



L'ACADEMIE ROUMAINE



**INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE
"NICOLAE SIMIONESCU"**

THESE DE DOCTORAT

Résumé

**L'IMPLICATION DE L'ALARMINE HMGB1 DANS LES PROCESSUS
INFLAMMATOIRES ASSOCIÉS AUX DYSFONCTIONNEMENTS VASCULAIRES
DANS LE CADRE DE L'HYPERLIPIDÉMIE ET DU DIABÈTE EXPÉRIMENTAL**

Directeur de recherche:

Dr. FELICIA ANTOHE

Doctorante:

RALUCA MARIA BOTEANU

BUCAREST

2012

SOMMAIRE

Introduction

Première partie

L'ÉTAT ACTUEL DES RECHERCHES

I. HMGB1 – Classifications, Structure et Localisation

1. La famille des protéines *high mobility group* (HMG)

1.1. La famille des protéines HMGA

1.2. La famille des protéines HMGB

1.3. La famille des protéines HMGN

2. La structure de la protéine HMGB1

2.1. Les domaines HMG *box*

2.2. La région acide

2.3. Les modifications post-translationnelles

3. La distribution de la protéine HMGB1

3.1. La répartition HMGB1 au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire

3.2. La localisation extracellulaire de la protéine HMGB1

3.2.1. La sécrétion active

3.2.2. La libération passive

II. Les récepteurs de la protéine HMGB1 et la signalisation intracellulaire

1. Le récepteur des produits finaux de glycation avancée (RAGE)

2. Les récepteurs type *Toll*

3. Les protéoglycanes

4. La thrombomoduline

III. Les fonctions de la protéine HMGB1

1. La fonction nucléaire

2. La fonction de l'alarmine

2.1. Les effets pro-inflammatoires de la protéine HMGB1

2.1.1. HMGB1, l'hyperlipidémie et l'athérosclérose

2.1.2. HMGB1 et le diabète de type 1

2.2. Les effets régénératifs de la protéine HMGB1

Conclusions

Deuxième partie

CONTRIBUTIONS ORIGINALES

1. But et objectifs

2. La méthodologie expérimentale

3. Les études expérimentales

I. Le déclenchement, l'entretien et l'arrêt du processus inflammatoire initié par la protéine HMGB1 dans l'hyperlipidémie expérimentale

Introduction

Méthode expérimentale

1. L'analyse des paramètres biochimiques et des modifications morphologiques induites par l'hyperlipidémie.

Discussions

Conclusions

2. La diète hyperlipidémique stimule la libération de la protéine HMGB1

2.1. La détection de la protéine HMGB1 dans le sérum

2.2. La localisation subcellulaire de la protéine HMGB1 dans le tissu cardiaque

2.3. La répartition subcellulaire de la protéine HMGB1 dans le tissu pulmonaire.

Discussions

Conclusions

3. La signalisation par HMGB1 dans des conditions de stress hyperlipidémique

3.1. La détection du niveau du récepteur RAGE, de la kinase AKT1 et de son degré de phosphorylation dans le tissu cardiaque

3.2. L'identification et la quantification RAGE, AKT1 et phospho-AKT1 dans le tissu pulmonaire

Discussions

Conclusions

4. L'effet produit par la fluvastatine sodique sur la protéine HMGB1 dans l'hyperlipidémie induite expérimentalement.

4.1. L'expression génique et le niveau de la protéine HMGB1 dans le sérum et dans les tissus (cœur et poumon)

4.2. Quantification du récepteur RAGE dans le tissu cardiaque et pulmonaire.

4.3. La détermination du niveau d' AKT1 et phospho -AKT1 dans le tissu cardiaque et pulmonaire

Discussions

Conclusions

II. La modulation de l'expression des protéines et de l'alarmine HMGB1 dans les macrophages activés avec du sérum hyperlipidémique

Introduction

Méthode expérimentale

1. La répartition des lipides dans les macrophages U937 activés avec du sérum hyperlipidémique

Discussions

Conclusions

2. L'expression protéique de l'alarmine HMGB1 dans les macrophages U937 qui sont activés.

Discussions

Conclusions

3. L'immunodétection du récepteur RAGE et la caractérisation du rapport AKT1/ phospho-AKT1 dans les macrophages activés

Discussions

Conclusions

III. L'augmentation de l'expression de la protéine HMGB1 au niveau génique et protéique induit et maintient l'inflammation pulmonaire dans le cas du diabète sucré de type 1

Introduction

Méthode expérimentale

1. Preuves biochimiques et morphologiques associées au diabète de type 1
expérimentalement induit.

Discussions

Conclusions

2. L'expression génique et la distribution subcellulaire de la protéine HMGB1
dans le tissu pulmonaire

Discussions

Conclusions

3. L'identification des systèmes de signalisation activés par HMGB1 dans le tissu
pulmonaire des souris ayant un diabète expérimental de type 1
 - 3.1 L'évaluation de l'expression protéique du récepteur RAGE
 - 3.2 La quantification du niveau de phosphorylation d'AKT
 - 3.3 L'expression protéique du facteur de transcription NF-kB

Discussions

Conclusions

4. Conclusions générales

Bibliographie

La liste des ouvrages publiés et communiqués

MOTS-CLÉS

HMGB1

L'ALARMINE

PROCESSUS INFLAMMATOIRES

HYPERLIPIDÉMIE

DIABÈTE TYPE 1

RAGE

AKT1

NK-kB

SYSTÈME CARDIO-PULMONAIRE

*

Dans le résumé ci-dessous, sont présentés brièvement les objectifs, la méthodologie et les conclusions envisagées sur la base des résultats obtenus des études présentées dans la deuxième partie de la thèse, le chapitre CONTRIBUTIONS ORIGINALES.

✚ But et objectifs

But:

Les études effectuées dans cette thèse visent à rendre compte du rôle et de la manière dont la protéine HMGB1 intervient dans le processus inflammatoire installé dans des conditions hyperlipidémiques – athérosclérotiques et de diabète type 1 expérimentalement induit.

Objectifs:

- a. L'analyse de la distribution cellulaire et subcellulaire de la protéine HMGB1 dans le système cardio-pulmonaire soumis au processus inflammatoire déjà existant dans des conditions hyperlipidémiques.
- b. La contribution de l'alarmine HMGB1 dans la signalisation cellulaire présente dans l'inflammation induite par le stress hyperlipidémique.
- c. L'étude de la protéine HMGB1 dans les macrophages activés par l'incubation au sérum hyperlipémique.
- d. L'analyse de la molécule HMGB1 du point de vue génique et protéique à la suite de l'administration du traitement avec fluvastine sodique aux animaux qui ont des plaques athérosclérotiques développées par une diète hyperlipidémique.
- e. L'évaluation de l'effet induit par l'administration de la fluvastine sodique sur les protéines de la cascade de signalisation initiée par HMGB1 pendant l'hyperlipidémie induite expérimentalement.
- f. L'investigation de la localisation de la protéine HMGB1 dans le tissu pulmonaire soumis à l'hyperglycémie de stress du diabète sucré type 1.

g. La détection des moyens de signalisation activés par l'alarmine HMGB1 dans le pulmonaire diabétique.

✚ Méthodologie expérimentale

1. Modèles expérimentales
 - 1.1 Le hamster hyperlipidémique
 - 1.2 Les souris ayant un diabète type 1 induit expérimentalement
 - 1.3 Les cultures cellulaires
2. Cryosections
3. Microscopie électronique
4. Déterminations biochimiques
5. La technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)
6. L'extraction de protéines
7. L'électrophorèse SDS-PAGE
8. Technique Western blot
9. L'isolation ARN total
10. Real Time PCR semi-quantitative
11. L'analyse statistique

✚ Conclusions générales

Les résultats des études effectuées dans cette recherche ont montré que:

- 1 – La diète hyperlipidémique peut induire la libération de l'alarmine HMGB1 dans le sérum, en lui attribuant le statut de marqueur des événements athérosclérotiques déclenchés ultérieurement par l'état hyperlipidémique.
- 2 – L'expression génique accrue et le niveau protéique élevé de l'alarmine HMGB1 dans l'extrait protéique qui provient du cœur des animaux hyperlipidémiques , indiquent l'existence du processus inflammatoire au niveau de cet organe.
- 3 – Le poumon des animaux hyperlipidémiques a montré une croissance de l'expression génique et un niveau élevé de la protéine HMGB1 dans les deux

fractions protéiques subcellulaires analysées, tout en signalant la présence de l'inflammation tissulaire.

- 4 – La liaison démontrée entre HMGB1 et l'hyperlipidémie expérimentale offre à l'alarmine le statut de cible incontestable de la stratégie thérapeutique utilisée afin d'améliorer l'état clinique du patient et également pour une évolution positive du patient.
- 5 – Dans le tissu cardiaque et pulmonaire l'expression protéique accrue de la protéine HMGB1 entre en corrélation positive avec le niveau élevé du récepteur RAGE et avec la forte phosphorylation de la kinase AKT. Toutes ces données nous fournissent la possibilité d'affirmer que dans le cas des animaux hyperlipidémiques, l'interaction HMGB1 – RAGE peut maintenir le processus inflammatoire par l'activation du système de signalisation PI3K/ AKT.
- 6 – Les résultats obtenus apportent des informations nouvelles pour la compréhension des mécanismes qui sont à la base du processus inflammatoire déclenché par les perturbations du métabolisme lipidique et entretenu par la protéine HMGB1.
- 7 – L'administration de la fluvastine aux animaux qui ont subi au départ une diète hyperlipidémique a eu un effet positif au niveau du tissu cardiaque, effet traduit par l'arrivée de la molécule HMGB1 à un niveau génique semblable à celui détecté sur les animaux cobayes control.
- 8 – Le traitement avec la fuvastine a eu le même effet positif sur le récepteur RAGE et sur la kinase AKT1 phosphorylées. Ainsi, la conséquence majeure de ces événements moléculaires générés par l'action de la fluvastine est représentée par la diminution de la synthèse de novo des molécules pro-inflammatoires, inclus la RAGE et le HMGB1, ayant comme conséquence la diminution de l'inflammation tissulaire.
- 9 – Une autre nouveauté que nous avons réussi à démontrer est représentée par la capacité de la fluvastine à réduire de manière significative la concentration sérique de l'alarmine HMGB1.

- 10 – Nous avons pu enregistrer la diminution de l'expression génique et protéique de la molécule HMGB1, dans le tissu pulmonaire chez les animaux control. Egalement, le niveau du récepteur RAGE et le degré de phosphorylation de la kinase AKT ont été diminués de manière significative, en troublant ainsi l'interaction HMGB1-RAGE et implicitement la signalisation par PI3K/AKT, qui active le facteur de transcription NF-kB. Ainsi, le niveau des cytokines pro-inflammatoires diminuera et le processus inflammatoire perdra également son intensité.
- 11 – Les expérimentations effectuées apportent des nouvelles preuves qui soutiennent l'hypothèse que l'alarmine HMGB1 fonctionne comme un médiateur de l'inflammation systémique générée pendant le stress hyperlipidémique.
- 12 – Le modèle expérimental *in vitro* proposé, s'intègre dans la catégorie des modèles utilisés dans l'étude des cellules spumeuses qui sont à l'origine du processus d'athérosclérose.
- 13 – Le sérum hyperlipidémique induit la translocation de l'alarmine HMGB1 du noyau en cytoplasme, processus démontré par la quantité significativement réduite de HMGB1 dans le noyau mais élevée dans le cytoplasme des macrophages pour qu'à la fin HMGB1 soit sécrétée dans le milieu extracellulaire.
- 14 – Les résultats obtenus rendent possible l'introduction de la protéine HMGB1 sur la liste de cytokines impliqués dans la pathogénie de l'athérosclérose, tout en ayant en vue sa relocalisation subcellulaire dans les macrophages chargés de lipides ce qui indique le rôle important de l'alarmine HMGB1 des étapes préliminaires au processus athérosclérotique.
- 15 – Les macrophages activés avec du sérum hyperlipidémique expriment sur leur surface le récepteur RAGE dans une quantité plus considérable que les cellules control. Dans le même contexte hyperlipidémique a été mis en évidence le système de signalisation PI3K/AKT chez les macrophages activés, par la phosphorylation de la kinase AKT à la thréonine de la position 308.

- 16 – Les résultats de l'étude *in vitro* représentent une preuve incontestable que HMGB1 est un médiateur important de l'inflammation déclenchée par le stress hyperlipidémique et que son blocage pourrait envisager un ralentissement du processus athérogénique.
- 17 Les animaux doubles transgéniques ont souffert pendant 8 semaines de divers déséquilibres métaboliques et somatiques qui ont conduit à l'installation du diabète sucré type 1, en représentant ainsi, un choix conforme aux exigences de l'expérimentation.
- 18 – Les modifications biochimiques produites aux animaux dTg, représentées surtout par le niveau glycémique élevé ont généré à ces animaux un manque d'énergie expliqué par le manque de l'insuline qui assure le nécessaire énergétique des cellules. Cet état a amené implicitement à une perte de poids de ces animaux diabétiques.
- 19 – La morphologie atypique de l'endothélium vasculaire pulmonaire détectée chez les souris dTg et le niveau élevé de la protéine HMGB1 dans le poumon diabétique expliqués par synthèse élevée de HMGB1 et par sa translocation du noyau vers le cytosol, indiquent l'existence du processus inflammatoire au niveau de ce tissu.
- 20 – Le processus inflammatoire mis en évidence dans le poumon diabétique, est maintenu et par la suite amplifié par les systèmes de signalisation activés par l'alarmine HMGB1. Ainsi, nous n'avons pas signalé seulement le niveau élevé du récepteur RAGE dans le tissu pulmonaire des souris mais aussi, son activation mise en évidence par la phosphorylation de la kinase AKT1 et par le niveau élevé de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B. Etant donné le fait que le facteur nucléaire kappa b est impliqué dans la synthèse de novo du récepteur RAGE mais aussi de l'alarmine HMGB1, nous considérons que dans le poumon diabétique est induit un état inflammatoire qui peut acquérir l'ampleur nécessaire afin de produire des modifications histologiques tissulaires et ainsi, d'affecter la fonction pulmonaire.

21 – A la lumière de ces données de même qu’aux implications qu’elles entraînent, des éventuelles thérapies qui ciblent le blocage de l’alarmine HMGB1 pourraient être essentielles dans la diminution des complications cardio-vasculaires associées à l’hyperlipidémie et au diabète.