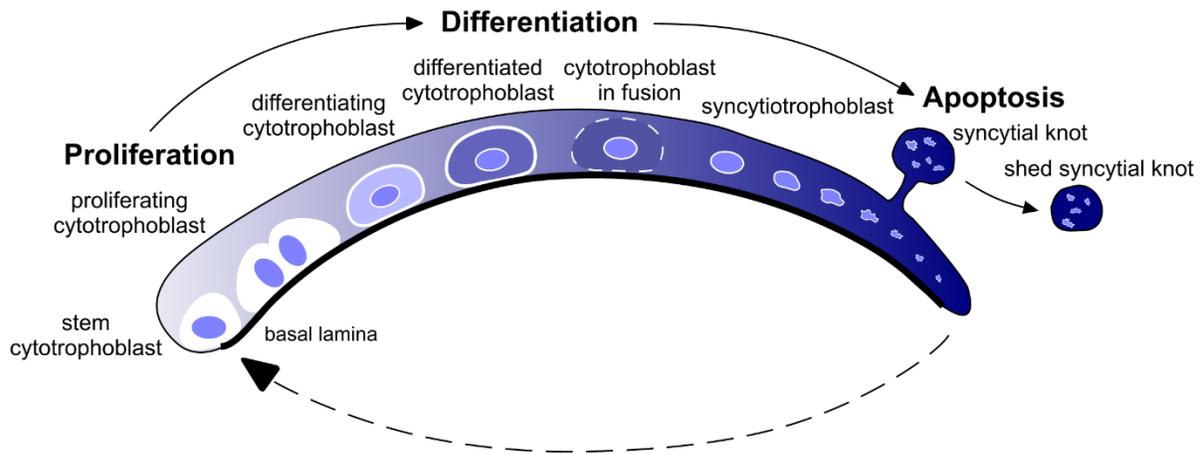


Figure 1.4: Renouvellement du trophoblaste villos. Le trophoblaste villos est formé des cytotrophoblastes souches prolifératives qui sortent du cycle cellulaire et se différencient en cytotrophoblaste villos. Les cytotrophoblastes villos mononucléés fusionnent et se différencient en un syncytium, le syncytiotrophoblaste. La dégénérescence du syncytiotrophoblaste se produit par apoptose pour permettre sa régénération et donc le maintien de l'homéostasie du trophoblaste villos. Tirée de (Lanoix *et al.*, 2012c).

Tableau 1.1 : Principaux facteurs modulant la fusion des cytotrophoblastes vilieux et la formation du syncytiotrophoblaste. Les facteurs inhibant la fusion sont exprimés avec (-) ; les facteurs induisant ce processus sont exprimés avec (+). PT : premier Trimestre ; TT : Troisième trimestre ; B : cellules BeWo. Adapté de (Gaster *et al.*, 2009).

| Facteur | Description | (-) (+) | Type cellulaire | Action | Référence |
|---------------|----------------------------|---------|-----------------|-----------------------|--------------------------------------|
| TGF- α | Facteur de croissance | + | TT | Biochimique | (Yang <i>et al.</i> , 2003) |
| CSF | Facteur de croissance | + | TT | Biochimique | (Garcia-Lloret <i>et al.</i> , 1994) |
| EGF | Facteur de croissance | + | TT | Biochimique | (Morrish <i>et al.</i> , 1987) |
| VEGF | Facteur de croissance | + | FT, TT | Biochimique | (Crocker <i>et al.</i> , 2001b) |
| PKA | Protéine kinase | + | B, TT | Fusion | (Knerr <i>et al.</i> , 2005) |
| ERK1/2 | Protéine kinase | + | TT | Biochimique et fusion | (Vaillancourt <i>et al.</i> , 2009) |
| p38 | Protéine kinase | + | TT | Fusion | (Vaillancourt <i>et al.</i> , 2009) |
| Syncytin 1 | Protéine membranaire | + | TT, B | Fusion | (Frendo <i>et al.</i> , 2003b) |
| Connexin 43 | Protéine membranaire | + | TT | Fusion | (Frendo <i>et al.</i> , 2003a) |
| Galectin 3 | Protéine membranaire | + | B | Fusion | (Dalton <i>et al.</i> , 2007) |
| TNF | Cytokine | - | TT | Biochimique | (Leisser <i>et al.</i> , 2006) |
| hCG | Hormone | + | TT | Biochimique | (Shi <i>et al.</i> , 1993) |
| CD98 | Transporteur d'acide aminé | + | B | Fusion | (Kudo <i>et al.</i> , 2003) |
| Calcium | Ion | + | TT, B | Fusion | (Eliane Alsat <i>et al.</i> , 1996) |

1.1.5 Stress oxydatif et trophoblaste

Le stress oxydatif est un élément clé dans l'homéostasie du trophoblaste. Dans une grossesse normale, le stress oxydatif joue un rôle important dans les étapes d'implantation ainsi que dans le développement du placenta. Une augmentation des taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une diminution des antioxydants au début de la grossesse ont été observées. En effet, au début de son développement le placenta est dans un environnement pauvre en oxygène, c.-à-d. hypoxie. La différence de pression en oxygène est plus élevée dans l'artère spiralée que dans le lit placentaire, induisant un stress oxydatif. Ce phénomène permet, à la fois, la différenciation des evCTB en cellule endothéliale et l'invasion des artères spiralées

par les evCTB (Rodesch *et al.*, 1992). Suite au remodelage, le flux sanguin plus fort, augmente le taux en oxygène (40 – 60 mmHg) dans la chambre intervillieuse, permettant le bon déroulement de la grossesse. Dans certaines complications de la grossesse telles que la prééclampsie (PE), il y a une augmentation importante du stress oxydatif qui entraîne un défaut de perfusion et une perturbation dans l'homéostasie du trophoblaste villositaire (Fig.1.5) (Roberts *et al.*, 1999).

1.1.6 Prééclampsie (PE)

La prééclampsie est une maladie multi-systémique spécifique à l'espèce humaine. La Société des obstétriciens gynécologues du Canada (SOGC) définit la prééclampsie comme hypertension gestationnelle qui se développe durant la grossesse (après la 20^e semaines) ou en période post-partum, associée avec protéinurie et/ou dysfonctionnement typique des organes cibles (Magee *et al.*, 2014). Selon les nouvelles directives de l'ACOG (2013), le diagnostic de la prééclampsie ne requiert plus la présence de protéine dans les urines (protéinurie). Des études montrent que des altérations rénales ou au foie peuvent survenir même dans présence de protéinurie, et que la quantité de protéine dans les urines ne prédit pas la sévérité et la progression de la prééclampsie (ACOG's guidelines, 2013). Le diagnostic clinique de la PE se caractérise par une tension artérielle systolique (TAS) ≥ 140 mm Hg et/ou une tension artérielle diastolique (TAD) ≥ 90 mm Hg à deux reprises et à au moins 15 minutes d'intervalle associée à une protéinurie ≥ 300 mg dans une collecte de 24 heures ou une bandelette réactive urinaire $\geq 1+$, apparue après 20 semaines de gestation. La prééclampsie se définit selon le degré de sévérité prééclampsie légère/modérée ou prééclampsie sévère (ou grave) (Magee *et al.*, 2014). Elle peut évoluer vers une éclampsie qui est un état convulsif paroxystique pouvant entraîner la mort chez la mère et le fœtus (ACOG, 2002). Il a été observé une plus grande prévalence de la PE chez les femmes qui présentent de l'hypertension chronique, du diabète, de l'obésité, une grossesse multiple, de la thrombophilie pré-gestationnelle et une PE antérieure (Hernandez-Diaz *et al.*, 2009, Howarth *et al.*, 2007, Kupferminc, 2003, Sibai, 2002). De plus, il a été montré qu'il y a un plus grand risque de développer la pathologie lors de la première grossesse (Chen *et al.*, 2009, Skjaerven *et al.*, 2002). Actuellement, le seul traitement définitif de la PE est la délivrance complète du placenta (Coppage *et al.*, 2002). Il est suggéré que la cause de la PE précoce ou sévère est une mauvaise implantation du placenta, due à un défaut d'invasion et de remodelage des artères spiralées maternelles par les evCTB (Brosens *et al.*, 1972). De ce fait, les vaisseaux restent de

petites tailles, contractiles et de haute résistance (Fig.1.5). En effet, cette invasion partielle du segment de la décidue et du myomètre entraîne une diminution du flux sanguin dans la chambre intervillieuse, induisant une hypoxie chronique (Harrington *et al.*, 1997, Papageorgiou *et al.*, 2002). Or, ce manque d'oxygène a pour conséquence d'augmenter le stress oxydatif placentaire et l'apoptose, perturbant ainsi l'hémostasie du STB (Burton *et al.*, 2001). En effet, il a été observé dans des cas de PE une augmentation des taux de facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), de 8-isoprostane, de radicaux superoxydes, de protéine carbonylée, de lipide peroxydé, de résidus de nitrotyrosine et d'ADN oxydé qui sont des biomarqueurs du stress oxydatif placentaire (Burton *et al.*, 2009, Myatt *et al.*, 2004). L'apparition des signes cliniques est le résultat d'un stress inflammatoire systémique suite à un relâchement de cytokines, de facteurs pro-inflammatoires et de facteurs placentaires libérés lors de l'apoptose du STB (Cindrova-Davies, 2009). L'ensemble de ces résultats montrent que le placenta et les trophoblastes sont des éléments clés impliqués dans cette maladie de la grossesse.

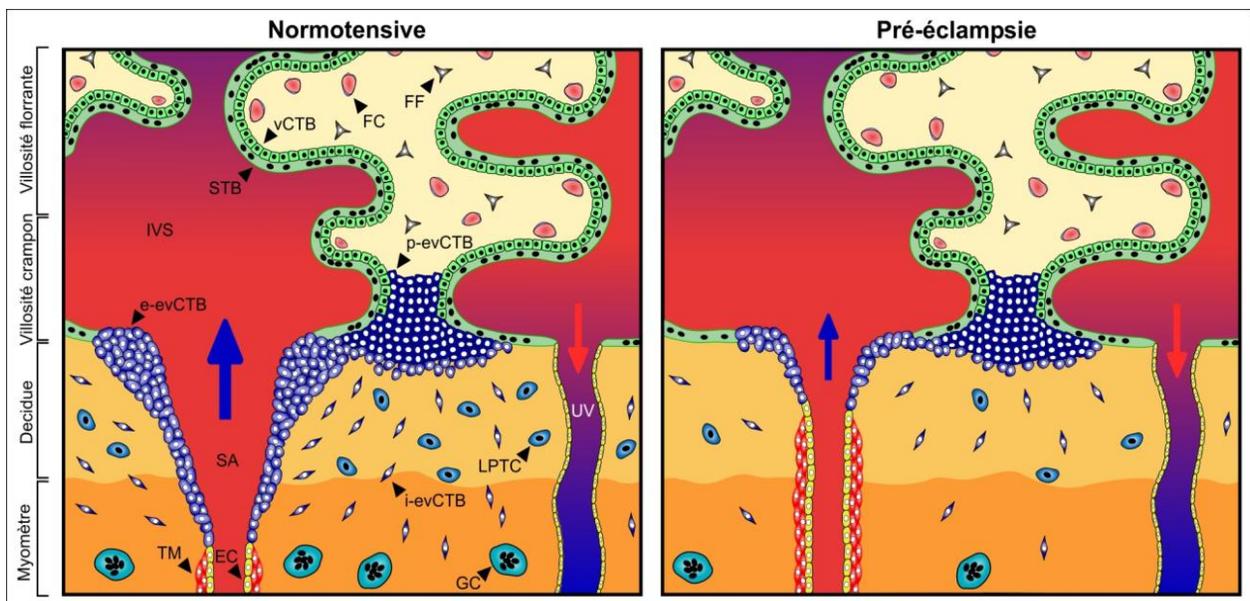


Figure 1.5: Différence entre l'implantation placentaire dans une grossesse normale et dans une grossesse compliquée par la prééclampsie. Dans un développement normal du placenta, les evCTB envahissent les artères spiralées maternelles et les modifient pour transformer des vaisseaux résistants de petite taille en vaisseaux de grande taille afin de permettre une perfusion adéquate du placenta et le bon développement du fœtus. Durant la phase d'invasion, les evCTB se différencient d'un phénotype épithélial en phénotype endothélial. Dans le cas d'une prééclampsie, les evCTB ne sont pas capables de se différencier en phénotype endothélial. Ainsi la modélisation est altérée, les artères spiralées maternelles restent résistantes et de petites tailles entraînant une ischémie/reperfusion dans la chambre intervillieuse. e-evCTB (cytotrophoblaste extravilloux endovasculaire), FC : capillaire fœtal ; FF : fibroblaste fœtal ; GC : cellule géante ; LPTC : grande cellule polygonale trophoblastique ; i-evCTB (cytotrophoblaste extravilloux invasif), p-evCTB (cytotrophoblaste extravilloux prolifératif) ; SA : artère spiralée utérine ; TM : tunique musculaire ; UV : veine utérine. Modifiée de (Lanoix, Haché et al. 2012).

1.1.7 Hypoxie/réoxygénation (H/R)

Récemment, des études ont suggéré que ce ne serait pas un environnement chroniquement hypoxique qui induirait des dommages oxydatifs et l'apoptose au niveau du trophoblaste, mais plutôt un état d'hypoxie suivie d'une réoxygénation (Hung *et al.*, 2006). Des études de cohortes de femmes enceintes vivant en haute altitude, où l'apport en oxygène est pauvre dans l'atmosphère, ne présentaient pas de stress oxydatif (Espinoza *et al.*, 2001, Reshetnikova *et al.*, 1994). Ces observations suggèrent une tolérance du placenta face à un faible taux d'oxygène. Du fait de l'invasion partielle du segment artérielle de la décidue et du myomètre, il a été proposé que le placenta serait perfusé de manière pulsative avec un taux en oxygène oscillant conduisant à un état d'ischémie-reperfusion (Jauniaux *et al.*, 1994, Jauniaux *et al.*, 2000). En effet, *in vitro* l'hypoxie/réoxygénation (H/R) augmente le stress oxydatif et active l'apoptose dans des explants placentaires de premier trimestre tandis qu'un état hypoxique induit la nécrose (Hung *et al.*, 2001, Hung *et al.*, 2002). De plus, il a été observé une augmentation d'espèces réactives de l'azote (RNS) et des ROS ainsi qu'une activation d'apoptose dans des primocultures de trophoblaste villoses provenant de grossesses prééclampsiques (Hung *et al.*, 2002, Y. Wang *et al.*, 2001).

1.1.8 Stress oxydatif, apoptose et inflammation placentaire

L'équipe de la Pre Vaillancourt a développé un modèle *in vitro* de traitement des vCTB en H/R afin de mimer la PE. Brièvement, les vCTB sont placés 72 h en condition de normoxie (87% N₂ ; 5% CO₂ ; 8% O₂). Cette concentration en O₂ correspond à la pression présente dans l'espace intervilloux *in vivo* à partir de la 12^e semaine de gestation jusqu'à terme (Schneider, 2011). Par la suite, les trophoblastes sont exposés pendant 4 h à l'hypoxie (94,5 N₂ ; 5% CO₂ ; 0,5% O₂) suivi d'une normoxie pendant 18 h, mimant ainsi une perfusion par intermittence (Fig.1.6). La concentration 0,5% en O₂ pour l'hypoxie a été choisie car elle induit l'apoptose mitochondriale (Cindrova-Davies *et al.*, 2007a). Ainsi, le traitement de primocultures de STB en H/R a montré une induction de l'apoptose intrinsèque par une augmentation du ratio Bax/Bcl2 et l'activation des caspases 9 et 3. De plus, l'activation de la caspase 3 entraîne une augmentation du clivage des protéines ROCK1 (*Rho-associated coiled-coil protein kinase 1*) et PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*) qui contribue à induire l'apoptose par l'inhibition de la réparation de l'ADN (Lanoix *et al.*, 2013). L'H/R induit l'augmentation de p38, SAPK/JNK (*stress-activated protein kinases/Jun amino-terminal kinases*), NFκB (*nuclear factor-kappaB*) et HIF-1α (*hypoxia*

inducible facteur-1 alpha) dans des explants de trophoblaste villos et des cultures primaires de STB, activant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et l'apoptose (Cindrova-Davies, 2009, Cindrova-Davies *et al.*, 2007b, Jung *et al.*, 2003, Lanoix *et al.*, 2013, Shin *et al.*, 2009). De plus, une augmentation de p38 et NFκB dans des placentas issus de grossesses de PE par rapport à ceux issus de grossesses normotensives a également été observée (Aban *et al.*, 2004, Shin *et al.*, 2009). L'H/R active donc les voies de signalisation de l'apoptose et de l'inflammation qui perturbent l'homéostasie des trophoblastes. Récemment, des études ont montré qu'il y a un lien entre le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique, chacun étant capable de se réguler mutuellement (Bhandary *et al.*, 2013, Burton *et al.*, 2011, Cullinan *et al.*, 2006, Dixon *et al.*, 2008, Ron *et al.*, 2007, K. Zhang *et al.*, 2008).

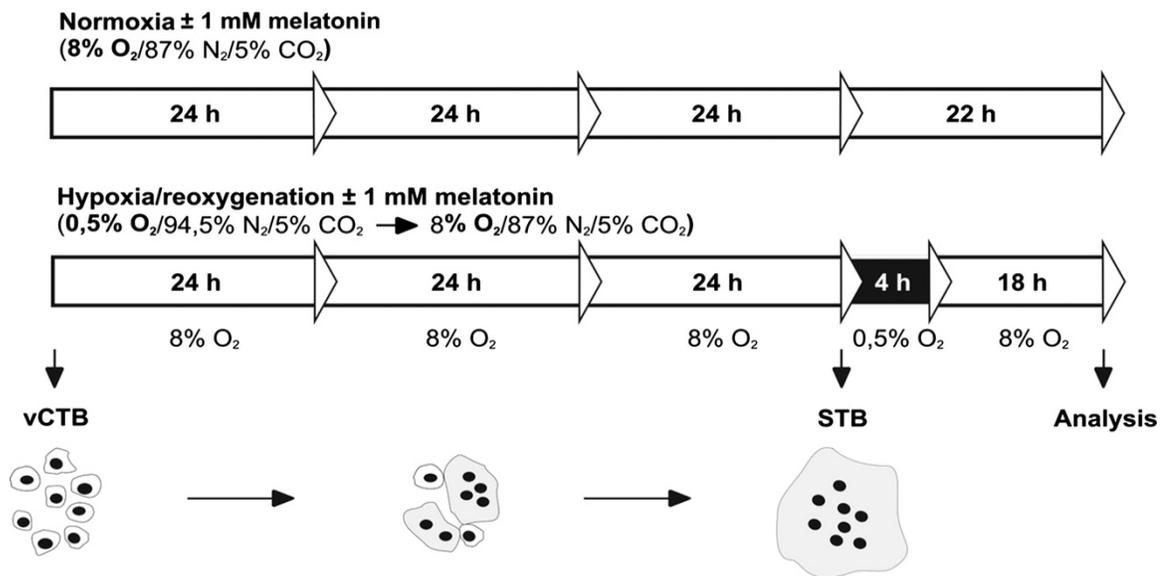


Figure 1.6: Modèle d'hypoxie et réoxygénation pour des cultures primaires de cytotrophoblastes villos. Les cellules sont cultivées sous normoxie (8% O₂) pour stimuler leur différenciation en syncytiotrophoblaste. Les cellules sont ensuite maintenues pendant 22 h sous normoxie ou soumises à l'hypoxie (0.5% O₂) pendant 4h suivi d'une réoxygénation durant 18h. Modifié de (Lanoix *et al.*, 2013)

1.1.9 Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle dans le stockage du calcium (Ca²⁺) ainsi que dans la traduction, le repliement et les modifications post-traductionnelles des protéines. Récemment, il a été montré que cet organe est aussi impliqué dans la prolifération et la mort cellulaire (Burton *et al.*, 2011). Le repliement de certaines protéines sous leur forme finale

nécessite la création de ponts disulfure entre les cystéines de chaînes latérales par l'enzyme disulfure isomérase (PDI). Pour former les ponts disulfures, la protéine PDI oxydée se lie à la chaîne peptidique via ses domaines thiorédoxydes. Un pont intermoléculaire peut donc être formé entre les cystéines catalytiques de la PDI et une cystéine réduite du substrat. Une réaction d'échange de thiol-disulfure prend alors place, permettant la formation d'un pont disulfure sur le substrat et réduisant la PDI. Les cystéines de PDI réduites sont réoxydées par transfère d'électron sur une partie de la cystéine de transfère du domaine C-terminale de la protéine ERO1 (*ER oxidore-ductine 1*). Ces électrons sont ensuite transmis à la cystéine N-terminale puis au cofacteur FAD (*flavin-adenine dinucleotide*) réduit en FADH₂. Enfin, FADH₂ est réoxydé en FAD par transfère de des électrons sur une molécule d'O₂, générant du H₂O₂ (Bulleid, 2012, Papp *et al.*, 2005). La réduction de l'O₂ pourrait également ne pas se faire, entraînant la production de ROS et une mauvaise maturation des protéines (Bulleid, 2012, Papp *et al.*, 2005, Tu *et al.*, 2004).

Dans le cas où les fonctions du RE sont perturbées, il y a une accumulation de protéines qui dépasse la capacité de repliement du RE. Ceci entraîne une accumulation de protéines mal repliées et il en résulte une activation de la voie de la réponse aux protéines mal repliées (*unfolded protein response*, UPR). Cette réponse UPR permet de rétablir l'homéostasie en diminuant la traduction des protéines, produisant plus de chaperonne et en retirant et dégradant les protéines mal repliées du RE. Dans le cas où l'homéostasie ne peut être rétablie, la cellule meurt par apoptose.

1.1.10 La voie *unfolded protein response* (UPR)

La voie UPR induit la libération de trois protéines présentes dans la membrane du RE. La première protéine PERK (Ser/Thr, *PKR-like ER kinase* ou eIF2AK3), se dissocie de la protéine chaperonne GRP78/BIP/HSP5A (GRP78 se lie avec une grande affinité aux protéines mal repliées), s'homodimérise et s'autophosphoryle pour activer son domaine kinase. PERK activée, phosphoryle la sous-unité du complexe eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 α*) qui entraîne son inactivation. Par conséquent, la synthèse et l'accumulation de nouvelles protéines dans le lumen du RE sont bloquées (Dever, 2002). De plus, la transcription de la protéine ATF4 (*activating transcription factor 4* ou CREB2) est activée et cette dernière est transloquée au noyau afin d'induire les gènes codant pour le métabolisme des acides aminés, la réponse antioxydante, l'arrêt de la croissance, la protéine CHOP (*C/EBP homologous protein* ou DDTI3 ou GADD153) et la protéine GADD34 (Suh *et al.*, 2012). GADD34 induit un

rétrocontrôle négatif sur l'inhibition de la synthèse de protéines par la déphosphorylation de p-eIF2 α si l'homéostasie est rétablie (Dever, 2002). ATF4 peut aussi induire les gènes de l'autophagie (B'Chir *et al.*, 2013) (Fig.1.7). De plus, PERK peut phosphoryler le NRF2 (*nuclear erythroid 2 p45-related factor 2* ou NFE2L2) ce qui entraîne sa dissociation de *keap1* et active les gènes possédant un élément de réponse antioxydante (ARE) et permet l'expression du HO-1 (*heme oxygenase 1*) qui a un effet antioxydant (Cullinan *et al.*, 2004).

La deuxième protéine IRE1 α (*inositol-requiring transmembrane linase /endonuclease 1 α* ou ERN1) se dissocie de GRP78 puis s'homodimérise et induit son activité kinase (Tirasophon *et al.*, 1998). L'autophosphorylation d'IRE1 α stimule son domaine endonucléase pour cliver l'ARNm qui code le facteur de transcription XBP1 (Yoshida *et al.*, 2001). XBP1 clivé (sXBP1) est transloqué dans le noyau et joue un rôle clé dans l'induction de différents gènes de l'UPR, incluant les gènes codant les différentes protéines chaperonnes présentes dans le lumen du RE et le système ERAD (*ER-associated degradation*) (Ann-Hwee Lee *et al.*, 2003a). La machinerie ERAD permet de transporter les protéines mal repliées dans le cytoplasme afin d'être ubiquitinées et dégradées par le protéasome (Ahner *et al.*, 2004, Hampton, 2002). De plus, le domaine kinase de IRE1 α peut former un complexe avec la protéine TRAF2 (*tumor necrosis factor-2*) et ASK1 (*apoptosis – regulating kinase 1* ou MAP3K5). Ceci entraîne la phosphorylation des protéines en aval SAPK/JNK et p38 MAPK qui induisent l'apoptose (Ron *et al.*, 2008). En effet, p-JNK induit l'apoptose en inhibant Bcl2 et activant Bim. (Lei *et al.*, 2003). JNK phosphorylée peut aussi activer la protéine activatrice 1 (AP-1) qui est un facteur de transcription qui induit les gènes pro-inflammatoires (Davis, 2000). La phosphorylation de p38 MAPK induit l'expression de CHOP qui augmente l'expression de Bim et du DR5 (*death receptor 5*) et une diminution de Bcl2 (Puthalakath *et al.*, 2007, Yamaguchi *et al.*, 2004). IRE1 α active aussi la voie de NF κ B. En effet, le complexe IRE1 α /TRAF2 active IKK (*I κ B kinase*) qui permet la dégradation du I κ B (*inhibitor of kappa B*). Cette dégradation entraîne la libération de NF κ B qui transloque au noyau et induit les gènes pro-inflammatoires (Hu *et al.*, 2006, Urano *et al.*, 2000) (Fig.1.7).

La troisième protéine ATF6 (*activated transcription factor 6*) se dissocie de GRP78/BIP et est transloquée dans l'appareil de Golgi où elle est hydrolysée par les S1P (*site-1 protein* ou MBTPS1) et S2P (*site-2 protease* ou MBTPS2) Ainsi, la forme active de ATF6 migre dans le noyau et régule la transcription des gènes contenant les ERSE-1 (*ER stress-reponse elements*) codant pour les protéines chaperonne (GRP78 et GRP94), XBP1 (*X box-binding protein 1*) et PDI afin de faciliter le repliement, la sécrétion et la dégradation des protéines dans le RE (A. H.

Lee *et al.*, 2003b). ATF6 peut aussi induire l'expression de CHOP (M. Li *et al.*, 2000). Cette voie de signalisation induit l'augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes (Fig.1.7).

Si l'homéostasie ne peut être rétablie, la réponse UPR initie l'apoptose par l'activation des caspases 12 et 4 présentes dans la membrane du RE (Hitomi *et al.*, 2004). Ces caspases sont capables d'activer directement la caspase 9 indépendamment de l'Apf1 et du cytochrome C de la mitochondrie (Rao *et al.*, 2004). De plus, la protéine CHOP induit par la voie PERK et ATF6, active l'apoptose, par une inhibition du gène codant Bcl2 et une augmentation de Bim (McCullough *et al.*, 2001) (Fig.1.7). CHOP induit aussi ERO1 qui active IP₃R (*inositol 1,4,5 trisphosphate receptor*) et entraîne la libération de Ca²⁺ dans la mitochondrie, il en résulte la mort par apoptose (G. Li *et al.*, 2009)

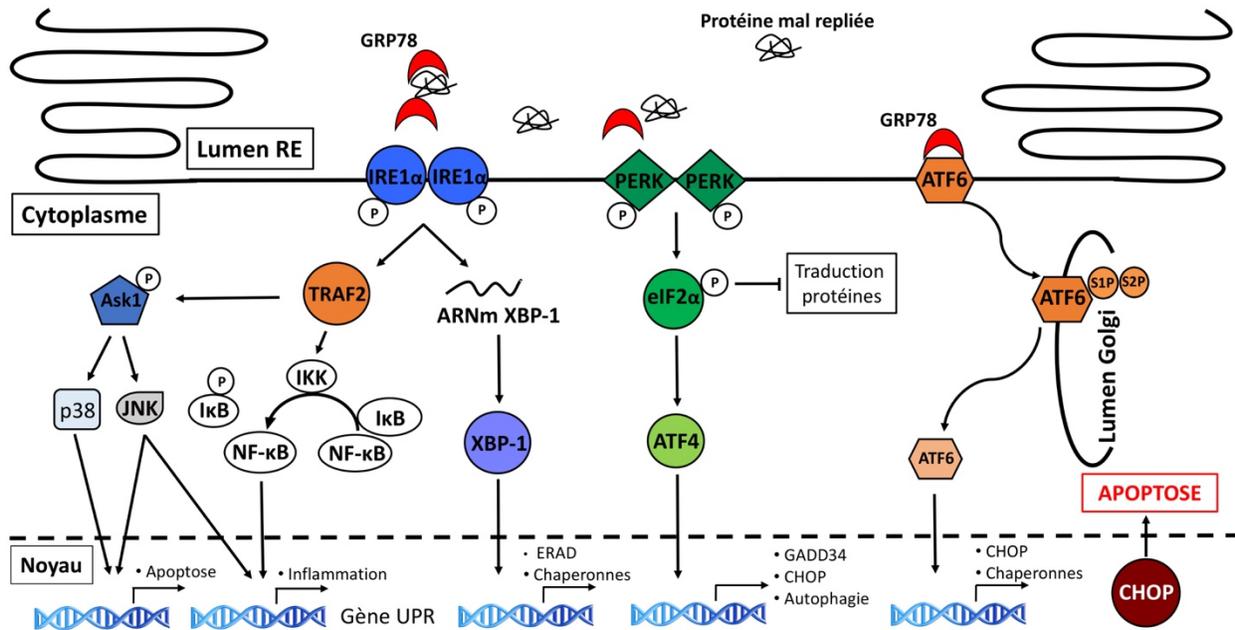


Figure 1.7: Voie de signalisation de l'unfolded protein response (UPR). L'activation de l'UPR suite à l'accumulation de protéine mal repliée dans le lumen du Reticulum endoplasmique (RE), entraîne l'activation des protéines situées dans la membrane du RE : PERK, IRE1 α et ATF6. En condition normale, PERK, IRE1 α et ATF6 sont liées à la protéine chaperonne GRP78, qui inhibe leurs activités. Lors du stress du RE, GRP78 se dissocie de PERK, IRE1 α et ATF6 ce qui mène à leurs activations. PERK s'autoactive, se dimérise et phosphoryle eIF2 α . P-eIF2 α inhibe la traduction des protéines et active ATF4 qui se transloque dans le noyau afin d'activer les gènes de l'UPR, incluant la transcription de la protéine GADD34 (déphosphoryle eIF2 α) et CHOP (induit l'apoptose). ATF4 induit également les gènes de l'autophagie. En réponse au stress du RE, IRE1 α s'autoactive et active son domaine endonucléase qui mène au clivage de l'ARNm XBP1. L'ARNm XBP1 est traduit et la protéine est transloquée dans le noyau afin d'induire la transcription de protéines chaperonnes et du système ERAD. Le système ERAD permet la dégradation de protéines mal repliées dans le RE afin de rétablir l'hémostasie du RE. IRE1 α peut activer TRAF2 qui phosphoryle Ask1. Ask1 active p38 MAPK qui se transloque dans le noyau afin d'induire JNK qui est transloquée dans le noyau et active les gènes d'apoptose et d'inflammation (via AP-1). Le complexe IRE1/TRAF2 induit IKK qui phosphoryle I κ B ce qui induit sa dégradation et active NF κ B. Ce dernier est transloqué dans le noyau et induit les gènes d'inflammation. ATF6 est un facteur de transcription qui est

transloquée à la membrane de l'appareil de Golgi où il subit un clivage par les protéases S1P et S2P afin de libérer son domaine kinase. Ce facteur de transcription transloque au noyau et induit les gènes de protéines chaperonnes et CHOP. UPR : *unfolded protein response* ; PERK : *protein kinase R (PKR)-like kinase* ; IRE1 : inositol-requiring enzyme 1 ; ATF6 : *activating transcription factor 6* ; eIF2 α : *eukaryotic translation initiation factor- α* ; CHOP : *C/EBP-homologous protein* ; XBP1 : *X-box-binding protein 1* ; S1P : *site 1 protease* ; S2P : *site 2 protease* ; TRAF2 : *tumor necrosis factor-2* ; ASK1 : *apoptosis – regulating kinase 1* ; JNK : *c-Jun N-terminal kinase* ; IKK : *I κ B kinase NF κ B : nuclear factor-kappa B* ; I κ B : *inhibitor of kappa B* (Todd et al., 2008).

Le stress du RE est impliqué dans différentes pathologies telles que le diabète, les maladies vasculaires cérébraux, les maladies neurodégénératives (ex. : Alzheimer, Parkinson), la fibrose pulmonaire, les infections virales, les maladies inflammatoires, les cancers, les maladies cardiaques, la RCIU et la PE (Kim *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2008, Oakes *et al.*, 2015). Un stress du RE a été observé par une augmentation d'expression de GRP78, p-IRE1, XBP1, p-38, eIF2 α , CHOP et caspase 12 chez des femmes qui présentent une PE précoce comparativement aux femmes normotensives (Burton *et al.*, 2011, Fu *et al.*, 2015, H. W. Yung *et al.*, 2014). Ceci est d'ailleurs supporté par une étude démontrant une augmentation de p-eIF2 α et CHOP dans les placenta de grossesse avec RCIU associée à une PE comparativement à des grossesses RCIU seules ou des grossesses normales (Burton *et al.*, 2011). De plus, le traitement des cellules BeWo en hypoxie/réoxygénation (1/20% O₂) a montré une induction de p-eIF2 α , ATF6, p-IRE1 et GRP78 (Yung *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats montrent l'implication du stress du RE dans la physiopathologie de la PE.

1.2 Mélatonine

1.2.1 Rôle

La mélatonine est une indolamine impliquée dans la régulation du cycle circadien et un puissant antioxydant contre les effets délétères des ROS et des RNS (Wakatsuki *et al.*, 2001). Elle est principalement sécrétée par la glande pinéale, mais aussi produite par la peau, la rétine, le tractus gastro-intestinal, les lymphocytes, les plaquettes, la moelle osseuse, les ovaires, les testicules, le fluide amniotique et le placenta (Bubenik, 2002, Champier *et al.*, 1997, Conti *et al.*, 2000, Lanoix *et al.*, 2008, A. Slominski *et al.*, 2008, Tijmes *et al.*, 1996, Tosini *et al.*, 1998). Elle joue un rôle important dans la maturation sexuelle, la régulation de la reproduction chez les animaux et protège les gamètes du stress oxydatif (Hoffman *et al.*, 1965, Lincoln *et al.*, 1980, Reiter *et al.*, 2009b). La mélatonine est impliquée dans l'inhibition de cancers, la physiologie de la rétine et les fonctions du système immunitaire (Bonilla *et al.*, 2004, Carrillo-

Vico *et al.*, 2005, Mediavilla *et al.*, 2010, Rosenstein *et al.*, 2010). De plus, elle régule différents processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, l'invasion et l'apoptose (Cos *et al.*, 1998, Sainz *et al.*, 2003). L'action de la mélatonine peut être récepteur-dépendant ou -indépendant (Nosjean *et al.*, 2001). Elle est synthétisée à partir de l'acide aminé essentiel L-tryptophane, qui est converti en sérotonine, et par la suite transformé en mélatonine par l'aralkylamine N-acétyltransférase (AANAT) suivie de l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT ou ASMT, acétylsérotonine-O-méthyltransférase) (Wurtman *et al.*, 1965). Il a été montré dans notre laboratoire que l'AANAT et la HIOMT sont exprimées dans le trophoblaste placentaire humain et les lignées cellulaires de choriocarcinomes placentaires, BeWo et JEG-3 (Lanoix *et al.*, 2008).

1.2.2 Récepteurs à mélatonine

Les récepteurs de la mélatonine, MT1 et MT2, sont des protéines à sept domaines transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). La mélatonine est aussi capable de se lier à d'autres protéines intracellulaires : le récepteur ROR/RZR (*retinoid orphan receptor et retinoid Z receptor*), la quinone réductase 2 (MT3) et la calmoduline (Reiter *et al.*, 2010).

Les récepteurs MT1 et MT2 sont retrouvés dans le système nerveux et en périphérie (lymphocyte, plaquette, cellule de granulosa, rein fœtal, artère coronaire, myomètre et adipocyte) (Dubocovich *et al.*, 2005). De plus, notre laboratoire a démontré la présence des récepteurs MT1, MT2 et ROR α dans les cellules BeWo et JEG-3 ainsi que dans les tissus placentaires et le trophoblaste villositaire isolés à partir de placenta à terme (Lanoix *et al.*, 2006). De nombreuses études ont démontré que la stimulation des récepteurs MT1 et MT2 active différentes voies de signalisation dépendamment de la cellule et du tissu, telles que AMPc/PKA, PLC, PLA₂, ERK 1/2 et les canaux K⁺ et Ca²⁺ (del Rio *et al.*, 2004, Luchetti *et al.*, 2010, Tan *et al.*, 2013).

1.2.3 Mélatonine et grossesse

Chez les femmes enceintes la mélatonine plasmatique augmente tout au long de la grossesse jusqu'à atteindre un pic lors de la parturition. Les femmes enceintes ont un taux de mélatonine (diurne et nocturne) plus élevé que les femmes non enceintes (Kivelä, 1991, Ogasawara *et al.*, 1991). Or, il a été suggéré que cette augmentation de mélatonine chez les

femmes enceintes pourrait venir du placenta (Nakamura *et al.*, 2001, Tamura *et al.*, 2008a, Tamura *et al.*, 2008b). Une étude a montré la présence d'ARNm des enzymes de synthèse de la mélatonine, AANAT et HIOMT, dans des placentas issus de grossesses de premier trimestre (Iwasaki *et al.*, 2005). Ces résultats ont été confirmés par notre laboratoire qui a démontré l'expression des enzymes et des récepteurs, MT1, MT2, ROR α de la mélatonine dans les placentas humains tout au long de la grossesse (Lanoix *et al.*, 2008, Soliman *et al.*, 2015). La mélatonine traverse facilement la barrière placentaire pour se retrouver dans la circulation fœtale (Okatani *et al.*, 1998). De plus, la concentration de mélatonine est plus élevée dans le cordon ombilical que dans le sang maternel (Mitchell *et al.*, 1979). Chez le fœtus humain, à partir de la 18^e semaine, la présence des récepteurs MT1 et MT2 dans le cerveau, rein, foie et rétine ont été démontrées (Niles *et al.*, 2004). De même que la présence de MT1 dans les cellules souches neuronales, ceci suggère que la mélatonine aurait un effet sur le développement neuronal (Niles *et al.*, 2004). De plus, la mélatonine joue un rôle important dans la croissance et la maturation sexuelle fœtale (Bishnupuri *et al.*, 1999, Bishnupuri *et al.*, 2000, Bishnupuri *et al.*, 2001). La présence de la mélatonine, ses récepteurs et des enzymes de synthèse dans le placenta et le fœtus suggèrent que la mélatonine a un rôle dans le développement du fœtus et le maintien de la grossesse.

1.2.4 Mélatonine et grossesses pathologiques

Le taux de mélatonine plasmatique maternel est diminué dans des cas de PE et de RCUI comparativement aux grossesses normales (Nakamura *et al.*, 2001). Kennaway et collaborateurs ont observé une diminution des taux urinaires de 6-sulfatoxymélatonines (métabolite de la mélatonine) chez les enfants nés de grossesse prééclampsique et une baisse plus importante dans le cas de RCIU (Kennaway *et al.*, 2001). De plus, notre laboratoire a montré que la PE est associée à une réduction d'activité et d'expression de ANAAT et des récepteurs MT1 et MT2 ainsi que de la concentration en mélatonine dans le tissu placentaire (Lanoix *et al.*, 2012a). Une réduction de l'expression de l'enzyme tryptophane hydrolase (TPH) (premier enzyme dans la voie de la synthèse de mélatonine) a aussi été montrée (Yamamoto Dde *et al.*, 2013). *In vitro*, la mélatonine protège de l'apoptose et du stress oxydatif induit par une H/R dans les STB humain (Lanoix *et al.*, 2013). Ces observations suggèrent que la mélatonine pourrait être un traitement de la PE. Récemment, Hobson et collaborateurs ont publié le protocole d'un essai clinique de phase 1 pour vérifier si l'administration de 10 mg de

mélatonine trois fois par jour retarde l'accouchement après un diagnostic de PE (Hobson *et al.*, 2013). Les résultats n'ont pas encore été publiés.

1.2.5 Effet antioxydant de la mélatonine (Fig.1.9)

La mélatonine est un puissant antioxydant. Son caractère lipophile et hydrophile lui permet de traverser facilement les membranes des cellules et des organites ainsi que les barrières morphologiques telles que la barrière hématoencéphalique et placentaire. Elle est distribuée dans tous les compartiments subcellulaires, particulièrement dans le noyau et la mitochondrie (Luchetti *et al.*, 2010, Slominski *et al.*, 2012, Venegas *et al.*, 2012). La mélatonine a une action directe de chélateur des radicaux libres ou indirects en stimulant, via l'activation de ses récepteurs MT1 et MT2 membranaire, l'expression des enzymes antioxydants. Li et collaborateurs ont montré que l'administration de mélatonine réduit la génération d'OH• suite à une ischémie-réperfusion dans le cerveau de rat (X. J. Li *et al.*, 1997). Après avoir chélaté un OH• la mélatonine est convertie en 3-hydroxylmélatonine cyclique qui neutralise à son tour d'autres radicaux libres et il en résulte la formation de N1-acétyl-N2-formyl-5-méthoxykynuramine (AFMK) (Hardeland *et al.*, 1993). Par la suite, AFMK est convertie en N1-acétyl-5-méthoxykynuramine (AMK) (Hardeland *et al.*, 1993). Ces métabolites sont aussi de bons chélateurs de radicaux libres (Fig.1.8) (Guenther *et al.*, 2005, Ressmeyer *et al.*, 2003, Tan *et al.*, 2001). La formation de ces métabolites peut se faire de manière enzymatique par l'enzyme 2-3 indolamine dioxygénase et l'enzyme arylamine formamidase ainsi que de manière non-enzymatique, en chélatant directement les radicaux libres (Ferry *et al.*, 2005, Hardeland *et al.*, 1993). Cette cascade antioxydante fait de la mélatonine un chélateur efficace pour réduire les dommages oxydatifs (Reiter *et al.*, 2009a, Tan *et al.*, 2002) et présentant des propriétés antioxydantes supérieures à la vitamine C et E, le glutathion, la β -carotène et le sélénium (Gultekin *et al.*, 2001, Hsu *et al.*, 2000, Milczarek *et al.*, 2010, Montilla *et al.*, 2001, Tan *et al.*, 2003).

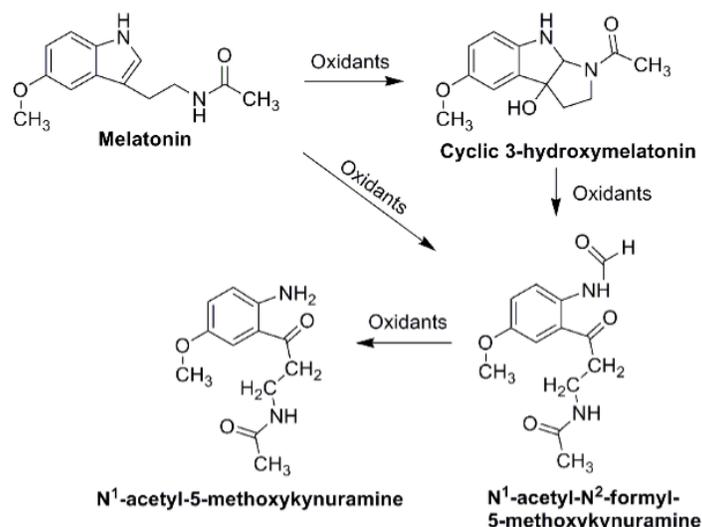


Figure 1.8: Cascade antioxydante de la mélatonine. La mélatonine neutralise un radical libre puis est convertie en 3-hydroxymélatonine cyclique et N¹-acétyl-N²-formyl-5-méthoxykynuramine (AFMK) qui à son tours chélate un radical libre et est convertie en N¹-acétyl-5-méthoxykynuramine (AMK). Modifié de (Galano *et al.*, 2013)

La mélatonine exerce aussi un effet antioxydant indirect, en inhibant les enzymes prooxydantes et en stimulant les enzymes antioxydantes. La mélatonine induit des changements dans l'expression des gènes des enzymes, mais aussi de leurs activités. L'augmentation des enzymes antioxydantes est récepteur dépendant. Choi et collaborateur ont montré une augmentation des enzymes antioxydantes (Cu-SOD, Zn-SOD et GSH-Rd) par une activation des récepteurs MT1 et MT2 suite à l'administration de mélatonine dans les fibroblastes de cornés (Choi *et al.*, 2011). En effet, la mélatonine réduit l'expression des enzymes prooxydantes, la lipoxygénase (catalyse la peroxydation des lipides) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) (Bettahi *et al.*, 1996, Brash, 1999, Hardeland, 2005, Pozo *et al.*, 1997). Une augmentation de l'activité des enzymes GSH-Px et SOD dans le cerveau, les reins, le foie de rate, des lignées cellulaires neurales et le placenta suite à l'administration de mélatonine a été démontrée (Barlow-Walden *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 2000, Mayo *et al.*, 2002, Ozturk *et al.*, 2000, Pablos *et al.*, 1995, Reiter, 1995). Il a été aussi proposé que la mélatonine pourrait d'induire l'expression des enzymes antioxydantes par la voie de signalisation NFκB. En effet, la mélatonine interagit avec la calmoduline, ce qui entraîne l'inactivation du récepteur RORα. Or, l'inhibition de RORα diminue l'expression de IκB ce qui entraîne la translocation de NFκB afin d'activer les gènes liés aux enzymes antioxydantes (Tomas-Zapico *et al.*, 2005).

Dans les cellules saines la mélatonine favorise la survie cellulaire en activant MT1 et MT2. Ceci entraîne l'inactivation de p38 et JNK et empêche l'induction de l'expression de p53 (protéine pro-apoptotique). Cette inhibition diminue le ratio Bax/Bcl2 ce qui empêche la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Par conséquent, il y a une inhibition des caspases 9 et 3, ce qui empêche l'apoptose (Das *et al.*, 2008, Das *et al.*, 2010).

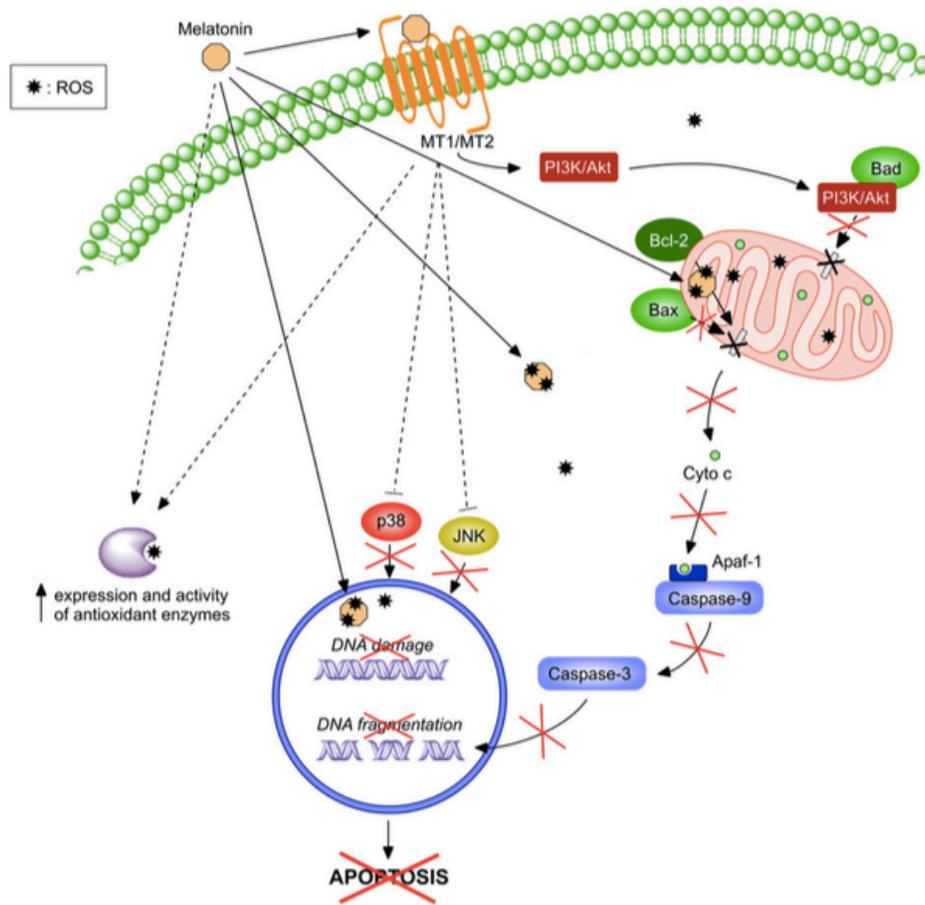


Figure 1.9: Effet antioxydant de la mélatonine de manière récepteur-dépendant et -indépendant. La mélatonine passe au travers de toutes les barrières physiologiques et neutralise les ROS dans le cytosol, la mitochondrie et le noyau. La mélatonine augmente l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes de manière récepteur-dépendant et -indépendant. L'activation des récepteurs MT1 et MT2 induit la phosphorylation d'AKT qui se lie à Bad afin d'empêcher la perméabilisation de la membrane mitochondriale. L'activation de MT1/MT2 inhibe la phosphorylation de p38 et JNK ce qui inactive p53. Il en résulte une inhibition de la voie intrinsèque de l'apoptose. APAF-1 : apoptotic protease activated factor 1 ; Bad : Bcl2 associated death promoted ; Bax : Bcl-2 associated X protein ; Bcl-2 : B-cell lymphoma 2 ; Cyto c : cytochrome c ; JNK : c-jun NH2-terminal kinases ; PI3K : phosphoinositol-3 kinase. Ligne pleine : mécanisme direct ; Ligne hachuré : mécanisme indirect. Tiré de (Lanoix *et al.*, 2012c)

1.2.6 Mélatonine et stress du RE

Le stress oxydatif contribue à l'activation de la réponse UPR (Brown *et al.*, 2010). Il a été suggéré que l'effet antioxydant de la mélatonine permettrait d'améliorer la viabilité cellulaire en modulant le stress du RE (Brown *et al.*, 2010). Par contre, peu d'études ont été réalisées sur l'effet de la mélatonine sur la modulation du stress du RE. Or, la mélatonine réduit les marqueurs du stress du RE et l'apoptose mitochondriale dans des pathologies neurologiques induit par différents inducteurs tels que la roténone, l'ischémie, la cyclosporine A, etc. (Carloni *et al.*, 2014, Goswami *et al.*, 2016, Yoo *et al.*, 2010). De même que dans la maladie de Parkinson où l'agrégation d' α -synucléine entraîne une activation de la voie UPR, la mélatonine renverse ces effets en induisant une diminution de l'expression de ATF4, CHOP, XBP1 et GRP78 (Chung *et al.*, 2013, Colla *et al.*, 2012, Holtz *et al.*, 2003). De plus, la mélatonine diminue l'expression d'ATF6, CHOP et le relâchement du cytochrome C suite à l'induction du stress du RE par l'arsénite de sodium dans le cerveau de rat (Anya MY Lin *et al.*, 2009). Ceci suggère que la mélatonine diminue l'apoptose induit par le stress du RE et la voie mitochondriale. En effet, il a été montré que la mélatonine serait capable de réduire les marqueurs du RE et aurait un effet protecteur dans différentes pathologies. Dans une insuffisance hépatique aiguë, l'apoptose hépatique induit par le stress du RE, joue un rôle important. Suite à une infection par une maladie hémorragique virale dans un modèle de lapin avec une insuffisance hépatique aiguë, une élévation de PERK, ATF6, IRE1, sXBP1, CHOP et de caspase 3 clivé a été observé dans le foie. Un traitement à la mélatonine prévient l'augmentation de ces facteurs (Tuñón *et al.*, 2013). De plus, dans le même modèle, les facteurs de l'autophagie sont augmentés et l'administration de mélatonine diminue beclin-1, p62, le complexe Atg5/12/16L1 et le ratio LC3II/LC3I (San-Miguel *et al.*, 2015). Ceci montre que la mélatonine a un effet régulateur sur le stress du RE. D'autres études ont montré l'implication de la mélatonine dans la régulation du stress du RE, du stress oxydatif, de l'autophagie et de l'apoptose. Le lipopolysaccharide (LPS) induit la mort fœtale et un RCIU chez la souris. L'administration de LPS induit le stress du RE par une augmentation de p-eIF2 α , JNK, CHOP et HO-1 (lié à l'augmentation du stress oxydatif) et une diminution du niveau de glutathion (GSH) et une augmentation des enzymes antioxydants (Hua Wang *et al.*, 2011). L'administration de mélatonine renverse tous ces effets du LPS (Hua Wang *et al.*, 2011, C Zhang *et al.*, 2007). Dans le cas d'un diabète de type 2, l'hyperglycémie entraîne un stress oxydatif et un stress du RE dans les cellules bêta du pancréas, menant aux différentes complications du diabète (Zephy *et al.*, 2015). Il a été montré que la mélatonine diminue les ROS et les protéines pro-

apoptotiques, p38 et JNK ainsi que la caspase 3, ce qui conduit à une amélioration de la viabilité des cellules insulino-résistantes INS-1 de rat (Jae-Hyung Park *et al.*, 2014). Toutes ces observations suggèrent que la mélatonine pourrait être un bon traitement thérapeutique pour réguler le stress oxydatif, le stress du RE, l'autophagie et l'apoptose dans le placenta.

CHAPITRE 2 : HYPOTHESE ET OBJECTIFS

La PE précoce ou sévère est une pathologie de la grossesse associée à un défaut de remodelage des artères spiralées maternelles, qui entraîne une perfusion pulsatile avec un taux en oxygène oscillant, conduisant à un état d'ischémie/reperfusion au niveau de la chambre intervillieuse (Jauniaux *et al.*, 1994, Jauniaux *et al.*, 2000). Ceci entraîne un stress oxydatif et l'apoptose au niveau des vCTB et du STB (Burton *et al.*, 2001). L'apparition des signes cliniques de la PE est le résultat d'un stress inflammatoire systémique suite à une libération de cytokines pro-oxydantes, de facteurs pro-inflammatoires et de facteurs placentaires libérés lors de la mort des STB (Cindrova-Davies, 2009). Il a été montré que le stress du RE pourrait être impliqué dans l'augmentation d'apoptose du STB observé dans la PE (Burton *et al.*, 2011). La mélatonine est une hormone à large spectre d'activité biologique. En effet, elle possède une puissante action cytoprotectrice et antioxydante (Reiter *et al.*, 2003). La présence de mélatonine et de ses récepteurs (MT1 et MT2) ainsi que de ses enzymes de synthèses (ANAAT et HIOMT) a été démontrée dans les trophoblastes humains et les lignées cellulaires de choriocarcinome placentaire, JEG-3 et BeWo (Lanoix *et al.*, 2008). Il a aussi démontré que la mélatonine a une action paracrine et autocrine sur les fonctions du placenta et un effet protecteur contre le stress oxydatif (Lanoix *et al.*, 2008). Dans les placentas provenant de grossesse avec PE, la concentration de mélatonine est diminuée ainsi que l'expression d'ANAAT et des récepteurs MT1 et MT2 comparée aux grossesses normotensives (Lanoix *et al.*, 2012a). L'augmentation du stress oxydatif, du stress du RE et de l'apoptose pourrait être la conséquence d'une altération du système mélatonine dans les placentas prééclamptiques. En effet, *in vitro*, le traitement à la mélatonine renverse l'augmentation du stress oxydatif et de l'apoptose induite par une H/R dans les primocultures de trophoblastes villosus (Lanoix *et al.*, 2013). Des études ont montré que la mélatonine est capable d'améliorer la viabilité cellulaire en modulant le stress du RE dans le foie (San-Miguel *et al.*, 2015, Tuñón *et al.*, 2013) et les maladies neurodégénératives (Carloni *et al.*, 2014, Goswami *et al.*, 2016). Actuellement, l'effet de la mélatonine sur le stress du RE induit par une H/R dans les trophoblastes villosus n'a jamais été étudié. **Notre hypothèse** est que la mélatonine protège les cellules trophoblastiques du stress du RE induit par une H/R. **Les objectifs spécifiques sont** : (1) Déterminer si l'H/R active le stress du RE et les voies de signalisations PERK et IRE1 α dans un modèle de trophoblaste villosus humain, les cellules BeWo ; (2) Déterminer si la mélatonine renverse les effets de l'H/R sur le stress du RE et les voies de signalisations PERK et IRE1 α dans les cellules BeWo.

CHAPITRE 3 : METHODOLOGIE

3.1 Matériels

La mélatonine (M5250) et le MEM/F-12 HAM sans rouge de phénol ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Le sérum bovin fœtal (FBS) inactif provient de chez Hyclone Laboratories (Logan, UT). Le TrypLE™ a été acheté chez Life technologies (Carlsbad, CA). Les flasques T-75 cm² et les plaques de 6 puits ont été achetés chez Corning Life Science (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON). Le Micro BCA Protein Assay kit a été obtenu chez Pierce Biotechnology. L'anticorps secondaire horseradish peroxidase (HRP)-conjugated et le Re-Blot plus Mild Antibody Stripping solution a été obtenu chez Millipore (Thermo Fisher Scientific). Les anticorps dirigés contre BIP/GRP78 (# 3177), IRE1 α (# 3294), PERK (# 5683), eIF2 α (# 9722), phospho-eIF2 α (Ser51 –# 9721), ATF-4 (# 11815), I κ B α (# 9242) ont été achetés chez Cell Signaling (Beverly, MA). Les anticorps monoclonaux contre phospho-IRE1 α (S724 –# ab48187), CHOP (# ab179823), p38 (# ab27986), p-p38 (# ab4822) et TRAF2 (# ab126758) ont été achetés chez Abcam (Toronto, ON). L'anticorps monoclonal contre phospho-PERK (Thr981 –# sc-32577) a été acheté chez Santa Cruz Biotech (Dallas, Tx). L'anticorps polyclonal contre NF κ B (# 06-418) provient de Millipore. Le kit de coloration MemCode™ Reversible Protein, le cocktail inhibiteur de protéases et le cocktail Inhibiteur Halt Phosphatase ont été acheté Thermo Fischer Scientific. Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF membranes et le Clarity Max™ Western ECL substrat proviennent de Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON).

3.2 Culture des cellules BeWo

La lignée cellulaire de choriocarcinome placentaire humain, BeWo, a été obtenue chez American Type Culture Collection (ATCC ; Rockville, MD). Les cellules BeWo ont été cultivées dans du milieu MEM/F12 HAM sans rouge de phénol avec 0,6 % de bicarbonate de sodium (Sigma Aldrich) et 10 % de FBS (Hyclone) dans des flasques T-75 cm² dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ à 37 °C. Les cellules ont été passées lorsqu'elles ont atteint 90% de confluence avec du TrypLE™.

3.3 Traitement (Fig.3.1)

Pour étudier l'effet de l'H/R et de la mélatonine sur le stress du RE, les cellules BeWo ont été cultivées dans du milieu MEM/F-12 HAM avec 10 % de FBS en conditions de normoxie ou d'H/R dans des Modular Incubateur Chambers (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA). Les cellules ont été cultivées à une densité de $4,5 \times 10^5$ cellules/cm² et incubées 24 h en condition de normoxie (8 % O₂, 5 % CO₂, 87 % N₂) afin de permettre aux cellules d'adhérer à la plaque. Par la suite, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de mélatonine (1 nM, 1 µM et 1 mM), ou le véhicule (DMSO 0,1 %) ou de la tunicamycine à 3,5 µg/ml (contrôle positif) et cultivées en normoxie (8 % O₂, 5 % CO₂, 87 % N₂) ou en H/R (hypoxie (0,5 % O₂, 5 % CO₂, 94,5 % N₂) pendant 4 h suivie d'une réoxygénation (8 % O₂, 5 % CO₂, 87 % N₂)) pendant 0 min, 2 h, 4 h, 6 h ou 24 h. La solution mère de mélatonine diluée dans 0,1% de DMSO a été fraîchement préparée le jour de l'expérience.

3.4 Immunobuvardage de type western (Fig.3.1)

Les protéines totales ont été extraites comme suit : les cellules BeWo ont été rincées avec du tampon phosphate salin froid (PBS), puis décoller avec 100 µL de tampon radioimmunoprécipitation RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, NP-40 1 %, Na-deoxycholate 0,25 %) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les lysats ont été mélangés par vortex toutes les 5 min pendant 30 min et maintenus sur glace. Par la suite, les lysats ont subi 2 sonifications de 5 s espacées de 30 s afin de solubiliser les protéines. Les homogénats ont été centrifugés 15 min à 14000 x g à 4 °C et les surnageants transférés dans des Eppendorfs de 1,5 mL. La concentration de protéines pour chaque échantillon a été déterminée par quantification spectrophotométrique (SpectracMax M5 avec le programme SoftMax Pro v5, Molecular Device, CA) en utilisant le kit Micro BCA Protein Assay kit (Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific). Les protéines ont été conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse par immunobuvardage de type western.

Les protéines ont été solubilisé dans du tampon Laemmli (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 200 mM β-mercaptoethanole, 20% glycérole, 4% dodécylsulfate de sodium (SDS) et 0,2 % de bleu de bromophénol) et chauffé à 95 °C pendant 7 min. Les protéines (40 ug) ont par la suite été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (gel de tassement 4% et gel séparation variant selon la taille des protéines), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Les membranes ont

été bloquées avec 5 % de lait en poudre écrémé (w/v) ou 5% de BSA (w/w) (pour les protéines phosphorylées) dans du tampon Tris salin (TBS) (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) pendant 1 h à température ambiante afin d'éviter des liaisons non spécifiques. Par la suite les membranes ont été incubées pour la nuit à 4 °C avec les anticorps primaires ; l'anti-BIP/GRP78 (1:1000), l'anti-IRE1 α (1:1000), l'anti-PERK (1:1000), l'anti-CHOP (1:500), l'anti-eIF2 α (1:1000), l'anti-phospho-eIF2 α (1:500), l'anti-ATF-4 (1:500), l'anti-NF κ B (1:500), l'anti-I κ B α (1:1000), l'anti-TRAF2 (1 :1000), l'anti-p38 (1 :1000) ou l'anti-p-p38 (1 :500). Les membranes ont été lavées 3 x 5 min avec du TBS contenant 0,1 % de Tween (TBS-T). Cette étape a été suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris conjuguées à une peroxydase horseradish pendant 1 h à température ambiante. Les membranes ont été lavées 3 x 5 min avec du TBS-T et mises en contact avec le Clarity™ Western ECL substrat (Bio-Rad). Les bandes associées aux protéines d'intérêts ont été révélées en utilisant le ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad) et l'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique avec le programme Image Lab 5.2 (Bio-Rad). La normalisation sur les protéines totales a été réalisée avec le MemCode™ Reversible Protein Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) suivant le protocole du fournisseur. Les protéines sont exprimées en pourcentage du véhicule témoin (DMSO normoxie).

3.5 Analyse statistique

Toutes les analyses ont été réalisées sur au moins quatre passages différents de cellules BeWo ($n \geq 4$). Les différences statistiques significatives ($P < 0,05$) ont été déterminées par le test Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn's ou un test-t à partir du logiciel GraphPrism v.5.0a, GraphPad Software, San Diego, CA.

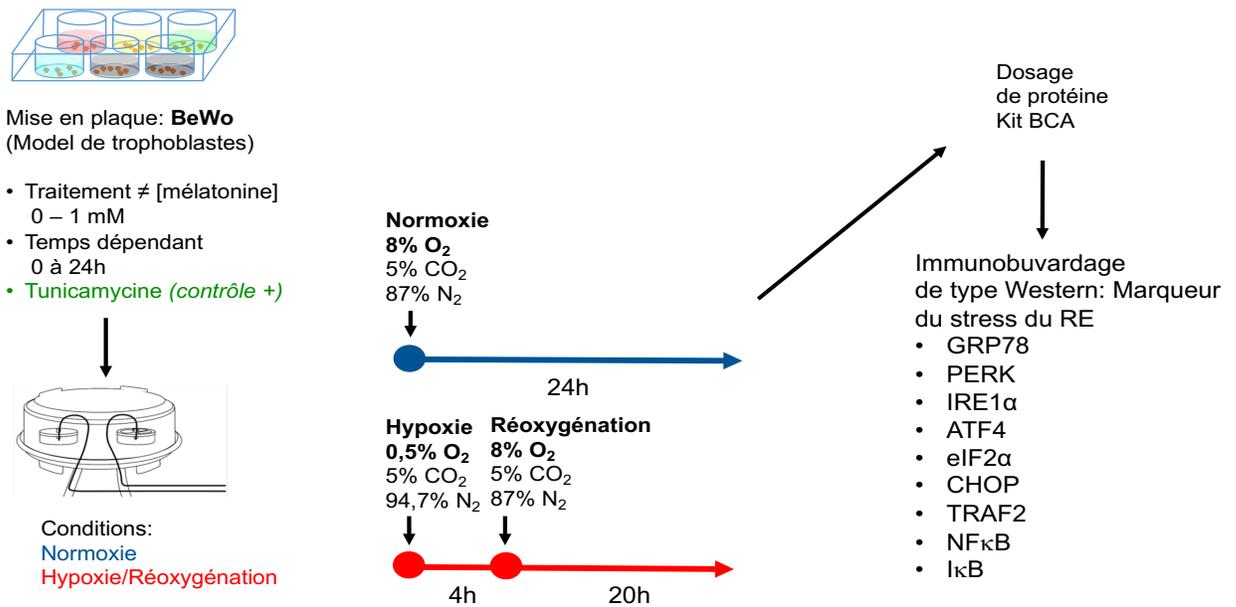


Figure 3.1: Représentation schématique du protocole expérimentale. Les cellules BeWo ont été traitées avec des concentrations croissantes de mélatonine (1 nM, 1 μM et 1 mM) ou le véhicule (DMSO 0,1 %) ou de la tunicamycine à 3,5 μg/ml (contrôle positif), puis cultivées en normoxie (8 % O₂, 5 % CO₂, 87 % N₂) ou en H/R (hypoxie (0,5 % O₂, 5 % CO₂, 94,5 % N₂) pendant 4 h suivie d'une réoxygénation (8 % O₂, 5 % CO₂, 87 % N₂)) pendant 0 min, 2 h, 4 h, 6 h et/ou 20 h, tel décrit à la section 3.3. Les protéines ont été extraites et dosées avec la trousse BCA, les marqueurs du stress du RE GRP78, PERK, IRE1α, ATF4, eIF2α, CHOP, TRAF2, NFκB et IκB ont été analysés par immunobuvardage de type western tel que décrit à la section 3.4.

CHAPITRE 4 : RESULTATS

4.1 Effet de l'hypoxie/réoxygénation (H/R) et de la mélatonine sur l'expression des protéines GRP78, PERK et IRE1 α de la voie UPR

Les analyses d'immunobuvardage de type western ont montré dans les cellules BeWo cultivées 24 h en condition d'H/R une augmentation significative de l'expression protéique de GRP78 (537,1% ; $P = 0,0172$), PERK (249,5% ; $P = 0,0379$) et IRE1 α (259,1% ; $P = 0,0293$) par rapport aux cellules maintenues en normoxie (Fig.4.1A, 4.2A et 4.3A). La mélatonine en condition de normoxie et d'H/R a augmenté de manière concentration-dépendante, avec un effet maximal à 1 mM mélatonine, l'expression protéique de GRP78, PERK, IRE1 α par rapport au véhicule-témoin (Fig.4.1B, 4.2B, 4.3B). La concentration de 1 mM mélatonine a donc été choisie pour les analyses subséquentes. En condition de normoxie la mélatonine (1 mM) a augmenté de manière significative l'expression de GRP78 (499,4% ; $P = 0,0510$), PERK (289,5% ; $P = 0,0094$), IRE1 α (357,0% ; $P = 0,0514$) par rapport au véhicule-témoin (Fig.4.1C, 4.2C, 4.3C). Le traitement avec 1 mM la mélatonine en condition d'H/R a montré une augmentation significative de GRP78 (756,2%, $P = 0,0373$), PERK (336,0%, $P = 0,0345$) et IRE1 α (534,6%, $P = 0,0115$) par rapport aux cellules maintenues en normoxie (Fig.4.1C, 4.2C, 4.3C). Ces résultats suggèrent que l'H/R et la mélatonine activent la voie UPR dans les cellules BeWo.

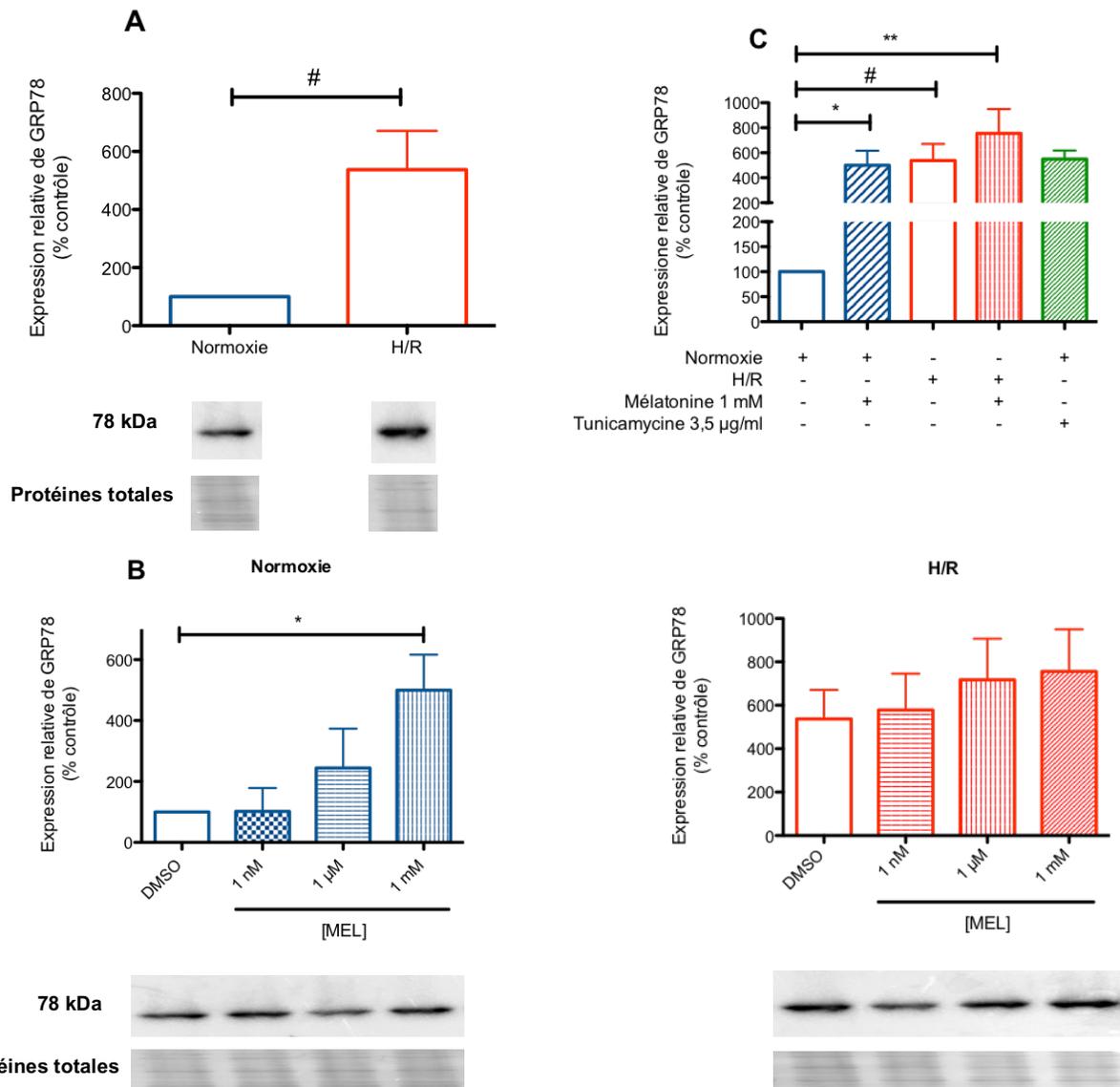


Figure 4.1: Effet de l'hypoxie/réoxygénation et de la mélatonine sur l'expression de la protéine GRP78. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 nM, 1 μM et 1 mM ou le véhicule témoin (0,1% DMSO) ou la tunicamycine (3,5 μg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie ou H/R pendant 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec l'anticorps anti-GRP78, tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine de GRP78 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode et photo représentative d'un immunobuvardage obtenue (A) en condition de normoxie vs H/R et (B) en condition de normoxie ou H/R en présence de concentrations croissantes de mélatonine. (C) Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'effet de 1 mM de mélatonine en condition de normoxie et d'H/R sur l'expression de la protéine de GRP78 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 24 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (± SEM) de 4 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$) ou le test-t ($^{##}P < 0,01$). Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.

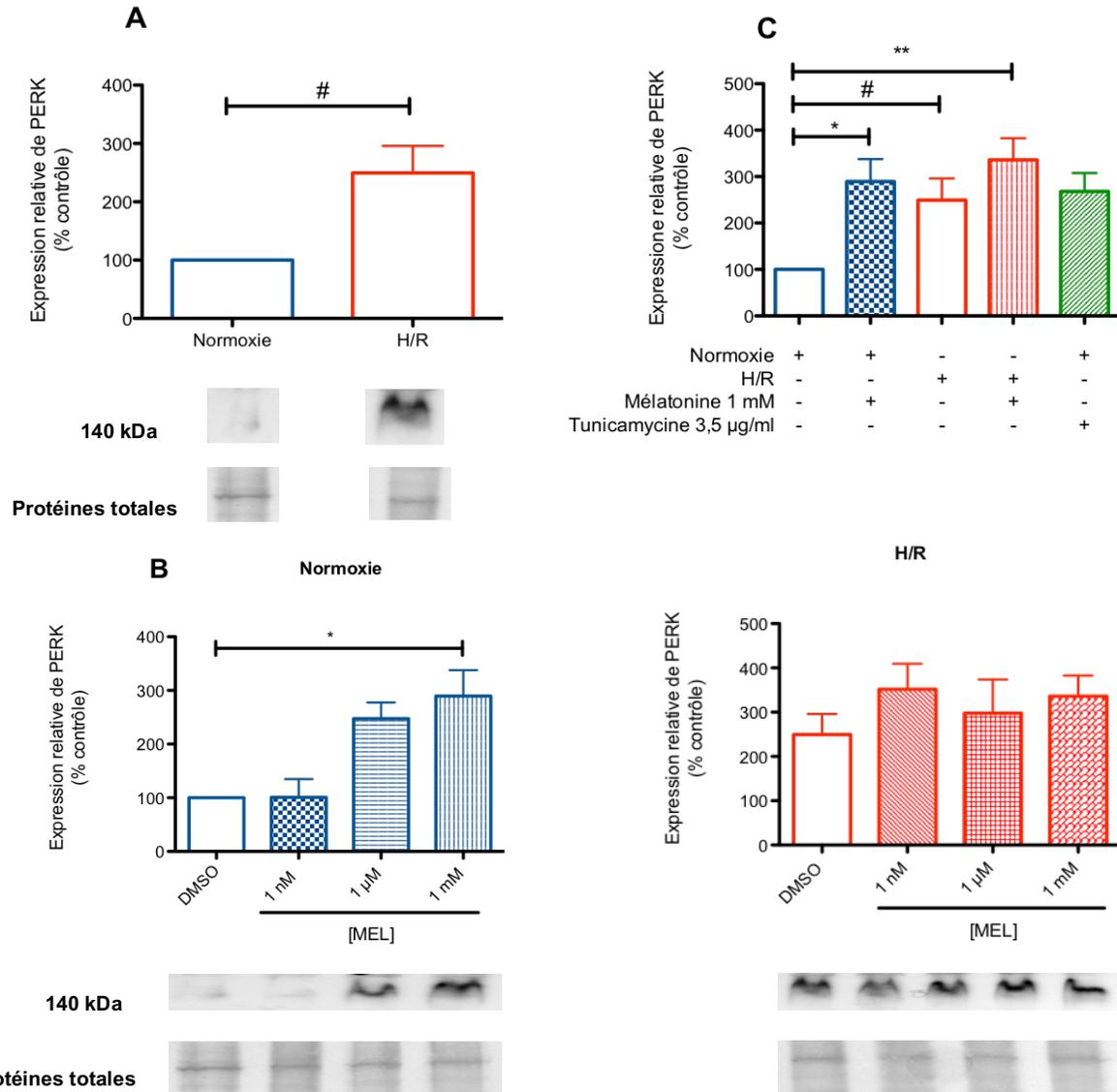


Figure 4.2: Effet de l'hypoxie/réoxygénation et de la mélatonine sur l'expression de la protéine PERK. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 nM, 1 μM et 1 mM ou le véhicule témoin (0,1% DMSO) ou la tunicamycine (3,5 μg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie ou H/R pendant 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec l'anticorps anti-PERK, tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine de PERK normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode et photo représentative d'un immunobuvardage obtenue (A) en condition de normoxie vs H/R et (B) en condition de normoxie ou H/R en présence de concentrations croissantes de mélatonine. (C) Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'effet de 1 mM de mélatonine en condition de normoxie et d'H/R sur l'expression de la protéine de GRP78 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 24 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (± SEM) de 4 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's ($*P < 0,05$) ou le test-t ($^{\#}P < 0,05$). Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.

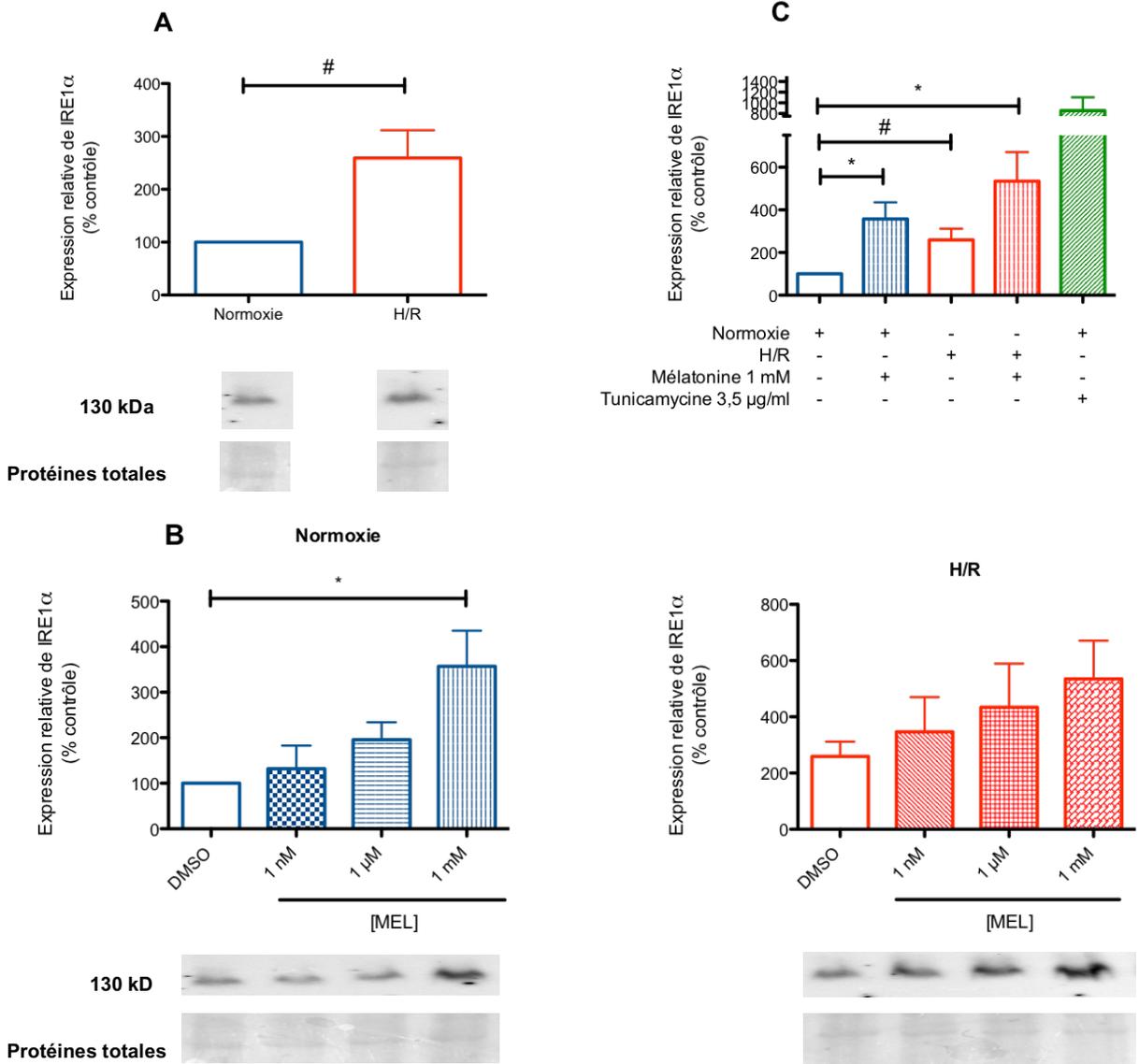


Figure 4.3: Effet de l'hypoxie/réoxygénation et de la mélatonine sur l'expression de la protéine IRE1 α . Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 nM, 1 μ M et 1 mM ou le véhicule témoin (0,1% DMSO) ou la tunicamycine (3,5 μ g/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie ou H/R pendant 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec l'anticorps anti-IRE1 α , tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine de IRE1 α normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode et photo représentative d'un immunobuvardage obtenue (A) en condition de normoxie vs H/R et (B) en condition de normoxie ou H/R en présence de concentrations croissantes de mélatonine. (C) Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'effet de 1 mM de mélatonine en condition de normoxie et d'H/R sur l'expression de la protéine de GRP78 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 24 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (\pm SEM) de 4 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's ($*P < 0,05$) ou le test-t ($^{\#}P < 0,05$). Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.

4.2 Effet de l'H/R et de la mélatonine sur la voie de signalisation PERK

Pour confirmer si la voie PERK est activée par l'H/R et la mélatonine, les protéines en aval eIF2 α , ATF4 et CHOP ont été analysées. Dans un premier temps, pour déterminer l'effet de l'H/R et de la mélatonine (1 mM) sur la voie PERK, des traitements temps-dépendants de 0, 2, 4, 6 et 24 h ont été réalisés. Les résultats ont montré que l'expression protéique d'eIF2 α phosphorylée sur eIF2 α totale (p-eIF2 α /eIF2 α) et CHOP ne varie pas de 0 à 24 h en condition de normoxie dans les cellules BeWo (Annexe Fig. I et II). En condition d'H/R, il n'y a pas de variation de 0 à 24 h de l'expression protéique pour le ratio p-eIF2 α /eIF2 α tandis qu'à 24 h il y a une augmentation significative de CHOP (180,5% ; $P = 0,0319$) par rapport au véhicule-témoin (Fig. 4.4A et C). En normoxie, 1 mM de mélatonine augmente le ratio p-eIF2 α /eIF2 α de manière temps-dépendant pour atteindre un maximum significatif d'expression protéique à 24 h (208,8%, $P = 0,0471$; Fig.4.4A ; annexe Fig. I) par rapport à 0 h, tandis qu'en H/R, aucun effet de la mélatonine n'est observé. La mélatonine (1 mM) n'a pas d'effet sur l'expression protéique de CHOP en condition de normoxie et H/R par rapport au témoin-DMSO, tandis qu'en H/R, elle augmente significativement (224,8 % ; $P = 0,0330$) par rapport au témoin-DMSO en normoxie (Fig.4.4C et annexe Fig. II). L'H/R induit, dans les cellules BeWo, une augmentation significative de l'expression protéique d'ATF4 (362,2% $P = 0,0479$) comparativement aux cellules maintenues en normoxie (Fig. 4.4 B). L'expression protéique d'ATF4 est également significativement augmentée par 1 mM de mélatonine en condition de normoxie (185,3% ; $P = 0,0060$) et d'H/R (866,1%, $P = 0,0510$; Fig.4.4 B) par rapport au véhicule-témoin. Ces résultats suggèrent que l'H/R et la mélatonine induisent la voie PERK par l'activation d'eIF2 α , d'ATF4 et CHOP dans les cellules BeWo.

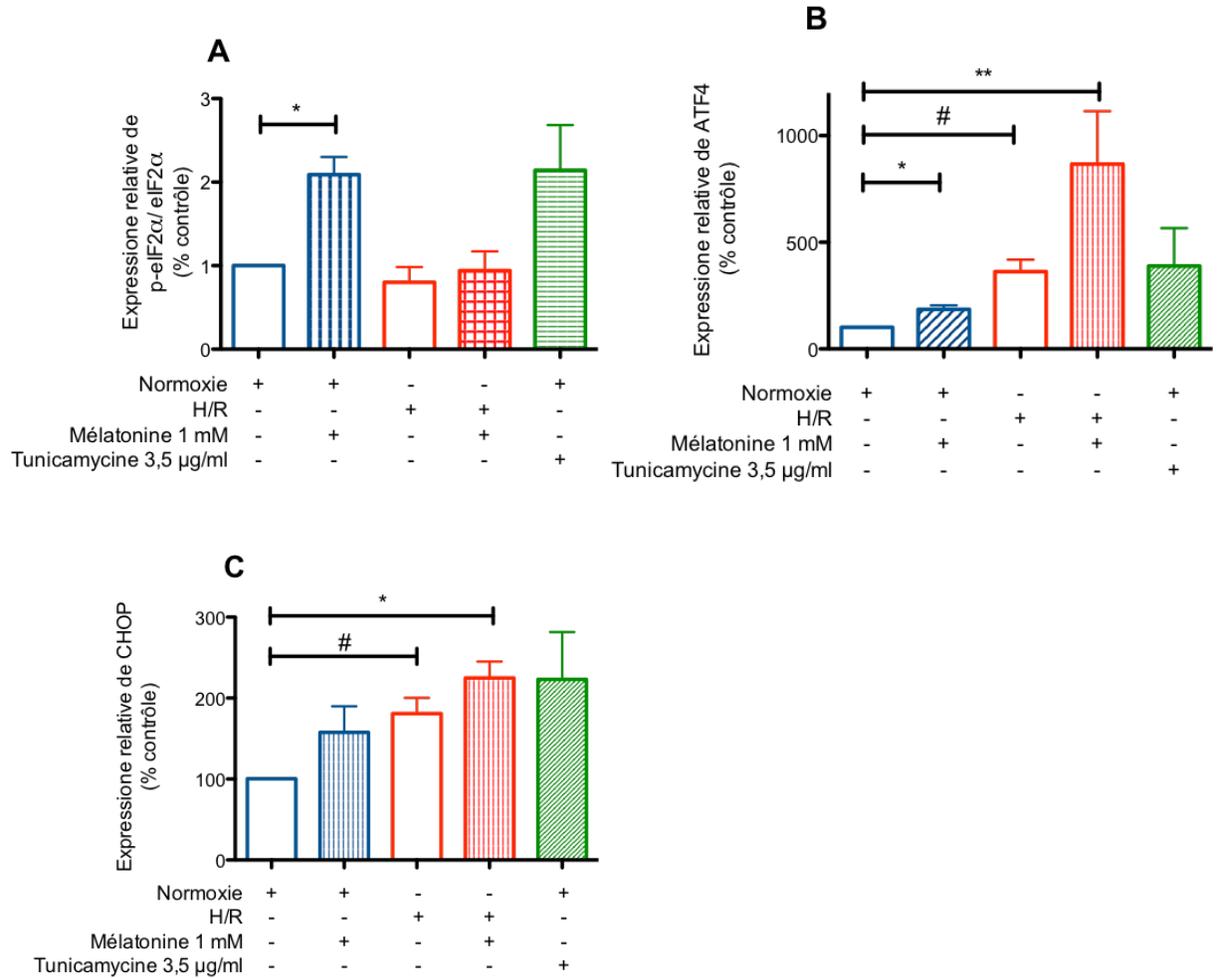


Figure 4.4: Effet de l'hypoxie/réoxygénation (H/R) et de la mélatonine sur l'expression des protéines eIF2α, ATF4 et CHOP de la voie PERK. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 mM ou le véhicule témoin (DMSO à 0,1%) ou de la tunicamycine (3,5 µg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie ou d'H/R pendant 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec les anticorps anti-p-eIF2α, anti-eIF2α, anti-ATF4, anti-CHOP tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine A) p-eIF2α/eIF2α, B) ATF4 et C) CHOP normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 24 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (± SEM) de 4 à 5 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's ($*P < 0,05$, $**P < 0,01$) ou le test-t ($^{##}P < 0,01$). Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine. Voir les annexes Fig. I, II et III, pour les analyses temps- et concentrations-dépendantes.

4.3 Effet de l'H/R et de la mélatonine sur la voie de signalisation IRE1 α

Pour vérifier si la voie IRE1 α est activée, des traitements temps dépendants à 0, 2, 4, 6 et 24 h en condition de normoxie et d'H/R, sans ou avec 1 mM mélatonine, ont été réalisés pour les protéines TRAF2, NF κ B et I κ B (Annexe Fig. IV et V). Les résultats ont montré en condition de normoxie que l'expression protéique de TRAF2 ne varie pas de 0 à 24 h (Annexe Fig. IV). En condition d'H/R, l'expression protéique de TRAF2 ne varie pas de 0 à 6 h par contre à 24 h, il y a une augmentation significative (248,0% ; $P = 0,0130$ Fig.4.5 A) par rapport aux cellules cultivées en normoxie. L'ajout de 1 mM de mélatonine, en condition de normoxie et H/R n'affecte pas l'expression protéique de TRAF2 comparativement au véhicule-témoin. Par contre, la mélatonine (1 mM), en condition d'H/R augmente significativement (275,4% ; $P = 0,0006$) l'expression de TRAF2 comparativement au véhicule-témoin en normoxie (Fig.4.4A). Ces résultats suggèrent que l'H/R active TRAF2. Les protéines en aval NF κ B et I κ B impliquées dans la régulation de l'inflammation ont également été analysées. Les résultats ont montré que l'expression protéique de NF κ B ne varie pas suite au traitement avec 1 mM de mélatonine en condition de normoxie et d'H/R de 0 à 24 h (Annexe Fig.V A et B ; Fig.4.5C). Les résultats ont montré, qu'en condition de normoxie 1 mM de mélatonine n'affecte pas l'expression protéique de I κ B (Annexe Fig.V C et D). En condition d'H/R, l'expression protéique I κ B ne varie pas de 0 h à 6 h mais à 24 h, il y a une augmentation significative (565,7% ; $P = 0,0352$) par rapport à la normoxie tandis qu'en condition de normoxie et d'H/R, la mélatonine n'a pas d'effet (Annexe Fig.V C et D, Fig.4.5D). Le ratio de NF κ B sur I κ B (NF κ B/I κ B) montre que les traitements avec ou sans mélatonine en condition de normoxie ou d'H/R, n'ont pas d'effet (Fig.4.5B). Ces résultats suggèrent que l'H/R active de manière significative TRAF2, mais que la voie de l'inflammation NF κ B n'est pas affectée ni par l'H/R ni par la mélatonine.

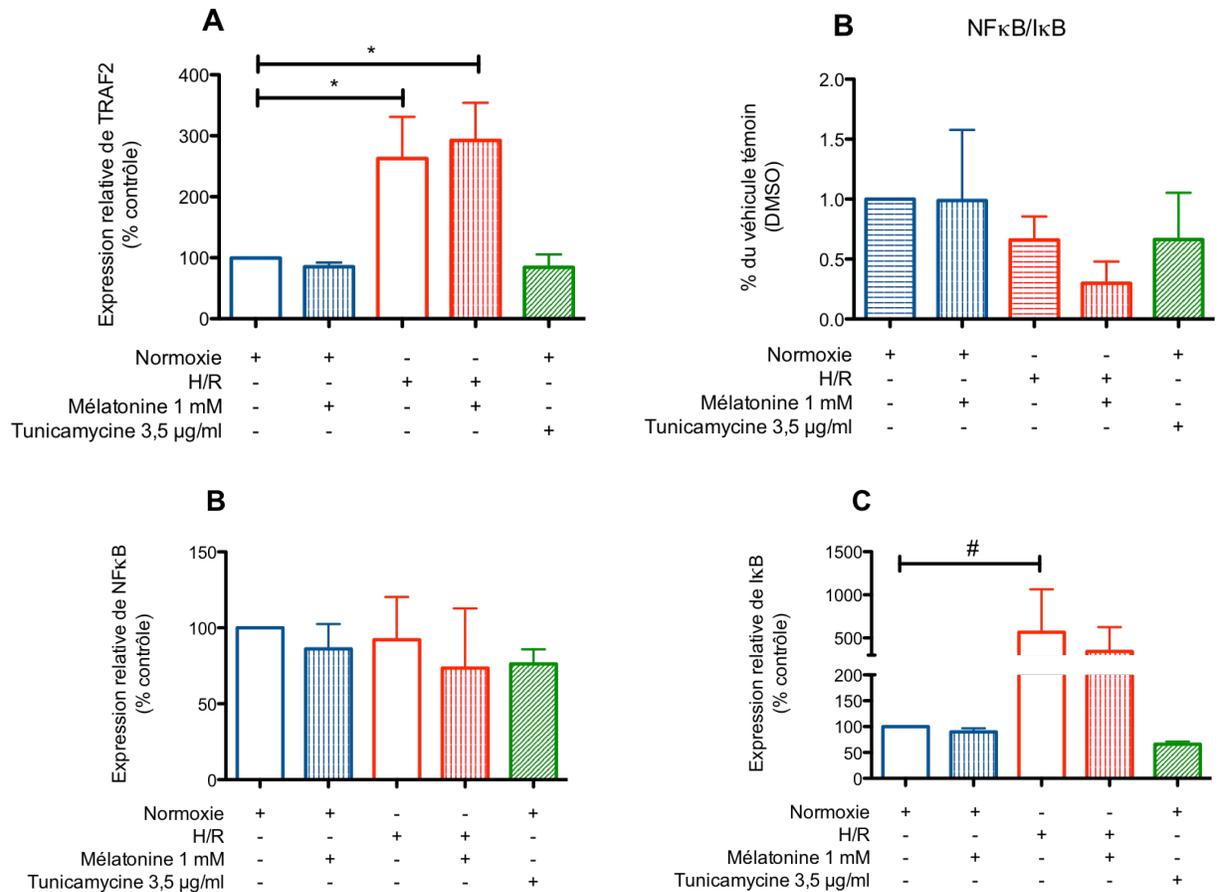


Figure 4.5: Effet de l'hypoxie/réoxygénation (H/R) et de la mélatonine sur l'expression des protéines TRAF2, NFκB et IκB de la voie IRE1α. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 mM ou le véhicule témoin (DMSO à 0,1%) ou de la tunicamycine (3,5 µg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie ou d'H/R pendant 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec les anticorps anti-TRAF2, anti-NFκB, anti-IκB tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine A) TRAF2, B) NFκB et C) IκB normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 24 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (± SEM) de 4 à 5 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's ou le test-t ($^{\#}P < 0,05$). Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine. Voir les annexes.Fig. IV et V, pour les analyses temps-dépendantes.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

Le premier objectif de cette étude était de démontrer si l'H/R induit le stress du RE dans un modèle de trophoblaste vilieux humain, les cellules BeWo. Nos résultats ont montré que l'H/R induit le stress du RE par une augmentation significative de la voie UPR (expression protéique de GRP78, PERK et IRE1 α). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature démontrant qu'une H/R sévère (1/20% O₂) augmente l'expression de GRP78 dans les cellules BeWo (Yung *et al.*, 2014). Lors d'un stress du RE, l'induction de GRP78 permet d'augmenter la capacité de repliement des protéines afin de rétablir l'homéostasie cellulaire (Xu *et al.*, 2005). De plus, des études ont montré la présence de GRP78 à la membrane plasmique du trophoblaste vilieux, suggérant que cette protéine joue un rôle important dans la syncytialisation (Arnaudeau *et al.*, 2009, Fradet *et al.*, 2012). Dans ce sens une diminution de la fusion suite à une inhibition de GRP78 dans les cellules BeWo a été décrite (Fradet *et al.*, 2012). Une diminution de GRP78 à la surface des vCTB issues de grossesses prééclamptiques vs normotensives a également été décrite, suggérant que la relocalisation de GRP78 du RE à la membrane plasmique est altérée dans les trophoblastes vilieux prééclamptiques (Fradet *et al.*, 2012). Les auteurs suggèrent qu'une altération de l'expression de GRP78 ou de sa translocation à la membrane plasmique entraîne un défaut de syncytialisation menant aux symptômes de PE (Fradet *et al.*, 2012). Des études ont également montré que la GRP78 est transloquée à la membrane plasmique lorsque le stress du RE est activé dans les cellules tumorales et normales (Li *et al.*, 2006, Pfaffenbach *et al.*, 2011). Au vu de ces résultats, nous proposons que l'induction de GRP78 par l'H/R est associée à une augmentation du taux de fusion qui induit une altération de l'homéostasie du trophoblaste vilieux, contribuant aux symptômes de PE. Pour vérifier cette hypothèse des analyses de syncytialisation par l'analyse de la sécrétion d'hCG et de fusion en condition d'H/R dans les BeWo devront être réalisées.

L'analyse des protéines en aval de la voie PERK a montré que l'H/R induit une augmentation d'ATF4 et CHOP sans affecter l'activation de p-eIF2 α . En outre, il a été montré que CHOP active directement GADD34, qui induit la biosynthèse de protéine par une déphosphorylation de la sérine 51 de la sous unité alpha d'eIF2 dans des cellules fibroblastiques d'embryon de souris traitées avec du DTT (Marciniak *et al.*, 2004). Étant donné que nos résultats ne montrent pas d'induction de p-eIF2 α en condition d'H/R, il serait intéressant de vérifier l'activation de GADD34 par immunobuvardage de type western. D'autre part, nos données montrent que la voie PERK est activée et induit l'apoptose en condition d'H/R

dans les cellules BeWo. Des tests de TUNEL et analyse de caspases seront réalisés afin de confirmer si l'apoptose est activé par les voies intrinsèque et/ou extrinsèque. Pour confirmer l'activation de PERK par l'H/R, étant donné que les analyses d'immunobuvardages avec l'anti-p-PERK n'ont pas été concluantes, des études d'immunoprécipitations devront être réalisées. Nos résultats sont en accord avec la littérature où une augmentation de p-eIF2 α , GRP78 et CHOP a été observé dans des placentas de grossesses compliquées par une PE associées à un RCIU comparativement aux placentas de grossesses normotensives (Hong-wa Yung *et al.*, 2008).

Des études ont montré l'implication de la protéine ATF4 dans l'induction de l'autophagie pour permettre la survie ou la mort cellulaire, dépendamment de la durée et l'intensité du stress du RE (B'Chir *et al.*, 2013, Deegan *et al.*, 2015, Deegan *et al.*, 2013). Une activation de l'autophagie par une augmentation des marqueurs LC3-II, LAMP-2 et beclin-1 dans des placentas de grossesses compliquées par un RCIU avec ou sans PE ainsi que dans des primocultures de trophoblastes villositaires cultivés sous hypoxie a été décrite (Curtis *et al.*, 2013, Hung *et al.*, 2012). Au vu de ces observations, nous émettons l'hypothèse que l'induction de la protéine ATF4 en condition d'H/R pourrait induire l'autophagie dans les cellules BeWo. Dans ce sens, des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont montré une augmentation de beclin-1 (responsable de la première étape de l'autophagie), d'ATG7 (activateur principal de l'autophagie) et de LC3-II suite au traitement avec 1 mM de mélatonine en condition d'H/R dans les cellules BeWo (Fagundes *et al.*, 2015). Des études supplémentaires, sont nécessaires pour confirmer ou infirmer l'implication d'ATF4 dans l'induction de l'autophagie.

La protéine IRE1 α contient un domaine endoribonucléase qui clive l'ARNm XBP1 et permet de générer son facteur de transcription qui est impliqué dans l'induction des protéines chaperonnes et la dégradation des protéines par le système ERAD afin de rétablir l'homéostasie. De plus, IRE1 α active les voies pro-inflammatoires par son domaine kinase. Il a été démontré que cette protéine peut stimuler les voies JNK, p38 et NF κ B par l'activation des protéines TRAF2 et ASK1 (Burton *et al.*, 2009). L'H/R (*in vitro*) et l'ischémie/reperfusion (*in vivo*) stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs angiogéniques qui sont impliqués dans la PE dans des explants villositaires (Cindrova-Davies *et al.*, 2007a, Hung *et al.*, 2004). Nos résultats ont montré que l'H/R augmente significativement TRAF2 et I κ B, sans effet sur NF κ B. De plus, le ratio NF κ B/I κ B, similaire à l'effet de la tunicamycine, n'est pas affecté par l'H/R suggérant que l'inflammation n'est pas activée par l'H/R dans les cellules BeWo. Étant donné que nos résultats ne montrent pas d'induction de NF κ B, mais une augmentation de TRAF2 en condition d'H/R, nous avons regardé la voie p38, qui en situation de stress du RE est

activée par la voie TRAF2-ASK1 (Fig. 5.1). Les résultats préliminaires ont montré que l'H/R n'a aucun effet sur le ratio P-p38/p38 totale après 0, 2, 4, 6 et 24 h de traitement comparé à la normoxie (annexe Fig. V). Une étude a démontré que p38 atteint son maximum d'activation (phosphorylation) rapidement (30 min) puis retourne à un niveau basal au bout de 1 h suite au traitement avec le 8-isoprostane dans des macrophages humains (Scholz *et al.*, 2003). Il serait intéressant de réaliser un traitement temps dépendant à 0, 15, 30 et 60 min en condition H/R afin de déterminer s'il y a une activation de p38 et ASK1/JNK dans les cellules BeWo. De plus, il reste à confirmer l'activation de la voie IRE1 α par la détection de l'ARNm XBP1 par RT-qPCR en condition d'H/R dans les cellules BeWo.

Une étude a montré l'implication de la voie PERK dans l'induction de l'inflammation dans des cellules neuronales et de carcinomes rénaux (Tam *et al.*, 2012). En effet, P-eIF2 α inhibe I κ B et permet la translocation de NF κ B au noyau afin d'induire les gènes d'inflammation. Il reste à étudier si l'activation de la voie PERK par l'H/R et 1 mM de mélatonine observée dans notre étude induit de l'inflammation. La protéine ATF6 aussi est capable d'induire NF κ B par la phosphorylation d'AKT (Nakajima *et al.*, 2011, Yamazaki *et al.*, 2009). Il sera important dans une étude future de déterminer si l'H/R et la mélatonine affect la voie ATF6 dans les cellules BeWo.

La mélatonine possède un grand pouvoir antioxydant (voir section 1.2.5). *In vitro*, la mélatonine renverse l'augmentation de stress oxydatif et l'apoptose induite par une H/R dans les primocultures de trophoblastes villos (Lanoix *et al.*, 2013). Des études ont montré que la mélatonine est capable également de favoriser la survie cellulaire en modulant le stress du RE dans les maladies du foie dans un modèle de lapin (San-Miguel *et al.*, 2015, Tuñón *et al.*, 2013) et les maladies neurodégénératives dans un modèle de rat et souris (Carloni *et al.*, 2014, Goswami *et al.*, 2016). La mélatonine induit le stress du RE et la réponse UPR par une augmentation significative de GRP78, PERK, IRE1 α , p-eIF2 α et ATF4 et n'affecte pas NF κ B en condition de normoxie et mime ainsi les effets de l'H/R. Ces résultats, contrairement à ce que nous avons proposé (voir section 1.2.6), montrent que la mélatonine ne renverse pas, mais plutôt mime les effets de l'H/R sur la voie UPR et le stress du RE dans les cellules BeWo. En effet, nos données sont en accord avec la littérature qui démontre que la mélatonine exerce des effets contraires dans les cellules normales vs tumorales. Ces résultats sont également en accord avec les données obtenues dans notre laboratoire démontrant que la mélatonine stimule l'apoptose en induisant une perte du potentiel de la membrane mitochondriale (Lanoix *et al.*, 2012c) et augmente PARP clivée dans les cellules BeWo (Fagundes *et al.*, 2015) contrairement aux primocultures de trophoblastes villos où la mélatonine inhibe l'apoptose. Dans les

primocultures de trophoblastes, la mélatonine permet la survie cellulaire en diminuant le stress oxydatif, l'inflammation et l'apoptose intrinsèque induite par une H/R (Lanoix *et al.*, 2013). Il a été montré que lors d'un stress environnemental, les cellules tumorales induisent la réponse UPR afin de favoriser la survie et la croissance cellulaire mais dans le cas d'un stress chronique, il y a l'induction de l'apoptose (Rouschop *et al.*, 2013, Rzymiski *et al.*, 2009, Schewe *et al.*, 2008), suggérant que le traitement de l'H/R couplé à la mélatonine induit un stress sévère menant à l'apoptose. Ces résultats mettent en évidence que les BeWo ne se comportent pas de la même façon que les trophoblastes primaires et sont en accord avec la littérature qui montre que la mélatonine exerce des effets différents sur les cellules non-tumorales vs. tumorales. En outre, il a été démontré dans que la mélatonine a un effet pro-oxydant dans plusieurs types de cellules tumorales tandis qu'elle a un effet antioxydant dans les cellules normales (Bejarano *et al.*, 2011a, Koh *et al.*, 2011, L. Xu *et al.*, 2014, L. Xu *et al.*, 2013). Plusieurs études démontrent que la mélatonine induit l'apoptose par la modulation de la production des ROS dans les tumeurs, tels que la lignée leucémie humaine HL-60, le mégacaryoblastique CMK, les cellules Jurkat et Molt-4, l'adénocarcinome de prostate LNCap, l'adénocarcinome du côlon HT-29 et le carcinome gastrique murin (Bejarano *et al.*, 2011a, Bejarano *et al.*, 2011b, Joo *et al.*, 2009, Koh *et al.*, 2011, Paternoster *et al.*, 2009, L. Xu *et al.*, 2014, L. Xu *et al.*, 2013), tandis qu'elle diminue les ROS, l'inflammation et l'apoptose dans les cellules normales, telles que les cellules pancréatiques et cardiaques de rat, neurales, musculaires (Antolín *et al.*, 2002, Ebel *et al.*, 2000, Karimfar *et al.*, 2015, J. H. Park *et al.*, 2013, Shang *et al.*, 2016). Il y a peu d'étude qui ont été réalisées sur la modulation du stress du RE par la mélatonine dans les cellules cancéreuses. Une étude a montré que la mélatonine induit la mort des cellules de mélanome B16F10 par la voie UPR et PI3K/Akt/mTOR (régulateur de la prolifération cellulaire). Le co-traitement tunicamycine/mélatonine diminue significativement la voie PI3K/Akt/mTOR et le ratio Bcl2/Bax tandis qu'il augmente les protéines du stress du RE, p-PERK et p-eIF2 α . Il en résulte une diminution de la viabilité cellulaire (Kim *et al.*, 2014). Ces résultats montrent que la mélatonine combinée à la tunicamycine diminue la survie en inhibant la voie PI3K/Akt/mTOR via l'activation de la voie du stress du RE dans les cellules cancéreuses. Or dans les cellules normales, la mélatonine améliore la viabilité cellulaire en diminuant le stress oxydatif, le stress du RE et l'apoptose telle que décrite dans la section 1.2.5. Toutes ces observations montrent que la mélatonine a des effets opposés en améliorant la survie cellulaire dans des cellules normales, mais entraînant la mort par apoptose dans les cellules tumorales.

À court terme, il reste à confirmer l'activation des protéines PERK et IRE1 α et l'apoptose ainsi que de déterminer si les protéines JNK, p38, XBP1BP et ATF6 sont induites en condition

d'H/R et avec la mélatonine dans les cellules BeWo (Fig.5.1). Si l'induction du stress du RE par la mélatonine est récepteur dépendant et/ou indépendant reste également à étudier, en utilisant des antagonistes sélectifs ou une approche de siARN contre MT1 et MT2. Afin de déterminer si la mélatonine a des effets différents sur le stress du RE dans les cellules trophoblastiques normales et physiopathologiques (tumorales, PE, etc.), des études devront être réalisées sur les primocultures de trophoblastes villosus tel que décrit par notre équipe (Sagrillo-Fagundes *et al.*, 2016)

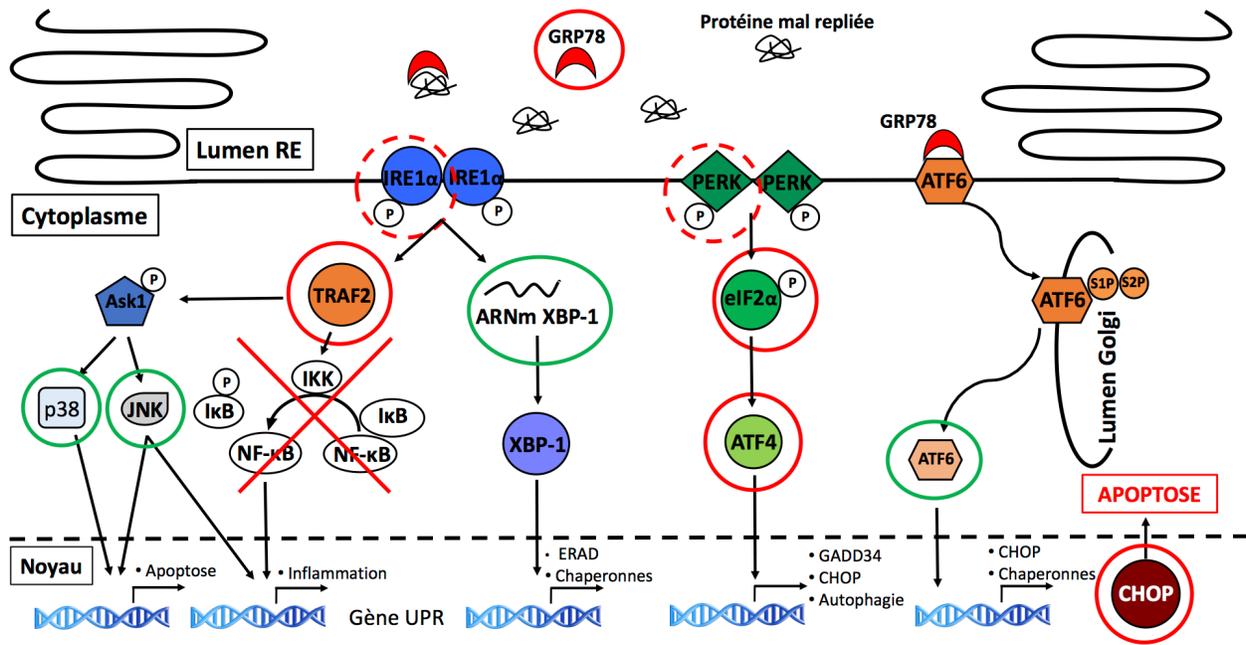


Figure 5.1: Schéma récapitulatif des voies de l'UPR activées suite au traitement en hypoxie/réoxygénation (H/R) et avec de la mélatonine dans les cellules BeWo. L'H/R et la mélatonine induit GRP78, PERK, IRE1 α , ATF4 et CHOP. Il reste à étudier si les protéines PERK et IRE1 α sont activées (phosphorylées). L'H/R et la mélatonine n'ont pas d'effet sur la voie de l'inflammation NF κ B et I κ B. Il reste à étudier l'effet de l'H/R et de la mélatonine sur les protéines ATF6, p38, JNK et l'ARNm XBP1. Cercle rouge : confirmé ; Cercle rouge hachuré : reste à confirmer ; Cercle vert : reste à étudier.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION

Cette étude démontre pour la première fois que l'H/R et la mélatonine active de manière similaire le stress du RE dans les cellules de choriocarcinome placentaire humaine BeWo, activant majoritairement la voie PERK et l'apoptose, sans effet sur la voie de l'inflammation IRE1 α (Fig.6.1). Ces données combinées à nos résultats précédents suggèrent que la mélatonine favorise la survie cellulaire des cellules normales, en diminuant le stress oxydatif, le stress du RE et les voies apoptotiques tandis que dans les cellules tumorales (BeWo), elle a un effet pro-oxydant en augmentant l'apoptose par le stress oxydatif, le stress du RE et une diminution des enzymes antioxydantes (Fig.6.2). En conclusion, cette étude suggère que les cellules BeWo ne sont pas un bon modèle pour étudier l'effet protecteur de la mélatonine dans les cellules trophoblastiques normales en condition d'H/R, mais elles sont un bon modèle pour étudier l'effet thérapeutique de la mélatonine dans les cancers placentaires.

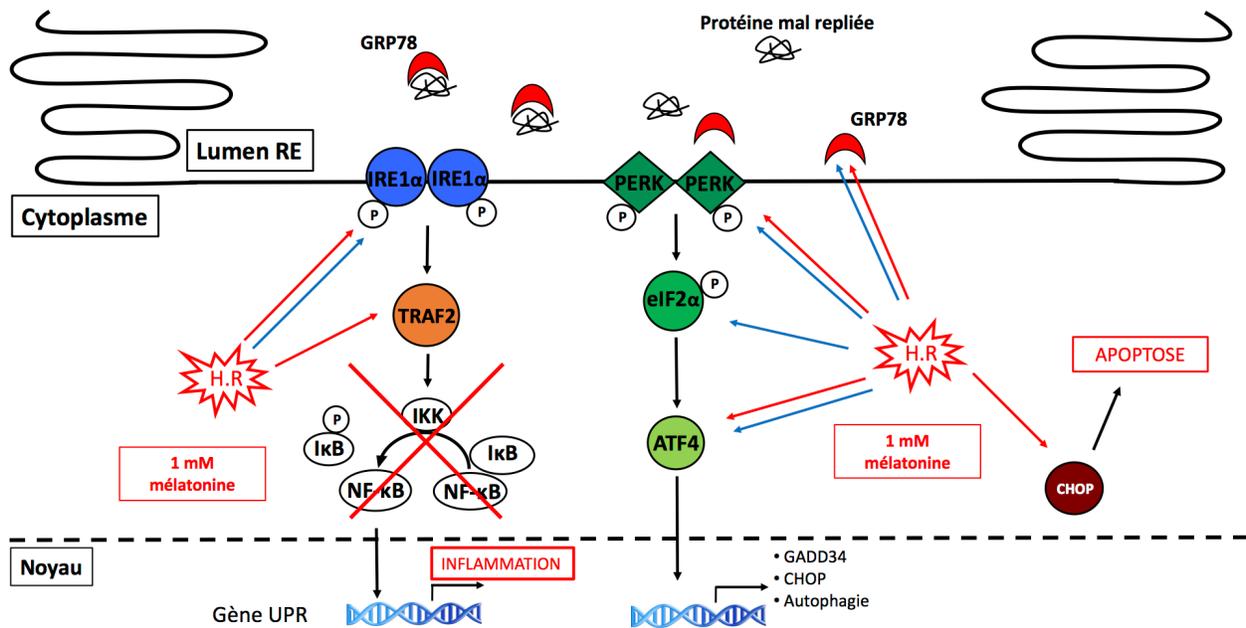


Figure 6.1: Schémas récapitulatif de l'effet de l'H/R et la mélatonine sur le stress du RE dans les cellules BeWo. Le traitement en H/R augmente l'expression protéique de GRP78, PERK, ATF4, CHOP, IRE1 α , p-eIF2 α et CHOP. Le traitement à 1 mM de mélatonine en condition de normoxie augmente l'expression protéique de GRP78, PERK, p-eIF2 α , ATF4, IRE1 α et TRAF2. Le traitement avec 1 mM en condition d'H/R augmente l'expression des protéines GRP78, PERK p-eIF2 α et CHOP et amplifie l'effet de l'H/R sur l'expression protéique de GRP78, PERK ATF4 et IRE1 α . Flèche bleue : Induction à 1 mM de mélatonine en normoxie; Flèche rouge : Induction à 1 mM de mélatonine en H/R ;

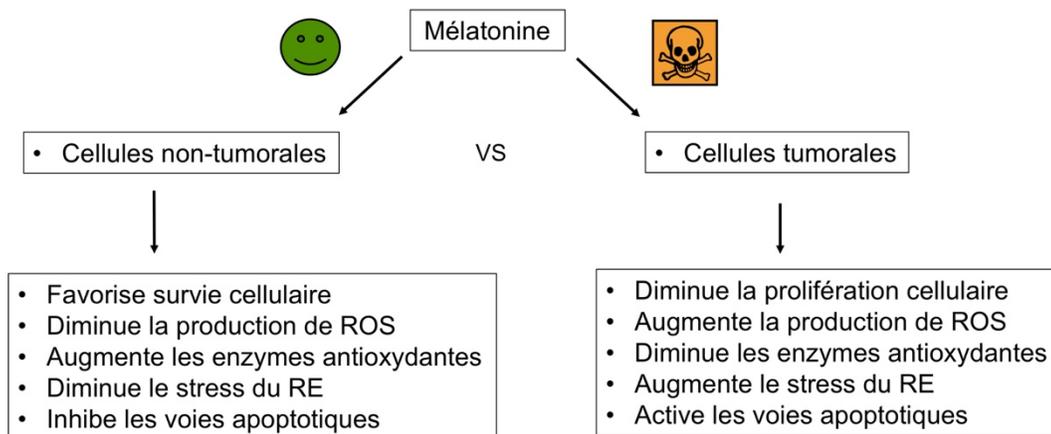


Figure 6.2 : Effet de la mélatonine dans les cellules non tumorales versus les cellules tumorales. La mélatonine favorise la survie dans les cellules non tumorales, en diminuant les ROS et les voies apoptotique, le stress du RE et augmentes les enzymes antioxydantes tandis que dans les cellules tumorales, la mélatonine diminue la prolifération cellulaire ainsi que les enzymes antioxydantes et augmente les ROS, le stress du RE et les voies apoptotiques.

CHAPITRE 7 : REFERENCES

- Aban M, Cinel L, Arslan M, Dilek U, Kaplanoglu M, Arpaci R & Dilek S (2004) Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *The Tohoku journal of experimental medicine* 204(3):195-202.
- ACOG (2002) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 99(1):159-167.
- Ahner A & Brodsky JL (2004) Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* 14(9):474-478.
- al-Lamki RS, Skepper JN & Burton GJ (1999) Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study. *Hum Reprod* 14(2):496-504.
- Alsat E, Malassiné A, Tarrade A, Merviel P & Evain-Brion D (1999) *Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste*. EDK, FRANCE. 1236-1243 p
- Antolín I, Mayo JC, Sainz RMA, del Brío MadIA, Herrera F, Martín V & Rodríguez C (2002) Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain research* 943(2):163-173.
- Aplin JD (1991) Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99 (Pt 4):681-692.
- Arnaudeau S, Arboit P, Bischof P, Shin-ya K, Tomida A, Tsuruo T, Irion O & Cohen M (2009) Glucose-regulated protein 78: a new partner of p53 in trophoblast. *Proteomics* 9(23):5316-5327.
- B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P & Bruhat A (2013) The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 41(16):7683-7699.
- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD & Poeggeler B (1995) Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry international* 26(5):497-502.
- Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA & Rodriguez AB (2011a) Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 108(1):14-20.
- Bejarano I, Espino J, Marchena AM, Barriga C, Paredes SD, Rodriguez AB & Pariente JA (2011b) Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Molecular and cellular biochemistry* 353(1-2):167-176.
- Bejarano I, Monllor F, Marchena AM, Ortiz A, Lozano G, Jimenez MI, Gaspar P, Garcia JF, Pariente JA, Rodriguez AB & Espino J (2014) Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *Journal of pineal research* 57(3):333-339.
- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D & Guerrero JM (1996) Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *Journal of pineal research* 20(4):205-210.

- Bhandary B, Marahatta A, Kim HR & Chae HJ (2013) An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *Int J Mol Sci* 14(1):434-456.
- Bishnupuri K & Haldar C (1999) Maternal photoperiodic exposures alter the neonatal growth, pineal functions and sexual development of the Indian palm squirrel *F. pennanti*. *Journal of neural transmission* 106(9-10):869-881.
- Bishnupuri K & Haldar C (2000) Profile of organ weights and plasma concentrations of melatonin, estradiol and progesterone during gestation and post-parturition periods in female Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. *Indian journal of experimental biology* 38(10):974-981.
- Bishnupuri K & Haldar C (2001) Maternal transfer of melatonin alters the growth and sexual maturation of young Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. *Neurosignals* 10(5):317-325.
- Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N & Huppertz B (2004) Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 11(1):90-98.
- Bonilla E, Valero N, Chacin-Bonilla L & Medina-Leendertz S (2004) Melatonin and viral infections. *Journal of pineal research* 36(2):73-79.
- Brash AR (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274(34):23679-23682.
- Brosens IA, Robertson WB & Dixon HG (1972) The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1:177-191.
- Brown MK & Naidoo N (2010) The UPR and the anti-oxidant response: relevance to sleep and sleep loss. *Molecular neurobiology* 42(2):103-113.
- Bubenik GA (2002) Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive diseases and sciences* 47(10):2336-2348.
- Budhreja V & Sadovsky Y (2006) Microarray analysis of trophoblast cells. *Methods Mol Med* 121:411-424.
- Bulleid NJ (2012) Disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(11).
- Burton GJ & Caniggia I (2001) Hypoxia: implications for implantation to delivery-a workshop report. *Placenta* 22 Suppl A:S63-65.
- Burton GJ & Yung HW (2011) Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens* 1(1-2):72-78.
- Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T & Charnock-Jones DS (2009) Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta* 30 Suppl A:S43-48.
- Carloni S, Albertini MC, Galluzzi L, Buonocore G, Proietti F & Balduini W (2014) Melatonin reduces endoplasmic reticulum stress and preserves sirtuin 1 expression in neuronal cells of newborn rats after hypoxia-ischemia. *Journal of pineal research* 57(2):192-199.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ & Reiter RJ (2005) A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27(2):189-200.
- Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE & James JL (2010) Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction* 140(6):803-813.

- Champier J, Claustrat B, Besancon R, Eymin C, Killer C, Jouvet A, Chamba G & Fevre-Montange M (1997) Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyltransferase mRNAs in human blood platelets. *Life sciences* 60(24):2191-2197.
- Chen YY, Wu ML, Kao MH, Su TH & Chen CP (2009) Perinatal outcome of recurrent pre-eclampsia versus pre-eclampsia in nulliparas. *J Obstet Gynaecol Res* 35(6):1042-1046.
- Choi SI, Dadakhujaev S, Ryu H, Im Kim T & Kim EK (2011) Melatonin protects against oxidative stress in granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts by mechanisms that involve membrane melatonin receptors. *Journal of pineal research* 51(1):94-103.
- Chung CY, Khurana V, Auluck PK, Tardiff DF, Mazzulli JR, Soldner F, Baru V, Lou Y, Freyzon Y & Cho S (2013) Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science* 342(6161):983-987.
- Cindrova-Davies T (2009) Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta* 30 Suppl A:S55-65.
- Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS & Burton GJ (2007a) Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol* 170(5):1511-1520.
- Cindrova-Davies T, Yung HW, Johns J, Spasic-Boskovic O, Korolchuk S, Jauniaux E, Burton GJ & Charnock-Jones DS (2007b) Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol* 171(4):1168-1179.
- Colla E, Coune P, Liu Y, Pletnikova O, Troncoso JC, Iwatsubo T, Schneider BL & Lee MK (2012) Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(10):3306-3320.
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M & Maestroni JM (2000) Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *Journal of pineal research* 28(4):193-202.
- Coppage KH & Polzin WJ (2002) Severe preeclampsia and delivery outcomes: is immediate cesarean delivery beneficial? *Am J Obstet Gynecol* 186(5):921-923.
- Cos S, Fernandez R, Guezmes A & Sanchez-Barcelo EJ (1998) Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer research* 58(19):4383-4390.
- Crocker IP, Barratt S, Kaur M & Baker PN (2001) The in-vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. *Placenta* 22(10):822-830.
- Crosley EJ, Elliot MG, Christians JK & Crespi BJ (2013) Placental invasion, preeclampsia risk and adaptive molecular evolution at the origin of the great apes: evidence from genome-wide analyses. *Placenta* 34(2):127-132.
- Cullinan SB & Diehl JA (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 279(19):20108-20117.
- Cullinan SB & Diehl JA (2006) Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38(3):317-332.

- Curtis S, Jones CJ, Garrod A, Hulme CH & Heazell AE (2013) Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26(4):339-346.
- Dara L, Ji C & Kaplowitz N (2011) The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53(5):1752-1763.
- Das A, Belagodu A, Reiter RJ, Ray SK & Banik NL (2008) Cytoprotective effects of melatonin on C6 astroglial cells exposed to glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Journal of pineal research* 45(2):117-124.
- Das A, McDowell M, Pava MJ, Smith JA, Reiter RJ, Woodward JJ, Varma AK, Ray SK & Banik NL (2010) The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4. 1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF- α toxicity involves membrane melatonin receptors. *Journal of pineal research* 48(2):157-169.
- Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103(2):239-252.
- Deegan S, Koryga I, Glynn SA, Gupta S, Gorman AM & Samali A (2015) A close connection between the PERK and IRE arms of the UPR and the transcriptional regulation of autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456(1):305-311.
- Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM & Samali A (2013) Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70(14):2425-2441.
- del Rio B, Garcia Pedrero JM, Martinez-Campa C, Zuazua P, Lazo PS & Ramos S (2004) Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem* 279(37):38294-38302.
- Dever TE (2002) Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108(4):545-556.
- Diedrich K, Fauser BC, Devroey P & Griesinger G (2007) The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 13(4):365-377.
- Dixon BM, Heath SH, Kim R, Suh JH & Hagen TM (2008) Assessment of endoplasmic reticulum glutathione redox status is confounded by extensive ex vivo oxidation. *Antioxid Redox Signal* 10(5):963-972.
- Dubocovich ML & Markowska M (2005) Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27(2):101-110.
- Ebelt H, Peschke D, Brömme HJ, Mörke W, Blume R & Peschke E (2000) Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *Journal of pineal research* 28(2):65-72.
- Espinoza J, Sebire NJ, McAuliffe F, Krampfl E & Nicolaides KH (2001) Placental villus morphology in relation to maternal hypoxia at high altitude. *Placenta* 22(6):606-608.
- Evain-Brion D (2001) [The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]. *Gynecol Obstet Fertil* 29(7-8):497-502.
- Fagundes LS, Maria E, Salustiano A, Yen PW & Vaillancourt C (2015) Melatonin regulates autophagy and inflammation in human trophoblastic cells. *Placenta* 36(9):A51-A52.
- Ferry G, Ubeaud C, Lambert PH, Bertin S, Coge F, Chomar P, Delagrangé P, Serkiz B, Bouchet JP, Truscott RJ & Boutin JA (2005) Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem J* 388(Pt 1):205-215.

- Fischer TW, Kleszczynski K, Hardkop LH, Kruse N & Zillikens D (2013) Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *Journal of pineal research* 54(3):303-312.
- Fradet S, Pierredon S, Ribaux P, Epiney M, Shin Ya K, Irion O & Cohen M (2012) Involvement of Membrane GRP78 in Trophoblastic Cell Fusion. *PLoS One* 7(8).
- Fu J, Zhao L, Wang L & Zhu X (2015) Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 54(1):19-23.
- Galano A, Tan DX & Reiter RJ (2013) On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of pineal research* 54(3):245-257.
- Garcia JJ, Lopez-Pingarron L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, Garcia-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramirez JM & Bernal-Perez M (2014) Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *Journal of pineal research* 56(3):225-237.
- Gauster M, Moser G, Orendi K & Huppertz B (2009) Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* 30 Suppl A:S49-54.
- Goswami P, Gupta S, Biswas J, Joshi N, Swarnkar S, Nath C & Singh S (2016) Endoplasmic reticulum stress plays a key role in rotenone-induced apoptotic death of neurons. *Molecular neurobiology* 53(1):285-298.
- Graham CH & Lala PK (1992) Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol* 70(10-11):867-874.
- Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressemeyer AR, Poeggeler B & Hardeland R (2005) Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *Journal of pineal research* 39(3):251-260.
- Gultekin F, Delibas N, Yasar S & Kilinc I (2001) In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol* 75(2):88-96.
- Hampton RY (2002) ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 14(4):476-482.
- Hardeland R (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27(2):119-130.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B & Tan DX (1993) The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 17(3):347-357.
- Harrington K, Goldfrad C, Carpenter RG & Campbell S (1997) Transvaginal uterine and umbilical artery Doppler examination of 12-16 weeks and the subsequent development of pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 9(2):94-100.
- Heazell AE, Lacey HA, Jones CJ, Huppertz B, Baker PN & Crocker IP (2008) Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast. *Placenta* 29(2):175-186.

- Hernandez-Diaz S, Toh S & Cnattingius S (2009) Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ* 338:b2255.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y & Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165(3):347-356.
- Hobson SR, Lim R, Gardiner EE, Alers NO & Wallace EM (2013) Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by pre-eclampsia (PAMPR): study protocol. *BMJ open* 3(9):e003788.
- Hoffman RA & Reiter RJ (1965) Pineal gland: influence on gonads of male hamsters. *Science* 148(3677):1609-1611.
- Holtz WA & O'Malley KL (2003) Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *Journal of Biological Chemistry* 278(21):19367-19377.
- Howarth C, Gazis A & James D (2007) Associations of Type 1 diabetes mellitus, maternal vascular disease and complications of pregnancy. *Diabet Med* 24(11):1229-1234.
- Hsu C, Han B, Liu M, Yeh C & Casida JE (2000) Phosphine-induced oxidative damage in rats: attenuation by melatonin. *Free radical biology & medicine* 28(4):636-642.
- Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ & Exton JH (2006) Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 26(8):3071-3084.
- Hung TH & Burton GJ (2006) Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 45(3):189-200.
- Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN & Burton GJ (2004) Secretion of Tumor Necrosis Factor- α from Human Placental Tissues Induced by Hypoxia-Reoxygenation Causes Endothelial Cell Activation in Vitro : A Potential Mediator of the Inflammatory Response in Preeclampsia. *The American Journal of Pathology* 164(3):1049-1061.
- Hung TH, Chen SF, Li MJ, Yeh YL & Hsieh TT (2010) Differential effects of concomitant use of vitamins C and E on trophoblast apoptosis and autophagy between normoxia and hypoxia-reoxygenation. *PLoS One* 5(8):e12202.
- Hung TH, Chen SF, Lo LM, Li MJ, Yeh YL & Hsieh TT (2012) Increased Autophagy in Placentas of Intrauterine Growth-Restricted Pregnancies. *PLOS ONE* 7(7):e40957.
- Hung TH, Skepper JN & Burton GJ (2001) In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am J Pathol* 159(3):1031-1043.
- Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS & Burton GJ (2002) Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res* 90(12):1274-1281.
- Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H & Kaufmann P (1999) Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79(12):1687-1702.

- 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.
- Jauniaux E, Ramsay B & Campbell S (1994) Ultrasonographic investigation of placental morphologic characteristics and size during the second trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 170(1 Pt 1):130-137.
- Jauniaux E, Van Oppenraaij RH & Burton GJ (2010) Obstetric outcome after early placental complications. *Curr Opin Obstet Gynecol* 22(6):452-457.
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN & Burton GJ (2000) Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157(6):2111-2122.
- Ji L, Brkic J, Liu M, Fu G, Peng C & Wang YL (2013) Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med* 34(5):981-1023.
- John R & Hemberger M (2012) A placenta for life. *Reprod Biomed Online* 25(1):5-11.
- Joo SS & Yoo YM (2009) Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *Journal of pineal research* 47(1):8-14.
- Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG & Neckers L (2003) Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 370(Pt 3):1011-1017.
- Kar M, Ghosh D & Sengupta J (2007) Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. *Hum Reprod* 22(11):2814-2823.
- Karimfar MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R & Bakhtiyari S (2015) The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *Int J Immunopathol Pharmacol* 28(1):69-76.
- Kaufmann P, Black S & Huppertz B (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69(1):1-7.
- Kennaway D, Flanagan D, Moore V, Cockington R, Robinson J & Phillips D (2001) The impact of fetal size and length of gestation on 6-sulphatoxymelatonin excretion in adult life. *Journal of pineal research* 30(3):188-192.
- Kim HS, Kim TJ & Yoo YM (2014) Melatonin Combined with Endoplasmic Reticulum Stress Induces Cell Death via the PI3K/Akt/mTOR Pathway in B16F10 Melanoma Cells. *PLOS ONE* 9(3):e92627.
- Kim I, Xu W & Reed JC (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7(12):1013-1030.
- Kivelä A (1991) Serum melatonin during human pregnancy. *Acta endocrinologica* 124(3):233-237.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM & Strauss JF, 3rd (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118(4):1567-1582.
- Koh W, Jeong SJ, Lee HJ, Ryu HG, Lee EO, Ahn KS, Bae H & Kim SH (2011) Melatonin promotes puromycin-induced apoptosis with activation of caspase-3 and 5'-adenosine

monophosphate-activated kinase-alpha in human leukemia HL-60 cells. *Journal of pineal research* 50(4):367-373.

Kupferminc MJ (2003) Thrombophilia and pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1:111-111.

Lanoix, Beghdadi H, Lafond J & Vaillancourt C (2008) Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *Journal of pineal research* 45(1):50-60.

Lanoix, Guerin P & Vaillancourt C (2012a) Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. *Journal of pineal research* 53(4):417-425.

Lanoix, Haché S, Dubé E, Lafond J & Vaillancourt C (2012b) Placental disorders in preeclampsia: maternal and perinatal outcomes.

Lanoix, Lacasse AA, Reiter RJ & Vaillancourt C (2012c) Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol* 348(1):1-11.

Lanoix, Lacasse AA, Reiter RJ & Vaillancourt C (2013) Melatonin: the watchdog of villous trophoblast homeostasis against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 381(1-2):35-45.

Lanoix, Ouellette R & Vaillancourt C (2006) Expression of melatonergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Hum Reprod* 21(8):1981-1989.

Le Bouteiller P (2001) HLA molecules, immunity and gestation. *Gynecol Obstet Fertil* 29(7-8):523-531.

Lee A-H, Iwakoshi NN & Glimcher LH (2003a) XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology* 23(21):7448-7459.

Lee AH, Iwakoshi NN & Glimcher LH (2003b) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23(21):7448-7459.

Lei K & Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5):2432-2437.

Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR & Tabas I (2009) Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 186(6):783-792.

Li J & Lee AS (2006) Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* 6(1):45-54.

Li M, Baumeister P, Roy B, Phan T, Foti D, Luo S & Lee AS (2000) ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF-Y and YY1. *Mol Cell Biol* 20(14):5096-5106.

Li XJ, Zhang LM, Gu J, Zhang AZ & Sun FY (1997) Melatonin decreases production of hydroxyl radical during cerebral ischemia-reperfusion. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica* 18(5):394-396.

Lin AM, Feng S, Chao P & Yang C (2009) Melatonin inhibits arsenite-induced peripheral neurotoxicity. *Journal of pineal research* 46(1):64-70.

Lin JH, Walter P & Yen TS (2008) Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 3:399-425.

- Lincoln GA & Short RV (1980) Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent progress in hormone research* 36:1-52.
- Liu F & Ng TB (2000) Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. *Biochem Cell Biol* 78(4):447-453.
- Loke YW & King A (2000) Immunology of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14(5):827-837.
- Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S & Galli F (2010) Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(10):3603-3624.
- Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E & von Dadelszen P (2014) Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. *J Obstet Gynaecol Can* 36(5):416-441.
- Malassine A (2001) [Morphological variability and placental function]. *Gynecol Obstet Fertil* 29(7-8):489-496.
- Malassine A, Frenzo JL & Evain-Brion D (2003) A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 9(6):531-539.
- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP & Ron D (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18(24):3066-3077.
- Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V & Rodriguez C (2002) Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59(10):1706-1713.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY & Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21(4):1249-1259.
- Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L & Reiter RJ (2010) Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Current medicinal chemistry* 17(36):4462-4481.
- Midgley AR, Pierce GB, Jr., Deneau GA & Gosling JR (1963) Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science* 141(3578):349-350.
- Milczarek R, Hallmann A, Sokolowska E, Kaletha K & Klimek J (2010) Melatonin enhances antioxidant action of alpha-tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Journal of pineal research* 49(2):149-155.
- Mitchell M, Bibby J, Sayers L, Anderson A & Turnbull A (1979) Melatonin in the maternal and umbilical circulations during human parturition. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 86(1):29-31.
- Mollaoglu H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Reiter RJ, Korkmaz A & Oter S (2007) Antioxidant effects of melatonin in rats during chronic exposure to hyperbaric oxygen. *Journal of pineal research* 42(1):50-54.
- Montilla P, Cruz A, Padillo FJ, Tunez I, Gascon F, Munoz MC, Gomez M & Pera C (2001) Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats. *Journal of pineal research* 31(2):138-144.

- 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. *J Clin Endocrinol Metab* 65(6):1282-1290.
- Myatt L & Cui X (2004) Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 122(4):369-382.
- Nakajima S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Saito Y, Kato H, Huang T, Yao J, Paton AW, Paton JC & Kitamura M (2011) Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF-kappaB through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBPbeta and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt. *Mol Cell Biol* 31(8):1710-1718.
- 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.
- Niles LP, Armstrong KJ, Castro LMR, Dao CV, Sharma R, McMillan CR, Doering LC & Kirkham DL (2004) Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC neuroscience* 5(1):41.
- Norwitz ER (2006) Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications. *Reprod Biomed Online* 13(4):591-599.
- Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrance P, Canet E & Boutin JA (2001) Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochemical pharmacology* 61(11):1369-1379.
- Oakes SA & Papa FR (2015) The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* 10:173-194.
- 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.
- Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S & Sagara Y (1998) Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *Journal of pineal research* 25(3):129-134.
- Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H & Huppertz B (2010) The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 140(5):759-766.
- Ozturk G, Coskun S, Erbas D & Hasanoglu E (2000) The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *The Japanese journal of physiology* 50(1):149-153.
- Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez R, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Acuna-Castroviejo D & Menendez-Pelaez A (1995) Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *Journal of pineal research* 19(3):111-115.
- Papageorghiou AT, Yu CK, Cicero S, Bower S & Nicolaidis KH (2002) Second-trimester uterine artery Doppler screening in unselected populations: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 12(2):78-88.
- Papp E, Nardai G, Mandl J, Bánhegyi G & Csermely P (2005) FAD oxidizes the ERO1-PDI electron transfer chain: The role of membrane integrity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(2):938-945.

- Park JH, Chung EJ, Kwon HJ, Im SS, Lim JG & Song DK (2013) Protective effect of melatonin on TNF- α -induced muscle atrophy in L6 myotubes. *Journal of pineal research* 54(4):417-425.
- Park JH, Shim HM, Na AY, Bae KC, Bae JH, Im SS, Cho HC & Song DK (2014) Melatonin prevents pancreatic β -cell loss due to glucotoxicity: the relationship between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Journal of pineal research* 56(2):143-153.
- Paternoster L, Radogna F, Accorsi A, Cristina Albertini M, Gualandi G & Ghibelli L (2009) Melatonin as a modulator of apoptosis in B-lymphoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 1171:345-349.
- Pfaffenbach KT & Lee AS (2011) The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Current opinion in cell biology* 23(2):150-156.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR & Guerrero JM (1997) Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *Journal of cellular biochemistry* 65(3):430-442.
- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P & Strasser A (2007) ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* 129(7):1337-1349.
- Rao RV, Ellerby HM & Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11(4):372-380.
- Reiter RJ (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9(7):526-533.
- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC & Tan DX (2009a) Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 44(4):175-200.
- Reiter RJ, Tan DX & Fuentes-Broto L (2010) Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 181:127-151.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC & Sainz RM (2009b) Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 81(3):445-456.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J & Czarnocki Z (2003) Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta biochimica Polonica* 50(4):1129-1146.
- Reshetnikova OS, Burton GJ & Milovanov AP (1994) Effects of hypobaric hypoxia on the fetoplacental unit: the morphometric diffusing capacity of the villous membrane at high altitude. *Am J Obstet Gynecol* 171(6):1560-1565.
- Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolin I, Zsizsik BK, Reiter RJ & Hardeland R (2003) Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox report : communications in free radical research* 8(4):205-213.
- Richart R (1961) Studies of placental morphogenesis. I. Radioautographic studies of human placenta utilizing tritiated thymidine. *Proc Soc Exp Biol Med* 106:829-831.
- Roberts JM & Hubel CA (1999) Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 354(9181):788-789.

- Rodesch F, Simon P, Donner C & Jauniaux E (1992) Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80(2):283-285.
- Ron D & Hubbard SR (2008) How IRE1 reacts to ER stress. *Cell* 132(1):24-26.
- Ron D & Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):519-529.
- Rosenstein RE, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM & Cardinali DP (2010) Melatonin as a therapeutic tool in ophthalmology: implications for glaucoma and uveitis. *Journal of pineal research* 49(1):1-13.
- Rouschop KM, Dubois LJ, Keulers TG, van den Beucken T, Lambin P, Bussink J, van der Kogel AJ, Koritzinsky M & Wouters BG (2013) PERK/eIF2alpha signaling protects therapy resistant hypoxic cells through induction of glutathione synthesis and protection against ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(12):4622-4627.
- Rzymiski T, Milani M, Singleton DC & Harris AL (2009) Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle* 8(23):3838-3847.
- Sagrillo-Fagundes L, Clabault H, Laurent L, Hudon-Thibeault AA, Salustiano EM, Fortier M, Bienvenue-Pariseault J, Wong Yen P, Sanderson JT & Vaillancourt C (2016) Human Primary Trophoblast Cell Culture Model to Study the Protective Effects of Melatonin Against Hypoxia/reoxygenation-induced Disruption. *J Vis Exp* 10.3791/54228(113).
- Sainz RM, Mayo JC, Tan D-X, Lopez-Burillo S, Natarajan M & Reiter RJ (2003) Antioxidant activity of melatonin in Chinese hamster ovarian cells: changes in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302(3):625-634.
- San-Miguel B, Crespo I, Sánchez DI, González-Fernández B, Ortiz de Urbina JJ, Tuñón MJ & González-Gallego J (2015) Melatonin inhibits autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis. *Journal of pineal research* 59(2):151-162.
- Schewe DM & Aguirre-Ghiso JA (2008) ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30):10519-10524.
- Schneider H (2011) Oxygenation of the placental-fetal unit in humans. *Respir Physiol Neurobiol* 178(1):51-58.
- Scholz H, Yndestad A, Damas JK, Waehre T, Tonstad S, Aukrust P & Halvorsen B (2003) 8-isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res* 59(4):945-954.
- Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C & Casanueva FF (1997) Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138(10):4501-4504.
- Shang B, Shi H, Wang X, Guo X, Wang N, Wang Y & Dong L (2016) Protective effect of melatonin on myenteric neuron damage in experimental colitis in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 30(2):117-127.
- Shin JK, Jeong YT, Jo HC, Kang MY, Chang IS, Baek JC, Park JK, Lee SA, Lee JH, Choi WS & Paik WY (2009) Increased interaction between heat shock protein 27 and mitogen-activated protein kinase (p38 and extracellular signal-regulated kinase) in pre-eclamptic placentas. *J Obstet Gynaecol Res* 35(5):888-894.
- Sibai BM (2002) Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 100(2):369-377.
- Skjaerven R, Wilcox AJ & Lie RT (2002) The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 346(1):33-38.

- Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J & Paus R (2008) Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19(1):17-24.
- Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS & Slominski AT (2012) Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 351(2):152-166.
- 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.
- Suh DH, Kim MK, Kim HS, Chung HH & Song YS (2012) Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1271(1):20-32.
- Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A & Niwa M (2012) ER stress activates NF- κ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS one* 7(10):e45078.
- Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan D-X, Sugino N & Reiter RJ (2008a) Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology* 25(3):291-303.
- Tamura H, Takayama H, Nakamura Y, Reiter RJ & Sugino N (2008b) Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *Journal of pineal research* 44(3):335-340.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R & Reiter RJ (2001) N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(12):2294-2296.
- Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM & Reiter RJ (2003) Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal of pineal research* 34(1):75-78.
- 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.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M & Hardeland R (2002) Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current topics in medicinal chemistry* 2(2):181-197.
- Teasdale F & Jean-Jacques G (1985) Morphometric evaluation of the microvillous surface enlargement factor in the human placenta from mid-gestation to term. *Placenta* 6(5):375-381.
- Tijmes M, Pedraza R & Valladares L (1996) Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 61(2):65-68.
- Tirasophon W, Welihinda AA & Kaufman RJ (1998) A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12(12):1812-1824.
- Todd DJ, Lee A-H & Glimcher LH (2008) The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8(9):663-674.
- Tomas-Zapico C & Coto-Montes A (2005) A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of pineal research* 39(2):99-104.

- Tosini G & Menaker M (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain research* 789(2):221-228.
- Tu BP & Weissman JS (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology* 164(3):341-346.
- Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Álvarez M, Prieto J & González-Gallego J (2013) Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of pineal research* 55(3):221-228.
- Tuuli MG, Longtine MS & Nelson DM (2011) Review: Oxygen and trophoblast biology--a source of controversy. *Placenta* 32 Suppl 2:S109-118.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP & Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287(5453):664-666.
- Vaillancourt C, Lanoix D, Le Bellego F, Daoud G & Lafond J (2009) Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. *Mini Rev Med Chem* 9(8):962-973.
- Venegas C, Garcia JA, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerrier C, Garcia-Corzo L, Lopez LC, Reiter RJ & Acuna-Castroviejo D (2012) Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of pineal research* 52(2):217-227.
- Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N & Fukaya T (2001) Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain. *Journal of pineal research* 31(2):167-172.
- Wang H, Li L, Zhao M, Chen YH, Zhang ZH, Zhang C, Ji YL, Meng XH & Xu DX (2011) Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced placental cellular stress response in mice. *Journal of pineal research* 50(4):418-426.
- Wang Y & Walsh SW (2001) Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 22(2-3):206-212.
- Wurtman RJ & Axelrod J (1965) The formation, metabolism, and physiologic effects of melatonin in mammals. *Progress in brain research* 10:520-529.
- Xu C, Bailly-Maitre B & Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115(10):2656-2664.
- Xu L, Jin QD, Gong X, Liu H & Zhou RX (2014) [Anti-gastric cancer effect of melatonin and Bcl-2, Bax, p21 and p53 expression changes]. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* 66(6):723-729.
- Xu L, Liu H, Zhang H, Wang RX, Song J & Zhou RX (2013) Growth-inhibitory activity of melatonin on murine foregastric carcinoma cells in vitro and the underlying molecular mechanism. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 296(6):914-920.
- Yamaguchi H & Wang HG (2004) CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 279(44):45495-45502.
- Yamamoto Dde R, Yamamoto Lde R, Rocha LP, Machado JR, Guimaraes CS, Reis MA & Correa RR (2013) Increase of placental sensitivity to melatonin and the alteration to its local synthesis in hypertensive syndromes in pregnancy. *Hypertension in pregnancy* 32(2):120-128.

- Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, Huang T, Nakajima S, Yao J, Paton AW, Paton JC & Kitamura M (2009) Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol* 183(2):1480-1487.
- Yoo YM & Jeung EB (2010) Melatonin suppresses cyclosporine A-induced autophagy in rat pituitary GH3 cells. *Journal of pineal research* 48(3):204-211.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T & Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107(7):881-891.
- Yung H-w, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS & Burton GJ (2008) Evidence of Placental Translation Inhibition and Endoplasmic Reticulum Stress in the Etiology of Human Intrauterine Growth Restriction. *The American Journal of Pathology* 173(2):451-462.
- Yung HW, Atkinson D, Campion-Smith T, Olovsson M, Charnock-Jones DS & Burton GJ (2014) Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Pathol* 234(2):262-276.
- Yusuf K, Smith SD, Sadovsky Y & Nelson DM (2002) Trophoblast differentiation modulates the activity of caspases in primary cultures of term human trophoblasts. *Pediatric research* 52(3):411-415.
- Zephy D & Ahmad J (2015) Type 2 diabetes mellitus: role of melatonin and oxidative stress. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 9(2):127-131.
- Zhang C, Li X-Y, Zhao L, Wang H & Xu D-X (2007) Lipopolysaccharide (LPS) up-regulates the expression of haem oxygenase-1 in mouse placenta. *Placenta* 28(8):951-957.
- Zhang K & Kaufman RJ (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454(7203):455-462.

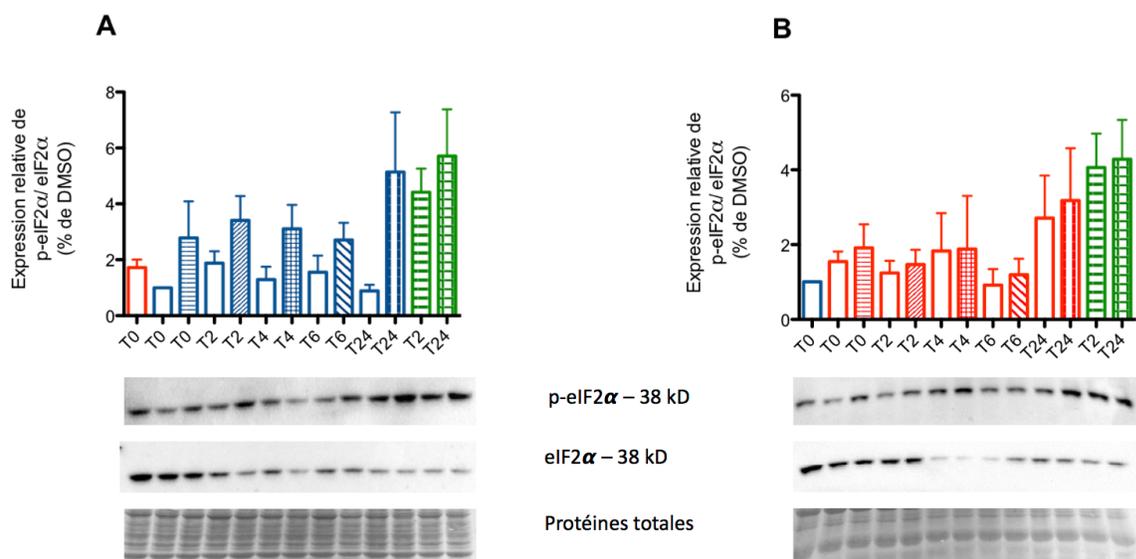


Figure 1 : Effet de la mélatonine sur l'expression la protéine eIF2α en condition de normoxie ou H/R de manière temps-dépendant. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 mM ou le véhicule témoin (DMSO à 0,1%) ou de la tunicamycine (3,5 µg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie (A) ou d'H/R (B) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec les anticorps anti-p-eIF2 et anti-eIF2α tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine p-eIF2α/eIF2α normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 0 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (± SEM) de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's. Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine. Voir les annexes.

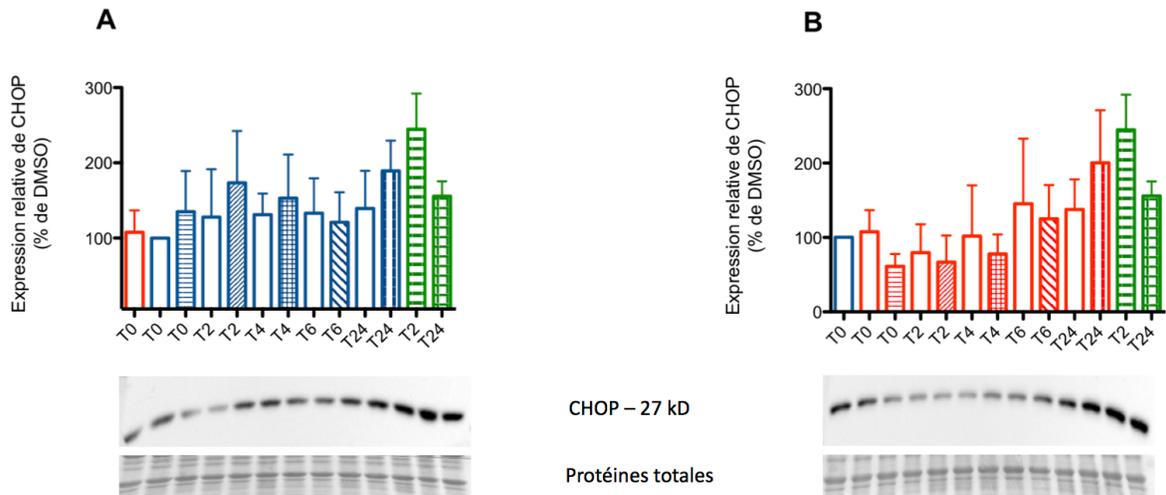


Figure II : Effet de la mélatonine sur l'expression la protéine CHOP en condition de normoxie ou H/R de manière temps-dépendant. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 mM ou le véhicule témoin (DMSO à 0,1%) ou de la tunicamycine (3,5 µg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie (A) ou d'H/R (B) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec les anticorps anti-CHOP tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine CHOP normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 0 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (\pm SEM) de 2 à 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's. Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.

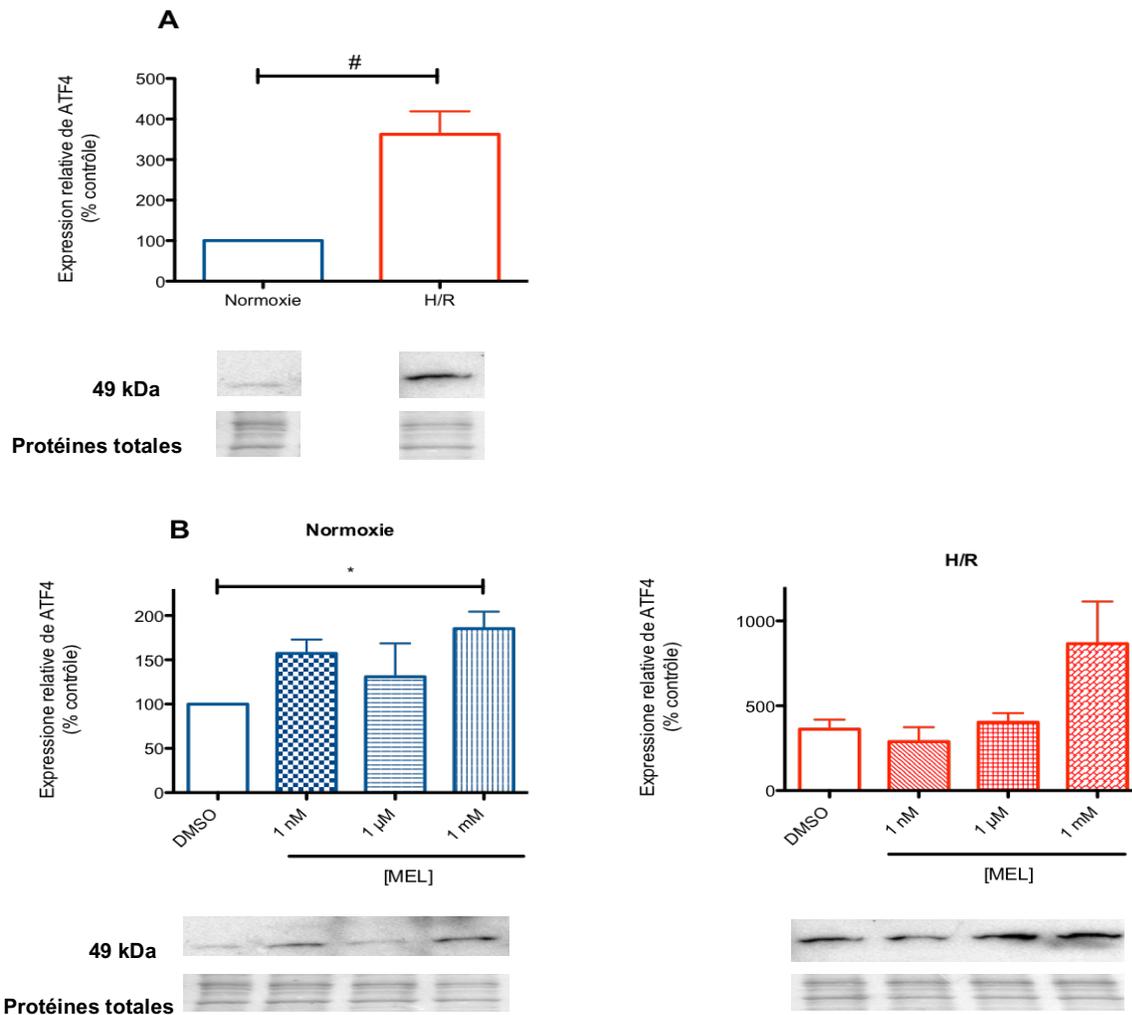


Figure III : Effet de l'hypoxie/réoxygénation et d'une concentration croissante mélatonine sur l'expression de la protéine ATF4. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 nM, 1 μM et 1 mM ou le véhicule témoin (0,1% DMSO) ou la tunicamycine (3,5 μg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie ou H/R pendant 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec l'anticorps anti-ATF4, tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine de GRP78 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode et photo représentative d'un immunobuvardage obtenue (A) en condition de normoxie vs H/R et (B) en condition de normoxie ou H/R en présence de concentrations-croissantes de mélatonine. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 24 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (± SEM) de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's ($*P < 0,05$) ou le test-t ($^{##}P < 0,01$). Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.

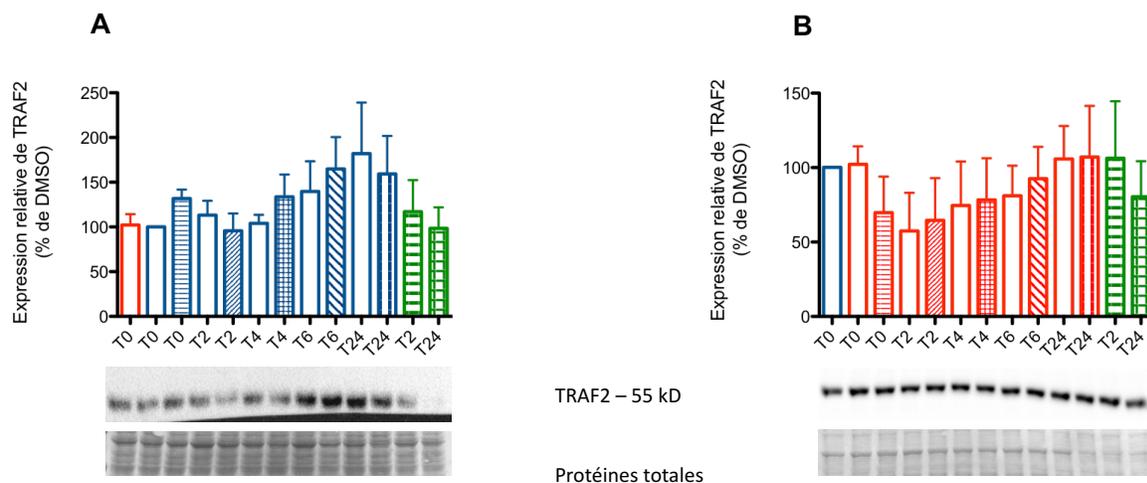


Figure IV : Effet de la mélatonine sur l'expression la protéine TRAF2 en condition de normoxie ou H/R de manière temps-dépendant. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 mM ou le véhicule témoin (DMSO à 0,1%) ou de la tunicamycine (3,5 µg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie (A) ou d'H/R (B) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec les anticorps anti-TRAF2 tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine TRAF2 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 0 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (\pm SEM) de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's. Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.

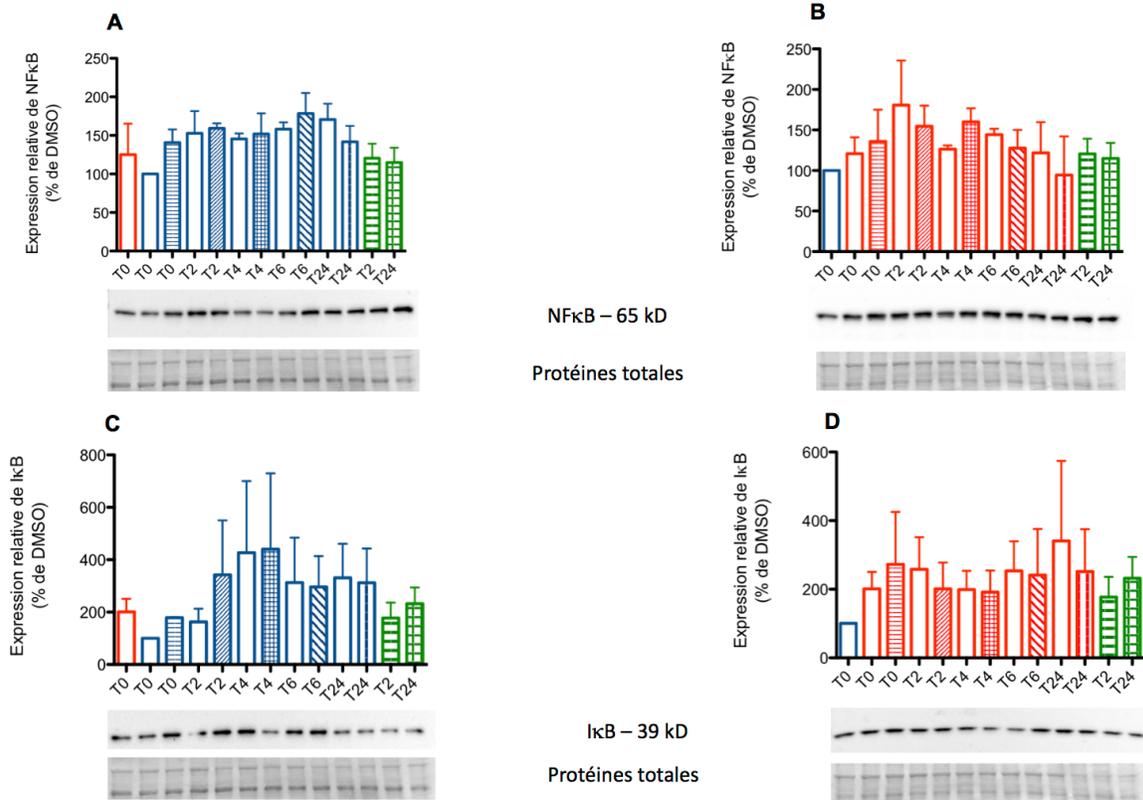


Figure V : Effet de la mélatonine sur l'expression des protéines NFκB et IκB en condition de normoxie ou H/R de manière temps-dépendant. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 mM ou le véhicule témoin (DMSO à 0,1%) ou de la tunicamycine (3,5 µg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie (A et B) ou d'H/R (C et D) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec les anticorps anti-p-p38 et anti-p38 tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine p-p38/p38 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 0 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (\pm SEM) de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's. Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.

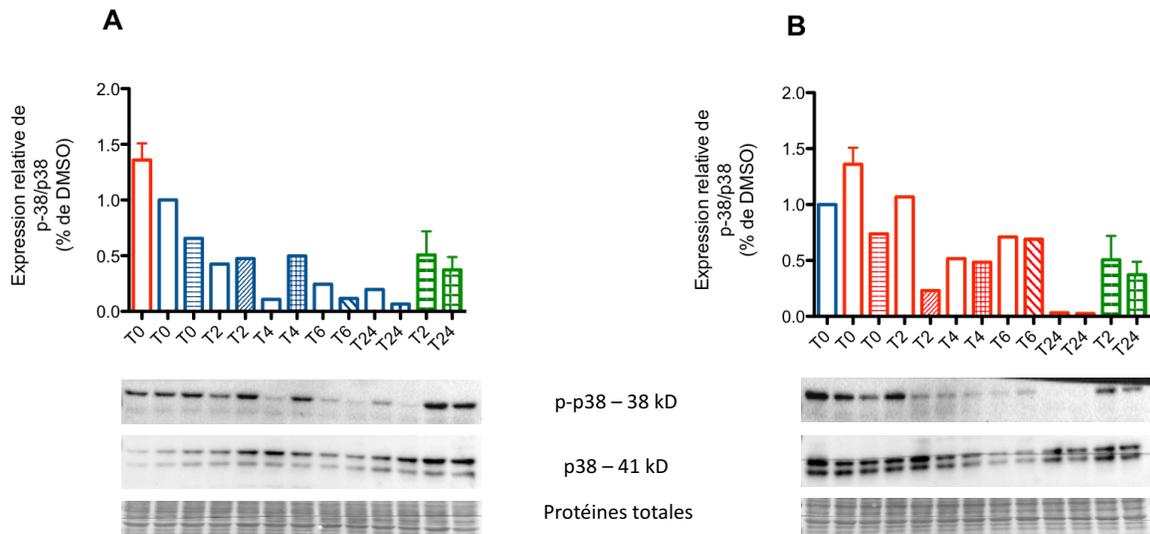


Figure VI : Effet de la mélatonine sur l'expression la protéine p38 en condition de normoxie ou H/R de manière temps-dépendant. Les cellules BeWo ont été traitées avec de la mélatonine à 1 mM ou le véhicule témoin (DMSO à 0,1%) ou de la tunicamycine (3,5 µg/ml ; contrôle positif) en condition de normoxie (A) ou d'H/R (B) pendant 0, 2, 4, 6 et 24 h. Les lysats de protéines ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (12%) puis transférés sur membrane de nitrocellulose et détectés avec les anticorps anti-p-p38 et anti-p38 tel que décrit dans la section méthodologie. Analyse semi-quantitative par densitométrie de l'expression de la protéine p-p38/p38 normalisée avec la coloration des protéines totales par MemCode. Les valeurs densitométriques sont exprimées en pourcentage du véhicule-témoin (DMSO en normoxie à 0 h ; valeur arbitraire de 100%). Les résultats représentent la moyenne (\pm SEM) de 1 expérience indépendante. L'analyse statistique comparativement aux véhicules-témoins a été réalisée par le test Kruskal-Wallis suivie du test post-hoc Dunn's. Les résultats du contrôle positifs n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques. Bleu : normoxie ; Rouge : H/R ; Vert : contrôle positif (tunicamycine) ; Colonne vide : DMSO ; Colonne hachurée : 1 mM mélatonine.