

Université de Montréal

Implication de HMGB1 dans la différenciation des trophoblastes

par

Julia Lainer Palacios

Sciences Biomédicales, Université de Montréal

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise es Sciences (MSc)
en sciences biomédicales
option médecine expérimentale

Mai 2017

© Julia Lainer Palacios, 2017

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Implication de HMGB1 dans la différenciation des trophoblastes

Présenté par :
Julia Lainer Palacios

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Nickolaus Heveker, président-rapporteur
Dre Sylvie Girard, directrice de recherche
Dr Christopher Price, membre du jury

RÉSUMÉ

Le placenta est l'organe essentiel au succès de la grossesse et la différenciation des trophoblastes est fondamentale pour son bon fonctionnement. La présence d'une inflammation non contrôlée, habituellement induite par des médiateurs inflammatoires endogènes, est associée à plusieurs complications de la grossesse. *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), une protéine nucléaire qui peut avoir des actions inflammatoires lorsque sécrétée dans le milieu extracellulaire, est un des médiateurs inflammatoires endogènes augmentés lors des grossesses pathologiques. Cependant, la manière dont HMGB1 agit à l'interface materno-fœtale est encore inconnue. Ce travail de maîtrise a comme objectifs d'évaluer la concentration, la localisation subcellulaire et la sécrétion de HMGB1 lors de la différenciation des trophoblastes et d'étudier sa distribution dans le placenta de grossesses compliquées par une pré-eclampsie (PE).

Dans ces travaux, nous avons démontré une augmentation de la concentration nucléaire de HMGB1 lors de la différenciation spontanée des trophoblastes. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur d'histones déacétylases (c.-à-d. NaB) mène à une accumulation de HMGB1 dans le cytoplasme et favorise la différenciation, tandis que l'utilisation d'un inhibiteur de l'export nucléaire (c.-à-d. leptomycine) mène à une diminution de la différenciation. En ce qui concerne les grossesses compliquées par la PE, il y a une redistribution de HMGB1 avec une accumulation cytoplasmique. En conclusion, ces travaux démontrent l'association entre la modulation de HMGB1 et la différenciation des trophoblastes, bien que le lien causal reste à déterminer.

Mots clés: HMGB1, placenta, trophoblastes, différenciation, prééclampsie.

ABSTRACT

The placenta plays a crucial role during pregnancy and trophoblast differentiation is fundamental to its proper functioning. The absence of inflammation is also essential for the success of gestation, the presence of uncontrolled inflammation is associated with several pregnancy complications, such as preeclampsia (PE) and preterm delivery. High Mobility Group Box 1 (HMGB1), a nuclear protein that acts as a pro-inflammatory mediator when secreted into the extracellular media, is one of the endogenous inflammatory mediators increased during pathological pregnancies. However, the actions of HMGB1 at the materno-fetal interface are still unknown. The aim of this work was to evaluate the concentration, subcellular localization and secretion of HMGB1 during trophoblast differentiation and to evaluate the distribution of HMGB1 in the placenta from pregnancies complicated with PE.

In my studies I have shown an increase of HMGB1's nuclear concentration during the spontaneous differentiation of trophoblasts. Moreover, the use of a histone deacetylase inhibitor (i.e. NaB) leads to an accumulation of HMGB1 in the cytoplasm and promotes differentiation, while the use of a nuclear export inhibitor (i.e. leptomycin) leads to a decrease in differentiation. Concerning pregnancies complicated with PE, there is a redistribution of HMGB1 with cytoplasmic accumulation.

In conclusion, this work demonstrates the association between the modulation of HMGB1 localisation with trophoblasts differentiation, although the causal link remains to be determined.

Key words: HMGB1, pregnancy, placenta, trophoblasts, differentiation, preeclampsia.

TABLE DE MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DE MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
REMERCIEMENTS	x
CHAPITRE I	1
1.1. Grossesse & Placenta	1
1.2. Inflammation	5
1.3. Inflammation et grossesse	6
1.4 HMGB1	9
1.4.1. HMGB1 nucléaire	11
1.4.2. HMGB1 cytoplasmique	13
1.4.3. HMGB1 dans le milieu extracellulaire	14
1.4.4. HMGB1 et grossesse	17
1.5 Hypothèse et Objectifs	21
CHAPITRE II	22
2. Méthodes	22
2.1. Culture cellulaire	22
2.1.1. Lignée cellulaire de trophoblaste (cellules BeWo)	22
2.2. Différenciation des cellules BeWo	24
2.3. Identification de la localisation cellulaire de HMGB1	24
2.4. Extraction de protéines	26
2.4.1. Extraction de protéines totales	26

2.4.2. Extraction différentielle des protéines (séparation des protéines nucléaire et cytoplasmique)	26
2.5. Analyses moléculaires	28
2.5.1. Immunobuvardage de type western	28
2.5.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) pour la β -hCG et pour HMGB1	29
2.5.3. Évaluation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux	30
2.5.4. Essai MTT	31
2.6. Immunocytochimie (Cellules BeWo)	31
2.7. Immunofluorescence (IF)	32
2.8. Immunohistochimie (Explants placentaires)	33
2.9. Analyses et statistiques	34
CHAPITRE III	36
3. Résultats	36
3.1. Détermination des conditions de culture optimales pour la lignée cellulaire de trophoblastes (cellules BeWo)	36
3.2. Différenciation des cellules BeWo (lignée de trophoblastes): sécrétion de β -hCG	39
3.3. Variation de la concentration de HMGB1 lors de la différenciation des trophoblastes.	41
3.3.1. Variation de la concentration subcellulaire de HMGB1	46
3.4. Modulation de l'exportation extranucléaire de HMGB1	49
3.4.1. Viabilité cellulaire suite à l'exposition aux inhibiteurs (cellules BeWo)	49
3.4.2. Association entre la localisation subcellulaire de HMGB1 et la différenciation des trophoblastes.	58

3.5. HMGB1 dans le placenta provenant des grossesses compliquées avec la prééclampsie	59
CHAPITRE IV	61
4. Discussion	61
4.1. HMGB1 et les cellules BeWo	62
4.2. HMGB1 dans les explants placentaires	64
4.3. Modulation de l'exportation de HMGB1 dans les explants placentaires	67
4.4. HMGB1 et la prééclampsie	72
4.5. Perspectives	74
CHAPITRE V	77
5. Conclusion	77
CHAPITRE VI	78
6. Bibliographie	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématisée du placenta démontrant la localisation des villosités choriales, site d'échange entre le sang maternel et foetal.	2
Figure 2. Représentation schématique de la localisation, prolifération et différenciation des trophoblastes dans le villous placentaire.	4
Figure 3. Représentation schématique des fonctions de HMGB1.	11
Figure 4. Représentation schématique de la structure moléculaire de HMGB1.	16
Figure 5. Evaluation de la viabilité des cellules Bewo dans les différents milieux de culture.	39
Figure 6. Différenciation des cellules BeWo suite au traitement avec la forskoline.	41
Figure 7. Concentration et sécrétion de HMGB1 par les cellules BeWo.	42
Figure 8. Concentration de HMGB1 aux différents jours de culture des explants placentaires.	44
Figure 9. Localisation de HMGB1 dans les explants placentaires aux différents jours de culture.	45
Figure 10. Concentration sub-cellulaire de HMGB1 dans les cellules BeWo.	47
Figure 11. Quantification de HMGB1 dans les fractions subcellulaires dans les explants placentaires.	48
Figure 12. Evaluation de la viabilité des cellules BeWo par test MTT.	51
Figure 13. Pourcentage des cellules apoptotiques dans les explants placentaires.	53
Figure 14. Modulation de la concentration subcellulaire de HMGB1 dans les cellules BeWo.	55

Figure 15. Modulation de la concentration subcellulaire de HMGB1 dans les explants placentaires.	57
Figure 16. Sécrétion de β -hCG à la suite de la modulation de la localisation de HMGB1.	59
Figure 17. Localisation de HMGB1 dans le placenta lors de la prééclampsie.	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
c.-à-d.	C'est à dire
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR4	Récepteur de Chemokine C-X type 4
Ctrl	Contrôle
DAMPs	<i>damage associated molecular pattern</i> , fragments moléculaires associés aux dommages
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12
ELISA	Immunosorbant lié aux enzymes
EtOH	Éthanol
FBS	Sérum Foetal Bovin
FK	Forskolin
HDAC	Histone déacétylase
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
hPL	Lactogène Placentaire humain
ICC	Immunocytochimie
IF	Immunofluorescence
IHC	Immunohistochimie
IL	Interleukine
Lep	Leptomycine B

LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MTT	3— [4,5 — dimethylthiazol-2-yl]-2,5 — diphenyltetrazolium bromide
NaB	Butyrate de Sodium
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
NRL	récepteurs “Nod-like”
NSL	Site de liaison nucléaire
PAMPs	fragments moléculaires associés aux pathogènes
PBS	Solution Saline Tamponnée au Phosphate
PE	Prééclampsie
PI	Iodure de Propidium
pPROM	Rupture précoce des membranes
PRR	Récepteurs de Reconnaissance de Motif
PTB	Accouchement prématuré
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End product</i>
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
ROS	Espèces Réactives de l’oxygène
siARN	silence d’Acide Ribonucléique
TLR	<i>Receptor Toll like</i>
β-hCG	Gonadotrophine Chorionique humaine β

REMERCIEMENTS

Je voudrais, premièrement, remercier Ines Boufaied qui a aidé avec les résultats de ce mémoire. Elle m'a aussi donné beaucoup de support scientifique et personnel, ayant une contribution indispensable pour le déroulement de mes travaux. J'aimerais aussi remercier Virginie Gaudreault qui a également participé à la réalisation des résultats présentés dans ce mémoire. De plus, je remercie les autres membres du laboratoire, Marie-Ève Brien, Cyntia Duval et notre stagiaire d'été Stéphanie Delage, qui ont aussi participé du développement du projet, mais principalement pour avoir toujours contribué à créer une ambiance de travail agréable.

Finalement, je veux remercier énormément ma directrice, Dre Sylvie Girard, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, m'avoir donné un énorme support, m'avoir transmis beaucoup de connaissance et pour la confiance tout au long de ma maîtrise.

CHAPITRE I

1.1. Grossesse & Placenta

La reproduction, nécessaire à la propagation de la vie chez les placentaires, débute par la fécondation, suivie de la placentation puis la gestation. La fécondation a lieu lorsque le spermatozoïde pénètre efficacement l'ovule formant ainsi le zygote qui, au stade de blastocyste, s'implante dans l'endomètre réceptif (decidua) et débute la placentation. Le blastocyste est formé de deux masses cellulaires distinctes, soit la masse cellulaire interne qui formera le fœtus et le trophoctoderme qui formera le placenta (Hendwerger, 2010). Les cellules souches de trophoblastes contenues dans le trophoctoderme, peuvent se différencier en deux types de trophoblastes, soit en trophoblastes villosités formant la partie du placenta où se feront les échanges entre le sang maternel et fœtal, soit en trophoblastes extravilloux, qui sont responsables de l'implantation, du remodelage des artères spiralées utérines et participent aussi à l'angiogenèse du placenta (Hendwerger, 2010; Lunci *et al.*, 2007).

La formation du placenta débute lors qu'il y a un contact stable entre le blastocyste et la paroi utérine, entre les 6^e et 7^e jour post conception (p.c.). Au début de la période d'implantation, le blastocyste possède une couche interne composée du mésoderme extra-embryonnaire, provenant de la masse cellulaire interne, ainsi qu'une couche externe composée des trophoblastes. Le contact entre les trophoblastes et les cellules épithéliales utérines mène à un processus de différenciation pour former des cellules multinuclées (syncytiotrophoblastes). Dans les deux jours qui suivent, la couche de syncytiotrophoblastes croît significativement grâce à une constante dif-

férentiation des cytotrophoblastes et entre les jours 8 et 13 p.c. des petites vacuoles commencent à se former, ces vacuoles étant responsables de former l'espace intervillaire (entre jour 16 et 18 p.c.) où il aura du sang maternel. Les cytotrophoblastes en prolifération vont former des colonnes entre les vacuoles et au moment où ces cellules entre en contact avec le tissu maternel, elles vont s'engager dans un autre type de différenciation et former les trophoblastes invasifs ou trophoblastes extravillieux. En parallèle, les cytotrophoblastes que ne sont pas en contact avec le tissu maternel, vont continuer leur processus de syncytialisation et former les premières branches de l'arbre villositaire. Par la suite, les cellules du mésenchyme extrafoetal envahissent le villositaire et finalement les capillaires foetaux apparaissent et commencent les échanges entre le sang maternel et foetal (Benirschke *et al.* 2012).

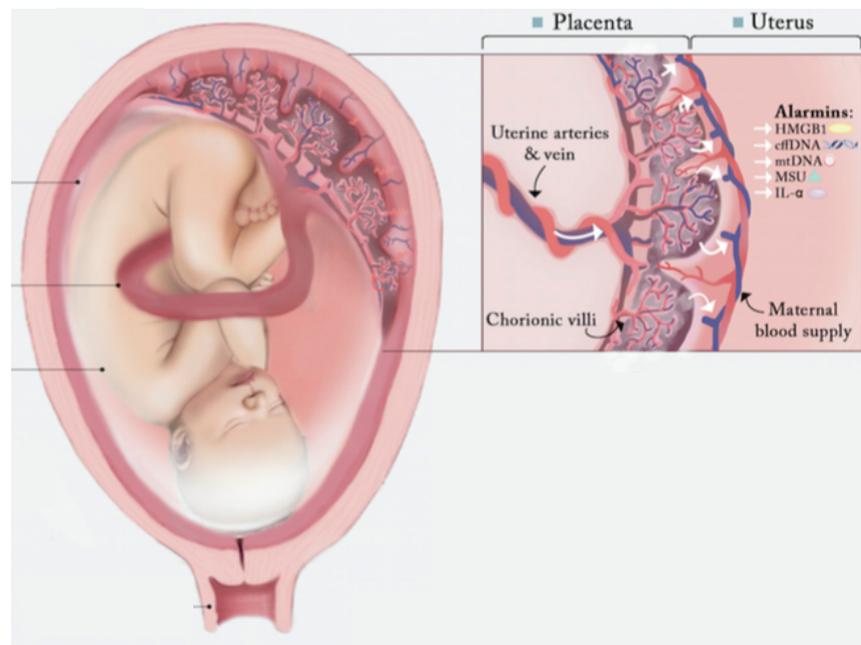


Figure 1. Représentation schématisée du placenta démontrant la localisation des villosités chorionales, site d'échange entre le sang maternel et foetal. Modifiée de Mathieu Nadeau-Vallée *et al.*, 2016.

Le placenta est l'organe central de la grossesse. Il est composé d'une face maternelle ou plaque basale rattachée à la paroi utérine, d'une face fœtale ou plaque chorale qui est en contact avec le liquide amniotique et, entre les deux, la chambre intervillieuse formée d'arborisation villositaire chorale (Voir figure 1). L'arbre vilieux, contenant les vaisseaux fœtaux, les macrophages placentaires résidents, ou cellules de Hofbauer, les cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes, qui tous ensemble forment un réseau complexe permettant les échanges avec le sang maternel et la protection de l'embryon (Hendwerger, 2010; Lunchi *et al.*, 2007; Donnelly et Campling, 2014).

Les cytotrophoblastes, cellules clés du placenta, tapissent la couche interne des villosités chorales. Ces cellules mononuclées se divisent et fusionnent pour former les syncytiotrophoblastes, cellules terminales non-prolifératives, qui recouvrent la couche externe des villosités (Hendwerger, 2010; Lunchi *et al.*, 2007, Donnelly et Campling, 2014). Le processus de différenciation et de fusion des cytotrophoblastes (figure 2), appelé syncytialisation, se poursuit tout au long de la grossesse et contribue au maintien de la barrière placentaire (Lei *et al.*, 2013).

Ainsi les syncytiotrophoblastes, en contact direct avec le sang maternel, assurent, dans un premier temps, des fonctions métaboliques en permettant l'apport en nutriments et en oxygène ainsi que l'élimination des déchets fœtaux (Hendwerger, 2010; Lunchi *et al.*, 2007, Donnelly et Campling, 2014, Ji *et al.*, 2013; Kingdom et Drewlo, 2011). L'oxygène, le glucose et les acides aminés, entre autres, arrivent au placenta par le sang de la mère et leur transport vers la circulation sanguine fœtale se fait par diffusion. À l'inverse le gaz carbonique et autres métabolites comme l'urée

qui viennent du sang foetal sont transférées au sang maternel pour leur élimination (Gude *et al.*, 2004; Donnelly et Campling, 2014). Les syncytiotrophoblastes exercent également une fonction endocrine par la sécrétion d'hormones nécessaires au bon déroulement de la grossesse, telles que la gonadotrophine chorionique humaine (β -hCG) et la lactogène placentaire (hPL), ainsi que des protéines procoagulantes (Ji *et al.*, 2013; Kingdom et Drewlo, 2011).

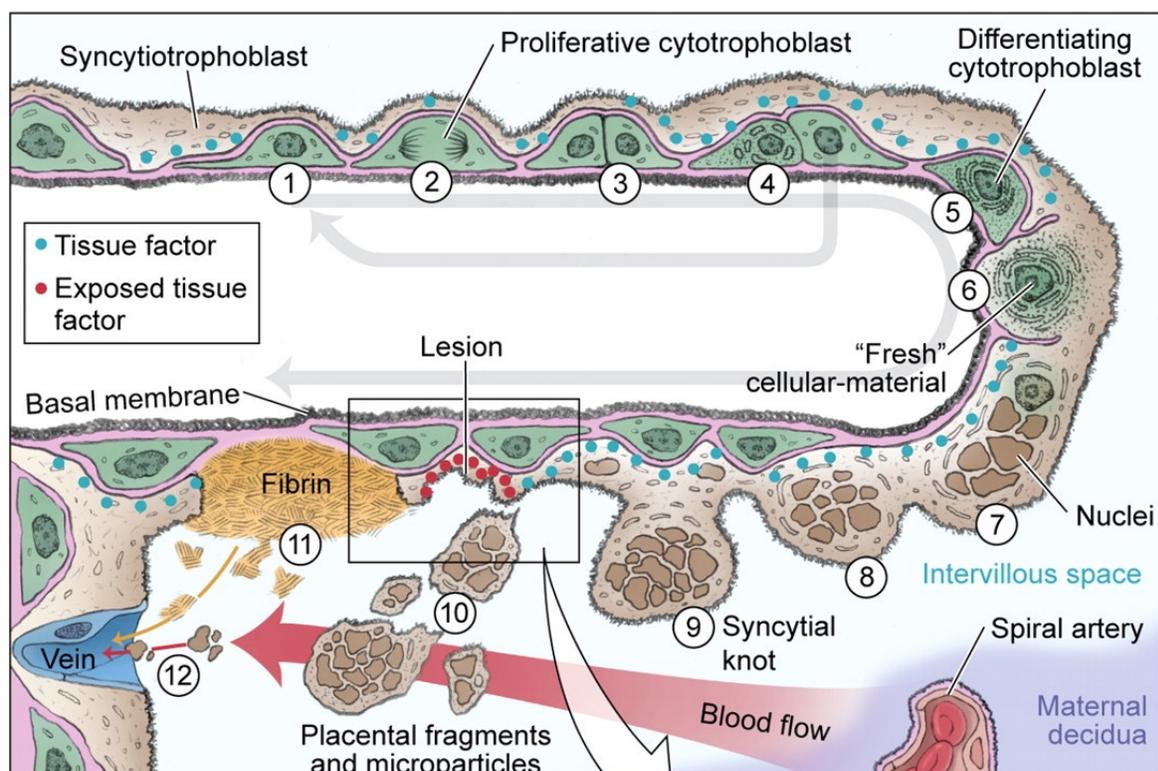


Figure 2. Représentation schématique de la localisation, prolifération et différenciation des trophoblastes dans le villous placentaire. Modifiée de John C. P. Kingdom et Sascha Drewlo. 2011.

Les hormones progestérone, lactogène placentaire (hPL) et gonadotrophine chorionique (β -hCG) sont produites par le placenta et sont associées à la régulation du profil inflammatoire pendant la grossesse (Challis *et al.*, 2009; Piccinni *et al.*,

2000). La sécrétion de progestérone est responsable du maintien de la quiescence du myomètre et contribue, entre autres, à la tolérance maternelle contre les antigènes fœtaux, tandis que le β -hCG est une hormone produite par les syncytiotrophoblastes importante pour le maintien du corps jaune et la sécrétion de progestérone durant le premier trimestre de la grossesse (Gude *et al.*, 2004; Donnelly et Campling, 2014).

Finalement, les syncytiotrophoblastes jouent un rôle immunologique et forment la première ligne de défense pour le fœtus fonctionnant comme une barrière protectrice contre les microorganismes exogènes et les substances toxiques (Gude *et al.*, 2004; Donnelly et Campling, 2014).

1.2. Inflammation

L'inflammation est une réponse naturelle du corps humain à la suite d'un stimulus. Cette stimulation peut être d'origine infectieuse induite par un pathogène exogène (ex. bactéries, virus), ou être causée par une molécule endogène, tel qu'à la suite d'un dommage tissulaire ou cellulaire induit par l'exposition à un environnement sous-optimal (ex. trauma physique ou chimique lors d'une fracture, obésité, auto-immunité, etc.). En présence d'un agent infectieux, le système immunitaire reconnaît les "*fragments moléculaires associés aux pathogènes*" (*pathogen associated molecular patterns* PAMPs) et déclenche une réponse immunitaire principalement via la stimulation des récepteurs "toll-like" (TLRs) (Chen et Nunez, 2010). Les PAMPs sont des séquences conservées, par exemple les lipoprotéines de la paroi des bactéries, qui vont

être reconnues par les cellules immunitaires. Ces dernières vont initier une réponse inflammatoire pour combattre et éliminer cette infection (Chen et Nunez, 2010).

L'inflammation peut aussi être induite en absence de pathogènes; on parle alors d'inflammation dite "stérile". Cette réponse inflammatoire est déclenchée suite à la reconnaissance par le système immunitaire des "*fragments moléculaires associés aux dommages — damaged associated molecular pattern*" (DAMPs) (Chen et Nunez, 2010). Les DAMPs sont des molécules endogènes relâchées par les cellules du soi. En condition physiologique, c.-à-d. normale, ces molécules sont contenues à l'intérieure des cellules et leurs niveaux extracellulaires sont minimales. Cependant, à la suite d'un stress, ces molécules peuvent être relâchées dans le milieu extracellulaire déclenchant ainsi une réponse immunitaire (Tang *et al.*, 2012). Les DAMPs stimulent les mêmes récepteurs que les PAMPs, soient les TLRs, ainsi que les récepteurs "Nod-like" (NLRs) faisant partie de la famille des *récepteurs de reconnaissance de motif* ("pattern recognition receptors" PRRs), de sorte que, peu importe le stimulus (DAMPs ou PAMPs), la réponse inflammatoire déclenchée sera similaire (Rubartelli et Lotze, 2007).

1.3. Inflammation et grossesse

L'inflammation stérile est importante particulièrement au début de la grossesse où elle est nécessaire pour une bonne implantation de l'embryon et le remodelage approprié des artères spiralées. Par la suite, tout au long du 2^e trimestre et la majeure partie du 3^e, le système immunitaire de la mère acquiert une tolérance aux an-

tigènes semi-allogéniques fœtaux et l'environnement materno-fœtal devient majoritairement anti-inflammatoire jusqu'à l'accouchement (Romero *et al.*, 2007). S'il y a absence d'adaptation du système immunitaire maternel, ou s'il y a survenue d'inflammation non contrôlée au cours de la gestation, ceci peut avoir des conséquences graves telles que l'accouchement prématuré (PTB), le retard de croissance intra-utérin (RCIU) ou la prééclampsie (PE) (Romero *et al.*, 2007; Challis *et al.*, 2009). L'inflammation non contrôlée durant la grossesse est associée à un changement du profil immunitaire de type majoritairement anti-inflammatoire à pro-inflammatoire qui se caractérise par la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , souvent observée dans des cas de complications de la grossesse tels que l'accouchement prématuré (Chaouat *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2014). Ce déséquilibre pro-inflammatoire est observé lors d'une infection et donc en présence d'un PAMP qui va induire l'activation de TLRs et mener à la libération de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Romero, *et al.* 2007; Challis *et al.*, 2009). Cependant, dans la majorité des complications de la grossesse, l'inflammation est observée sans agents infectieux détectables. C'est le cas de la majorité des grossesses avec PE, pathologie caractérisée principalement par une hypertension et qui est associée à une augmentation du risque de mortalité et morbidité maternelle ainsi qu'à d'autres complications de la grossesse tel que le RCIU et PTB (Uzan *et al.*, 2011; Chaiworapongsa *et al.*, 2014). Le profil immunitaire rencontré dans la PE est principalement un déséquilibre pro-inflammatoire maternel, profil qui est aussi observé lors de grossesse chez des femmes ayant subi un "stress". Coussons-Read *et al.*, 2007 ont suggéré une diminution de l'interleukine (IL)-10 (cytokine anti-inflammatoire) et une augmentation de l'IL-

6, qui est pro-inflammatoire, dans le sérum maternel de deuxième trimestre de gestation chez des femmes ayant vécues un stress psychosocial. Un profil similaire a également été observé dans le sérum des femmes atteintes de la PE (Coussons-Read *et al.*, 2007; Szarka *et al.*, 2010).

Le processus exact par lequel les complications de la grossesse se développent n'est pas encore complètement connu. Cependant, un élément commun à toutes ces complications est l'inflammation, particulièrement dans le placenta, qui s'accompagne d'un débalancement pro-inflammatoire avec libération de médiateurs pro-inflammatoires particulièrement des cytokines (Challis *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2007). En plus des cytokines, des médiateurs inflammatoires endogènes, c.-à-d. alarmines (DAMPs), sont aussi augmentés dans les complications de la grossesse. Parmi les DAMPs augmentés, il y a "high mobility group box 1" (HMGB1), l'acide urique et l'ADN fœtal libre (Romero *et al.*, 2007; Scharfe-Nugent *et al.*, 2009; Martin et Brown, 2010). L'augmentation de l'ADN fœtal libre a déjà été détecté dans l'accouchement prématuré (Farina *et al.*, 2005) et la prééclampsie (Levine *et al.*, 2004). Levine *et al.* (2004) suggèrent l'utilisation de l'ADN comme marqueur de la prééclampsie, car il semble avoir une légère augmentation de la molécule avant l'établissement de la maladie suivi d'une augmentation plus significative une fois la maladie est effectivement établi. L'ADN fœtal libre fonction comme un DAMP pour activer le TLR-9 qui mène à une transcription des cytokines proinflammatoires via la voie du NF- κ B, menant à l'inflammation présent dans les deux conditions pathologiques décrites précédemment (Scharfe-Nugent *et al.*, 2009). L'acide urique est un DAMP associé à la PE depuis les années 1980, l'augmentation de cette molécule est liée à l'hypertension,

dysfonctionnement rénal et endothélial présents lors de la PE, de plus il y a une corrélation positive entre l'augmentation de l'acide urique circulante et la sévérité de la pathologie (Martin et Brown, 2010). Lorsque l'acide urique est présente dans la circulation sanguine à des concentrations supérieures à 70 µg/ml, elle va former de cristaux qui vont activer l'inflammasome dans les cellules immunitaires et stimuler la production d'IL1-β induisant la réponse inflammatoire (Shi, 2010). Dernièrement, HMGB1 est une alarmine de plus en plus associées aux complications de la grossesse (Nadeau-Vallée *et al.*, 2016; Menon *et al.*, 2016; Girard *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2007) dont le rôle à l'interface materno-fœtal est toujours peu connu, mais ces caractéristiques vont être discutées dans la section suivante..

1.4 HMGB1

La famille de protéines *High Mobility Group Box* est une famille de protéines nucléaires bien conservées au long de l'évolution. Celle-ci est composée de trois membres, soit HMGB1, HMGB2 et HMGB3 parmi lesquels HMGB1 est le seul exprimé de manière ubiquitaire dans toutes les cellules nucléées (Yanai *et al.*, 2012; Castiglione *et al.*, 2011). Les trois membres de la famille HMGB possèdent une structure similaire (80% de similarité) présentant deux domaines de liaison nucléaire qui sont connus comme étant les boîtes A et B, ainsi qu'une queue terminale acide chargée négativement (C-tail) (Yang *et al.*, 2013; Yanai *et al.*, 2012; Castiglione *et al.*, 2011). HMGB2 est présent principalement dans les testicules et organes lymphoïdes, mais son action principale intervient pendant le développement embryonnaire. HMGB3 est aussi impliqué dans l'embryogenèse et est exprimé dans cellules hématopoïétiques

de la moelle osseuse chez les adultes (Yanai *et al.*, 2012; Castiglione *et al.*, 2011, Bianchi et Agresti, 2005).

HMGB1 est une protéine retrouvée dans le noyau de tous les types cellulaires. Il se lie à l'ADN de façon non spécifique et agit principalement comme régulateur de la transcription. Il est aussi impliqué dans la réparation et la réplication de l'ADN (Yang *et al.*, 2013). Le rôle nucléaire de HMGB1 va être discuté en détail ci-dessous. Lorsque les lysines des sites de localisation nucléaire (NLS) sont acétylées, HMGB1 est transloqué vers le cytoplasme puis sécrété dans le milieu extracellulaire où il aura des actions immunitaires, détaillées dans la section 1.4.2 ().

HMGB1 est le seul membre de la famille qui est impliqué dans la réponse immunitaire comme DAMP ou par son rôle de cytokine. La boîte A de HMGB1 possède deux cystéines, localisées aux positions 23 et 45 (C₂₃ et C₄₅) et une séquence de localisation nucléaire (NSL1) avec quatre lysines conservées. La boîte B comporte une seule cystéine à la position 106 (C₁₀₆) et a aussi un NSL (NSL2) avec cinq lysines conservées (Yang *et al.*, 2013; Bonaldi *et al.*, 2003). Les lysines doivent être acétylées lors de la translocation du noyau vers le cytoplasme et les cystéines des boîtes A et B peuvent présenter plusieurs modifications post-traductionnelles, par exemple être réduites ou oxydées. Ces modifications mènent à la génération de différentes isoformes de HMGB1 et chacune d'entre elles aura une fonction immunitaire différente dans le milieu extracellulaire (détaillés dans la section 1.4.3) (Yang *et al.*, 2013). Des niveaux élevés du DAMP HMGB1 dans la circulation sont associés à plusieurs maladies auto-immunes (i.e. arthrite rhumatoïde), au cancer, au sepsis ainsi qu'aux com-

plications de grossesse. Les fonctions de HMGB1 dans les différents compartiments cellulaires sont schématisés dans la figure 3.

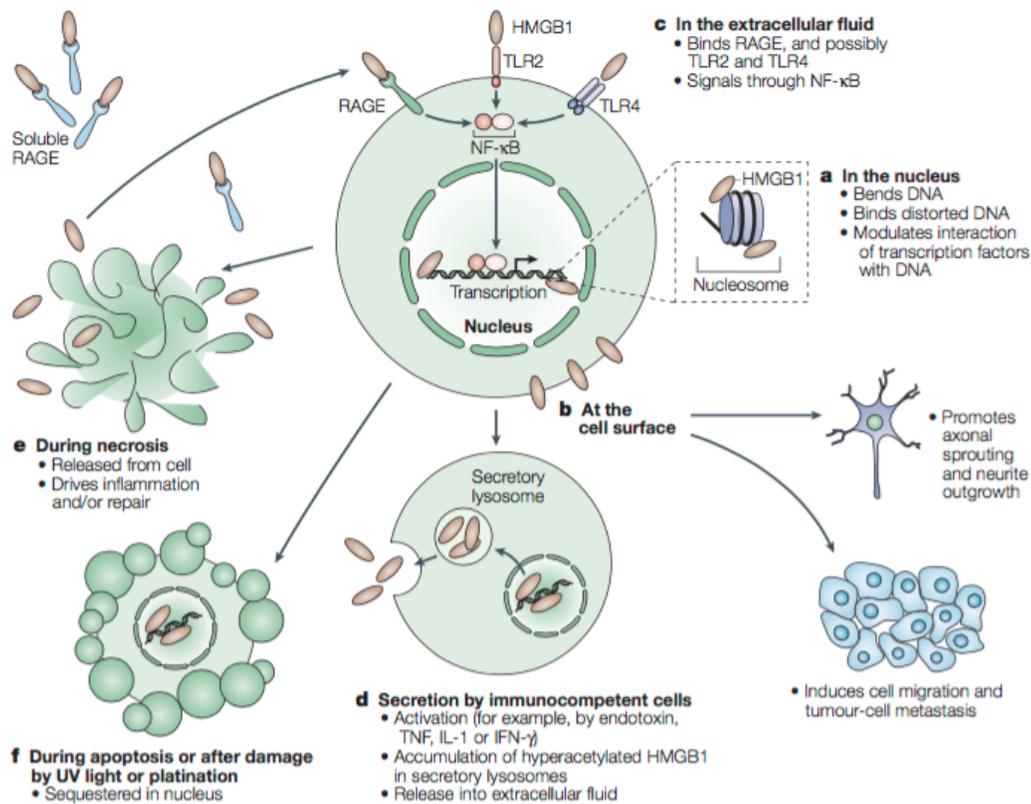


Figure 3. Représentation schématique des fonctions de HMGB1. Provenant de: Lotze et Trace, 2005.

1.4.1. HMGB1 nucléaire

HMGB1 est indispensable pour la vie des mammifères. Les souris *knock-out* décèdent juste après la naissance due à une hypoglycémie sévère (Calogero, *et al.*, 1999). Dans le noyau, les boîtes A et B de HMGB1 se lient à l'ADN de manière non spécifique et la protéine aura alors 3 rôles: (1) faciliter le déroulement de la chroma-

tine et le remodelage du nucléosome (Bianchi et Agresti, 2005); (2) provoquer le repliement de l'ADN et faciliter la liaison avec des complexes de protéines régulatrices et facteurs de transcription (Bianchi et Agresti, 2005; Lotze et Tracey, 2005) (3) faciliter la réparation de l'ADN (Lange *et al*, 2008). La capacité de HMGB1 à moduler la structure de l'ADN fait que certaines protéines le recrutent pour faciliter leurs interactions avec l'ADN (Agresti et Bianchi, 2003). Ces protéines peuvent être, entre autres, des facteurs de transcription (ex. des récepteurs hormonaux nucléaires), des protéines de recombinaison de site spécifique (ex. RAG1) ou des protéines de réparation de l'ADN (Agresti et Bianchi, 2003).

Concernant le rôle de HMGB1 sur les récepteurs hormonaux, il est connu que sa présence dans le noyau augmente l'affinité des domaines de liaison à l'ADN (soit des récepteurs de l'androgène, progestérone, glucocorticoïde et minéralocorticoïde) à l'ADN (Verrijdt *et al.*, 2002). De plus, HMGB1 participe à la restructuration du nucléosome pour faciliter la liaison du récepteur d'œstrogène à l'élément de réponse canonique d'œstrogène et la subséquente augmentation de la transcription (Joshi *et al.*, 2012). De manière générale, HMGB1 semble avoir un effet sur la structure du nucléosome ainsi que de la chromatine, prouvant une relaxation qui facilite la liaison des récepteurs hormonaux à l'ADN, cependant le mécanisme exacte par lequel HMGB1 participe à l'interaction entre l'ADN et les protéines est encore inconnu (Joshi *et al.*, 2012).

La participation de HMGB1 à la réparation de l'ADN n'est pas encore bien décrite, cependant, Liu *et al.*(2010) ont démontré que HMGB1 est capable de se lier à

des protéines réparatrices ainsi qu'à des protéines architecturales, ce qui établit une relation entre HMGB1, la réparation et le changement de conformation de la chromatine et donc de l'ADN.

1.4.2. HMGB1 cytoplasmique

Lors de la présence d'un dommage ou d'un signal de stress, les cellules immunitaires vont relâcher HMGB1 dans le milieu extracellulaire. Cependant, pour être activement sécrété, HMGB1 doit être transloqué du noyau vers le cytoplasme, action qui se produit lorsque les lysines de HMGB1 sont hyperacétylées et n'interagissent plus avec les complexes d'importation nucléaire. Le signal qui mène à l'acétylation n'est toujours pas connu, mais il semble être associé à une diminution de l'activité des histones déacétylases (HDAC) (Yang *et al.*, 2013; Dimitriu *et al.*, 2005; Lotze et Tracey, 2005). En présence d'un stimulus inflammatoire, HMGB1 cytoplasmique s'accumule dans des vésicules sécrétoires puis est sécrété activement dans le milieu extracellulaire par les cellules immunitaires (Dimitriu *et al.*, 2005; Lotze et Tracey, 2005). La translocation de HMGB1 vers le cytoplasme est importante, non seulement pour sa libération dans le milieu extracellulaire, mais également pour son rôle dans la régulation de l'autophagie. Lors de l'autophagie HMGB1 va se lier avec la protéine Beclin-1 qui, à son tour, interagit avec plusieurs cofacteurs pour former le complexe qui mène à la mort cellulaire programmée (Tang *et al.*, 2010). L'utilisation des agents inducteurs de l'autophagie (ex. H₂O₂, rapamycine) mènent à la translocation de HMGB1 vers le cytoplasme, tandis l'absence de HMGB1 (due à un *knockout*) diminue la concentration des marqueurs d'autophagie (Tang *et al.*, 2010). Cependant, des cel-

lules anuclées mais qui possèdent HMGB1 cytoplasmique présentent la même concentration des marqueurs que les cellules contrôles, ce qui met en évidence l'importance de HMGB1 dans le cytoplasme pour l'autophagie (Tang *et al.*, 2010). Il est important de noter que, à l'exception des cellules immunitaires (principalement les macrophages), qui peuvent sécréter HMGB1 à la suite d'un stimulus inflammatoire (Dimitriu *et al.*, 2005; Lotze et Tracey, 2005), HMGB1 n'a jamais été démontrée comme étant sécrétée activement hors de la cellule et son passage par le cytoplasme n'est pas nécessaire pour la relâche passive dans le milieu extracellulaire (voir ci-dessous).

1.4.3. HMGB1 dans le milieu extracellulaire

La libération de HMGB1 peut se produire de façon passive ou active. La sécrétion active a été détaillée dans la section précédente. La sécrétion passive se produit lors de la nécrose, au cours de laquelle, HMGB1 qui est lié faiblement à la chromatine va être libéré et relâché dans le milieu extracellulaire. Cette libération n'arrive cependant pas lors de la mort programmée, soit l'apoptose, car HMGB1 est séquestré dans la cellule (Yang *et al.*, 2013, Lotze et Trace, 2005). De plus, lors de l'apoptose, il aura condensation du noyau, mais sans relâche du contenu dans le milieu extracellulaire, contrairement à ce qui est observé lors de la nécrose. Ceci explique l'absence de relâche de DAMPs dans le cadre de mort programmée (Yang *et al.*, 2012; Castiglione *et al.*, 2010; Lotze et Trace, 2005).

Les actions extracellulaires de HMGB1 incluent (1) l'induction de la cascade inflammatoire via son action sur les récepteurs TLR2, 4, 9 et le "Receptor for Advanced Glycation End product" (RAGE) menant à une stimulation de la libération de cytokines via la voie de NFκB et MAPK; (2) la formation d'hétérocomplexe avec CXCL12 pour promouvoir le recrutement leucocytaire (Yang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012; Venereau *et al.*, 2012). Dépendamment du type de libération et l'isoforme, l'activité de HMGB1 sera différente (Andersson *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013; Venereau *et al.*, 2012; Ulloua *et al.*, 2005). En présence de nécrose, l'intégrité de la membrane nucléaire est compromise et la forme nucléaire d'HMGB1 avec les lysines des NSL non acétylées et les cystéines des boîtes A et B réduites est relâchée dans le milieu extracellulaire, (Andersson *et al.*, 2014; Venereau *et al.*, 2012). Cependant, lors de la libération active de HMGB1 par les cellules immunitaires, HMGB1 est libéré dans le milieu extracellulaire dans sa conformation acétylée (lysines des NSLs acétylées et cystéines de la boîte A présentant un pont disulfure) (Venereau *et al.*, 2012; Andersson *et al.*, 2014). Tout dépendant si les cystéines C₂₃ et C₄₅ se retrouvent dans la forme avec pont disulfure ou all-thiol, HMGB1 va se lier soit au récepteur CXCR4 (CD184) et promouvoir le recrutement leucocytaire, soit au TLR4 et agir comme un stimulant de la libération des cytokines (Yang *et al.*, 2013; Venereau *et al.*, 2012). Les isoformes de HMGB1 et leurs fonctions sont illustrés dans la figure 4.

L'environnement extracellulaire aura aussi une influence sur l'isoforme de HMGB1 qui sera rencontré. La présence de stress oxydatif, souvent observé dans un contexte d'inflammation, peut entraîner des modifications post-traductionnelles et un changement vers une isoforme spécifique d'HMGB1 (forme avec le pont disulfure) et

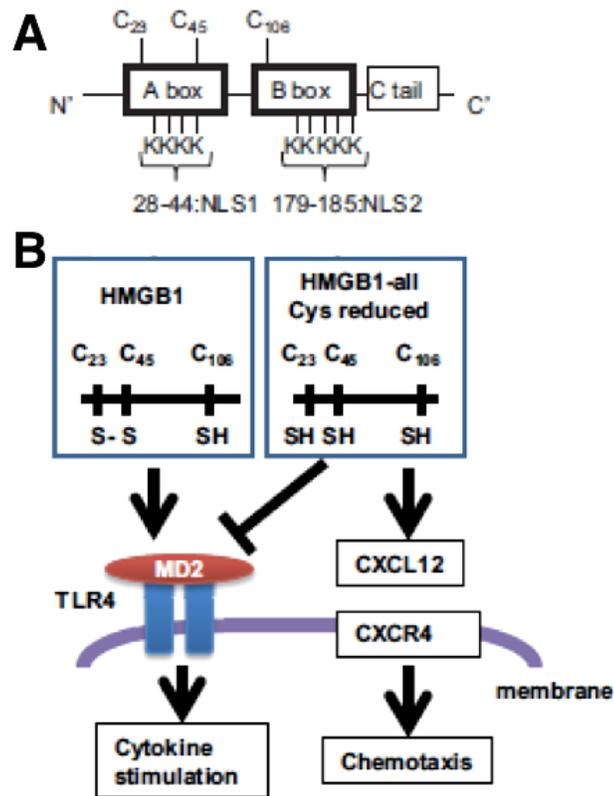


Figure 4. Représentation schématique de la structure moléculaire de HMGB1. Structure de HMGB1 (A), les isoformes et leurs interactions (B). Modifiée de: Yang *et al.* 2012.

une fonction de cytokine (Castiglioni *et al.*, 2010; Venereau *et al.*, 2012). Juste après une lésion stérile chez les souris, la forme réduite de HMGB1 est retrouvée, cependant, 6h après la lésion, c'est l'isoforme avec le pont de disulfure qui est présente. Cette altération peut être expliquée par le fait que les cellules endommagées libèrent l'isoforme chimioattractante dans le milieu extracellulaire déclenchant l'infiltration des cellules immunitaires qui, à leur tour, sécrètent l'isoforme avec le pont disulfure; ou encore par le fait que la présence de ROS dans le milieu mène à l'oxydation de HMGB1 (Venereau *et al.*, 2012). Il n'est pas possible de savoir si la présence d'un

pont disulphure (forme oxydée) de HMGB1 est une conséquence du pouvoir réducteur du milieu extracellulaire ou si cela est l'isoforme sécrété par les cellules. Néanmoins, il a été montré que la forme avec le pont disulphure est présente dans le milieu lors qu'il y a des cellules immunitaire, ainsi que que lors de la mort programmée, soit apoptose ou pyroptose, tandis que l'isoforme all-thiol (réduite) n'est présente que lors de dommage cellulaire et nécrose (Venerau *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

En résumé, HMGB1 est une protéine qui présente des actions importantes à l'intérieur et extérieur de la cellule. Ces actions nucléaires sont fondamentales pour la survie et ces actions extracellulaires sont importantes pour la réponse immunitaire, mais peuvent être aussi associées à des complications lors d'une inflammation non contrôlée.

1.4.4. HMGB1 et grossesse

Les connaissances sur le rôle de HMGB1 dans la grossesse normale sont restreintes. Les seules informations disponibles dans un contexte de grossesse physiologique viennent de Menon *et al.*, 2016, qui ont présenté des preuves d'une augmentation de HMGB1 dans le cytoplasme des cellules épithéliales de l'amnion (partie interne des membranes fœtales) en association avec la sénescence cellulaire observée dans les membranes à terme (Menon *et al.*, 2016). HMGB1 a aussi été identifié dans le noyau et cytoplasme des cellules du placenta (syncytiotrophoblastes) lors de l'analyse par immunohistochimie (Holmlund *et al.*, 2007). De plus, une augmentation de l'ARN messager de HMGB1 dans les cellules du placenta a été reliée avec la nouvelle synthèse de la molécule par ces cellules (Holmlund *et al.*, 2007). Ainsi,

dans les conditions physiologiques, HMGB1 a été démontré comme étant présent dans le cytoplasme des cellules de l'amnion et dans les trophoblastes. En ce qui concerne les grossesses pathologiques, il y a beaucoup plus d'informations disponibles. Des niveaux augmentés de HMGB1 ont été associés au dysfonctionnement du placenta (Girard *et al.*, 2014), la prééclampsie (Naruse *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2014) ainsi que l'accouchement prématuré, en lien avec l'inflammation intra-amniotique (Baumbusch *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2011; Bredeson *et al.*, 2014). De plus, HMGB1 a été associé au diabète gestationnel (Giacobbe *et al.*, 2016) ainsi qu'aux pertes de grossesse récurrente (Jin *et al.*, 2015). L'implication de HMGB1 dans les complications de la grossesse a été récemment revue par notre laboratoire (Nadeau-Vallée *et al.*, 2016).

Lors de la PE, HMGB1 est élevé dans le sérum des femmes atteintes en comparaison avec des femmes ayant des grossesses normales (Naruse *et al.*, 2012). L'analyse de placentas provenant des grossesses compliquées par la PE démontre une augmentation des niveaux de HMGB1 dans le cytoplasme des syncytiotrophoblastes (Yin *et al.*, 2015), et une augmentation de l'expression d'ARN messager et de protéines pour HMGB1 a été rapportée dans des cas de PE (Zhu *et al.*, 2014). Cette augmentation de l'expression d'ARN messager de HMGB1 a aussi été rapportée dans les membranes fœtales lors d'accouchements prématurés (Bredeson *et al.*, 2014). Toujours dans le contexte de l'accouchement prématuré, HMGB1 est aussi augmenté dans le liquide amniotique des femmes qui présentent de l'inflammation intra-amniotique ainsi que la rupture précoce des membranes (pPROM, événement fréquemment liée à l'accouchement prématuré) (Baumbusch *et al.*, 2016; Romero *et*

al., 2011). De plus, dans des cultures de membranes fœtales traitées avec un PAMP, le lipopolysaccharide bactérien (LPS), ou exposées à la fumée de cigarette (un stress oxydatif), une augmentation de la sécrétion de HMGB1 est observée (Bredeson *et al.*, 2014).

HMGB1 est une molécule qui possède différentes actions selon sa localisation et donc son lieu d'action agissant, entre autres, comme régulateur de la transcription dans le noyau et comme DAMP (c.-à-d. médiateur inflammatoire) dans le milieu extra-cellulaire (Yang *et al.*, 2013; Venereau *et al.* 2012). Lors de la grossesse HMGB1 a déjà été associé à plusieurs pathologies (Romero *et al.* 2007; Girard *et al.* 2014; Naruse *et al.*, 2012), cependant son rôle dans un contexte physiologique demeure restreinte. La compréhension du rôle de HMGB1 dans un contexte non-pathologique est importante pour déterminer son action dans un contexte pathologique et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les travaux précédents du Dre Girard ont démontré l'augmentation de HMGB1 (en parallèle avec d'autres alarmines et médiateurs inflammatoires) dans la circulation maternelle ainsi que dans le placenta de grossesse à haut risque de complications, ce qui suggère une corrélation entre l'inflammation du placenta et le développement des grossesses pathologiques (Girard *et al.*, 2014). En résumé, ces évidences suggèrent un rôle de HMGB1 lors de grossesses pathologiques. Cependant, la possible implication de HMGB1 dans les fonctions du placenta et, plus précisément, dans la différenciation des trophoblastes dans une situation physiologique est toujours très peu connue. Une meilleure connaissance du rôle de HMGB1 dans un

contexte physiologique permettrait de déterminer son implication dans un contexte pathologique.

1.5 Hypothèse et Objectifs

HMGB1 est une molécule qui possède des actions différentes selon son site d'action (Yang *et al.*, 2013; Venereau *et al.* 2012) agissant, entre autres, comme régulateur de la transcription dans le noyau et comme DAMP dans le milieu extra-cellulaire. Lors de la grossesse HMGB1 a déjà été associé à plusieurs pathologies (Romero *et al.* 2007; Girard *et al.* 2014; Naruse *et al.*, 2012), cependant son rôle dans un contexte physiologique demeure restreinte. La compréhension du rôle de HMGB1 dans un contexte non-pathologique est important pour comprendre aussi son action dans le contexte pathologique et réussir à remédier la pathologie.

Dans le cadre de ce mémoire de maîtrise, nous avons étudié le lien entre HMGB1 et la différenciation des trophoblastes, étape indispensable pour la bonne formation et fonctionnement du placenta (Hendwerger, 2010), en émettant l'hypothèse que la concentration et localisation sub-cellulaire de HMGB1 est modulée en parallèle avec la syncytialisation, c.-à-d. HMGB1 va sortir du noyau des cytotrophoblastes lors de leur fusion.

Les objectifs étaient de: (1) déterminer la concentration de HMGB1 et localisation subcellulaire lors de la différenciation des trophoblastes en conditions physiologiques; (2) déterminer l'association entre la localisation d'HMGB1 et la différenciation trophoblastiques; (3) investiguer la distribution de HMGB1 lors d'une complication de la grossesse (c.-à-d. PE).

CHAPITRE II

2. Méthodes

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Lignée cellulaire de trophoblaste (cellules BeWo)

Comme décrit dans l'introduction, les trophoblastes sont les cellules principales du placenta. Pour les analyses, nous avons utilisé une lignée de cellules trophoblastiques, les cellules BeWo, qui sont des trophoblastes de choriocarcinome qui ne se différencient pas de façon spontanée pour former les syncytiotrophoblastes. Les cellules ont été cultivées dans du DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12, 50/50, Multicell, Wisent INC, Canada) supplémenté de 10% de sérum de fœtus bovin ("fetal bovine serum" FBS, Multicell, Wisent INC, Canada) et placées dans un incubateur à 37 degrés et 5% CO₂. Les cellules ont été maintenues en culture dans des flasques de 75cm² (Thermo Scientific) et passés aux 3 jours, soit à une confluence de 80%.

Pour réaliser ces travaux, nous avons testé trois différents types de milieux, soit du (1) DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12, 50/50, Multicell, Wisent INC, Canada) supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin ("fetal bovine serum" FBS, Multicell, Wisent INC, Canada), (2) DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12, 50/50, Multicell, Wisent INC, Canada) sans FBS et (3) Opti-Mem® I (Reduced Serum Medium, Gibco, Life Technologies, ON), pour déterminer le milieu optimal. Lors des analyses, les cellules ont étéensemencées à une

densité de $0,75 \times 10^5$ cellules/ml dans un des milieux décrits ci-dessus et incubé toute la nuit avant le traitement.

2.1.2. Cellules primaires: explants placentaires humains

Les explants ont été préparés à partir de biopsies de placentas obtenus par césarienne à la suite de grossesses sans complications accouchées à terme au CHU Sainte Justine. Toutes les participantes ont donné leur consentement éclairé et signé un formulaire de consentement.

Les explants ont été préparés tel que décrit précédemment par Brien *et al.*, 2017. Le tissu placentaire (biopsie) a été lavé à plusieurs reprises avec du PBS 1X stérile pour enlever le sang, ont été coupé en morceaux de 2-3mm et ont été placé dans des “*netwells*” (puits avec des filets permettant la enlèvement du milieu sans perturber le tissu) dans des plaques 12 puits. Les explants ont été cultivés dans du milieu RPMI 1640 (Life technologies, USA) supplémenté avec 5% FBS (Multicell, Wisent INC), bicarbonate de sodium (2 mg/ml), 1% HEPES (Life technologies), 1% pyruvate de sodium 100mM (Life technologies), 100 µg/ml streptomycine sulfate (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 100IU/ml pénicilline G (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 0.1 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 1 µg/ml insuline bovine (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 0.1 µg/ml rétinol acétate (Sigma-Aldrich, ON, Canada), carbonate de calcium 0.26 mg/mL (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 25 µg/mL L-alanine (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 0.2 mg/mL L-cystéine (Sigma-Aldrich, ON, Canada), 50 µg/mL acide ascorbique (Sigma-Aldrich, ON, Canada), et 0.1% gentamicine (Sigma-AI-

drich, ON, Canada) ajusté à pH 7.2, et incubés à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂. Le temps de culture a varié selon les expériences (détails dans la section résultats), mais indépendamment de la durée de la culture, le milieu a été changé à chaque 24h.

2.2. Différenciation des cellules BeWo

Bien que les cellules BeWo ne soient pas en mesure de se différencier spontanément comme les cellules primaires (c.-à-d. les cytotrophoblastes), leur fusion peut être induite par l'induction de l'AMP cyclique à l'aide de la forskoline (Handwerker, 2010). Nous avons donc traité les cellules BeWo avec la forskoline (Sigma-Aldrich, ON, Canada) à une dose de 25 µM, pendant 24 ou 48 h avec ou sans traitement concomitant (voir ci-dessous). La concentration de forskoline utilisée est plus faible à celle couramment utilisée dans la littérature, cependant elle a préalablement été validée dans notre laboratoire comme étant celle qui avait le meilleur effet sur la différenciation/fusion cellulaire tout en ayant peu d'effet sur la viabilité.

2.3. Identification de la localisation cellulaire de HMGB1

Comme décrit dans l'introduction, HMGB1 est une protéine localisée principalement dans le noyau. Pour investiguer le rôle de sa localisation nucléaire, nous avons utilisé un inhibiteur d'exportation nucléaire, la leptomycine B (Invivogen, Cedarlane, ON, Canada). La leptomycine inhibe l'exportine 1 (CRM1) qui est nécessaire

à l'exportation nucléaire de HMGB1 (Bonaldi *et al.*, 2004). Les BeWo ont été traités avec la leptomycine à différentes concentrations (10nM, 25nM et 50nM, Invivogen) seule ou en combinaison avec la forskoline (inducteur de différenciation) pendant 24 h ou 48h. Dans les explants placentaires, la leptomycine a été ajoutée au milieu seulement au deuxième jour de culture à une dose de 50nM (plus de détails dans la section des résultats 3.4.2). L'éthanol a été utilisé comme véhicule et ajouté à la culture dans un volume identique à celle utilisé pour la leptomycine.

Comme mentionné précédemment (voir introduction p.18), HMGB1 doit être acétylée pour être exporté du noyau vers le cytoplasme. Nous avons donc utilisé un inhibiteur de "histones deacetylase (hDAC)" général, le butyrate de sodium (NaB, Sigma, Canada). Une concentration de 0.5mM de NaB (dose connue pour inhiber l'action des HDACs) a été utilisée (Evankovich *et al.*, 2010). Les cellules BeWo ont été traitées pour une période de 24h ou 48h, période durant laquelle nous avons aussi évalué la différenciation cellulaire induite par la forskoline. Dans les explants placentaires, le NaB (utilisé à la même concentration que pour les BeWo) a été ajouté quotidiennement dans le milieu pendant toute la durée de la culture (plus de détails dans la section des résultats 3.4.2).

2.4. Extraction de protéines

2.4.1. Extraction de protéines totales

Les cellules ou les explants ont été homogénéisés dans un tampon de lyse contenant 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ON, Canada) et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Calbiochem, Millipore, ON, Canada), et par la suite centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été recueillis et la concentration en protéines a été déterminée par dosage de Bradford (BioRad, ON, Canada).

2.4.2. Extraction différentielle des protéines (séparation des protéines nucléaire et cytoplasmique)

Pour pouvoir déterminer la concentration de HMGB1 dans les différents compartiments cellulaires, nous avons utilisé deux protocoles permettant d'isoler spécifiquement les protéines du cytoplasme et du noyau dans les cellules Bewo et les explants respectivement. Les deux protocoles sont basés sur le concept de "salting-in/salting-out".

Extraction différentielle à partir des cellules BeWo: après traitement, les cellules ont été lavées avec du PBS deux fois puis incubées dans du tampon cytoplasmique (HEPES 10mM, KCl 10mM, EDTA 0,1mM, EGTA 0,1mM, DTT 1mM et inhibiteur de protéase au pH 7,9) avec 10% de NP40 5% pendant 15 minutes. Par la suite, le contenu des puits a été récolté et transféré dans un tube conique 1.5 mL et centri-

fugé à 13000rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré puis centrifugé une seconde fois. Le surnageant a été conservé et identifié comme la fraction cytoplasmique. La fraction insoluble (le "pellet") a été resuspendue dans le tampon nucléaire (HEPES 20mM, NaCl 0.4mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, DTT 1mM et inhibiteur de protéase), incubée sur glace pendant 30 minutes puis centrifugée à 13000rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et identifié comme la fraction nucléaire.

Extraction différentielle à partir des explants: Les explants ont été récupérés après traitement et placés dans le tampon Sucrose-Tris-Magnesium (STM) (Sucrose 250mM, 50mM Tris-HCl au pH 7.4, MgCl₂ 5mM, NaF et NaVO₄) pour être triturés à l'aide d'un homogénéisateur et ensuite décantés sur glace pour 30 minutes. Les échantillons ont été vortexés et centrifugés à 800 g durant 15 minutes. Le surnageant (S0) a été récupéré pour l'extraction de la fraction cytoplasmique et la fraction insoluble (pellet, P0) pour l'extraction de la fraction nucléaire.

Le surnageant S0 a été recentrifugé à 800 g durant 15 minutes et le surnageant (S1) récupéré et recentrifugé à 11 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant (S2) a été récupéré et précipité avec de l'acétone 100% durant 1 heure à -20 °C. Après la précipitation, le surnageant S2 a été centrifugé à 12 000 g pendant 5 minutes et la fraction insoluble (pellet) récupéré et resuspendu dans le tampon STM, formant la fraction cytoplasmique.

Pour la fraction nucléaire, le pellet P0 a été resuspendu dans le tampon STM, vortexé et centrifugé à 500 g durant 15 minutes. Le surnageant a été jeté et le pro-

cessus répété. La fraction insoluble (pellet, P1) a été récupérée, resuspendue dans du STM, vortexée et centrifugée à 10 000 g durant 15 minutes. La fraction insoluble (pellet, P2) a été récupérée et resuspendue dans du tampon Sodium-EDTA-Triton (NET) (HEPES 20mM, MgCl₂ 1.5mM, NaCl 0.5mM, EDTA 0.2mM, 20% glycérol, 1% Triton, inhibiteur de protéases et les inhibiteurs de phosphatase NaF et NaVO₄) et incubée sur glace pour 30 minutes. Par la suite, les noyaux ont été brisés par sonication et centrifugés à 9000 g pour 30 minutes à 4°C. Le surnageant récupéré a été identifié comme la fraction nucléaire.

2.5. Analyses moléculaires

2.5.1. Immunobuvardage de type western

Les échantillons de protéines (30µg) ont été placés sur un gel de polyacrylamide 12% et migrés pendant 30 minutes à 100V et 1 h à 200V. Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0.45µm, Bio-Rad, ON, Canada). Pour prévenir la liaison non spécifique des protéines, les membranes ont été bloquées avec 5% de lait dans du (TBS-T) 0.1% pendant 45 minutes et ensuite incubées avec l'anticorps primaire, soit anti-HMGB1 (Novus biologicals, Info), anti-lamine B1 comme marqueur de protéine nucléaire (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) ou anti-β-actine comme marqueur de protéine cytoplasmique (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) pendant 18 h (toute la nuit) à 4°C. Les membranes ont été lavées avec du TBS-T 0.1%, incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire

approprié conjugué à la “horseradish peroxidase, HRP” (BioRad, ON, Canada) et le signal détecté par chimiluminescence (clarity wester ECL substrate, BioRad, ON, Canada). Après la révélation, les membranes marquées avec HMGB1 et Lamine B1 ont été placées dans la solution de “décapage” (glycine 25mM, SDS 1% , pH 2) pendant 20 minutes et lavées avec TBS-T 0,1%. Par la suite, elles ont été bloquées et incubées avec l’anticorps pour β -actine (Santa Cruz) qui a servi comme contrôle interne de la quantité de protéine cytoplasmique, tandis que la Lamine B1 a servi comme contrôle de la quantité de protéine nucléaire.

2.5.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) pour la β -hCG et pour HMGB1

Les ELISAs pour HMGB1 (Creative Diagnostic, USA) et β -hCG (DRG International, USA) ont été réalisées selon les instructions fournies par les fabricants. Ayant CV (%) de 1,3 et limite de détection 0,8 ng/ml.

Pour le β -hCG, les standards et les surnageants des cultures cellulaires et des explants ont été incubés en présence d'anticorps anti β -hCG couplés à une enzyme et biotinylés dans des puits incubées avec la streptavidine. Après 60 minutes, les puits ont été lavés avec le tampon de lavage et le substrat de l’enzyme conjuguée ajouté pendant 15 minutes suivi de l’addition du tampon d’arrêt. L’absorbance a été mesurée à 450 nm avec un lecteur de plaque (Bio-Rad iMark® microplate reader).

Pour l'ELISA de HMGB1, la plaque 96 puits a été incubé avec l'anticorps de capture pour 18 h à 4°C. Après lavage, les standards, surnageants, extraits des cellules et tissus et anticorps de détection ont été incubés à 37°C pour une heure puis à 4°C pour 18 h. La plaque a été lavée et la peroxydase streptavidine ajoutée et incubée pendant 30 minutes à température pièce. Par la suite, la plaque a été lavée et le tampon TMB ajouté pour une incubation de 30 minutes à température pièce suivi de l'addition de la solution d'arrêt. L'absorbance a été mesurée à 450nm/630nm par le lecteur de plaque Bio-Rad iMark® microplate reader.

2.5.3. Évaluation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux

Pour évaluer la viabilité des cellules BeWo lors de la détermination des conditions optimales de culture (voir résultats pour les détails), nous avons utilisé le test "FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I" (BD Biosciences).

Après traitements, les cellules ont été trypsinées, lavées 2 fois avec du PBS 1X et resuspendues à une concentration de 1×10^6 cellules/ml dans du Binding Buffer 1X. 100 µl de la suspension cellulaire a été transféré dans un tube FACS et incubé avec 5 µL d'Annexin V-FITC et 5 µL de PI pendant 15 minutes à température pièce et à l'abri de la lumière. 400 µL du Binding Buffer 1X a été ajouté à chaque tube et l'analyse par cytométrie de flux a été réalisée en dedans d'une heure. Les contrôles suivants: cellules non marquées, cellules marquées uniquement avec le PI ou uniquement avec l'annexin V, ont été utilisés pour calculer les compensations et définir

les limites des grilles positives et négatives. Les cellules doubles négatives sont définies comme les cellules vivantes. Les cellules présentant un double marquage correspondent aux cellules nécrotiques ou en apoptose tardive. Finalement, les cellules positives uniquement pour l'annexin V correspondent aux cellules apoptotiques.

2.5.4. Essai MTT

Pour mesurer la viabilité cellulaire suite au traitement des cellules BeWo avec les inhibiteurs, nous avons effectué le test de MTT ((3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide; thiazolyl blue, Sigma, ON, Canada). Les cellules ont été placées dans une plaque de 96 puits à une densité de $0,75 \times 10^5$ cellules/ml et laissées 18 h pour permettre l'adhésion cellulaire. Après traitement, 0,5 mg/ml de MTT a été ajouté à chaque puits et la plaque incubée pour une période de 2 heures à 37° et 5% CO₂. Le milieu a été retiré et les cristaux dissouts dans de l'isopropanol. L'absorbance a été lue à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Bio-Rad iMark® microplate reader).

2.6. Immunocytochimie (Cellules BeWo)

Les cellules BeWo ont été cultivées sur des lamelles en verre et, après les traitements, fixées avec du méthanol et gardées à -20 °C jusqu'à leur analyse par immunocytochimie (ICC). Pour réaliser l'ICC, les lamelles ont été amenées à température ambiante et traitées de la manière suivante: lavage dans du PBS, blocage de la per-

oxydase endogène (incubation dans une solution de 1% H₂O₂ dans du PBS pendant 10 minutes), lavage dans du PBS, incubation de 30 minutes avec une solution de perméabilisation (BSA à 2%, Tween 0.1% dans du PBS), incubation pendant une nuit avec l'anticorps primaire anti-HMGB1 (HMGB1, Novus Biologicals, ON, Canada), lavage dans du PBS, incubation avec l'anticorps secondaire, IgG anti-lapin-conjugué à la HRP (BioRad, ON, Canada) à température ambiante pendant 1 heure, lavage dans du PBS, révélation avec la 3, 3-diaminobenzidine (DAB, VWR, Canada) pendant exactement 3 minutes pour chaque lamelle, lavage dans du PBS, contre-coloration avec de l'hématoxyline, déshydratation (éthanol 50%, éthanol 70%, éthanol 100%) et xylène et montage des lamelles avec le milieu de montage Cytoseal 60 (Thermo Scientific, ON, Canada).

2.7. Immunofluorescence (IF)

Après traitements, les cellules BeWo cultivées sur lamelles ont été fixées, bloquées et perméabilisées de la même manière que pour l'immunocytochimie. Après, les lamelles ont été incubées avec un anticorps anti-HMGB1 déjà combiné avec alexa fluo 488 pendant 16 h à 4°C. Par la suite, ils ont été lavés et montés avec le milieu de montage contenant du DAPI (Life Technologies, ON, Canada).

2.8. Immunohistochimie (Explants placentaires)

Les explants ont été récupérés après les traitements à différent temps et fixés avec de la formaldéhyde 4% pendant 24 h avant d'être transférés dans du PBS et enrobés dans la paraffine. Subséquemment, les tissus ont été coupés à l'aide d'un microtome (5µm d'épaisseur), et traités pour l'immunohistochimie (IHC) comme suit: les lames ont été placées dans une séquence de solutions soit le xylène pour déparaffiner les tissus, éthanol 100%, éthanol 70%, et l'eau, pour réhydrater les tissus. Ensuite les tissus ont été transférés dans une solution de citrate 0,01M et chauffé 2x5 min au micro-ondes pour démasquer les antigènes. Une fois revenues à température ambiante, les lames ont été placées dans de l'eau contenant 0.3% de peroxyde d'hydrogène pour bloquer la peroxydase endogène. Par la suite, elles ont été lavées avec du PBS. Les sites antigéniques non spécifiques ont été bloqués (solution de blocage: BSA 2%, Triton 0.2% et sérum normal de chèvre, normal goat sérum NGS 2%) pendant 30 minutes puis les tissus ont été incubés avec l'anticorps primaire pour 18 h à 4°C. Les lames ont ensuite été lavées et incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP durant 1 h à température pièce, suivi d'un lavage et révélation avec le DAB (3-diaminobenzidine, VWR, Canada) pendant exactement 5 minutes pour chaque lame pour ainsi pouvoir comparer l'intensité du marquage observé. Les coupes ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline et différenciées dans l'eau scott (Scott's water, eau avec un haut pH), pour ensuite être déshydratées dans l'éthanol 50%, éthanol 70%, éthanol 100% et xylène avant d'être montées avec une lamelle. Nous avons utilisé les anticorps primaires contre HMGB1 (HMGB1, Novus Biologicals) et M30 (fragment de cytokératine 18 clivé par caspase - détecteur

d'apoptose) (Roche, ON, Canada), qui ont été incubés pendant 18 h à 4°C et l'anticorps secondaire conjugué à la HRP (BioRad, ON, Canada) approprié a été incubé durant 1 heure.

2.9. Analyses et statistiques

Analyses d'immunohistochimie: Les images de ICC et IF ont été prises manuellement à l'aide d'un microscope Olympus upright BX51, camera CoolSnap ES et du logiciel MetaVue, à raison de 3 photos par lames dans des régions sélectionnées aléatoirement avec un agrandissement de 20X. Les lames d'IHC ont été scannées par un scanneur haute résolution de lames (Axioscan, Zeiss, ON, Canada) et les photos (3 photos de régions aléatoires pour chaque condition) ont été prises avec le logiciel ZEN Imaging Software (Zeiss).

Le logiciel Image J (NIH Image, USA) a été utilisé pour analyser l'intensité du marquage via l'analyse de l'aire marquée dans les coupes histologiques, tel que précédemment publié (Girard *et al.*, 2010). Les photos aléatoires de chaque condition ont été soumises à l'analyse par "colour deconvolution" - déconvolution des couleurs, où les trois couleurs sont séparés. Ainsi, il est possible de quantifier l'aire marquée par l'anticorps spécifique et révélé avec du DAB (marquage brun) et l'aire totale de cellules (bleu). Après la quantification de l'aire avec l'utilisation d'un seuil spécifique pour toute les tissus, nous avons fait un ratio entre l'aire marquée par l'anticorps et l'aire totale, de manière à ne pas avoir de faux résultats due à la différence entre la

quantité de tissus contenu dans chaque photo/condition. Le logiciel a aussi été utilisé pour compter le nombre de cellules positives pour M30 (analyse des cellules apoptotiques). Finalement, ce logiciel a été utilisé pour quantifier l'intensité des bandes obtenues par immunobuvardage de type western.

Les calculs de moyennes et rapports ont été effectués dans le logiciel Microsoft Excel et les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel Graphpad (Graph Pad Prism, Version 7 pour Mac, CA, USA). Les analyses statistiques qui ont été utilisées sont le "One Way Anova" avec le test de Tukey lors de la comparaison entre plusieurs groupes et t-test lors de la comparaison entre deux groupes. Un $p < 0.05$ a été considéré significatif et les erreurs représentées par SEM. Les tests ont réalisés dans, au moins, 3 cultures cellulaires différentes ou tissus provenant de placentas différentes, signalisé comme "n" dans les résultats.

CHAPITRE III

3. Résultats

3.1. Détermination des conditions de culture optimales pour la lignée cellulaire de trophoblastes (cellules BeWo)

Les conditions de culture cellulaire, c.-à-d. type de milieu de culture et milieu de traitement, sont importantes pour la viabilité des cellules et l'obtention de résultats pertinents. Dans notre laboratoire, nous utilisons couramment le milieu de culture DMEM/F12 avec supplémentation de 10% de FBS. Cependant, des données de la littérature suggèrent l'élimination du sérum lors des traitements. Étant donné que les conditions de cultures publiées sont variables, nous avons testé différentes conditions (n=3) pour m'assurer de sélectionner celle qui était optimale en terme de viabilité/mortalité cellulaire. Nous avons donc cultivé les cellules avec trois différents milieux de culture pour déterminer leur impact sur la mortalité des cellules BeWo (apoptose et nécrose). Les milieux utilisés étant: 1- DMEM/F12 supplémenté avec du FBS (10%), qui est le milieu dans lequel on garde les cellules couramment au laboratoire et le plus souvent utilisé dans la littérature, 2- DMEM/F12 sans la supplémentation avec le sérum et 3- Opti-Mem, un milieu réduit en sérum. Les deux derniers milieux sont souvent utilisés pour réduire une éventuelle interférence du sérum avec le traitement des cellules. L'effet de ces milieux sur la viabilité/mortalité des cellules a été déterminé par l'utilisation du kit FITC Annexin V Apoptosis Detection. Ce kit permet le marquage des cellules avec un anti-Annexin V couplé au fluorochrome FITC, un phospholipide, phosphatidylsérine, qui est exposé au milieu extracellulaire lors de

l'apoptose, et à l'iodure de propidium (PI), un intercalent de l'ADN qui diffuse dans les cellules dont la membrane extracellulaire est compromise. Les cellules sont ensuite analysées au FACS pour identifier les cellules vivantes (doubles négatives), les cellules apoptotiques (PI-/FITC+) et les cellules nécrotiques (PI+/FITC+).

Lorsque l'on compare les milieux sans sérum par rapport au DMEM/F12 supplémenté, on observe une diminution du pourcentage de cellules viables et une augmentation de la nécrose dans les cellules maintenues dans le milieu Opti-Mem, et ce, peu importe le temps de culture étudié (24 et 48 h, Fig 5). Après 24 h de culture dans le milieu Opti-Mem, nous pouvons observer que le taux de nécrose est d'environ 10% et, après 48 h, ce pourcentage est légèrement augmenté. En ce qui concerne l'apoptose, une augmentation est observée après 48 h dans le milieu DMEM/12 sans FBS, ce qui met en évidence l'importance de la supplémentation avec le sérum. Ainsi, en absence de traitement, le milieu classique, c.-à-d. DMEM-F12 + FBS, est le milieu optimal pour le maintien en culture des cellules BeWo.

La forskoline est l'agent chimique couramment utilisé pour induire la différenciation des cellules BeWo qui, contrairement aux cellules primaires, ne se différencient pas spontanément (Handwerger, 2010). L'exposition à la forskoline induisant un certain stress sur les cellules BeWo, nous avons décidé de tester l'impact de ce traitement sur la viabilité cellulaire dans les différents milieux détaillés ci-dessus. Le traitement avec la forskoline diminue le pourcentage de cellules viables de façon minimale dans le milieu supplémenté en FBS. Après 24 h d'exposition à la forskoline, on observe une diminution du pourcentage de cellules viables avec une augmentation

de l'apoptose dans le DMEM/F12 sans sérum (87% et 13% respectivement) et, après 48 h de traitement, on observe une augmentation de la nécrose (50% de cellules nécrotiques). Dans le milieu Opti-Mem, la FK entraîne aussi l'augmentation du pourcentage des cellules nécrotique (83% viables, 6% en apoptose et 11% nécrose) à 24 h, de même après une période de 48 h de traitement ou le % de cellules nécrotiques augmente à 40% (Fig 5). Par conséquent, nous avons sélectionné le milieu DMEM-F12 avec FBS pour la suite de nos expériences, ce milieu étant celui qui permet le maintien de la meilleure viabilité cellulaire avec les taux les plus faibles de cellules apoptotique/nécrotique, et ce même lors du traitement avec la forskoline.

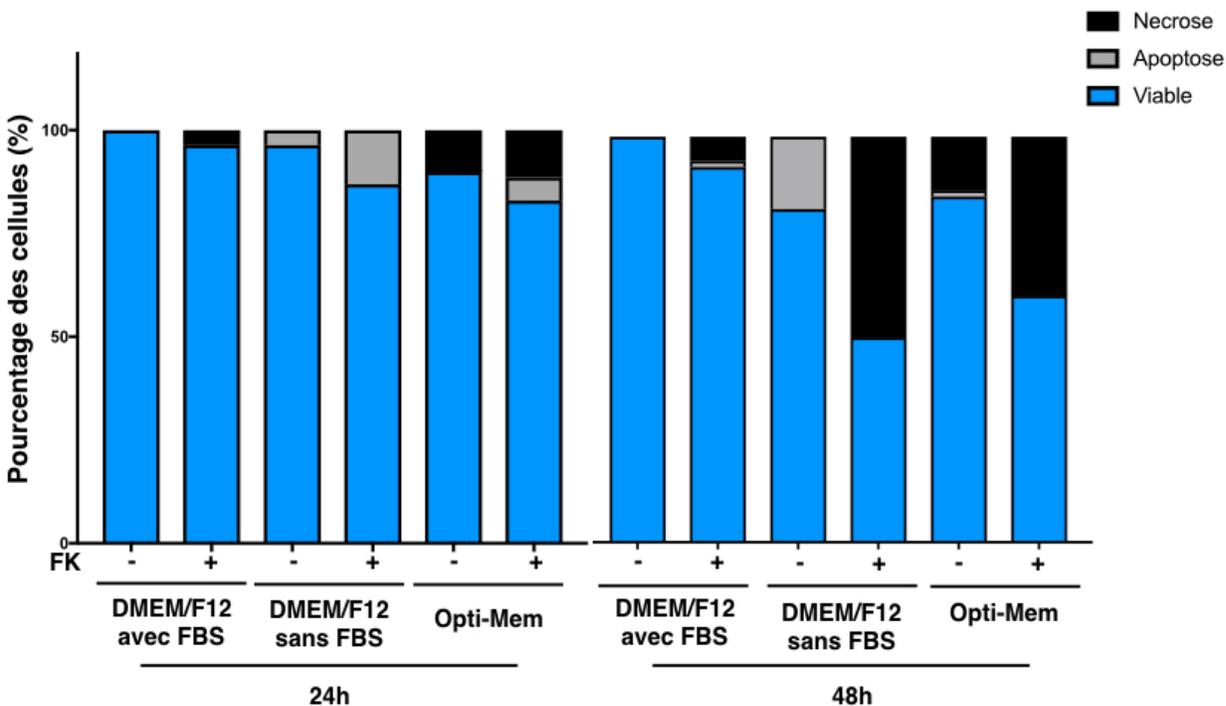


Figure 5. Evaluation de la viabilité des cellules BeWo dans les différents milieux de culture. L'effet des milieux de culture DMEM/F12 avec ou sans FBS et Opti-MEM sur la viabilité des cellules a été déterminé par cytométrie de flux suite aux marquages Annexin V et PI. Le graphique représente le % de cellules vivantes, apoptotique et nécrotiques pour chaque milieu testé après 24h et 48h, en présence ou non de FK. N=3/condition.

3.2. Différenciation des cellules BeWo (lignée de trophoblastes): sécrétion de β -hCG

Tel que détaillé dans l'introduction, seuls les trophoblastes différenciés, appelés syncytiotrophoblastes, ont la capacité de relâcher du β -hCG. Nous avons donc utilisé cette caractéristique propre aux syncytiotrophoblastes comme marqueur pour suivre et confirmer la différenciation des cellules BeWo et ce, en quantifiant la β -hCG sécrétée dans le milieu extracellulaire par ELISA (n=6). Une augmentation de la concentration de β -hCG est directement reliée à la différenciation des trophoblastes.

En parallèle, pour appuyer les résultats basés sur la sécrétion de β -hCG, nous avons réalisé une étude de la morphologie cellulaire (n=6) par immunocytochimie (ICC). La différenciation des trophoblastes en syncytiotrophoblastes implique la fusion des cellules qui forment alors des structures multinucléées de grand volume visible par microscopie.

Les résultats des expériences réalisées montrent une sécrétion basale de β -hCG très faible par les cellules BeWo autant à 24h et 48h de culture. Toutefois, les niveaux de sécrétion sont fortement augmentés après traitement à la FK (100X plus que les cellules non traitées) et ce rapidement (24h) après le début du traitement (Fig 6 A). De même, l'étude de la morphologie cellulaire permet l'observation de changements morphologiques typiques des syncytiotrophoblastes à 24h dans les cellules traitées avec la FK, c.-à-d. une augmentation du volume nucléaire et diminution du nombre des cellules totales, indiquant la fusion des cytotrophoblastes (Fig 6 B).

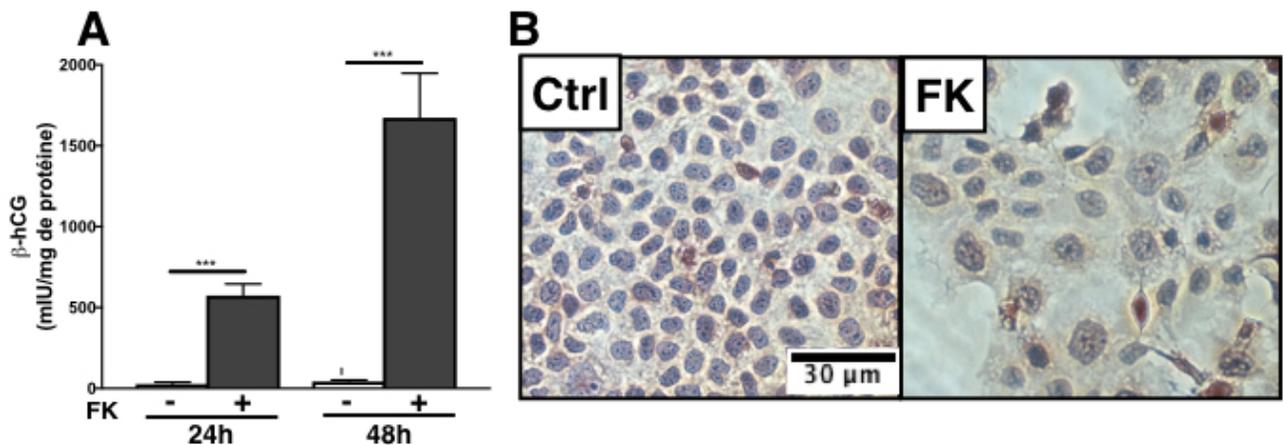


Figure 6. Différentiation des cellules BeWo suite au traitement avec la forskoline (25µM). La sécrétion de β-hCG, fait seulement par les cellules différenciées, est induite par le traitement des cellules avec 25µM de forskoline (FK) indépendamment de la durée 24h ou 48h (A). La différenciation est aussi observée visuellement par ICC, les cellules traitées avec la forskoline (FK) (25µM) pendant 24h possèdent des noyaux plus gros que ceux de la culture contrôle (Ctrl) (B), ce qui indique la fusion et donc la différenciation cellulaire. Replicatas: N=6/condition. Echelle =30µm, révélation avec du DAB et contre-coloration avec l'hématoxyline. Statistique, test de T: *** = p<0.001

3.3. Variation de la concentration de HMGB1 lors de la différenciation des trophoblastes.

Afin d'évaluer l'expression et la localisation d'HMGB1 lors du processus de différenciation, les cellules BeWo ont été traitées à la forskoline (inducteur de différenciation) pendant 24h et 48h. Les niveaux cellulaires d'HMGB1 ont été quantifiés par Immunobuvardage de type western (WB) (n=3) et par ELISA (n=3) alors que les niveaux extracellulaires ont été dosés par ELISA. Les résultats démontrent que, lors de la différenciation des BeWo, la quantité intracellulaire globale de HMGB1 demeure inchangée, ce qui est observé autant par WB (Fig 7 A) que par ELISA (Fig 7 B). Toutefois, on observe une augmentation significative de la sécrétion de HMGB1 entre 24 h

et 48 h ($p=0.02$) dans les cellules exposées à l'agent de différenciation, mais la différence observée entre les cellules traitées avec la forskoline pour 48 h et les cellules contrôles n'est pas significative bien qu'une tendance soit observée ($p=0.07$) (Fig 7 C).

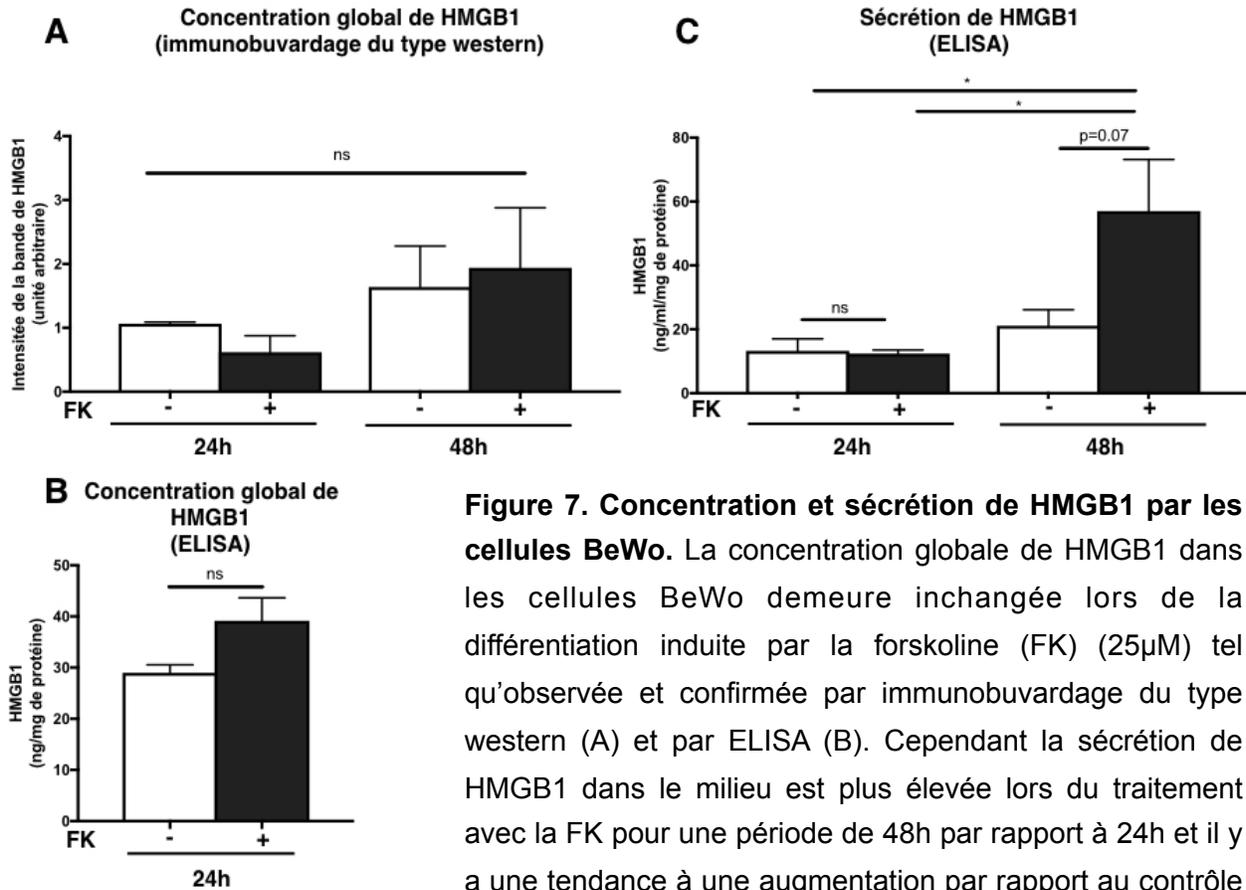


Figure 7. Concentration et sécrétion de HMGB1 par les cellules BeWo. La concentration globale de HMGB1 dans les cellules BeWo demeure inchangée lors de la différenciation induite par la forskoline (FK) ($25\mu\text{M}$) tel qu'observée et confirmée par immunobuvardage du type western (A) et par ELISA (B). Cependant la sécrétion de HMGB1 dans le milieu est plus élevée lors du traitement avec la FK pour une période de 48h par rapport à 24h et il y a une tendance à une augmentation par rapport au contrôle (C). Replicatas: $N=3/\text{condition}$. Statistique, test de T: $*p\leq 0.05$.

Pour assurer la concordance de ces résultats, obtenus sur une lignée cellulaire de trophoblaste (BeWo), avec l'environnement plus complexe que représente le placenta humain, nous avons utilisé un modèle d'explant placentaire fait à partir de pla-

centa humain obtenu par césarienne à terme. Ce type de culture de biopsie (explants) de placenta est le modèle le plus représentatif de la situation *in vivo* puisqu'il conserve la structure tridimensionnelle du tissu ainsi que les interactions des différents types cellulaires. De plus, les cytotrophoblastes présents dans les explants gardent la capacité de se différencier spontanément en culture pour reformer la couche de syncytiotrophoblaste (Voir discussion).

Les explants ont été maintenus en culture pendant 5 jours. La sécrétion de β -hCG a été mesurée par ELISA tout au long de la culture pour évaluer la différenciation des trophoblastes. Les résultats démontrent une augmentation significative des niveaux de β -hCG dans les surnageants des explants au jour 5 de la culture, quand comparées au deuxième jour en culture (n=7) (Fig 8 A).

La quantité d'HMGB1 intra et extracellulaire a également été évaluée pour la durée du maintien des explants en culture (5 jours). En comparant la sécrétion de HMGB1 chaque jour, on observe que les explants ont libéré une grande quantité de HMGB1 dans les premières 24 h une moyenne de 78 ng par mg de protéine, cependant à partir de la deuxième journée la quantité sécrétée diminue significativement avec une moyenne de 23 ng de HMGB1 par ml/mg de protéine et cette diminution continue jusqu'au jour 5 étant significativement diminuée par rapport au jour 1 et 2 (Fig 8 B). Cependant, la quantité de HMGB1 contenue dans l'ensemble du tissu des explants aux différents jours de culture demeure inchangée telle qu'observé par immunobuvardage de type western (n=7) (Fig 8 C) et ELISA (n=7) (Fig 8 D) et ce malgré le fait que les trophoblastes contenus dans les explants se différencient de façon

spontanée tel que rapporté précédemment (Simán *et al.*, 2001) et tel que démontré par le dosage de β -hCG (Fig 8 A).

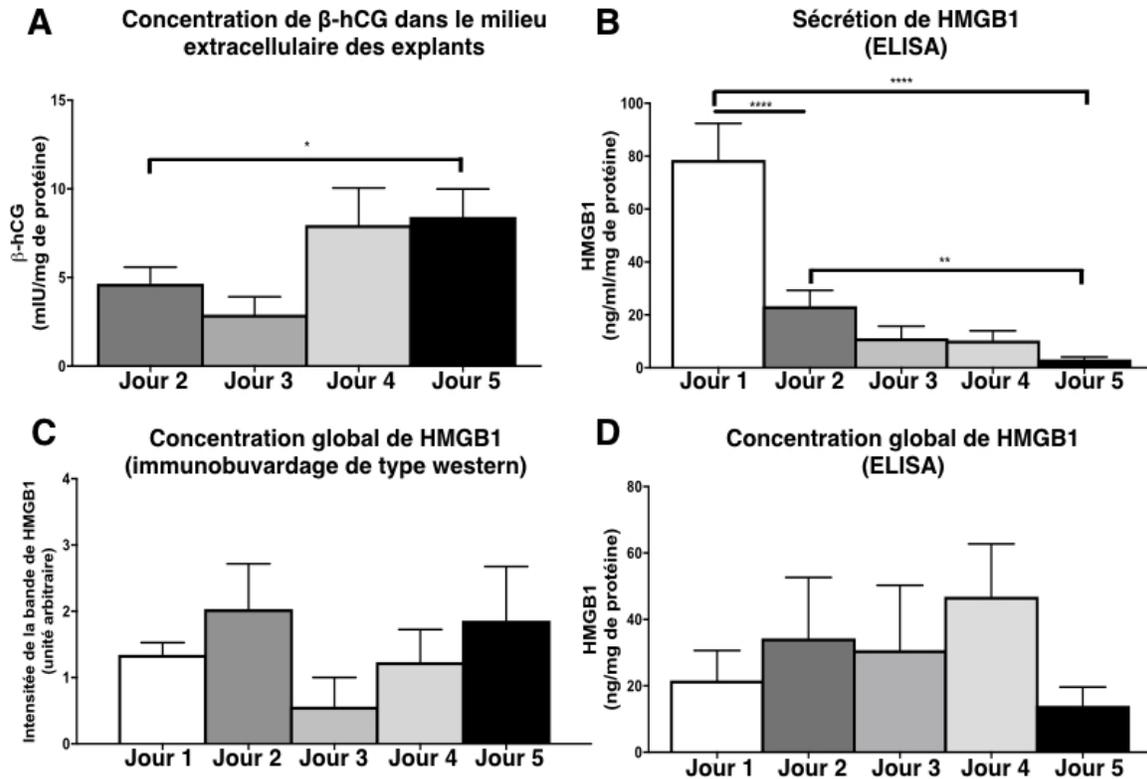


Figure 8. Concentration de HMGB1 aux différents jour de culture des explants placentaires. Sécrétion de β -hCG dans les différents jours de culture des explants démontrant l'augmentation significative au jour 5 (A). La sécrétion de HMGB1 dans le milieu extra-cellulaire par les explants dans les différents jours de culture, mesuré par ELISA, diminue significativement après les premières 24h en culture et continue a diminuer jusqu'à la dernière journée, étant significativement différent de la première et deuxième journées de culture (B). La concentration globale de HMGB1 dans le tissu demeure inchangée tel qu'observé par immunobuvardage de type western (C) et résultat confirmé par ELISA (D). Replicatas: n=7/condition. Statistique ANOVA avec Tukey post-test: ***= $p \leq 0.001$; **= $p \leq 0.01$; * = $p \leq 0.05$.

Pour confirmer l'absence de changement des niveaux intracellulaires d'HMGB1 observée lors des analyses par ELISA et immunobuvardage de type wes-

tern et surtout pour étudier sa localisation dans le tissu lors de la différenciation des trophoblastes, nous avons utilisé l'immunohistochimie (n=8). Lorsque l'on analyse l'intensité du marquage, il n'y a pas de différence significative entre les différents jours de culture (Fig 9 A-F). Cependant une différence est observée par rapport à la distribution de ce marquage. HMGB1 est plutôt localisé au niveau des trophoblastes (flèches dans la figure 9), plus particulièrement dans le cytoplasme lors des jours 1 à 3 et dans le noyau pour les autres jours de culture.

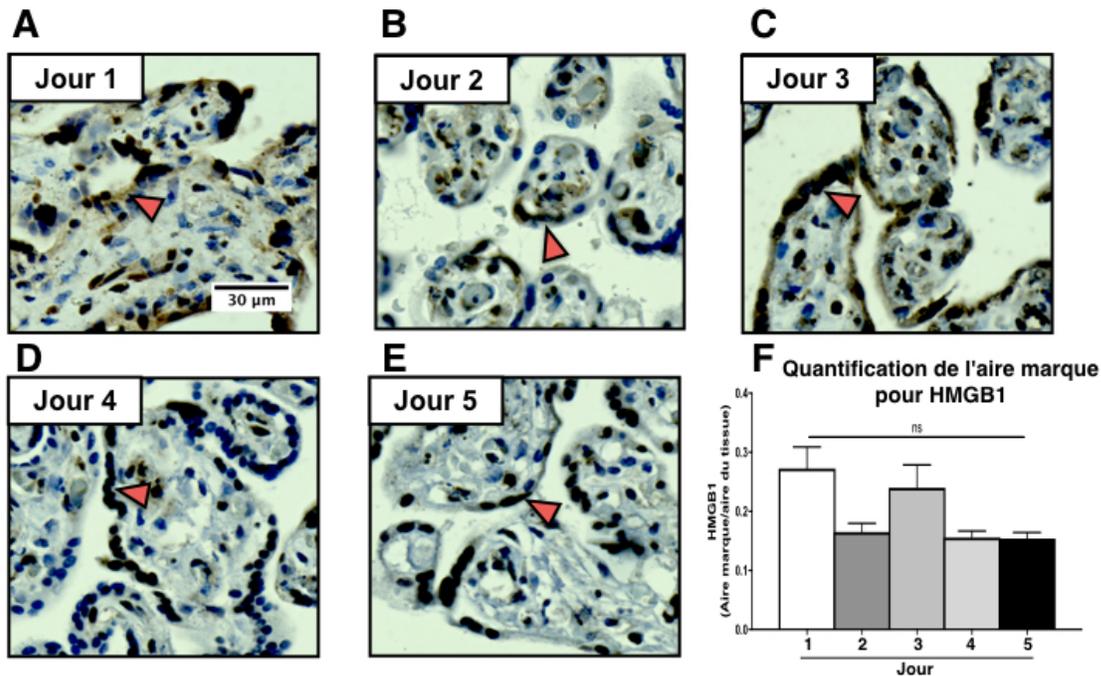


Figure 9. Localisation de HMGB1 dans les explants placentaires aux différents jours de culture. Exemple représentatif de marquage pour HMGB1 dans les explants placentaires du jour 1 au jour 5 (A-E). Aucune différence significative dans la quantité de HMGB1 dans l'ensemble du tissu placentaire étudié dans les différentes jours en culture par immunohistochimie (F), ratio entre l'aire marquée et l'aire total de tissus fait par déconvolution de couleurs. Le marquage est principalement observé dans les trophoblastes (flèches). Replicatas: N=8/condition. Echelle = 30µm, révélation avec du DAB et contre-colocation avec hématoxyline. Statistique ANOVA avec Tukey post-test: * $p \leq 0.05$.

3.3.1. Variation de la concentration subcellulaire de HMGB1

Bien que la concentration de HMGB1 demeure inchangée dans l'extrait protéique globale aux différents jours de culture des explants, on observe une variation de la concentration de HMGB1 sécrétée dans le milieu extracellulaire. Cette variation est également présente dans les cellules BeWo lors de la différenciation. Puisque HMGB1 est une protéine principalement nucléaire qui peut être transportée au cytoplasme et ensuite libérée dans le milieu extracellulaire, nous avons décidé de regarder s'il avait une différence au niveau de la concentration de HMGB1 dans les différents compartiments cellulaires, soient le noyau et le cytoplasme, lors de la différenciation autant dans les BeWo que les explants. Nous avons donc procédé à l'extraction différentielle des protéines nucléaires et cytoplasmiques sur les cellules BeWo traitées ou non à la forskoline (n=3) et sur les explants aux 5 jours de culture (n=6). La pureté des fractions a été confirmée par WB en utilisant la lamine B comme contrôle pour les protéines nucléaires et la β -actine comme contrôle pour les protéines cytoplasmiques.

En ce qui concerne les BeWo, la différenciation des trophoblastes ne s'accompagne d'aucun changement dans la concentration nucléaire de HMGB1 puisqu'on observe aucune différence significative de la quantité nucléaire de HMGB1 dans les cellules, et ce, à 24 h et 48 h (n=3) après traitement à la Forskoline (Fig 10 A). Toutefois, on note une augmentation significative de la quantité de HMGB1 dans les noyaux des cellules 48 h après traitement à la forskoline ($p=0.0062$) lors que l'on compare avec le même traitement après 24 h (Fig 10 A). Le dosage de HMGB1 dans

le cytoplasme ne montre aucune différence significative à 24 h, mais, après 48 h de traitement, il y a une accumulation significative dans le cytoplasme des cellules différenciées en comparaison au contrôle ($p=0.01$) (Fig 10 B).

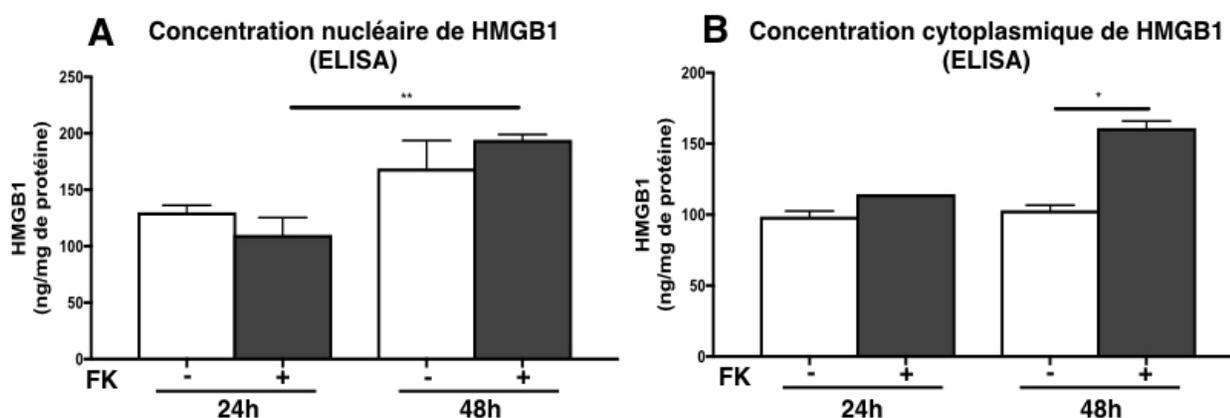


Figure 10. Concentration sub-cellulaire de HMGB1 dans les cellules BeWo. Aucune différence observée dans la concentration nucléaire de HMGB1 avec le traitement à la forskoline (FK) (25 μ M), mais une augmentation est observée entre 48h et 24h de culture (A), lors de la quantification par ELISA. Une accumulation de la quantité de HMGB1 est observée dans le cytoplasme lors de la différenciation des cellules BeWo avec le traitement à la forskoline (FK) 25 μ M pour une période de 48h (B), lors de la quantification par ELISA. Replicatas: n=3/condition. Statistique, test de T: * = $p\leq 0.05$; ** = $p\leq 0.01$.

Pour ce qui est des cultures d'explantats placentaires, l'analyse de la fraction nucléaire montre une augmentation de HMGB1 aux jours 4 et 5 tel que démontré par l'augmentation de l'intensité de la bande pour HMGB1 dans les deux dernières journées par immunobuvardage de type western (WB) (Fig 11 A), et également démontre par ELISA (Fig 11 B). L'analyse de la fraction cytoplasmique ne démontre aucun changement significatif de la concentration de HMGB1 tout au long de la culture ni par WB ni par ELISA (Fig 11 C et D). Globalement, bien que la concentration totale de

HMGB1 ne soit pas modulée, sa concentration nucléaire est augmentée en association avec la différenciation des trophoblastes.

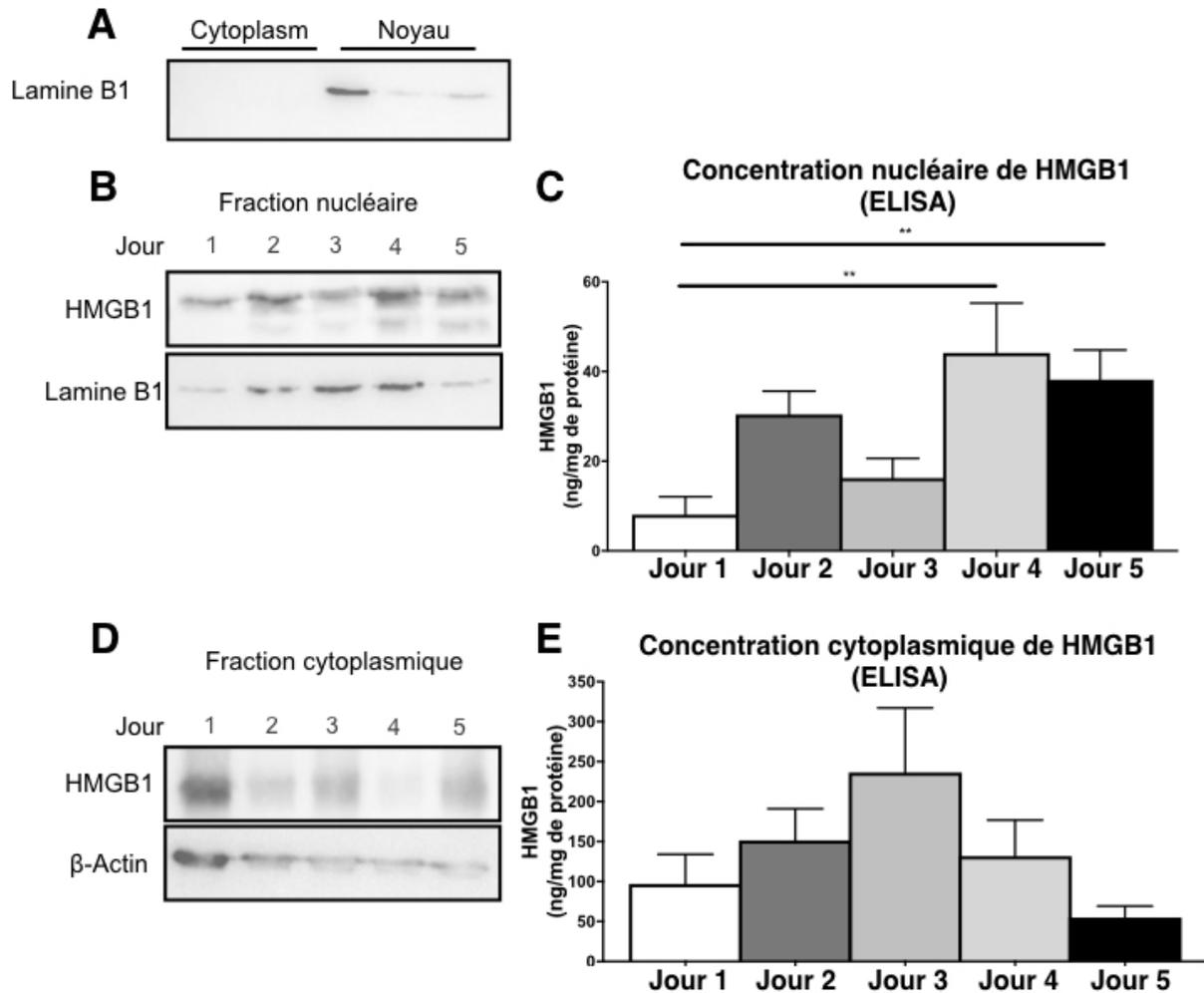


Figure 11. Quantification de HMGB1 dans les fractions subcellulaires dans les explants placentaires. Pureté de la fraction cytoplasmique confirmée par l'absence de Lamine B1 (protéine nucléaire) dans la fraction (A). Une augmentation de la quantité de HMGB1 dans la fraction nucléaire des explants avec la différenciation a été observée par immunobuvardage de type western (B) et quantifiée par ELISA (C). Cependant, la concentration de HMGB1 dans le cytoplasme ne fut pas significativement changée peut importe les jours de cultures tel que mesuré par immunobuvardage de type western (D) et par ELISA (E). Replicatas: N=6/condition. Statistique ANOVA avec Tukey post-test: **= $p \leq 0.01$.

3.4. Modulation de l'exportation extranucléaire de HMGB1

Pour mieux comprendre le rôle de HMGB1 dans le processus de différenciation des trophoblastes, nous avons investigué la possibilité de moduler sa localisation de façon non spécifique. Nous avons utilisés deux inhibiteurs soient, le NaB, inhibiteur des hDAC qui a pour effet de favoriser la translocation de HMGB1 vers le cytoplasme et la Leptomycin B, inhibiteur de l'exportine 1 qui favorise l'accumulation d'HMGB1 dans le noyau. Nous avons débuté par déterminer l'effet de ces inhibiteurs sur la viabilité cellulaire. Ensuite, nous avons étudié la localisation de HMGB1 suite aux différents traitements, et ce, autant dans les cellules BeWo que les explants.

3.4.1. Viabilité cellulaire suite à l'exposition aux inhibiteurs (cellules BeWo)

Pour déterminer l'effet des inhibiteurs NaB et Leptomycine B sur la viabilité cellulaire, nous avons utilisé la méthode de MTT pour les cellules BeWo (n=3) et l'immunohistochimie avec le marqueur d'apoptose M30 pour les explants placentaires (n=7).

En ce qui concerne les BeWo, nous avons analysé la viabilité cellulaire des différentes conditions de traitement (voir méthode sections 2.2 et 2.3 pour le détail des traitements et des inhibiteurs utilisés) soit 1- cellules traitées avec véhicule (Veh-PBS); 2-NaB; 3- deuxième véhicule (Veh-EtOH); 4- Leptomycine; et les mêmes traitements combinés à la forskoline. Puisqu'aucune différence n'a été observée entre le traitement avec le PBS ou l'éthanol, les 2 véhicules, nous avons combiné les deux

pour les analyses de viabilité. La viabilité cellulaire a été déterminée après 4 h, 24 h et 48 h de traitement. Lorsque l'on compare les différents groupes expérimentaux, la viabilité cellulaire demeure inchangée après 4 h de traitement (Fig 12 A). Cependant pour les durées de culture plus longues, soit 24 et 48 h, les deux inhibiteurs ont des effets importants sur la viabilité. Le traitement au NaB induit une diminution de la viabilité significative par rapport au contrôle, et cette diminution reste la même lorsqu'il y a combinaison avec la forskoline (Fig 12 B et C). L'exposition à la leptomycine à la dose recommandée par le fabricant (c.-à-d. 50nM) fut toxique pour les cellules autant à 24 h qu'à 48 h (Fig 12 B et C). La toxicité de la leptomycine a aussi été observée par la diminution de la densité des cellules dans les images de fluorescence (Fig 12 E). Nous avons donc testé des doses plus faibles de leptomycine, soit 25nM et 10nM, mais les deux se sont avérées autant toxiques (données non présentées).

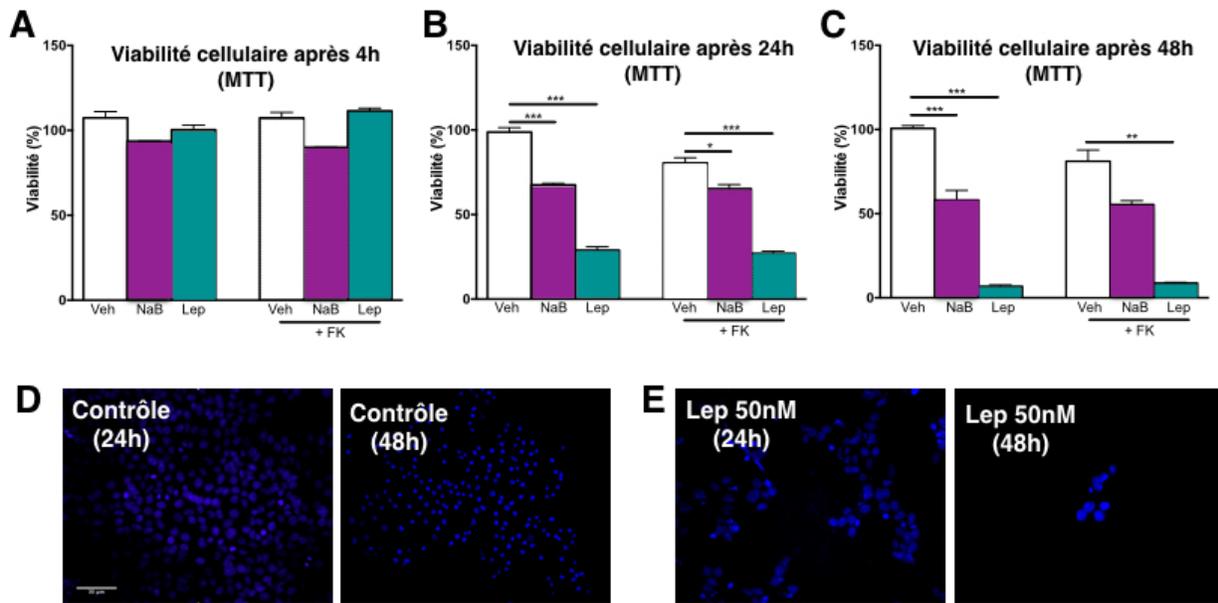


Figure 12. Evaluation de la viabilité des cellules BeWo par test MTT. La viabilité des cellules BeWos est inchangée après 4h d'exposition aux inhibiteurs (c.-à-d. NaB (0,5mM)= inhibiteur de HDAC et Leptomycine - Lep (50nM) = inhibiteur d'exportation nucléaire) (A). Cependant après 24h (B) et 48h (C) la viabilité est significativement diminuée lors du traitement à l'un ou l'autre des inhibiteurs et ce avec ou sans forskoline (FK) (25µM). L'effet des inhibiteurs sur la viabilité cellulaire peut aussi être observé par la densité des cellules dans les images de fluorescence (D et E). Replicatas: N=3/condition. Statistique, test de T: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. Echelle 30µm; Fluorescence bleu = DAPI.

Pour l'analyse de la viabilité cellulaire dans les explants placentaires, nous avons utilisé l'immunohistochimie pour détecter un marqueur apoptotique, M30, et nous avons calculé le pourcentage de cellules apoptotiques (M30 positives). Parce que les explants sont habituellement plus robustes que les cellules en monocouches, nous avons débuté les tests en utilisant les doses recommandées par le fabricant (c.-à-d. 0,5mM pour le NaB et 50nM pour la leptomycine). Les explants ont été maintenus en culture pour une période de cinq jours, période durant laquelle la couche externe formée de syncytiotrophoblaste se reforme (voir section 1.1 pour les détails).

L'analyse des cellules apoptotiques dans les explants a été faite dans les explants contrôles récupérés à chaque jour de culture ainsi que dans les explants traités avec les inhibiteurs, et récupérés au jour 5. Lorsque l'on regarde les explants contrôles à chaque jour de culture, on observe un taux d'apoptose d'environ 3,5%, et ce, peu importe le jour de culture (Fig 13 A). Une moyenne semblable est observée pour le véhicule (EtOH) (Fig 13 B). Concernant le traitement au NaB, celui-ci favorise la survie des explants qui démontrent seulement 2% de cellules apoptotiques; pourcentage significativement plus petite que celle des explants non traités (Fig 13 B).

Dans des analyses préliminaires, l'exposition à la leptomycine chaque jour de culture s'est avérée toxique (données non présentés), nous avons donc traité les explants à la leptomycine à la journée où les cytotrophoblastes sont les plus exposés, soit au jour 2 (quand les explants sont déjà acclimatées à culture et sont en train de se différencier, tel que détaillé dans la section 3.3) et ce traitement a aussi diminué le taux d'apoptose lorsque l'on compare avec le véhicule (Fig 13 B).

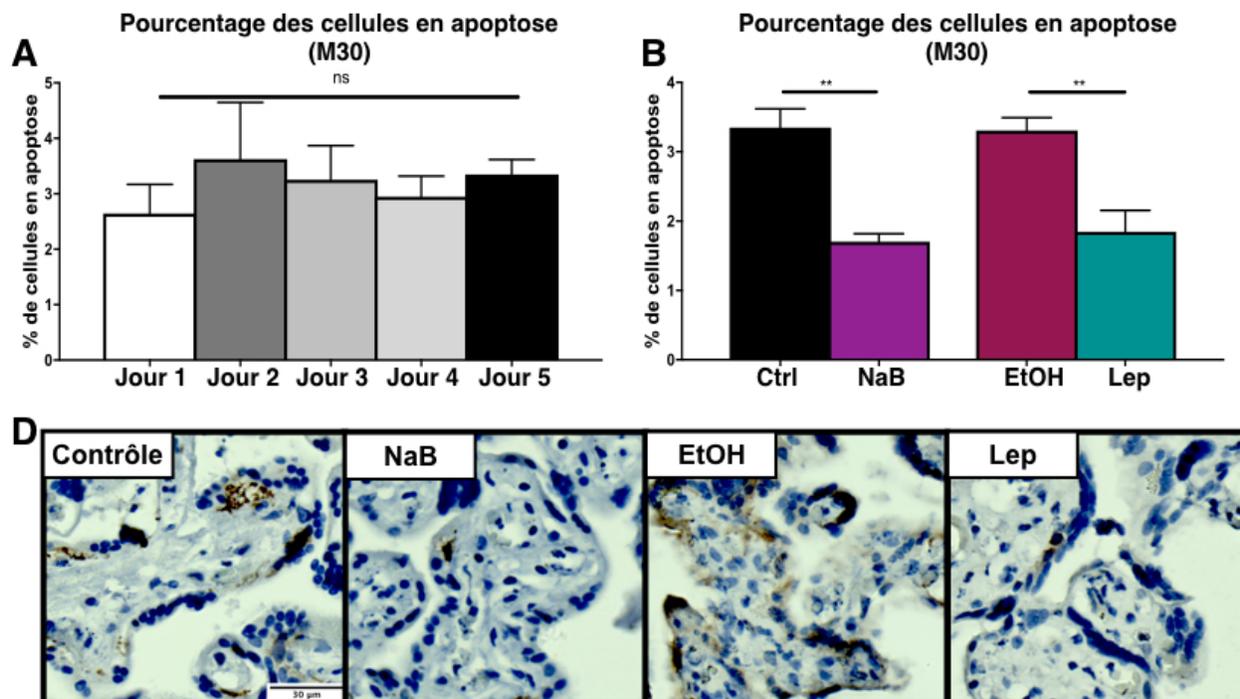


Figure 13. Pourcentage des cellules apoptotiques dans les explants placentaires. Le pourcentage de cellules apoptotiques (M30 positives) dans les explants ne change pas peu importe le jour de culture (A), lors du traitement avec les inhibiteurs (B) on observe une diminution significative du pourcentage des cellules en apoptose. Le pourcentage a été fait par le rapport entre cellules positives (brunes) et le nombre total de cellules. Images représentative d'immunohistochimie pour M30 dans des explants exposés au véhicule et traitements (D). Replicatas: N=7/condition. Statistique ANOVA avec Tukey post-test, pour les jours sans traitement et test de T: pour la comparaison entre le traitement avec NaB (0,5mM) et contrôle, ainsi que pour Leptomycine (Lep) (50nM) et éthanol (EtOH) **= $p \leq 0.01$. Echelle = 30µm; révélation avec DAB et contre-colocation avec l'hématoxyline.

Les effets des inhibiteurs sur la viabilité définis, nous avons ensuite évalué l'effet sur la localisation subcellulaire de HMGB1. Pour déterminer l'exportation de HMGB1 hors du noyau (ou sa rétention nucléaire) dans les cellules BeWo, nous avons utilisé l'immunobuvardage de type western (n=3), et l'ELISA (n=3) et nous avons confirmé les résultats visuellement à l'aide de l'immunofluorescence (n=6) par analyse de la colocalisation entre HMGB1 et le DAPI (marqueur nucléaire). Le traite-

ment avec l'inhibiteur de HDAC (NaB), n'entraîne aucune variation significative de la concentration de HMGB1, ni dans la fraction nucléaire (Fig 14 A) ni dans celle cytoplasmique (Fig 14 B), et ce, peu importe la durée du traitement (c.-à-d. 24 h ou 48 h) ni le type d'analyse utilisée. Toutefois, il semble y avoir une tendance à la diminution dans le noyau lors du traitement de 24 h ($p=0.087$) (fig 14 A). Nous avons confirmé ce résultat visuellement par immunofluorescence et, comme on peut le voir dans la figure 14 C, les cellules contrôles ou les cellules traitées soit avec la forskoline, soit avec le NaB pour une période de 24 h présentent une colocalisation modérée de HMGB1 et du DAPI, ainsi qu'un niveau constant de HMGB1.

En ce qui concerne la libération de HMGB1 dans le milieu extracellulaire suite au traitement avec le NaB, on n'observe pas de variation significative lorsqu'on compare avec les cellules contrôles ou celles traitées avec la forskoline, bien que la forskoline induit une augmentation après 48 h (Fig 14 D). La leptomycine étant toxique pour les cellules, nous n'avons pas fait l'analyse de la sécrétion de HMGB1 suite au traitement étant donné que ces résultats seraient faussés, puisqu'HMGB1 est libéré dans le milieu extracellulaire lors de la nécrose.

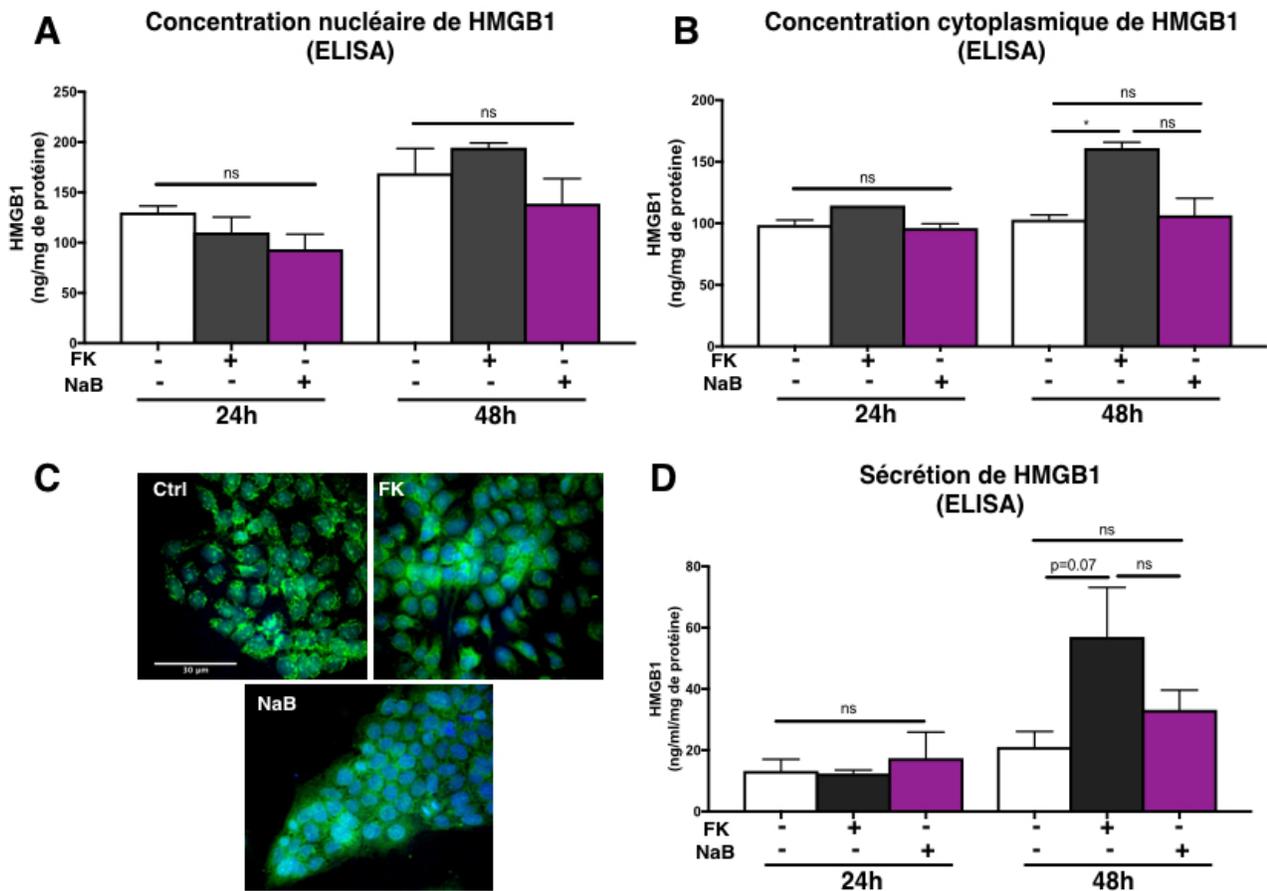


Figure 14. Modulation de la concentration subcellulaire de HMGB1 dans les cellules BeWo. Aucune variation dans la concentration nucléaire (A) et cytoplasmique (B) de HMGB1 n'est observé après l'utilisation de NaB (0,5mM), lors de l'analyse par ELISA et ça peut importe le période de incubation (24h ou 48h). Colocalisation entre HMGB1 (vert) et DAPI (blue) détectée par immunofluorescence (C) démontrant l'absence de changement malgré l'utilisation de NaB, colocalisation réalisé par fusion de canaux dans le software Image J®. Sécrétion de HMGB1 dans le milieu extra-cellulaire suite au traitement démontré par ELISA (D). Replicatas: N=3/condition (Elisa, D); n=9/condition (Fluorescence C). Statistique, teste de T: * = $p \leq 0.05$. Echelle: 30μm.

Pour investiguer la concentration de HMGB1 dans les explants placentaires à la suite des traitements, nous avons utilisé le test d'ELISA (n=7). Nous avons observé que la concentration globale de HMGB1 est significativement augmentée par l'inhibiteur d'histone déacetylase (3 fois plus élevé que le contrôle ($p=0.029$)) (Fig 15 A). Lorsque les fractions cytoplasmiques et nucléaires sont isolées séparément, on remarque que la concentration de HMGB1 dans la fraction nucléaire n'est pas significativement différente de celle du contrôle à la suite du traitement au NaB. Cependant, la fraction cytoplasmique présente une concentration significativement supérieure à celle du contrôle ($p=0.032$) (Fig 15 B), il y a donc une augmentation du mouvement net vers le cytoplasme de HMGB1 à la suite du traitement au NaB. Aucune différence n'a été observée après le traitement à la leptomycine en ce qui concerne les concentrations cytoplasmiques, nucléaire et extracellulaire (Fig 15 B-D), cependant il y a une diminution de la concentration globale de HMGB1 lorsque comparé à son véhicule (éthanol). Cependant, l'éthanol seul mène à une augmentation significative de la concentration globale d'HMGB1 par rapport au contrôle sans traitement, menant ainsi à une différence aussi significative lorsque l'on compare à la leptomycine. Pour confirmer ces résultats, nous avons aussi réalisé une analyse par immunohistochimie et l'analyse de l'aire correspondant au marquage HMGB1 par rapport à l'aire totale du tissu ne montre pas de différence significative entre les tissus contrôles et ceux traités au NaB, mais une diminution est observée dans ceux traités à la leptomycine par rapport à son véhicule (Fig 15 F), confirmant la variation de concentrations subcellulaire de HMGB1.

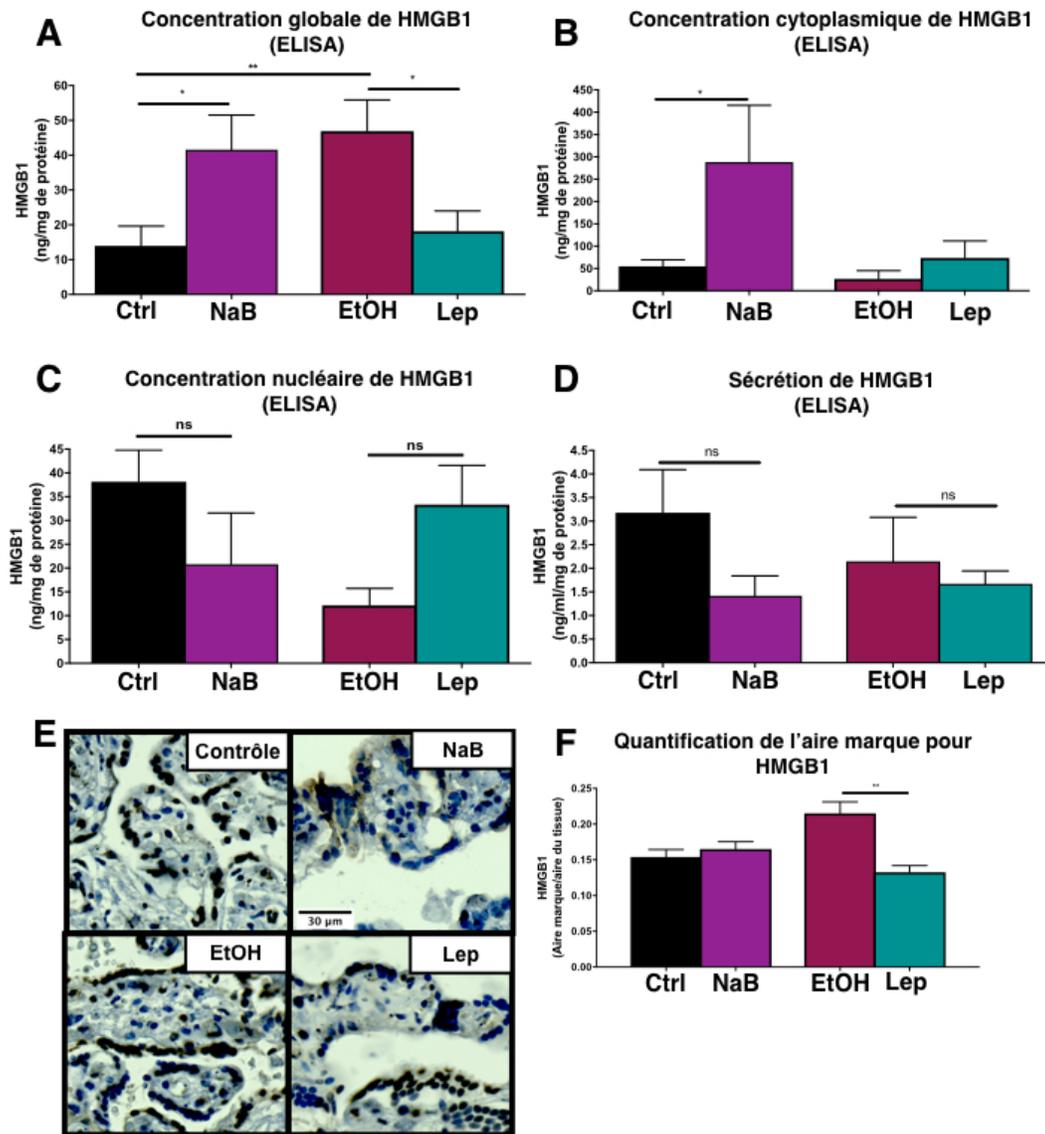


Figure 15. Modulation de la concentration subcellulaire de HMGB1 dans les explants placentaires. Le traitement au NaB (0,5mM) induit une augmentation de la concentration totale de HMGB1 dans les explants tandis que la leptomycine (50nM) induit une diminution par rapport à son véhicule, l'éthanol; l'éthanol à son tour, induit à une augmentation significative de la concentration global de HMGB1 en comparaison au contrôle, lors de l'analyse par ELISA (A). La concentration de HMGB1 dans le cytoplasme est augmentée lors du traitement avec NaB (B), par contre la concentration dans la fraction nucléaire demeure inchangée (C). En ce qui concerne la sécrétion de HMGB1 dans le milieu extracellulaire, aucun des inhibiteurs n'a induit une différence (D). L'analyse par immunohistochimie confirme ces résultats avec une diminution de l'intensité du marquage dans le cytoplasme des trophoblastes à la suite du traitement avec la leptomycine (Lep) (50nM). Exemples représentatifs de staining en (E) et quantification du marquage en (F), ratio entre l'aire marquée et l'aire total de tissu fait par déconvolution de couleurs. Replicatas: N=7/condition. Statistique, test de T (comparaison entre chaque condition avec le véhicule/contrôle) *= p<0.05; **=p<0.01. Echelle: 30µm, révélation avec DAPI et contre-coloration avec hematoxyline

3.4.2. Association entre la localisation subcellulaire de HMGB1 et la différenciation des trophoblastes.

Une fois les conditions optimales de traitement induisant des changements dans la localisation de HMGB1 déterminées, nous avons investigué si la modulation de l'export nucléaire de HMGB1 interférait avec la différenciation des trophoblastes. Dans les cellules BeWo, l'inhibiteur de l'histone déacétylase (NaB) n'a pas eu d'effet sur la localisation de HMGB1 (Fig 14 A, B et D) et n'a pas influencé la différenciation des trophoblastes puisque la sécrétion de β -hCG reste inchangée dans les deux conditions (Fig 16 A).

Lorsqu'on étudie l'action des inhibiteurs dans les explants placentaires, on remarque que le NaB induit une augmentation de HMGB1 dans le cytoplasme (Fig 15 B), tandis que la leptomycine n'entraîne pas son accumulation (Fig 15). En concordance, la sécrétion de β -hCG par les explants traités avec le NaB est significativement supérieure à celle des explants contrôles au jour 5 de culture ($p=0.0004$) (Fig 16 B). Lorsque l'on regarde l'effet de la leptomycine sur la différenciation, malgré l'absence d'accumulation de HMGB1 dans le noyau, on voit qu'elle induit une diminution de la libération de β -HCG, principalement au jour 5 de culture, où la concentration est 3 fois moins importante que celle du véhicule ($p=0.0016$) (Fig 16 C). Globalement, ces résultats démontrent que la modulation de la localisation de HMGB1 est liée à la différenciation des trophoblastes.

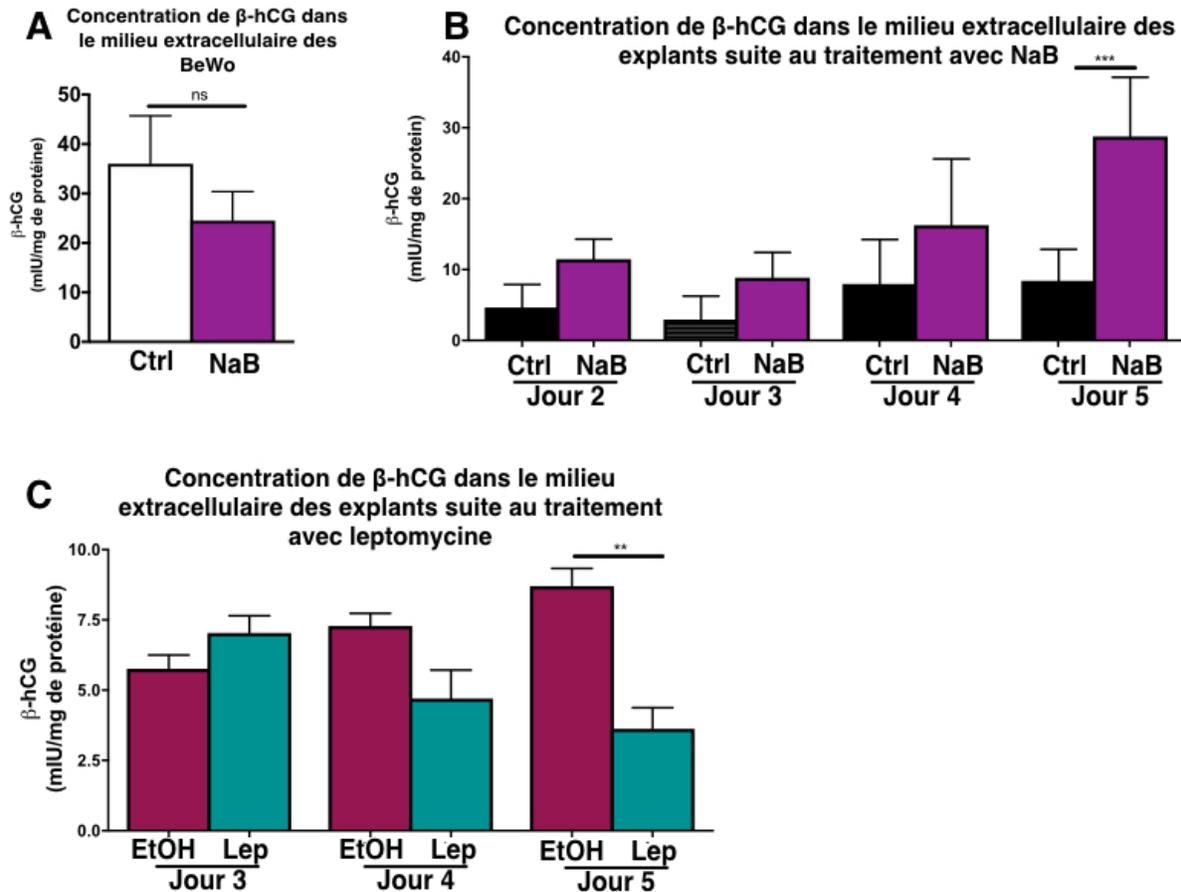


Figure 16. Sécrétion de β -hCG à la suite de la modulation de la localisation de HMGB1. L'exposition au NaB dans les cellules BeWo ne change pas la sécrétion de β -hCG (A). Dans les explants, l'exposition au NaB augmente la sécrétion de β -hCG (B); et le traitement à la leptomycine diminue la sécrétion de β -hCG au jour 5 de culture. Replicatas: N=7/condition. Statistique, test de T * p <0.05; ** p <0.01, *** p <0.001.

3.5. HMGB1 dans le placenta provenant des grossesses compliquées avec la prééclampsie

Compte tenu du lien entre les niveaux de HMGB1 et les complications de la grossesse (voir introduction page 14), nous avons étudié la distribution du marquage pour HMGB1 dans des placentas de grossesses avec prééclampsie (PE) pour

déterminer s'il y avait une différence par rapport à des placentas provenant de grossesses normales (c.-à-d. sans complications). Lors des analyses de placentas provenant de grossesses compliquées avec la PE, nous avons observé une translocation de HMGB1 vers le cytoplasme (Fig 17). L'analyse du marquage pour HMGB1 dans ces placentas montre un marquage plus intense dans l'ensemble des tissus, avec un marquage nucléaire semblable à celui observé dans les tissus de grossesses normales et, une augmentation au niveau du cytoplasme (Fig 17). De plus, le marquage pour HMGB1 est particulièrement observé dans les trophoblastes (Fig 17 A, Flèches). Ainsi, les analyses pointent vers une augmentation de HMGB1 dans les placentas de grossesses avec PE, avec une accumulation dans le cytoplasme.



Figure 17. Localisation de HMGB1 dans le placenta lors de la prééclampsie. Il y a une redistribution de HMGB1 vers le cytoplasme des syncytiotrophoblastes dans les placentas de grossesses avec prééclampsie (PE) par rapport aux placentas de grossesses normales (A). Augmentation de l'intensité du marquage pour HMGB1 dans les tissus de PE (B). Replicatas: N=20/condition. Statistique, test de T; *p<0.05. Echelle: 30µm, révélation avec DAB et contre-coloration avec hemotoxyline.

CHAPITRE IV

4. Discussion

Durant ce travail de maîtrise, nous avons étudié les variations de la distribution subcellulaire de HMGB1 en association avec la différenciation des trophoblastes, le principal type cellulaire du placenta. Les études réalisées sur une lignée cellulaire de trophoblastes, cellules BeWo, ont démontré une augmentation de la sécrétion dans le milieu extracellulaire ainsi que de la concentration cytoplasmique de HMGB1 lorsque la différenciation était induite par le traitement avec la forskoline, et ce pour une période de 48h. Le traitement avec l'inhibiteur de HDAC (c.-à-d. NaB) n'a pas induit de variation dans la concentration de HMGB1 et n'a pas modulé la différenciation cellulaire. L'utilisation de la leptomycine (inhibiteur d'export nucléaire) a généré un haut taux de mortalité dans les cellules et les résultats n'ont donc pas été considérés. L'utilisation du modèle d'explant placentaire a démontré une augmentation de la concentration nucléaire de HMGB1 ainsi qu'une diminution de sa sécrétion lors de la différenciation des trophoblastes. Avec ce modèle, le plus représentatif de la situation *in vivo*, le traitement au NaB a généré une accumulation de HMGB1 dans le cytoplasme, tandis que la leptomycine a induit une diminution de la concentration totale de HMGB1, par rapport à son véhicule, mais sans accumulation nucléaire significative. En association avec ces résultats, le traitement avec le NaB a induit une augmentation de la différenciation des trophoblastes (sécrétion de β -hCG), tandis que la leptomycine, elle l'a diminuée. Dans les placentas de grossesses pathologiques (c.-à-d. atteintes de la prééclampsie), on a observé une redistribution de HMGB1 vers le

cytoplasme des syncytiotrophoblastes particulièrement, phénomène qui n'est pas observé dans les placentas de grossesses sans complications (normales). Globalement, les résultats démontrent un changement de la distribution de HMGB1 lors de la différenciation des trophoblastes et une possible association entre les 2, bien que le lien causal reste à déterminer.

4.1. HMGB1 et les cellules BeWo

Les résultats obtenus avec les cellules BeWo et les explants ne concordent pas parfaitement, ce qui peut être expliqué par le fait que les BeWo sont une lignée cellulaire isolée d'un choriocarcinome (c.-à-d. cancer du placenta) et que ces cellules ne se différencient pas spontanément contrairement aux cytotrophoblastes contenus dans les explants. Les différences entre les résultats observés entre les BeWos et les explants sont dues au fait que les BeWos sont une lignée cellulaire composée seulement de trophoblastes, tandis que les explants sont une culture *ex vivo* possédant divers types cellulaires, de manière que ces deux sont des systèmes différents et ne peuvent pas être comparés directement, chaque résultat doit être analysé individuellement. Pour induire la différenciation chez les BeWo, il est nécessaire d'utiliser un agent chimique (la forskoline) qui active l'AMP cyclique ce qui mène à la différenciation des trophoblastes et à leur fusion. Une augmentation de la concentration extracellulaire de HMGB1 à la suite du traitement avec la forskoline ainsi que des agonistes de l'AMPc a déjà été démontrée par Passalacqua *et al.* (1997) dans des astrocytes (cellules cérébrales) de façon similaire à ce que nous avons démontré dans

nos résultats. Cependant, cette étude n'a pas rapporté le taux de nécrose cellulaire à la suite de l'exposition à la forskoline, la nécrose étant bien connue pour être l'un des mécanismes de relâche passive de HMGB1 (Lotze et Tracey, 2009). Dans nos travaux, nous avons observé que le traitement avec la forskoline pour la période de 48 h induit 6% de nécrose, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de HMGB1 dans le milieu extracellulaire que nous avons observé.

D'un autre côté, l'augmentation de la concentration extracellulaire de HMGB1 que nous avons observés peut-être aussi liée à la différenciation des trophoblastes. Jia *et al.* (2014), ont démontré une association entre l'élévation de la concentration extracellulaire de HMGB1 et la différenciation des cellules *nurse-like* de leucémie lymphocytaire chronique. De plus, Guazzi *et al.* (2007), ont démontré qu'il existe une translocation de HMGB1 vers le cytoplasme et une augmentation de sa concentration dans le milieu lors de la différenciation des cellules de neuroblastome. Dans leurs travaux, Guazzi *et al.* (2007) ont observé que les cellules non différenciées possèdent une concentration de HMGB1 plutôt nucléaire, tandis que les cellules différenciées présentent une concentration majoritairement cytoplasmique qui mènent à une sécrétion active de la protéine. Dans nos analyses, nous avons aussi observé une concentration de HMGB1 dans le cytoplasme qui est augmentée lors de la différenciation induite par forskoline et une augmentation de la concentration dans le milieu dans la même condition. Ainsi, il est possible que lors de la différenciation des BeWo, HMGB1 soit transloqué vers le cytoplasme et sécrété activement par ces cellules.

Pour modifier la localisation de HMGB1 dans les trophoblastes, nous avons utilisé deux inhibiteurs soit le NaB et la leptomycine. Cependant, ils n'ont pas eu l'effet escompté dans les cellules BeWo. Le NaB a été sélectionné puisqu'il y a été démontré par Takai *et al.* (2008) que les autres inhibiteurs de HDACs connus entraînent une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une diminution de 50% de la viabilité, ce qui n'était pas le cas du NaB. En ce qui concerne l'absence d'effet du NaB sur la différenciation des cellules BeWos, Ruebner *et al.* (2013) ont démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de HDAC (la trichostatin A, TSA) diminue la sécrétion de hCG par les cellules BeWo, ce qui pourrait expliquer nos résultats, bien que ceci n'a jamais été rapporté avec le NaB. En ce qui concerne la leptomycine, la toxicité que nous avons observée peut-être due au fait que cet inhibiteur n'est pas spécifique pour HMGB1. Il inhibe le CRM1 qui est responsable du transport des protéines et facteurs de régulation de la croissance cellulaire, ainsi son inhibition peut mener à une diminution de la survie cellulaire (Liu *et al.*, 2016). Une autre hypothèse est que la leptomycine induit un arrêt de la prolifération cellulaire, tel que démontré précédemment (Marchetti *et al.*, 2004), menant à une diminution de la viabilité ce qui a pu contribuer au résultat obtenu dans les cellules BeWo.

4.2. HMGB1 dans les explants placentaires

Lors de nos travaux, nous avons observé que la concentration extracellulaire de HMGB1 dans les explants est élevée dans les premières 24 heures de culture suivie d'une diminution prononcée à partir de 48 heures, et ce jusqu'au jour 5. Cette re-

lâche importante de HMGB1 peut être expliquée par trois possibilités : La première serait due à un taux important de nécrose qui a lieu lors de l'acclimatation du tissu à la culture. Une deuxième explication est la possibilité d'une libération active de HMGB1 par les macrophages placentaires (cellules de Hofbauer) en réponse au stress de la mise en culture. Cependant, cette 2e hypothèse est peu probable puisque la majorité du marquage pour HMGB1 au jour 1 de la culture est observé dans les trophoblastes. Une troisième possibilité est que les trophoblastes libèrent eux aussi HMGB1 activement, ce qui est possible puisque nous avons observé la présence de HMGB1 dans le cytoplasme des trophoblastes et la translocation vers le cytoplasme est l'étape précédant la sécrétion active (Lotze et Tracey, 2009). La première et la troisième possibilités peuvent toutes les deux contribuer aux niveaux élevés de HMGB1 détectés dans le milieu extracellulaire. Cependant, il est impossible de différencier les deux options ou de s'assurer de leurs contributions avec les résultats des travaux présentés dans ce mémoire. Après 48 h en culture, les explants sont acclimatés aux conditions et la mort cellulaire est quasi inexistante (selon nos analyses), cependant HMGB1 est toujours retrouvé dans le milieu extracellulaire même qu'il y a une diminution significative au dernier jour par rapport au deuxième, ainsi il est possible que les trophoblastes continuent à le libérer tout au long de la culture lors de leur différenciation. Comme décrit dans la section précédente, il existe une association entre HMGB1 extracellulaire et la différenciation cellulaire, ainsi il est possible que dans le milieu extracellulaire HMGB1 stimule la différenciation des trophoblastes en se liant aux récepteurs, de cette manière HMGB1 formerait un complexe avec les récepteurs et ne serait pas reconnu par le kit d'ELISA utilisé pour le

quantifier. Étant donné que la différenciation maximale a lieu aux jours 4 et 5 de la culture, tel que démontré par l'augmentation de β -hCG dans ces jours, il serait logique que la concentration de HMGB1 extracellulaire soit la plus faible, car il y a une augmentation de la concentration de HMGB1 liée aux récepteurs et donc une moindre quantité détectée.

Pour ce qui est de la concentration intracellulaire de HMGB1, malgré le fait que la quantité globale de HMGB1 dans les explants demeure inchangé tout au long de la culture, il y a une augmentation significative de la concentration nucléaire dans les deux dernières journées (jour 4 et 5). Cette accumulation nucléaire pourrait être liée à la différenciation des trophoblastes, car l'augmentation de la concentration de HMGB1 arrive simultanément avec l'augmentation de la sécrétion de β -hCG. Les actions nucléaires de HMGB1 dans les trophoblastes sont inconnues, mais il a été démontré que dans le noyau, HMGB1 interagit avec des récepteurs stéroïdiens et augmente leur activation (Melvin et Edwards, 1999). La régulation de la différenciation des trophoblastes est sous le contrôle, entre autres, de ces hormones (Malassiné et Cornier, 2002). Donc une accumulation de HMGB1 dans le noyau des trophoblastes contenus dans les explants pourrait être reliée à la différenciation via la régulation à la hausse des récepteurs hormonaux. D'un autre côté, l'augmentation de HMGB1 dans le noyau entre les jours 3 et 4 pourrait aussi refléter une plus grande sécrétion active de la protéine dans le milieu extracellulaire par les trophoblastes.

4.3. Modulation de l'exportation de HMGB1 dans les explants placentaires

Dans le cadre des travaux présentés dans ce mémoire, nous avons utilisé deux inhibiteurs pour moduler l'export nucléaire de HMGB1 avec l'objectif de comprendre son rôle lors de la différenciation des trophoblastes dans un contexte *in vitro*. Nous avons donc vérifié si l'induction de l'export nucléaire ou l'accumulation de HMGB1 dans le noyau avait une influence positive ou négative sur la différenciation des trophoblastes.

Le traitement des explants avec le NaB a mené à une augmentation de la concentration globale de HMGB1, ainsi que l'augmentation des niveaux cytoplasmiques, sans avoir effet sur la sécrétion ni sur la concentration nucléaire. L'augmentation globale de HMGB1 est très probablement due à l'augmentation de la concentration cytoplasmique. La translocation de HMGB1 vers le cytoplasme à la suite du traitement avec des inhibiteurs non spécifiques de HDAC a été démontrée par Evankovich *et al.* (2010) dans des hépatocytes. De plus, le groupe a aussi attesté que les HDACs impliqués dans la déacétylation de HMGB1 étaient les HDAC1 et HDAC4. L'association entre HDAC1 et HMGB1 a aussi été démontrée par Borthwick et Mann(2016) dans des cellules stellaires hépatiques. HDAC1 est l'une des enzymes inhibées par le NaB, ce qui supporte l'hypothèse que l'augmentation cytoplasmique de HMGB1 dans les explants à la suite du traitement avec la NaB serait due à cette action.

Dans le cytoplasme, HMGB1 participe de la régulation de l'autophagie et son accumulation dans ce compartiment cellulaire est normalement reliée à des pathologies comme l'insuffisance rénale aiguë (Zhou *et al.*, 2011) et la prééclampsie (Chen *et al.*, 2016) (plus de détails dans la section 4.4). De plus, son augmentation dans le cytoplasme est normalement associée à une sécrétion active dans le milieu extracellulaire (Lotze et Tracey, 2009). Cependant, l'induction de l'accumulation de HMGB1 dans le cytoplasme des explants par le NaB, n'a pas mené à une augmentation de l'apoptose n'y une élévation de sa concentration extracellulaire, mais a favorisé la différenciation cellulaire. Comme mentionné précédemment (section 4.1), la translocation de HMGB1 vers le cytoplasme a été démontrée lors de la différenciation des cellules de neuroblastome (Guazzi *et al.*, 2007), il est ainsi possible que l'accumulation qu'on observe lors des analyses soit reliée à l'induction de la différenciation, qui est aussi favorisée lors du traitement avec le NaB.

En ce qui concerne l'influence du NaB sur la différenciation, un effet stimulateur a été observé bien que la différenciation spontanée observée dans les explants soit associée à une accumulation nucléaire de HMGB1. Cependant, Maltepe *et al.* (2005) ont démontré une augmentation du niveau d'acétylation des histones lors de la différenciation des trophoblastes, augmentation qui est favorisée lors du traitement avec NaB. Ainsi, l'induction de la différenciation pourrait être due à cette acétylation et non à la translocation de HMGB1. Une autre explication possible est que la stimulation de la différenciation est due au fait que l'utilisation d'un HDAC augmente l'acétylation du facteur de transcription *glial cell missing 1* (GCM1) qui participe à la régulation de syncytin-1 augmentant son activité et menant à une stimulation de la fusion et

donc la différenciation des cytotrophoblastes (Chang *et al.*, 2013). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de HDAC augmente l'acétylation de la chromatine menant à une relaxation de sa structure et une augmentation de la transcription d'une manière générale (Verdone *et al.*, 2005). Cette élévation de la transcription peut mener à une régulation à la hausse de plusieurs gènes et protéines impliqués dans la différenciation cellulaire, incluant possiblement HMGB1. Ceci expliquerait le fait que sa concentration nucléaire n'est pas diminuée malgré l'induction de l'export, reflétant une possible augmentation de sa production qui va favoriser son interaction avec des récepteurs hormonaux et promouvoir une augmentation de la différenciation. Une autre hypothèse serait que l'augmentation de la concentration cytoplasmique de HMGB1 induite par le NaB mène à une plus grande sécrétion active de la molécule et une fois dans le milieu extracellulaire, HMGB1 va se lier aux récepteurs et induire la différenciation. Encore une fois, l'augmentation de la concentration extracellulaire ne serait pas détectée due à la formation des complexes entre la protéine et ses récepteurs.

L'utilisation de la leptomycine lors de la deuxième journée de culture a généré une diminution de la concentration globale de HMGB1, mais n'a pas mené à une accumulation nucléaire significative en comparaison à son véhicule. L'analyse des fractions nucléaires et cytoplasmiques des explants traités avec le véhicule de la leptomycine (éthanol) a montré que la concentration nucléaire de HMGB1 était plus basse que celle des explants sans traitement alors que la concentration cytoplasmique était similaire. Zou et Crews (2014) ont démontré dans les cellules corticales du cerveau qu'il y a une augmentation de la concentration de HMGB1 à la suite du traitement avec l'éthanol, augmentation qui était présente dans l'ensemble des cellules et dans

le cytoplasme. Ils ont aussi démontré une augmentation de l'ARN messager pour HMGB1, démontrant une régulation à la hausse de la traduction de HMGB1 (Zou et Crews, 2014). Cependant, dans notre cas, nous n'avons pas détecté cette augmentation cytoplasmique lors de l'exposition à l'éthanol donc cet effet est possiblement spécifique à certains types de cellules. Dans notre cas l'éthanol a induit une augmentation de la concentration globale de HMGB1, ce qui pourrait être expliqué par un effet toxique de l'alcool. Comme démontré dans la figure 13B, les tissus traités avec la leptomycine présentent un pourcentage de cellules en apoptose significativement plus petit que les tissus traités avec l'éthanol, et il est donc probable que la leptomycine contre l'effet toxique de l'éthanol. De plus, l'éthanol induit à des modifications épigénétiques, soit l'hyperméthylation et l'hypométhylation de l'ADN ainsi que la méthylation, acétylation et/ou phosphorylation des histones (Shukla *et al.*, 2008), modifications qui peuvent affecter la liaison de HMGB1 avec la chromatine, menant à une probable formation de complexes avec d'autres molécules et à la diminution de sa détection par ELISA.

La diminution de la concentration totale de HMGB1 lors du traitement avec la leptomycine, peut être expliquée par le fait que l'inhibiteur diminue l'export de HMGB1 vers le cytoplasme et donc la concentration nucléaire reste assez élevée pour qu'il n'y ait pas besoin d'augmenter sa production pour le maintien de ses fonctions nucléaires, malgré la présence d'éthanol (le véhicule). En ce qui concerne la différenciation trophoblastique dans les explants, le traitement avec l'éthanol n'a pas modifié la sécrétion de β -hCG comparativement au contrôle. Cependant la leptomycine a elle induit une diminution de la sécrétion de β -hCG et donc une diminution de la différenciation. Cependant, la leptomycine n'est pas un inhibiteur spécifique de HMGB1 et,

comme discuté dans la session 4.1, l'inhibition de CMR1 mène à une diminution de la prolifération et croissance cellulaire, en plus d'inhiber l'export des protéines et facteurs de transcription qui peuvent être liés à la différenciation cellulaire (Marchetti *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2016). De plus, il est possible que la diminution de l'export nucléaire mène à une diminution de la sécrétion active de HMGB1, étant donné qu'il faut que HMGB1 soit dans le cytoplasme pour sa libération active dans le milieu extracellulaire, ainsi la concentration de la protéine serait diminuée, sa liaison avec les récepteurs limitée et la différenciation empêchée.

Globalement, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent une accumulation de HMGB1 dans le noyau lors de la différenciation des trophoblastes dans des conditions physiologiques, reflétant la potentielle importance de son activité nucléaire pour la syncytialisation. Le rôle de HMGB1 dans la différenciation de trophoblastes pourrait être due à ses actions nucléaires, c.-à-d directement liées à son interaction avec des récepteurs hormonaux en favorisant leur expression, en augmentant leur activité et leur liaison aux hormones stéroïdiennes du milieu. Henson *et al.* (1996) ont démontré qu'il y a une augmentation significative de la concentration d'estradiol extracellulaire lorsqu'il y a une augmentation de la quantité de syncytiotrophoblastes dans la culture. Zicari *et al.* (2008), ont démontré que le traitement d'explants d'endomètre avec de l'estradiol 17- β (E2) induisait une augmentation globale de HMGB1. L'estradiol 17- β induit la différenciation des trophoblastes (Rama *et al.*, 2003) donc il est possible que la présence de cette hormone dans le milieu lors de l'augmentation de la différenciation et donc de la quantité de syncytiotrophoblastes, mène à une augmentation de HMGB1 qui, à son tour, va augmenter l'expression des récepteurs,

favoriser l'interaction avec les hormones et induire la différenciation (Boonyaratana-kornkit *et al.*, 1998; Scovell, 2016). Cependant il n'y a aucune preuve de quelconque présence d'estradiol dans notre système de culture.

Les travaux présentés dans ce mémoire ne permettent pas de valider hors de tout doute qu'une augmentation de la concentration nucléaire de HMGB1 ou une augmentation de sa sécrétion entrainerait la différenciation des trophoblastes. Étant donné que les inhibiteurs utilisés (leptomycine et NaB) sont tous deux non-spécifiques, les résultats présentés ne permettent que de démontrer une association entre la localisation de HMGB1 et la différenciation des trophoblastes, résultats qui devront être approfondis à l'aide d'inhibiteur spécifique.

4.4. HMGB1 et la prééclampsie

Un autre volet de nos travaux consistait à étudier des placentas qui proviennent de grossesses compliquées avec la prééclampsie. Nos analyses ont déterminé l'accumulation de HMGB1 dans le cytoplasme des trophoblastes. Cette translocation du noyau vers le cytoplasme avait déjà été démontrée par Yin *et al.* (2014) dans des placentas de grossesses compliquées avec la prééclampsie par des analyses de western blot et immunohistochimie et nos résultats concordent avec ces derniers. De plus, lors de nos analyses, nous avons observé une augmentation de l'aire totale marquée pour HMGB1 lors de la prééclampsie, augmentation liée à la redistribution cytoplasmique de HMGB1.

La translocation vers le cytoplasme de HMGB1 est la première étape menant à la sécrétion extracellulaire. En lien, une augmentation de HMGB1 a été rapportée dans le sérum maternel des femmes atteintes de PE (Naruse *et al.*, 2012). De plus, encore dans un contexte inflammatoire, l'accumulation cytoplasmique de HMGB1 a été démontrée dans les lésions cutanées lors de lupus (Barkauskaite *et al.*, 2007) et dans différents cancers tels que le mésothéliome (Jube *et al.*, 2012), carcinome nasopharyngal (Wu *et al.*, 2008) et le cancer du côlon (Kang *et al.*, 2009). Toutes ces études indiquent une association entre l'augmentation de HMGB1 cytoplasmique et l'établissement ou le développement de ces maladies. Nos résultats confirment que la prééclampsie présente la même association. Dans le cytoplasme, HMGB1 participe à la régulation de l'autophagie. HMGB1 y interagit avec la Beclin-1, protéine qui joue un rôle central dans l'autophagie, et une diminution de la concentration cytoplasmique de HMGB1 diminue l'autophagie (Tang *et al.*, 2012). Certaines études ont démontré une augmentation de l'autophagie lors de la prééclampsie. Chen *et al.*, 2012 ont démontré une augmentation des protéines LC3 et Beclin-1 (deux marqueurs d'autophagie) dans le placenta des grossesses avec PE; Oh *et al.*, 2008, ont démontré aussi une augmentation de LC3 dans les trophoblastes des grossesses compliquées avec la PE. Par conséquent, il est possible que lors de la PE, la redistribution de HMGB1 au niveau du cytoplasme contribue à l'augmentation d'autophagie qui est rapportée et collabore au développement de la pathologie.

4.5. Perspectives

Bien que les résultats présentés dans ce mémoire démontrent une association entre HMGB1 et la différenciation des trophoblastes, l'utilisation d'inhibiteurs non spécifiques ne peut confirmer un lien direct. Pour définir la participation de HMGB1 dans la différenciation des trophoblastes et déterminer le lien direct entre les deux, des techniques spécifiques pour cibler HMGB1 devront être, par la suite, utilisées. La technique du "silencing des ARN" (siRNA) permettrait d'empêcher la transcription de HMGB1 et ainsi valider si l'accumulation nucléaire de HMGB1 est impliquée dans la différenciation ou en est une conséquence. L'utilisation de siRNA dans les explants placentaires a été décrite par Forbes *et al.* (2009) et l'utilisation de siRNA pour HMGB1 dans les trophoblastes de souris et dans la ligne cellulaire JEG-3 (cytotrophoblastes et extra-villous trophoblastes de carcinome) a été réalisée par Jiang *et al.* (2014). Dans leur étude Jiang *et al.* (2014) ont observé que la transfection avec 2 μM de siRNA pour HMGB1 menait à un taux de silence de 80% dans les deux types cellulaires et ça sans présenter aucun effet sur la viabilité cellulaire.

Afin de vérifier l'hypothèse que HMGB1 interfère avec la différenciation via la stimulation des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, il serait intéressant de quantifier par PCR l'ARN messenger (ARNm) de HMGB1 ainsi que des récepteurs hormonaux impliqués dans la différenciation lors de la culture des explants. La quantification des récepteurs hormonaux pourrait confirmer s'il y a une augmentation lors de l'accumulation nucléaire de HMGB1 et lors de la différenciation spontanée des trophoblastes. La co-immunoprécipitation pourrait être une méthode à considérer, afin de

vérifier s'il y a une interaction entre HMGB1 et ces récepteurs dans le placenta, étant donné que Boonyaratankornkit *et al.*, 1998 ont démontré que HMGB1 interagit avec les récepteurs stéroïdiennes, cette interaction stimule leur liaison avec l'ADN et augmente leur activité transcriptionnelle.

L'utilisation de siRNA permettrait de déterminer le rôle de HMGB1 nucléaire, mais, pour valider l'hypothèse qui stipule que HMGB1 participe dans la différenciation à travers ses actions extracellulaires un anticorps bloquant pour HMGB1, un antagoniste de la boîte A de HMGB1 ou des molécules qui neutralisent les actions extracellulaires de HMGB1 pourraient être utilisés (Yang et Tracey, 2010). L'utilisation de ces molécules neutralisantes n'interfererait pas avec les actions intracellulaires de HMGB1 et permettrait, donc, de déterminer si les actions de HMGB1 dans la différenciation sont dues à son action intra ou extracellulaire. De plus, l'utilisation des antagonistes des récepteurs de HMGB1 pourrait être envisagée comme une approche plus spécifique pour identifier la voie de signalisation par lequel HMGB1 exerce ses actions extracellulaires (Yang et Tracey, 2010)

HMGB1 est une protéine qui peut posséder différentes isoformes selon la forme de libération dans le milieu extracellulaire, des modifications post-traductionnelles, le compartiment cellulaire où elle se trouve et des conditions environnantes (Andersson *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013). Tout dépendant de l'isoforme, HMGB1 aura une action différente (Yang *et al.*, 2013; Venereau *et al.*, 2012). Dans ce contexte, il serait intéressant de vérifier quel isoforme de HMGB1 est sécrété par les trophoblastes et lequel d'entre eux est impliqué dans leur différenciation, ce qui pourrait être fait par

spectrométrie de masse. La plupart des études qui associent HMGB1 avec les maladies inflammatoires ne mentionnent pas quel est l'isoforme impliquée, ainsi cette information pourrait contribuer à une meilleure compréhension du fonctionnement de HMGB1.

Pour adresser la question de la translocation de HMGB1 vers le cytoplasme lors de la prééclampsie et son association avec l'autophagie, il serait premièrement intéressant de confirmer l'augmentation de beclin-1 et LC3 dans les trophoblastes par ELISA et immunohistochimie. Par la suite, étudier si, en effet, HMGB1 pourrait interagir avec les protéines régulatrices de l'autophagie dans le cytoplasme des placentas avec PE. Il serait aussi intéressant d'induire l'autophagie par la rapamycine dans des explants placentaires, technique qui a été démontrée efficace pour augmenter HMGB1 dans le cytoplasme des cellules de colon (HCT116) (Tang *et al.*, 2010). Cette approche permettrait de vérifier si dans le placenta, l'induction de l'autophagie mène à une translocation de HMGB1 vers le cytoplasme et si cette corrélation entre la localisation subcellulaire de la protéine et l'autophagie est aussi applicable dans le placenta.

CHAPITRE V

5. Conclusion

Ce projet de maîtrise avait comme objectifs de (1) déterminer la concentration globale de HMGB1 ainsi que dans les compartiments cellulaires (c.-à-d. noyau et cytoplasmes) lors de la différenciation des trophoblastes dans des conditions physiologiques; (2) déterminer s'il avait une association entre la localisation subcellulaire de HMGB1 et la syncytialisation et (3) étudier la distribution de HMGB1 dans les placentas des grossesses atteintes de la prééclampsie. Nos travaux ont répondu à ces objectifs et nous avons démontré (1) la présence de HMGB1 dans les trophoblastes ainsi que la modulation de sa localisation, dans le noyau et cytoplasme, lors de la différenciation des trophoblastes; nous avons aussi démontré (2) l'association entre la localisation et la syncytialisation via la modulation de la localisation de HMGB1 et, finalement, (3) étudié la redistribution de HMGB1 dans les trophoblastes lors de la prééclampsie démontrant une accumulation cytoplasmique prédominante.

Globalement, nos travaux ont démontré l'association entre le changement de localisation de HMGB1 et la différenciation des trophoblastes. Cependant, des études plus approfondies utilisant des modulateurs spécifiques de l'action de HMGB1 sont nécessaires. Une meilleure compréhension du rôle de HMGB1 dans un contexte physiologique permettra de comprendre son implication dans les pathologies liées à la grossesse pour éventuellement développer des stratégies thérapeutiques efficaces.

CHAPITRE VI

6. Bibliographie

- Agresti, A. and M. E. Bianchi (2003). "HMGB proteins and gene expression." Curr Opin Genet Dev **13**(2): 170-178.
- Andersson, U., D. J. Antoine and K. J. Tracey (2014). "The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications." J Intern Med **276**(5): 420-424.
- Barkauskaite, V., M. Ek, K. Popovic, H. E. Harris, M. Wahren-Herlenius and F. Nyberg (2007). "Translocation of the novel cytokine HMGB1 to the cytoplasm and extracellular space coincides with the peak of clinical activity in experimentally UV-induced lesions of cutaneous lupus erythematosus." Lupus **16**(10): 794-802.
- Baumbusch, M. A., C. S. Buhimschi, E. A. Oliver, G. Zhao, S. Thung, K. Rood and I. A. Buhimschi (2016). "High Mobility Group-Box 1 (HMGB1) levels are increased in amniotic fluid of women with intra-amniotic inflammation-determined preterm birth, and the source may be the damaged fetal membranes." Cytokine **81**: 82-87.
- Benirschke, K., G. J. Burton and R. N. Baergen (2012). "Early Development of the Human Placenta." Pathology of Human Placenta 6th Edition, Chap 5: 41-53.
- Bianchi, M. E. and A. Agresti (2005). "HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 496-506.
- Bonaldi, T., F. Talamo, P. Scaffidi, D. Ferrera, A. Porto, A. Bachi, A. Rubartelli, A. Agresti and M. E. Bianchi (2003). "Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion." EMBO J **22**(20): 5551-5560.
- Boonyaratanakornkit, V., V. Melvin, P. Prendergast, M. Altmann, L. Ronfani, M. E. Bianchi, L. Taraseviciene, S. K. Nordeen, E. A. Allegretto and D. P. Edwards (1998). "High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells." Mol Cell Biol **18**(8): 4471-4487.
- Borthwick, L. A. and D. A. Mann (2016). "Liver: Osteopontin and HMGB1: novel regulators of HSC activation." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **13**(6): 320-322.
- Brien, M. E., C. Duval, J. Palacios, I. Boufaied, A. A. Hudon-Thibeault, M. Nadeau-Vallee, C. Vaillancourt, C. P. Sibley, V. M. Abrahams, R. L. Jones and S. Girard (2017). "Uric Acid Crystals Induce Placental Inflammation and Alter Trophoblast Function via an IL-1-Dependent Pathway: Implications for Fetal Growth Restriction." J Immunol **198**(1): 443-451.

- Calogero, S., F. Grassi, A. Aguzzi, T. Voigtlander, P. Ferrier, S. Ferrari and M. E. Bianchi (1999). "The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice." Nat Genet **22**(3): 276-280.
- Castiglioni, A., V. Canti, P. Rovere-Querini and A. A. Manfredi (2011). "High-mobility group box 1 (HMGB1) as a master regulator of innate immunity." Cell Tissue Res **343**(1): 189-199.
- Challis, J. R., C. J. Lockwood, L. Myatt, J. E. Norman, J. F. Strauss, 3rd and F. Petraglia (2009). "Inflammation and pregnancy." Reprod Sci **16**(2): 206-215.
- Chang, C. W., M. L. Cheong, G. D. Chang, M. S. Tsai and H. Chen (2013). "Involvement of Epac1/Rap1/CaMKI/HDAC5 signaling cascade in the regulation of placental cell fusion." Mol Hum Reprod **19**(11): 745-755.
- Chaouat, G., J. Tranchot Diallo, J. L. Volumenie, E. Menu, G. Gras, G. Delage and B. Mognetti (1997). "Immune suppression and Th1/Th2 balance in pregnancy revisited: a (very) personal tribute to Tom Wegmann." Am J Reprod Immunol **37**(6): 427-434.
- Chen, G. Q., H. Zhang, H. B. Qi, Z. W. Yao, L. Gao and C. L. Qiu (2012). "[Effects and mechanisms of autophagy of trophoblast cells in severe preeclampsia]." Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi **28**(3): 294-296.
- Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." Nat Rev Immunol **10**(12): 826-837.
- Chen, Q., Y. X. Yin, J. Wei, M. Tong, F. Shen, M. Zhao and L. Chamley (2016). "Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) in the cytoplasm of placental syncytiotrophoblast from preeclamptic placentae." Cytokine **85**: 30-36.
- Coussons-Read, M. E., M. L. Okun and C. D. Nettles (2007). "Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy." Brain Behav Immun **21**(3): 343-350.
- Cross, J. C. (2000). "Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis." Semin Cell Dev Biol **11**(2): 105-113.
- Davie, J. R. (2003). "Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate." J Nutr **133**(7 Suppl): 2485S-2493S.
- Donnelly, L. and G. Campling (2014). "Functions of the placenta." Anaesthesia & Intensive Care Medicine **15**(3): 136-139.
- Dumitriu, I. E., P. Baruah, A. A. Manfredi, M. E. Bianchi and P. Rovere-Querini (2005). "HMGB1: guiding immunity from within." Trends Immunol **26**(7): 381-387.
- Evankovich, J., S. W. Cho, R. Zhang, J. Cardinal, R. Dhupar, L. Zhang, J. R. Klune, J. Zlotnicki, T. Billiar and A. Tsung (2010). "High mobility group box 1 release from hepatocytes during ischemia and reperfusion injury is mediated by decreased histone deacetylase activity." J Biol Chem **285**(51): 39888-39897.

- Farina, A., E. S. LeShane, R. Romero, R. Gomez, T. Chaiworapongsa, N. Rizzo and D. W. Bianchi (2005). "High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: A risk factor for spontaneous preterm delivery." American Journal of Obstetrics and Gynecology **193**(2): 421-425.
- Forbes, K., M. Desforges, R. Garside, J. D. Aplin and M. Westwood (2009). "Methods for siRNA-mediated reduction of mRNA and protein expression in human placental explants, isolated primary cells and cell lines." Placenta **30**(2): 124-129.
- Giacobbe, A., R. Granese, R. Grasso, V. Salpietro, F. Corrado, G. Giorgianni, G. Foti, D. Amadore, O. Triolo, L. Giunta and A. Di Benedetto (2016). "Association between maternal serum high mobility group box 1 levels and pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus." Nutr Metab Cardiovasc Dis **26**(5): 414-418.
- Girard, S., A. E. Heazell, H. Derricott, S. M. Allan, C. P. Sibley, V. M. Abrahams and R. L. Jones (2014). "Circulating cytokines and alarmins associated with placental inflammation in high-risk pregnancies." Am J Reprod Immunol **72**(4): 422-434.
- Girard, S., G. Sébire and H. Kadhim (2010). "Proinflammatory orientation of the interleukin 1 system and downstream induction of matrix metalloproteinase 9 in the pathophysiology of human perinatal white matter damage." J Neuropathol Exp Neural **69**(11): 1116-1129.
- Gude, N. M., C. T. Roberts, B. Kalionis and R. G. King (2004). "Growth and function of the normal human placenta." Thromb Res **114**(5-6): 397-407.
- Handwerger, S. (2010). "New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation." Mol Cell Endocrinol **323**(1): 94-104.
- Henson, M. C., W. Shi, S. J. Greene and B. C. Reggio (1996). "Effects of pregnant human, nonpregnant human, and fetal bovine sera on human chorionic gonadotropin, estradiol, and progesterone release by cultured human trophoblast cells." Endocrinology **137**(5): 2067-2074.
- Holmlund, U., H. Wahamaa, N. Bachmayer, K. Bremme, E. Sverremark-Ekstrom and K. Palmblad (2007). "The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta." Immunology **122**(3): 430-437.
- Hoppe, G., K. E. Talcott, S. K. Bhattacharya, J. W. Crabb and J. E. Sears (2006). "Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1." Exp Cell Res **312**(18): 3526-3538.
- Ji, L., J. Brkic, M. Liu, G. Fu, C. Peng and Y. L. Wang (2013). "Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia." Mol Aspects Med **34**(5): 981-1023.
- Jia, L., A. Clear, F. T. Liu, J. Matthews, N. Uddin, A. McCarthy, E. Hoxha, C. Durance, S. Iqbal and J. G. Gribben (2014). "Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia." Blood **123**(11): 1709-1719.

- Jiang, R., J. Cai, Z. Zhu, D. Chen, J. Wang, Q. Wang, Y. Teng, Y. Huang, M. Tao, A. Xia, M. Xue, S. Zhou and A. F. Chen (2014). "Hypoxic trophoblast HMGB1 induces endothelial cell hyperpermeability via the TLR-4/caveolin-1 pathway." J Immunol **193**(10): 5000-5012.
- Jin, H., J. Wu, Q. Yang, Y. Cai, W. He and C. Liu (2015). "High mobility group box 1 protein polymorphism affects susceptibility to recurrent pregnancy loss by up-regulating gene expression in chorionic villi." J Assist Reprod Genet **32**(7): 1123-1128.
- Joshi, S. R., Y. C. Sarpong, R. C. Peterson and W. M. Scovell (2012). "Nucleosome dynamic: HMGB1 relaxes canonical nucleosome structure to facilitate estrogen receptor binding." Nucleic Acids Res **40**(20): 10161-10171.
- Jube, S., Z. S. Rivera, M. E. Bianchi, A. Powers, E. Wang, I. Pagano, H. I. Pass, G. Gaudino, M. Carbone and H. Yang (2012). "Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma." Cancer Res **72**(13): 3290-3301.
- Kang, H. J., H. Lee, H. J. Choi, J. H. Youn, J. S. Shin, Y. H. Ahn, J. S. Yoo, Y. K. Paik and H. Kim (2009). "Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers." Lab Invest **89**(8): 948-959.
- Kingdom, J. C. and S. Drewlo (2011). "Is heparin a placental anticoagulant in high-risk pregnancies?" Blood **118**(18): 4780-4788.
- Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida and S. Horinouchi (1999). "Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9112-9117.
- Lange, S. S., D. L. Mitchell and K. M. Vasquez (2008). "High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10320-10325.
- Levine, R. J., C. Qian, E. S. LeShane, K. F. Yu, L. J. England, E. F. Schisterman, T. Wataganara, R. Romero and D. W. Bianchi (2004). "Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia." American Journal of Obstetrics Gynecology **190**(3): 707-713.
- Liu, X., Y. Chong, H. Liu, Y. Han and M. Niu (2016). "CRM1 inhibitor S109 suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest in renal cancer cells." Korean J Physiol Pharmacol **20**(2): 161-168.
- Liu, Y., R. Prasad and S. H. Wilson (2010). "HMGB1: roles in base excision repair and related function." Biochim Biophys Acta **1799**(1-2): 119-130.
- Lotze, M. T. and K. J. Tracey (2005). "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal." Nat Rev Immunol **5**(4): 331-342.

- Lu, B., T. Nakamura, K. Inouye, J. Li, Y. Tang, P. Lundback, S. I. Valdes-Ferrer, P. S. Olofsson, T. Kalb, J. Roth, Y. Zou, H. Erlandsson-Harris, H. Yang, J. P. Ting, H. Wang, U. Andersson, D. J. Antoine, S. S. Chavan, G. S. Hotamisligil and K. J. Tracey (2012). "Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release." Nature **488**(7413): 670-674.
- Lunghi, L., M. E. Ferretti, S. Medici, C. Biondi and F. Vesce (2007). "Control of human trophoblast function." Reprod Biol Endocrinol **5**: 6.
- Malassine, A. and L. Cronier (2002). "Hormones and human trophoblast differentiation: a review." Endocrine **19**(1): 3-11.
- Maltepe, E., G. W. Krampitz, K. M. Okazaki, K. Red-Horse, W. Mak, M. C. Simon and S. J. Fisher (2005). "Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta." Development **132**(15): 3393-3403.
- Marchetti, A., B. Cecchinelli, M. D'Angelo, G. D'Orazi, M. Crescenzi, A. Sacchi and S. Soddu (2004). "p53 can inhibit cell proliferation through caspase-mediated cleavage of ERK2/MAPK." Cell Death Differ **11**(6): 596-607.
- Martin, A. C. and M. A. Brown (2010). "Could uric acid have a pathogenic role in pre-eclampsia?" Nature Reviews **6**(12): 744-748.
- Melvin, V. S. and D. P. Edwards (1999). "Coregulatory proteins in steroid hormone receptor action: the role of chromatin high mobility group proteins HMG-1 and -2." Steroids **64**(9): 576-586.
- Menon, R., F. Behnia, J. Poletini, G. R. Saade, J. Campisi and M. Velarde (2016). "Placental membrane aging and HMGB1 signaling associated with human parturition." Aging (Albany NY) **8**(2): 216-230.
- Miller, R. K., O. Genbacev, M. A. Turner, J. D. Aplin, I. Caniggia and B. Huppertz (2005). "Human placental explants in culture: approaches and assessments." Placenta **26**(6): 439-448.
- Mor, G. (2008). "Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction." Ann N Y Acad Sci **1127**: 121-128.
- Muller, S., L. Ronfani and M. E. Bianchi (2004). "Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function." J Intern Med **255**(3): 332-343.
- Nadeau-Vallee, M., D. Obari, J. Palacios, M. E. Brien, C. Duval, S. Chemtob and S. Girard (2016). "Sterile inflammation and pregnancy complications: a review." Reproduction **152**(6): R277-R292.
- Naruse, K., T. Sado, T. Noguchi, T. Tsunemi, S. Yoshida, J. Akasaka, N. Koike, H. Oi and H. Kobayashi (2012). "Peripheral RAGE (receptor for advanced glycation endproducts)-ligands in normal pregnancy and preeclampsia: novel markers of inflammatory response." J Reprod Immunol **93**(2): 69-74.

- Oh, S. Y., S. J. Choi, K. H. Kim, E. Y. Cho, J. H. Kim and C. R. Roh (2008). "Autophagy-related proteins, LC3 and Beclin-1, in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia." Reprod Sci **15**(9): 912-920.
- Passalacqua, M., M. Patrone, G. B. Picotti, M. Del Rio, B. Sparatore, E. Melloni and S. Pontremoli (1998). "Stimulated astrocytes release high-mobility group 1 protein, an inducer of LAN-5 neuroblastoma cell differentiation." Neuroscience **82**(4): 1021-1028.
- Rama, S., P. Petrusz and A. J. Rao (2004). "Hormonal regulation of human trophoblast differentiation: a possible role for 17beta-estradiol and GnRH." Mol Cell Endocrinol **218**(1-2): 79-94.
- Romero, R., T. Chaiworapongsa, Z. Alpay Savasan, Y. Xu, Y. Hussein, Z. Dong, J. P. Kusanovic, C. J. Kim and S. S. Hassan (2011). "Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in preterm labor with intact membranes and preterm PROM: a study of the alarmin HMGB1." J Matern Fetal Neonatal Med **24**(12): 1444-1455.
- Romero, R., S. K. Dey and S. J. Fisher (2014). "Preterm labor: one syndrome, many causes." Science **345**(6198): 760-765.
- Romero, R., F. Gotsch, B. Pineles and J. P. Kusanovic (2007). "Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury." Nutr Rev **65**(12 Pt 2): S194-202.
- Rubartelli, A. and M. T. Lotze (2007). "Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox." Trends Immunol **28**(10): 429-436.
- Ruebner, M., P. L. Strissel, A. B. Ekici, E. Stiegler, U. Dammer, T. W. Goecke, F. Faschingbauer, F. B. Fahlbusch, M. W. Beckmann and R. Strick (2013). "Reduced syncytin-1 expression levels in placental syndromes correlates with epigenetic hypermethylation of the ERVW-1 promoter region." PLoS One **8**(2): e56145.
- Scaffidi, P., T. Misteli and M. E. Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." Nature **418**(6894): 191-195.
- Scharfe-Nugent, A., S. C. Corr, S. B. Carpenter, L. Keogh, B. Doyle, C. Marin, K. A. Fitzgerald, S. Daly, J. J. O'Leary and L. A. J. O'Neill (2009). "TLR9 Provokes Inflammation in Response to Fetal DNA: Mechanism for Fetal Loss in Preterm Birth and Preeclampsia." J Immunology **188**(11): 5706-5712
- Scovell, W. M. (2016). "High mobility group protein 1: A collaborator in nucleosome dynamics and estrogen-responsive gene expression." World J Biol Chem **7**(2): 206-222.
- She, Y. (2010) "Caught red-handed: uric acid is an agent of inflammation." J Clin Invest **120**(6): 1809-1811.

- Shukla, S. D., J. Velazquez, S. W. French, S. C. Lu, M. K. Ticku and S. Zakhari (2008). "Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol." Alcohol Clin Exp Res **32**(9): 1525-1534.
- Siman, C. M., C. P. Sibley, C. J. Jones, M. A. Turner and S. L. Greenwood (2001). "The functional regeneration of syncytiotrophoblast in cultured explants of term placenta." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(4): R1116-1122.
- Szarka, A., J. Rigo, Jr., L. Lazar, G. Beko and A. Molvarec (2010). "Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array." BMC Immunol **11**: 59.
- Takai, N., T. Ueda, M. Nishida, K. Nasu and H. Narahara (2008). "Histone deacetylase inhibitors induce growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human choriocarcinoma cells." Int J Mol Med **21**(1): 109-115.
- Tang, D., R. Kang, C. B. Coyne, H. J. Zeh and M. T. Lotze (2012). "PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity." Immunol Rev **249**(1): 158-175.
- Tang, D., R. Kang, K. M. Livesey, C. W. Cheh, A. Farkas, P. Loughran, G. Hoppe, M. E. Bianchi, K. J. Tracey, H. J. Zeh, 3rd and M. T. Lotze (2010). "Endogenous HMGB1 regulates autophagy." J Cell Biol **190**(5): 881-892.
- Ticconi, C., A. Zicari, A. Belmonte, M. Realacci, V. Rao Ch and E. Piccione (2007). "Pregnancy-promoting actions of HCG in human myometrium and fetal membranes." Placenta **28 Suppl A**: S137-143.
- Ulloa, L. and D. Messmer (2006). "High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe." Cytokine Growth Factor Rev **17**(3): 189-201.
- Uzan, J., M. Carbonnel, O. Piconne, R. Asmar and J. M. Ayoubi (2011). "Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management." Vasc Health Risk Manag **7**: 467-474.
- Venereau, E., M. Casalgrandi, M. Schiraldi, D. J. Antoine, A. Cattaneo, F. De Marchis, J. Liu, A. Antonelli, A. Preti, L. Raeli, S. S. Shams, H. Yang, L. Varani, U. Andersson, K. J. Tracey, A. Bachi, M. Uguccioni and M. E. Bianchi (2012). "Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release." J Exp Med **209**(9): 1519-1528.
- Verdone, L., M. Caserta and E. Di Mauro (2005). "Role of histone acetylation in the control of gene expression." Biochem Cell Biol **83**(3): 344-353.
- Verrijdt, G., A. Haelens, E. Schoenmakers, W. Rombauts and F. Claessens (2002). "Comparative analysis of the influence of the high-mobility group box 1 protein on DNA binding and transcriptional activation by the androgen, glucocorticoid, progesterone and mineralocorticoid receptors." Biochem. J. **361**: 97-103.
- Wu, D., Y. Ding, S. Wang, Q. Zhang and L. Liu (2008). "Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma." J Pathol **216**(2): 167-175.

- Yanai, H., T. Ban and T. Taniguchi (2012). "High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity." Trends Immunol **33**(12): 633-640.
- Yang, H., D. J. Antoine, U. Andersson and K. J. Tracey (2013). "The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis." J Leukoc Biol **93**(6): 865-873.
- Yang, H. and K. J. Tracey (2010). "Targeting HMGB1 in inflammation." Biochim Biophys Acta **1799**(1-2): 149-156.
- Yin, Y., J. Wey, M. Tong, F. Shen, M. Zhao and Q. Chen (2014). "The expression of high mobility group box 1 (HMGB1) correlates with the severity and onset of preeclampsia and associates with the levels of uric acid." Placenta **35**(9): A82
- Zhou, R. R., S. S. Zhao, M. X. Zou, P. Zhang, B. X. Zhang, X. H. Dai, N. Li, H. B. Liu, H. Wang and X. G. Fan (2011). "HMGB1 cytoplasmic translocation in patients with acute liver failure." BMC Gastroenterol **11**: 21.
- Zhu, L., Z. Zhang, L. Zhang, Y. Shi, J. Qi, A. Chang, J. Gao, Y. Feng and X. Yang (2015). "HMGB1-RAGE signaling pathway in severe preeclampsia." Placenta **36**(10): 1148-1152.
- Zicari, A., C. Centonze, M. Realacci, B. Buchetti, A. Pietropolli and C. Ticconi (2008). "Estradiol 17-beta and progesterone modulate inducible nitric oxide synthase and high mobility group box 1 expression in human endometrium." Reprod Sci **15**(6): 559-566.
- Zou, J. Y. and F. T. Crews (2014). "Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling." PLoS One **9**(2): e87915.