



HAL
open science

Rôle de SIRT1 et de la biogenèse mitochondriale dans la prolifération des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire

Giada Zurlo

► To cite this version:

Giada Zurlo. Rôle de SIRT1 et de la biogenèse mitochondriale dans la prolifération des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS205 . tel-01557235

HAL Id: tel-01557235

<https://theses.hal.science/tel-01557235>

Submitted on 6 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLS205

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à Université Paris Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 569 ITFA
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat : Physiologie, physiopathologie

Par

Mme Giada Zurlo

Rôle de SIRT1 et de la biogenèse mitochondriale dans la
prolifération des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 4 décembre 2015:

Composition du Jury :

Mr, Poüs, Christian	Professeur, Université Paris-Saclay	Président du Jury
Mme, Lombès, Anne	DR2, Université Paris Descartes	Rapporteur
Mme, Quarck, Rozenn	Chercheur, Katholieke Universiteit Leuven	Rapporteur
Mr, Savineau, Jean-Pierre	Professeur, Université Bordeaux 2	Examineur
Mr Mericskay, Mathias	CR1, Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Mr, Veksler, Vladimir	Professeur, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse



Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury, en commençant par Christian Poüs : merci d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi que pour votre disponibilité, gentillesse et bonne humeur. Vos conseils m'ont beaucoup aidée pendant la parenthèse « tubuline » de mon doctorat. Un grand merci également à Anne Lombès et Rozenn Quarck, rapporteurs de ma thèse, et à Jean-Pierre Savineau et Mathias Mericskay, examinateurs de mon travail. Je vous suis très reconnaissante d'avoir pris le temps de vous intéresser à mon étude.

Je remercie Rodolphe Fischmeister de m'avoir accueillie au sein de l'U769 en tant que doctorante. Je pense que la qualité de travail et la bonne ambiance qui caractérisent cette unité sont uniques : je n'aurais pu demander mieux pour commencer la vie dans la recherche. Merci pour ton soutien, ta bonne humeur et ton savoir scientifique et général. Un grand merci également à Ana-Maria Gomez, actuelle directrice de l'unité (maintenant U1180), pour ta capacité à rendre ce lieu de travail aussi convivial que plaisant, tout en gardant une rigueur certaine. Je suis sûre que tu sauras garantir un avenir lumineux à ce laboratoire.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse Vladimir Veksler (Volodia). Merci de m'avoir guidée pendant ces trois années avec disponibilité et compétence, tout en m'accordant beaucoup d'autonomie. Tu m'as toujours donné la possibilité de formuler mes hypothèses et de les développer, m'aidant avec tes précieux conseils. Travailler en ta compagnie a été une expérience très formatrice et enrichissante.

Un grand merci à Renée Ventura-Clapier pour m'avoir accueillie dans son équipe. Ta bonne humeur, ta disponibilité et ta générosité rendent l'ambiance de ce groupe de recherche incomparable. Merci pour ton énorme savoir, ton soutien et tes superbes BBQ ! Je tiens à adresser ma reconnaissance à Anne Garnier, actuelle chef d'équipe avec Volodia. Ton sourire et ton grand cœur sont vraiment précieux ! Je n'ai aucun doute que tu sauras préserver cette équipe, qui est tant petite que riche, au niveau des thématiques et des techniques.

Un énorme merci à nos collaborateurs de l'hôpital Marie Lannelongue : Frédéric Perros pour nous avoir fourni les cellules humaines, pour son énorme compétence dans le domaine de l'HTAP et pour ses bons conseils ; Benoît Ranchoux pour l'aide dans l'étude *in vivo* ; Sylvia Cohen-Kaminsky pour nous avoir donné l'accès aux caissons d'hypoxie ; Marc Humbert pour son soutien.

Tout au long de ma thèse j'ai pu bénéficier des plateformes techniques disponibles au sein de la faculté, qui ont contribué à mener à bien mes travaux. Je tiens notamment à remercier Valérie Nicolas pour son aide dans l'imagerie. Il est vraiment super agréable de travailler avec une personne si compétente et, en même temps, si souriante, disponible et toujours de bonne humeur.

Merci également à Valérie Domergue et à tout le staff de l'animalerie : votre aide pendant la manip *in vivo* a été vraiment précieuse !

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aussi à Claudine Deloménie pour ses conseils avisés concernant la PCR quantitative.

Un énorme merci à mes collègues, actuels et passés, qui m'ont apporté une bouffée d'oxygène permanente : Matthieu je te remercie en premier, parce que c'est aussi grâce à toi que je suis là maintenant. Malgré le fait que tu étais en pleine rédaction de thèse, tu as réservé du temps

pour m'accompagner dans mes premiers pas dans la recherche en master 2, et tu m'as énormément aidée pour la préparation du concours pour la bourse doctorale. En plus d'être un excellent encadrant, tu as été un ami.

Marianne, merci pour ton amitié, nos nombreuses discussions (y a-t-il quelque chose sur lequel on est d'accord ? ☺), le rallye improvisé pour sortir de la fac, pour m'avoir initiée à *Friends*, m'avoir fait goûter tes supers plats japonais, avoir partagé avec moi les joies de la rédaction de la thèse, m'avoir permis de devenir (plus ou moins !) une main verte, et pour plein d'autres choses !

Maryline, je te suis extrêmement reconnaissante pour ta bonne humeur, tes conseils, ton soutien, ton optimisme : tu m'as toujours aidée dans les moments les plus difficiles.

Jérôme, travailler avec toi est un vrai plaisir : tu es toujours disponible pour discuter de science, mais également de livres, films, news, etc. Tu as été mon référent pour la langue française, d'autant plus que tu as fait l'énorme boulot de lire et corriger ma thèse. Vraiment je ne sais pas comment te remercier (pour commencer, sûrement par un tiramisù banane chocolat ☺).

Milia et ses virgules, merci d'avoir toujours été là pour m'écouter, pour rigoler et bavarder ensemble, et pour m'aider à faire face aux difficultés que l'on a rencontré pendant nos thèses. Tu as été un repère !

Delphine, tu es arrivée tard malheureusement, mais cette fin de thèse passée à tes côtés a été merveilleuse. Merci pour ta disponibilité, ta joie de vivre constante, tes conseils, ton énergie.

Mélanie, merci pour ton aide constante et précieuse, et pour être si souriante et disponible. C'est un plaisir de travailler avec toi !

Dom, malheureusement tu es partie très tôt, mais tu m'as appris énormément de choses, et ton ironie m'as remonté beaucoup de fois le moral quand les manips ne marchaient pas ! Je te remercie du plus profond du cœur.

Julie, Fiona et Lucile : c'est un vrai bonheur de travailler avec vous (entre une rotation d'écran et un otage de bananes) ! Vos rires sont contagieux, et votre réserve de bonbons que vous offrez généreusement sauve souvent la vie. Je sais que ma sonnerie va vous manquer, mais bon, il faudra que vous vous y fassiez !

Pierre et Ibrahim, merci pour les moments de convivialité passés ensemble, notamment pour les nombreuses pauses dans votre bureau et les parties de Mito ☺. Ibrahim, t'es trop fort pour tricher !! Pierre, évite de voler les ventilateurs quand on part en boîte à danser ☺

Marta, merci pour m'avoir appris ta méthode super efficace avec l'administration française !

Fabio, Hind et Zeineb, c'est vraiment dommage que vous soyez partis au début de ma thèse, votre départ s'est fait beaucoup sentir ! Merci pour la bonne ambiance que vous avez toujours su transmettre au labo.

Christophe, merci pour ton soutien constant, pour tes conseils, pour ton aide au cytomètre en flux et pour m'avoir initiée au merveilleux monde des sirtuines ☺.

Fred, tu m'as beaucoup aidée au microscope confocal, et tu m'as toujours donné de bons conseils ! Tu aurais été un super co-directeur de thèse, c'est vraiment dommage que tu partes du labo si tôt.

Alex et Fanny, merci pour nos discussions et les beaux moments vécus ensemble. C'était toujours marrant de voir la personne la plus téméraire et celle la plus frileuse au monde partager le même bureau, avec la première qui ouvrait la fenêtre, et la deuxième qui allumait le chauffage juste après que l'autre quittait la pièce !

Boris, merci pour ton aide pour la dissection de l'artère pulmonaire ! Travailler à tes côtés est super agréable, tu maintiens toujours le calme et on peut discuter de plein de choses.

Jessica, merci pour ta bonne humeur, ton énergie et nos discussions. Je n'oublierai jamais ta super coiffure ☺.

Riccardo et Jean Piero, merci d'avoir amené un peu d'Italie ici !

Anita et Nieves, merci d'avoir toujours transmis au labo de la bonne humeur ! Vos rires m'ont beaucoup manqué après vos départs à Baltimore et à Zurich. Merci pour les beaux moments qu'on a partagé !

Patrick, merci de m'avoir autant aidée dans un monde pour moi presque inconnu, le monde de l'informatique ! Je faisais presque exprès d'avoir des problèmes d'ordinateur pour rigoler un peu en ta compagnie ;)

Françoise, merci d'être si efficace, disponible et gentille. Les déjeuners en ta compagnie ont toujours été des moments très agréables !

Sophie, ta gentillesse est incroyable. Merci d'avoir été ma « mère Noël » pendant ces années !

Je remercie aussi tous les autres membres du labo, du 2^{ème}, 3^{ème} et 5^{ème} étage : vous avez contribué à rendre ces années inoubliables.

Je remercie du fond du cœur mes camarades de cette aventure parisienne, commencée en Erasmus avec Michi et Flavia, et continuée pendant la thèse avec Silvia, Juliette, Cami, Marina et Seba. Comment j'aurais fait sans vous ? Il suffisait de vous voir pour oublier les journées « non » : je vais garder le meilleur souvenir de nos piques niques, des escapades du week-end à Bordeaux et Berlin, des dîners du mercredi pour couper la semaine, des concerts, du yoga, du frisbee... Vous aller me manquer énormément !

Je remercie également mes amis de la résidence de l'Yvette pour l'accueil super que m'ont réservé dès notre première rencontre, et pour avoir préservé notre amitié après mon départ de la banlieue vers Paris. Merci Marion, Nico, JB, Badri, Quentin : je vous adore !

Je tiens maintenant à remercier mes amis d'Italie, qui malgré la distance ne m'oublient pas. Même si pendant ces années je n'ai pas pu partager la vie au quotidien avec vous, il m'a juste suffi de penser à vous pour avoir chaud au cœur.

Je remercie donc Chiara, qui représente tout ce que l'on peut espérer d'une amie : rayonnante, généreuse, brillante, tu es toujours là pour fêter les moments de joie et pour supporter ensemble les événements les plus tristes.

Merci à Elena, Francesco, Bea, Marghe, Nuria, Nadia pour tous les beaux moments qu'on a vécus ensemble, pour m'avoir donné à chaque fois que je rentrais en Italie une dose de bonne humeur, de sérénité et d'alcool. Vous avez été mes rayons de soleil dans les jours parisiens nuageux.

Bien évidemment, je remercie ma merveilleuse famille, qui m'a toujours soutenue, écoutée, confortée et incitée à donner le meilleur de moi-même. Merci Maman et Papa d'être pour moi l'exemple de force et d'énergie devant les péripéties de la vie. Merci à Alice, Alberto et Letizia : je sais que quoi qu'il arrive, nous pourrons compter les uns sur les autres.

Ma dernière pensée est pour toi Chiso : avec ton originalité et ta pureté, tu es unique au monde, et tu rends chaque jour spécial.

Table des matières

Résumé	8
Abstract	8
Liste des abréviations	9
Liste des illustrations	12
Figures	12
Tableaux	13
Préambule	14
Introduction	16
Chapitre I : Le système vasculaire pulmonaire	16
A. Anatomie des vaisseaux sanguins	16
B. Physiologie des vaisseaux sanguins pulmonaires	19
1. Contraction des CML	21
2. Relaxation des CML	23
C. Pathologie du système circulatoire pulmonaire: l'hypertension artérielle pulmonaire	25
1. Définition et épidémiologie	25
2. Classification Clinique	27
3. Anatomie pathologique de l'HTAP	28
Hyperprolifération et résistance à l'apoptose des CML	31
4. Bases moléculaires de l'HTAP	34
a) La prédisposition génétique	34
b) La prédisposition épigénétique	35
c) La voie de l'endothéline	35
d) La voie de l'oxyde nitrique	36
e) La voie de la prostacycline	37
f) La voie de la sérotonine	38
g) La voie de RhoA/Rho kinase (ROCK)	39
h) La voie du peptide intestinal vasoactif	39
i) L'inflammation chronique et l'auto-immunité	39
l) Drogues et toxines	41
m) Genre et métabolisme des œstrogènes	41
n) Métabolisme cellulaire	41
5. Traitements	43
6. Modèles expérimentaux	44
a) Modèles in vivo	44
b) Modèles in vitro	45
Chapitre II : Les mitochondries	46
A. La structure des mitochondries	46
B. La physiologie mitochondriale	47
1. Fonctions énergétiques des mitochondries	47
2. L'équilibre d'oxydoréduction	51
3. L'homéostasie du Ca ²⁺	53
4. L'apoptose	54
C. Le cycle de vie mitochondrial	56
1. La biogenèse mitochondriale	57

2. La dynamique mitochondriale: fission et fusion	64
3. La mitophagie.....	68
<i>D. La dysfonction mitochondriale de l'HTAP.....</i>	<i>70</i>
1. Le cycle de vie mitochondriale est perturbé dans l'HTAP	70
2. La production d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales est altérée dans l'HTAP	71
3. Le métabolisme mitochondriale est sous-régulé dans l'HTAP	72
4. Les mitochondries dans l'HTAP présentent faibles niveaux de Ca ²⁺	73
5. Le potentiel de membrane mitochondriale est altéré dans l'HTAP	73
6. La voie apoptotique mitochondriale est altérée dans l'HTAP	74
<i>E. La régulation de PGC-1α</i>	<i>75</i>
Chapitre III : SIRT1	79
<i>A. La fonction de SIRT1</i>	<i>82</i>
1. SIRT1 comme senseur métabolique.....	82
2. Régulation métabolique par SIRT1 dans les différents tissus.....	83
<i>B. SIRT1 et HTAP.....</i>	<i>85</i>
<i>C. La régulation de l'activité de SIRT1</i>	<i>86</i>
1. Régulation de son expression génique	86
2. Régulation par des modifications post-traductionnelles	87
3. Régulation par la formation de complexes.....	88
4. Régulation par le NAD ⁺	88
5. Composés régulant l'activité des sirtuines	89
Objectifs de l'étude.....	92
Matériel et méthodes	94
Modèles in vitro	94
<i>A. Culture primaire de cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire de rat</i>	<i>94</i>
<i>B. Culture des cellules humaines de muscle lisse de l'artère pulmonaire</i>	<i>95</i>
1. Phénotypage des CML-AP de rat.....	96
2. Transfection transitoire des cellules	97
3. Infection des cellules	98
4. Stimulation des cellules.....	98
5. Etude de la prolifération des CML-AP	99
a) Incorporation du BrdU	99
b) WST-1 (Water Soluble Tetrazolium salt)	99
c) Comptage de cellules	99
d) Détection de PCNA.....	99
6. Etude de la mortalité des CML-AP	100
7. Observation du réseau mitochondrial.....	100
8. Extraction d'ARN messager et analyse de PCR quantitative en temps réel (qPCR)	101
9. Etude de l'expression protéique via Western blot.....	103
10. Immunoprécipitation	106
Modèle in vivo : les souris KO SIRT1 générales inductibles soumises à hypoxie chronique	107
<i>A. Description des souris</i>	<i>107</i>
1. Le génotypage des souris	108
2. Le traitement des souris.....	108
3. Evaluation du remodelage vasculaire et cardiaque chez les souris.....	109
a. Paramètres hémodynamiques	109
b. Hypertrophie cardiaque droite.....	110

c. Muscularisation des artères pulmonaires.....	110
4. Etude de l'expression protéique via Western blot.....	111
Analyse statistique.....	112
Résultats	113
I. Le profil métabolique des CML-AP dérivées de patients atteints d'HTAP	113
II. La balance acétylation/désacétylation dans les CML-AP de patients HTAP.....	114
III. Effet d'une régulation négative de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP	116
IV. Effet de la délétion génétique de SIRT1 sur le remodelage vasculaire in vivo	118
V. Effet d'une régulation positive de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP	122
VI. Effets métaboliques de l'activation de SIRT1	126
VII. Effets de l'activation de SIRT1 sur la morphologie mitochondriale	128
Discussion	130
Principaux résultats obtenus.....	130
Discussion des résultats et perspectives	130
A. <i>Les CML-AP des patients atteints d'HTAP présentent un remodelage métabolique</i>	130
B. <i>La balance acétylation/désacétylation penche vers l'acétylation dans les CML-AP en hyperprolifération</i>	134
C. <i>La régulation négative de SIRT1 facilite la prolifération des CML-AP</i>	136
D. <i>La délétion génétique de SIRT1 aggrave le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie chronique chez la souris</i>	137
E. <i>La surexpression de SIRT1 n'influence pas la prolifération des CML-AP.</i>	140
F. <i>Stac-3 active SIRT1 dans les CML-AP.</i>	141
G. <i>La régulation positive de l'activité de SIRT1 inhibe fortement la prolifération des CML-AP et est associée à l'activation de la biogenèse mitochondriale.</i>	142
H. <i>La régulation positive de l'activité de SIRT1 modifie la morphologie mitochondriale.</i>	145
Bibliographie.....	148
Annexes	190
Annexe 1	190
Sirtuin1 Regulates Human and Rodent Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation: Role in Pulmonary Arterial Hypertension.	190
Annexe 2	228
Metabolic therapy: Cobalamin protects mitochondrial oxidative capacity and contractile function in myocardial dysfunction.....	228

Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie mortelle caractérisée par un important remodelage vasculaire, principalement dû à l'hyperprolifération et à la résistance à l'apoptose des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire (CML-AP).

Récemment il a été montré que les CML-AP présentent un remodelage du métabolisme énergétique, avec une régulation négative de l'oxydation phosphorylante associée à une activation de la voie glycolytique, qui semble contribuer à leur phénotype particulier.

La désacétylase sirtuine1 (SIRT1) est un important modulateur du métabolisme énergétique, notamment via son activation de *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha* (PGC-1 α), régulateur clé de la biogenèse mitochondriale. Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que la prolifération des CML-AP de rat et humaines est caractérisée par une réduction de l'activité de SIRT1, et est augmentée suite à l'inhibition pharmacologique ou la sous-expression spécifique de SIRT1. De plus, suite à hypoxie chronique, des souris génétiquement déficientes en SIRT1 présentent un remodelage vasculaire plus important que celui observé chez les souris contrôles, ce qui est associé à une augmentation accentuée de l'hypertrophie et de la pression systolique du ventricule droit. Au contraire, l'activation pharmacologique de SIRT1 inhibe fortement la prolifération des CML-AP, et est associée à l'activation de la biogenèse mitochondriale.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'inactivation de SIRT1 joue un rôle causal dans l'hyperprolifération des CML-AP et cette enzyme pourrait être une nouvelle cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'HTAP.

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a lethal disease characterized by an intensive vascular remodelling, mainly due to hyper-proliferation and resistance to apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs).

Recently it has been found that PASMCs, similarly to cancer cells, demonstrate a shift in energy metabolism from oxidative phosphorylation towards glycolysis thus contributing to their particular phenotype.

The deacetylase sirtuin1 (SIRT1) is an important modulator of energy metabolism, particularly via its activation of *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha* (PGC-1 α), the master regulator of mitochondrial biogenesis. Here we show for the first time that rat and human PASMC proliferation is characterised by a diminution of SIRT1 activity, and is potentiated by SIRT1 pharmacological inhibition or specific downregulation. Moreover, after chronic hypoxia exposure, SIRT1 KO mice display a more intense vascular remodelling compared to their control littermates and this is associated with an exacerbated increase in right ventricle systolic pressure and hypertrophy. Conversely, pharmacological SIRT1 activation strongly inhibits PASMC proliferation, and is associated with the activation of mitochondrial biogenesis.

In general, the data obtained show that SIRT1 inactivation plays a causative role in PASMC proliferation and this enzyme could be a promising therapeutic target for PAH treatment.

Liste des abréviations

Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A
Acyl-CoA : acyl-coenzyme A
ADP: adénosine di phosphate
ADN : acide désoxyribonucléique
AMP : adénosine monophosphate
AMPC : adénosine monophosphate cyclique
AMPK : *AMP-activated protein kinase*
ANOVA : *analysis of variance*
AP-1 : *activating protein-1*
Apaf-1 : *apoptotic peptidase activating factor-1*
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP: adénosine triphosphate
BAK : *B cell lymphoma 2 antagonist killer*
BAX : *B cell lymphoma 2-associated X protein*
Bcl-2 : *B cell lymphoma 2*
BID : *BH3 interacting domain death agonist*
BMP : *bone morphogenetic protein*
BMPR2 : *bone morphogenetic protein receptor 2*
BrdU : Bromodéoxyuridine
BSA : albumine de sérum bovin
CD38 : *cluster of differentiation 38*
CML : cellule du muscle lisse
CML-AP : cellule du muscle lisse de l'artère pulmonaire
CO₂ : dioxyde de carbone
DMEM: *Dulbecco's modified eagles medium*
DRP1 : *dynamain-related protein 1*
EGF : *epidermal growth factor*
eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*
ERR: *estrogen related receptor*
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

FADD : *Fas-associated death domain protein*
FAD(H₂) : flavine adénine dinucléotide
Fas(L) : *Fetal alcohol syndrome (ligand)*
FIS1 : *fission protein 1*
FOXO1 : *forkhead box protein O1*
GABP : *GA-binding protein*
GDP : guanosine diphosphate
GLUT : *glucose transporter*
GMP : guanosine monophosphate
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
GPx : glutathion peroxydase
GSK3 β : *glycogen synthase kinase 3 β*
GTP : guanosine triphosphate
HIF : *hypoxia-inducible factor*
HO[•] : radical hydroxyle
HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
HTP : hypertension pulmonaire
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
KO : *Knock Out*
K_v : *voltage-gated potassium channel*
LKB1 : *liver kinase B1*
MAP : *mitogen-activated protein*
MFF : *mitochondrial fission factor*
MFN : mitofusine
MiD49/51 : *mitochondrial dynamics proteins of 49/51 KDa.*
NAD(P)(H) : nicotinamide adenin dinucléotide (phosphate)
NAMPT : *nicotinamide phosphoribosyltransferase*
NFAT : *nuclear factor of activated T cells*
NRF-1 : *nuclear respiratory factor-1*
OPA1 : optic atrophy 1
O₂ : oxygène
O₂⁻ : ion superoxyde
PARP : poly(ADP-ribose) polymérase
PBS : *phosphate buffered saline*

PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*
PCR : réaction en chaîne par polymérase
PDGF : *platelet derived growth factor*
PGC : *PPAR- γ -coactivator*
PGI₂ : prostaglandine I₂
PINK1 : *PTEN-induced putative kinase 1*
PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*
PRC : *PGC-1 related co-activator*
ROC : *receptor-operated calcium channel*
ROCK : *Rho-associated protein kinase*
rpm: *round per minute*
SERCA : *sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*
SIRT: sirtuine
Sir2 : *Silent information regulator 2*
SOC : *store-operated calcium channel*
SOD : superoxyde dismutase
STAC: *sirtuin activating compound*
SVF : sérum de veau fœtale
TFAM : facteur de transcription mitochondrial A
TFB : facteur de transcription mitochondrial B
TGF- β : *transforming growth factor β*
TOM : *the outer membrane multisubunit receptor complex*
TRPC : *transient receptor potential channel*
UCP2 : *uncoupling protein 2*
VD: ventricule droit
VDAC: *voltage-dependent anion channel*
VG : ventricule gauche
VHL : *von Hippel–Lindau tumor suppressor*
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
WB : *western blot*
WST : *water soluble tetrazolium salt*

Liste des illustrations

Figures

Figure 1 : Représentation schématique du système circulatoire.	16
Figure 2 : Comparaison de la structure des artères, des veines et des capillaires	19
Figure 3 : Régulation de la contraction du muscle lisse.....	23
Figure 4 : Régulation de la relaxation du muscle lisse.....	25
Figure 5 : Le remodelage vasculaire dans l'HTAP.	26
Figure 6 : Représentation de l'anatomie pathologique de l'HTAP.....	31
Figure 7 : Représentation schématique des voies de l'endothéline, de l'oxyde nitrique et de la prostacycline.....	38
Figure 8 : Schéma des voies de signalisation altérées dans l'HTAP.	42
Figure 9 : Représentation schématique de la compartimentation mitochondriale.	47
Figure 10 : Schéma des mécanismes mitochondriaux pour la production d'énergie.....	49
Figure 11 : Représentation simplifiée de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	50
Figure 12 : Les principales réactions qui mènent à la génération des espèces réactives de l'oxygène.....	52
Figure 13 : Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie du Ca^{2+}	54
Figure 14 : Les voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de la mort cellulaire par apoptose.....	56
Figure 15: Représentation schématique du cycle de vie mitochondrial.....	57
Figure 16 : Réseau dirigé par PGC-1 α pour réguler les fonctions mitochondriales.	62
Figure 17 : Mécanisme schématisé de la biogenèse mitochondriale.	64
Figure 18: Représentation schématisée de la fission mitochondriale.....	66
Figure 19 : Représentation schématisée de la fusion mitochondriale.	68
Figure 20 : Mécanisme moléculaire proposé pour la mitophagie induite par Parkin.....	70
Figure 21 : La dysfonction mitochondriale dans l'HTAP.....	75
Figure 22 : Modèle pour la régulation de l'acétylation de PGC-1 α selon la disponibilité des nutriments.....	79
Figure 23 : Représentation de la réaction catalysée par SIRT1.	80
Figure 24 : Schéma des voies de signalisation métaboliques contrôlées par SIRT1 dans les différents tissus.....	84
Figure 25 : Représentation schématique des mécanismes régulant l'activité de SIRT1.....	91

Figure 26 : Représentation schématique de la procédure d'isolement des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire de rat.	95
Figure 27 : Images représentatives du phénotypage des CML-AP de rat.	97
Figure 28 : Représentation schématique du protocole utilisé pour l'étude <i>in vivo</i>	109
Figure 29 : Images représentatives des artères pulmonaires de souris non muscularisée, partiellement muscularisée et totalement muscularisée.	111
Figure 30 : Le profil métabolique des CML-AP-HTAP.	114
Figure 31 : La balance acétylation/désacétylation dans les CML-AP.	116
Figure 32 : Effet d'une régulation négative de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP.	118
Figure 33 : Effets de la délétion de SIRT1 d'un point de vue moléculaire.	119
Figure 34 : Effet de la délétion de SIRT1 sur le remodelage vasculaire <i>in vivo</i>	121
Figure 35 : Effet de la surexpression de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP de rat.	122
Figure 36 : Effet de Stac-3 sur l'activité de SIRT1.	123
Figure 37 : Effets de Stac-3 sur la prolifération et la mortalité des CML-AP de rat.	124
Figure 38 : Effet de Stac-3 sur la prolifération des CML-AP humaines.	125
Figure 39 : Effets métaboliques de l'activation de SIRT1.	127
Figure 40 : Effets de l'activation de SIRT1 sur la morphologie mitochondriale.	129
Figure 41 : Représentation schématique du cycle de Randle.	144

Tableaux

Tableau 1 : Activité enzymatique, localisation et cibles des sirtuines de mammifère.	81
Tableau 2 : Séquences et températures d'hybridation des amorces utilisées.	103
Tableau 3 : Composition du tampon de lyse pour l'extraction des protéines.	105
Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les Western blots.	106

Préambule

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare, avec une prévalence estimée à 15-50/million d'habitants, mais ayant un impact sociétal très important. Il s'agit en effet d'une pathologie mortelle, avec un taux de survie à 5 ans d'environ 50%, qui affecte des patients, en majorité féminin, en âge de procréer et de travailler (entre les 30 et 50 ans), et qui coûte extrêmement cher en termes de traitement.

L'HTAP est définie par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne au delà de 25 mmHg au repos, et est caractérisée par une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire qui mène à une insuffisance cardiaque droite et à la mort précoce du patient. L'élévation de la résistance vasculaire est principalement due à un important remodelage de l'artère pulmonaire marqué par un épaissement de sa paroi qui engendre la réduction du diamètre de la lumière et, par conséquent, une surcharge du cœur droit.

L'étiologie et la pathogenèse de l'HTAP idiopathique restent voilées de mystère ; son développement peut être déterminé par un fond génétique, par un large éventail de facteurs environnementaux et/ou par de mécanismes de déclenchement tel que l'inflammation. Les thérapies actuelles ne sont pas satisfaisantes puisqu'elles ne sont pas capables de faire régresser la maladie. En effet, il s'agit de vasodilatateurs qui ont été conçus pour le traitement de l'hypertension systémique et qui en conséquence ne sont pas spécifiques du système circulatoire pulmonaire. De plus, la communauté scientifique s'accorde désormais sur le fait que la diminution de la lumière vasculaire serait principalement causée non par la vasoconstriction, mais plutôt par l'altération de l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire (CML-AP). De façon similaire aux cellules cancéreuses, les CML-AP hyperprolifèrent et sont résistantes à l'apoptose, conduisant ainsi à leur accumulation dans la paroi vasculaire, qui à la longue devient plus épaisse. Il est donc nécessaire d'identifier d'autres cibles thérapeutiques qui permettraient de traiter cette maladie mortelle plus efficacement.

Récemment, il a été montré que les CML-AP dérivées de patients atteints d'HTAP partagent de nombreuses caractéristiques avec les cellules cancéreuses, en plus du phénotype hyperprolifératif et résistant à l'apoptose. Ces cellules présentent notamment un remodelage métabolique qui a été observé pour la première fois par Otto Warburg dans les cellules de cancer, à savoir une régulation négative du métabolisme mitochondrial associée à une augmentation du flux glycolytique même en présence d'oxygène. De façon intéressante, il a

été suggéré que ce remodelage métabolique pourrait contribuer au phénotype pseudotumorale des CML-AP, étant donné qu'il active plusieurs voies de signalisation qui aboutissent d'une part à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, connu pour stimuler la prolifération, et d'autre part à une diminution du potassium intracellulaire et des facteurs pro apoptotiques libérés par les mitochondries, éléments déclenchant la mort cellulaire. Le rétablissement de la balance métabolique normale semblerait donc être une option thérapeutique possible pour le traitement de l'HTAP. En effet, de façon encourageante, la stimulation du métabolisme mitochondrial chez de modèles animaux d'HTAP a montré des effets bénéfiques.

La désacétylase Sirtuine 1 (SIRT1) est un activateur très important du métabolisme mitochondrial, qui agit dans divers tissus modulant l'activité de plusieurs facteurs de transcriptions et co-activateurs transcriptionnels. Elle active notamment PGC-1 α , régulateur clé de la production de nouvelles mitochondries dans la cellule, dont l'expression est diminuée dans les CML-AP des patients HTAP.

Le projet de cette thèse consistait donc en l'exploration du rôle possible de SIRT1 dans la prolifération des CML-AP. Ceci a conduit à étudier divers aspects tels que l'état d'activation de SIRT1 dans les CML-AP en hyperprolifération, son rôle dans la prolifération de ce type cellulaire, son importance dans le remodelage vasculaire *in vivo*, et sa capacité à activer le métabolisme mitochondrial dans les CML-AP. Ce travail a donc été réalisé au moyen de différentes approches allant de techniques classiques de biologie cellulaire et moléculaire et de biochimie, à des approches faisant appel à l'imagerie confocale, et ceci au moyen de plusieurs systèmes modèles incluant les CML-AP de rat, humaines et les souris déficientes en SIRT1.

Introduction

Chapitre I : Le système vasculaire pulmonaire

A. Anatomie des vaisseaux sanguins

La **circulation pulmonaire** est un circuit partant du cœur qui traverse les poumons avant de revenir à la pompe cardiaque. Le sang pauvre en oxygène est éjecté du ventricule droit pour atteindre les poumons en empruntant l'artère pulmonaire, et se jette enfin dans l'oreillette gauche via la veine pulmonaire. Le sang riche en oxygène est alors propulsé par le ventricule gauche dans le reste du corps via l'aorte et ses branches. Après passage dans les réseaux capillaires irrigant les différents organes, ce sang, alors devenu désoxygéné, effectue son retour à l'oreillette droite par les veines caves supérieure et inférieure (circulation systémique) (figure 1).

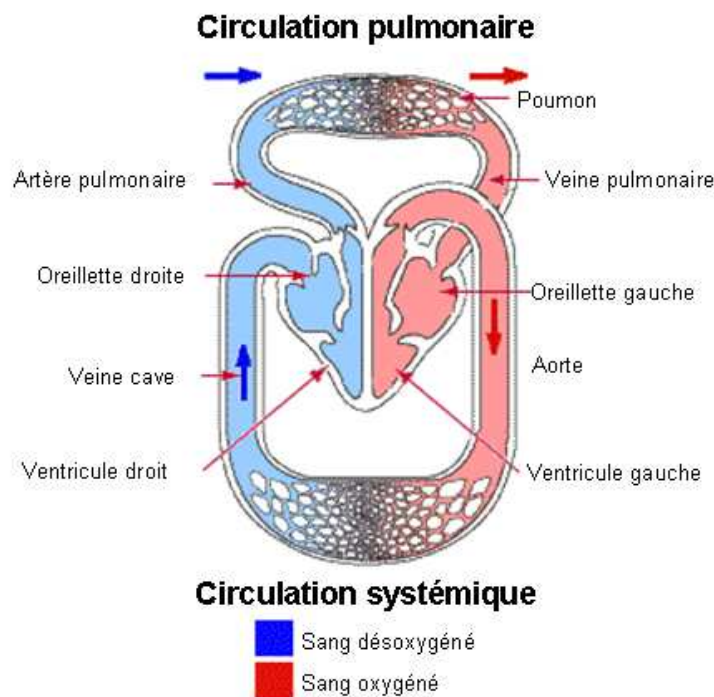


Figure 1 : Représentation schématique du système circulatoire.

La **circulation systémique** correspond à la circulation du sang oxygéné qui part du ventricule gauche et se rend à tous les organes du corps via l'aorte et ses branches. Elle inclut aussi le retour du sang désoxygéné provenant des organes à l'oreillette droite via la veine cave. La **circulation pulmonaire** correspond à la circulation du sang désoxygéné qui est propulsé par le ventricule droit et se rend aux poumons via l'artère pulmonaire et ses branches afin d'y être oxygéné à nouveau. Elle comprend aussi le retour du sang oxygéné des poumons à l'oreillette gauche via la veine pulmonaire.

Adaptée de <http://webschoolsolutions.com/patts/systems/lungs.htm>

Le sang s'écoule dans un réseau composé de vaisseaux sanguins. Il s'agit de structures dynamiques formées d'une paroi entourant une lumière dans laquelle le sang circule. Ces vaisseaux peuvent moduler la circulation sanguine en se contractant (vasoconstriction), en se relaxant (vasodilatation) et en proliférant (angiogenèse). Selon leurs structures et leurs fonctions, trois groupes sont distingués : les artères, les veines et enfin les capillaires.

Les artères et les veines présentent une paroi composée de trois couches ou tuniques : l'intima, la média, et l'adventice [1], représentées en figure 2. L'intima consiste en un simple épithélium nommé endothélium qui agit comme une barrière semi-sélective entre la lumière vasculaire et le tissu entourant cette dernière en contrôlant le passage des matériaux. Cette tunique libère en outre des substances agissant sur la média qui peuvent moduler la pression artérielle via les mécanismes de vasoconstriction ou de vasodilatation. L'intima est séparée de la média par la lamina (ou limitante) élastique interne, une lame de fibre élastique constituée d'élastine. La média est constituée de couches d'élastine et de cellules musculaires lisses (CML), dont la contraction ou la relaxation est contrôlée par des neurofibres vasomotrices du système nerveux autonome, par des facteurs humoraux, et par l'endothélium, tel que mentionné précédemment. Enfin, l'adventice est composée par un mélange de matrice extracellulaire, de fibroblastes et de cellules nerveuses. Elle est caractérisée par la présence de fibres de collagène fortement liées les unes aux autres, qui permettent aux artères et aux veines de s'étirer pour éviter une sur-dilatation due à la pression sanguine. Il faut noter que dans les artères de gros calibre, l'adventice et la média sont séparées par la lamina élastique externe, une couche élastique acellulaire.

Malgré le fait que les parois artérielle et veineuse présentent la même structure à trois couches, l'épaisseur relative de ces dernières varie dans les deux types de vaisseaux (figure 2), reflétant ainsi leur différente fonction. Les **artères** sont responsables du transport du sang provenant des ventricules, c'est à dire que ce sang est sous haute pression en raison de l'action de la pompe cardiaque. Pour faire face à ces poussées sanguines par le cœur, elles ont une paroi très épaisse, particulièrement riche en CML, qui confèrent force et élasticité. Les veines portent au contraire le sang sous basse pression depuis les organes et les tissus vers le cœur ; elles présentent, pour cette raison, des parois plus fines que celles des artères. De plus, elles possèdent une lumière plus large que celle des artères, et contiennent des systèmes de valves pour faire face à la pression artérielle faible et à la force de gravité, empêchant ainsi le reflux du sang.

Au sein même du groupe des artères, celles-ci montrent des variations dans la structure de leur paroi, de sorte qu'elles peuvent être distinguées en trois catégories : les artères élastiques,

les artères musculaires et les artérioles. Les artères élastiques ont une paroi épaisse et sont situées à proximité du cœur, comme l'artère pulmonaire ; elles présentent un large diamètre (2.5-1 cm) ainsi qu'une forte élasticité, et opposent une faible résistance au sang circulant du cœur aux artères de taille moyenne. Leur paroi se dilate ou se contracte passivement quand le sang est éjecté du cœur, pour que le sang puisse avancer en continu et non par saccades, malgré les contractions cardiaques. Les artères musculaires présentent, pour leur part, un diamètre plus petit (0,3 mm-1 cm), et affichent la média la plus épaisse de tous les vaisseaux, étant ainsi davantage responsables de la vasoconstriction que les artères élastiques, mais étant également moins étirables. Enfin, plus loin du cœur, les artérioles sont les plus petites artères. Leur média est en majeure partie composée de CML, avec très peu de fibres élastiques, et leur adventice est réduite. La variation de leur diamètre (d'environ 30 μm) détermine l'efflux sanguin dans les capillaires : quand les artérioles se contractent, le sang évite les tissus qu'elles irriguent alors que lorsqu'elles se dilatent, le volume sanguin augmente dans les capillaires locaux.

Les **capillaires** sont les plus petits vaisseaux de l'organisme, avec un diamètre qui varie de 8 à 10 μm . Ils parcourent tous les organes et tissus en formant un réseau, et sont responsables de l'échange de substances telles que les gaz, les nutriments, les hormones, ou encore les déchets métaboliques, entre le sang et le fluide interstitiel entourant les cellules. Pour mieux accomplir leur fonction, la structure des capillaires est extrêmement différente de celle des artères et des veines : leur lumière est en effet entourée par une unique couche de cellules endothéliales.

Les capillaires s'unissent pour former les veinules, dont le diamètre est compris entre 8 et 100 μm . Ces veinules fusionnent ensuite pour former les **veines**, dont le diamètre augmente à mesure qu'on se rapproche du cœur. Grâce à leur grande lumière, les veines peuvent contenir un important volume sanguin, servant ainsi de réservoirs de sang. De plus, elles offrent une basse résistance au flux du sang, facilitant de cette façon son transport vers les oreillettes cardiaques.

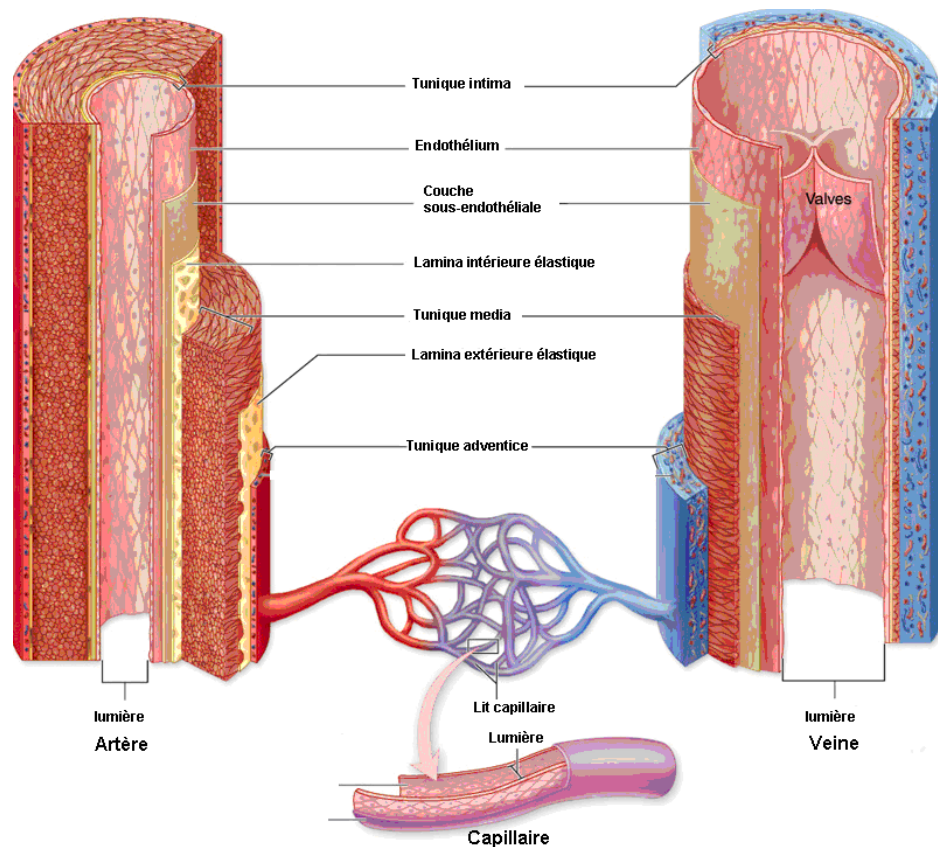


Figure 2 : Comparaison de la structure des artères, des veines et des capillaires

Les artères et les veines présentent la même structure à trois couches, mais l'épaisseur relative de ces dernières est différente entre les deux types de vaisseaux. La tunique média est épaisse dans les artères et relativement mince dans les veines, tandis que la tunique adventice est mince dans les artères et relativement épaisse dans les veines. De plus, ces dernières présentent une lumière plus large que celle des artères, et contiennent des valves pour empêcher le reflux du sang. La structure des capillaires diffère de celle des artères et des veines : leur lumière est en effet entourée par une unique couche de cellules endothéliales.

Adapté de http://academic.kellogg.edu/herbretsonc/bio201_mckinley/f231_walls_de_an_arter_c.jpg.

B. Physiologie des vaisseaux sanguins pulmonaires

La circulation sanguine est fondamentale pour la vie de l'organisme. Chaque cellule a besoin d'énergie pour exécuter toutes ses fonctions, et ne peut la produire qu'en recevant du dioxygène (O_2) et des nutriments. Ceux-ci sont transportés dans le sang oxygéné mis en mouvement par le cœur pour rejoindre l'aorte avant d'atteindre l'ensemble des cellules constituant l'organisme. Dans le même temps, les déchets produits en conséquence de l'oxydation du carbone sont transportés par le sang désoxygéné qui est envoyé aux poumons pour être réoxygéné et se décharger du dioxyde de carbone (CO_2) qu'il contient.

Au vu de l'importance de l'approvisionnement en sang de toutes les cellules du corps, il n'est pas surprenant que ce système complexe soit strictement régulé pour satisfaire les demandes de l'organisme. Nommément, la pression artérielle est un facteur qui doit être contrôlé et maintenu stable.

La **pression artérielle pulmonaire** est la pression exercée par le sang circulant sur les parois des artères pulmonaires. Au repos et en conditions physiologiques, la pression artérielle pulmonaire moyenne est d'environ 14 mmHg, avec une limite supérieure de 20,6 mmHg [2]. Elle est directement proportionnelle au débit cardiaque et à la résistance vasculaire. Le **débit cardiaque** est le volume de sang éjecté dans la circulation par les ventricules cardiaques en une minute : il est relativement stable, étant donné qu'il est dépendant du volume sanguin et de la fréquence cardiaque, qui ne changent pas chez un individu sain au repos. La **résistance vasculaire** est la résistance au flux qui doit être vaincue pour permettre la circulation du sang à travers le système cardiovasculaire, et est déterminée par la viscosité du sang ainsi que par la longueur et le diamètre des vaisseaux. Sachant que les deux premiers facteurs cités sont normalement constants, la résistance vasculaire est principalement dépendante du diamètre vasculaire, qui change fréquemment, puisqu'il est soumis à la vasoconstriction et à la vasodilatation des vaisseaux. La résistance vasculaire est notamment inversement proportionnelle à la quatrième puissance du rayon, qui est la moitié du diamètre : ainsi, même une très légère variation en termes de diamètre vasculaire a un impact fort sur la valeur de la pression artérielle.

En comparaison avec leurs homologues systémiques, les artères et artérioles pulmonaires montrent une paroi plus fine et une lumière plus importante. Pour ces raisons, elles offrent une faible résistance au flux sanguin, demandant ainsi moins de pression pour faire circuler le sang que dans le circuit systémique. Par conséquent, la pression artérielle pulmonaire moyenne est beaucoup plus faible que la pression artérielle systémique moyenne qui est d'environ 90 mmHg.

Une autre différence importante entre la circulation pulmonaire et la circulation systémique est la réaction à faibles niveaux d'O₂ sanguin. En fait, tandis que les vaisseaux systémiques adultes se dilatent pendant l'hypoxie, les vaisseaux pulmonaires se contractent. Ces différentes réponses sont dues aux fonctions opposées des vaisseaux pulmonaires et systémiques, les premiers prenant l'oxygène et les deuxièmes le distribuant. La vasoconstriction pulmonaire hypoxique permet la redistribution du flux pulmonaire depuis les sites affichant une pression partielle d'O₂ basse vers les sites présentant une importante disponibilité d'O₂ ; au contraire, la vasodilatation hypoxique systémique permet une optimisation de la perfusion des tissus pour s'adapter à leur demande métabolique et ainsi la satisfaire. La physiologie de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique a été étudiée durant de nombreuses décennies, et il s'avère que les mitochondries, organites cellulaires qui feront l'objet du deuxième chapitre de l'introduction, y jouent un rôle essentiel [3]. En effet, en

qualité de senseurs d'O₂, les mitochondries peuvent moduler leur production d'espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent alors diffuser dans le cytoplasme et vers la membrane cellulaire et réguler des cibles sensibles à l'état oxydatif, pouvant à leur tour induire la contraction des CML. Par exemple, les canaux potassiques membranaires voltage-dépendants sont inhibés par les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales, ce qui conduit à une dépolarisation membranaire, qui à son tour provoque l'activation des canaux calciques voltage-dépendants et, par conséquent, une augmentation du calcium (Ca²⁺) cytoplasmique [4]. Cette dernière déclenche la vasoconstriction et favorise la prolifération cellulaire, selon les mécanismes que qui seront détaillés ci-dessous.

Les mitochondries des CML de l'artère pulmonaire (CML-AP) et celles des CML des vaisseaux systémiques présentent des différences, qui pourraient expliquer la différence de production basale d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales et les réponses opposées à l'hypoxie. Les mitochondries des CML-AP montrent, en effet, une diminution de l'expression et de la fonction de complexes I-III de la chaîne respiratoire et une augmentation de l'expression de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase en comparaison avec les CML des vaisseaux systémiques [5].

Comme il a été mentionné ci-dessus, la pression artérielle dépend fortement du diamètre vasculaire, qui à son tour varie selon le tonus des vaisseaux. La vasoconstriction et la vasodilatation sont médiées par les CML par des mécanismes moléculaires qui seront décrits dans les sections suivantes.

1. Contraction des CML

La contraction des CML est induite par une augmentation de la concentration du Ca²⁺ dans le cytoplasme, selon le mécanisme représenté en figure 3. Le Ca²⁺ libre lie la calmoduline, protéine capable de s'associer aux ions Ca²⁺, et le complexe Ca²⁺-calmoduline active ensuite la kinase de la chaîne légère de la myosine, une enzyme qui phosphoryle les chaînes légères de la myosine en présence d'ATP. Les chaînes légères de la myosine sont des sous-unités régulatrices de 20 KDa situées sur les têtes de myosine ; leur phosphorylation détermine la stimulation de leur activité ATPasique, et, par conséquent, la formation de ponts d'union entre les têtes de myosine et les filaments d'actine, ce qui détermine la contraction des CML.

Une augmentation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique dans les CML-AP peut être produite soit par un flux augmenté de Ca²⁺ dans la cellule via des canaux calciques de la

membrane plasmique, soit via le libération de Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarcoplasmique [6, 7].

Le premier mécanisme implique de multiples canaux perméables au Ca^{2+} , tels que (a) les canaux calciques voltage-dépendants, régulés par des changements du potentiel de membrane, (b) les ROC (*receptor-operated calcium channels*), activés par l'interaction des agonistes avec leurs récepteurs membranaires, et (c) les SOC (*store-operated calcium channels*), activés par la déplétion de Ca^{2+} dans les réserves intracellulaires [8, 9]. Le deuxième mécanisme est basé sur la sensibilité du réticulum sarcoplasmique à l'inositol triphosphate et à la ryanodine [6, 7].

La dépolarisation de la membrane plasmique engendre l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants [9] et, donc, l'influx de Ca^{2+} dans la cellule, et facilite également la production d'inositol triphosphate, qui stimule la libération de Ca^{2+} dans le cytosol par le réticulum sarcoplasmique [10].

Les ROC sont activés par la liaison de ligands libérés par les cellules endothéliales, tels que l'endothéline-1, la noradrénaline (aussi appelée norépinephrine), l'angiotensine II, la vasopressine, la sérotonine et le thromboxane A_2 [9], à leurs récepteurs spécifiques liés à la membrane plasmique. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G_q hétérotrimérique, qui, utilisant l'échange de GTP en GDP (d'où le nom de protéine G), stimule l'activité de la phospholipase C, déterminant ainsi la formation de deux seconds messagers : l'inositol triphosphate et le diacylglycérol. La liaison de l'inositol triphosphate aux récepteurs situés sur le réticulum sarcoplasmique déclenche la libération de Ca^{2+} dans le cytosol ; de l'autre côté, le diacylglycérol active la protéine kinase C, qui phosphoryle les canaux calciques voltage-dépendants, favorisant la contraction.

Pour leur part, les SOC sont activés par la déplétion du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique [11], et contrôlent un influx de Ca^{2+} qui est fondamental pour le remplissage du réticulum sarcoplasmique et pour maintenir une concentration de Ca^{2+} cytosolique élevée.

La fonction des SOC et ROC est dépendante de l'expression des gènes TRPC (*transient receptor potential channel*). Des gènes TRPC connus, TRPC1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimées dans les CML-AP humaines [11], et TRPC1, 3, et 5 dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire [12].

La phosphorylation des chaînes légères de la myosine et, donc, la contraction des CML, est maintenue par des voies de transduction du signal initiées par des récepteurs couplés aux protéines G. Comme montré en figure 3, l'activation de la protéine G_q par des composés tels que la norépinephrine, l'angiotensine II, l'endothéline-1 et la vasopressine, au-delà de

stimuler la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (médiée par l'inositol triphosphate), active la Rho-kinase, qui inhibe la phosphatase de la chaîne légère de la myosine, cette dernière ayant une activité favorisant la relaxation.

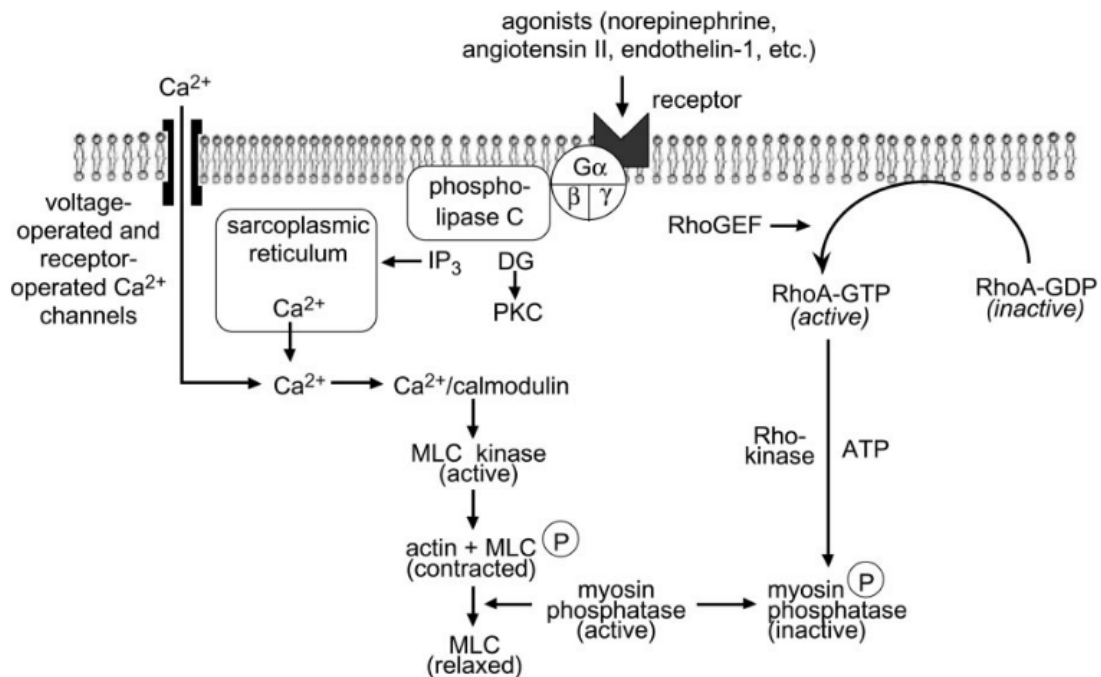


Figure 3 : Régulation de la contraction du muscle lisse.

Divers agonistes lient des récepteurs spécifiques pour activer la contraction dans le muscle lisse. Cette liaison active la phospholipase C via l'intervention d'une protéine G. La phospholipase C produit deux seconds messagers à partir du lipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: le diacylglycerol (DG) et l'inositol trisphosphate (IP_3). L'inositol trisphosphate se lie à des récepteurs spécifiques sur le réticulum sarcoplasmique, engendrant la libération du Ca^{2+} . Le DG et le Ca^{2+} activent la protéine kinase C (PKC), qui favorise la contraction via la phosphorylation de canaux calciques, activés par une dépolarisation de la membrane, ou d'autres protéines qui régulent les glissements des têtes de myosine sur les filaments d'actine. Le Ca^{2+} se fixe à la calmoduline, activant ainsi la MLC kinase (*myosin light chain kinase*). Cette kinase phosphoryle en fait la chaîne légère de la myosine qui change de conformation, pouvant ainsi lier l'actine, initiant le raccourcissement de la cellule musculaire lisse. Cependant, la réponse contractile est transitoire, et son maintien est assuré par un mécanisme de sensibilisation au Ca^{2+} incluant l'inhibition de l'activité de la phosphatase de la myosine par la Rho kinase. Ce mécanisme est initié en même temps que l'activation de la phospholipase C, via la stimulation de la petite protéine liant le GTP RhoA. L'activation de RhoA par le récepteur couplé à la protéine G implique un facteur d'échange de nucléotides de guanine (RhoGEF) et la migration de RhoA à la membrane plasmique. Une fois activé, RhoA augmente l'activité de la Rho kinase, occasionnant l'inhibition de la phosphatase de la myosine. Cela favorise l'état contractile, étant donné que la chaîne légère de la myosine ne peut plus être déphosphorylée. De [13]

2. Relaxation des CML

La relaxation des CML a en effet lieu lorsque la phosphorylation des chaînes légères de la myosine est réduite. Cela peut être produit par 1) une diminution de la libération de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique ou de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, 2) l'inhibition de la kinase de la chaîne légère de la myosine par une augmentation de la concentration intracellulaire de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de la guanosine monophosphate cyclique

(GMPc), et 3) la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine par la phosphatase de la chaîne légère de la myosine.

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'élimination de Ca^{2+} , qui est soit remis en réserve dans le réticulum sarcoplasmique grâce à l'action d'une pompe calcique ATP-dépendante appelée SERCA (*sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*), soit expulsé à l'extérieur de la cellule par une pompe calcique ATP-dépendante et un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ tous deux localisés à la membrane plasmique (figure 4).

L'activation des protéines G_s par des composés comme l'adrénaline (aussi appelée épinephrine), l'adénosine et la prostacycline augmente l'AMPc, qui active la protéine kinase A, qui à son tour phosphoryle la kinase de la chaîne légère de la myosine. Cette dernière est phosphorylée aussi par la protéine kinase G [14], qui est activée par le GMPc produit par la guanylate cyclase, stimulée à son tour par le vasodilatateur oxyde nitrique, libéré par les cellules endothéliales. La phosphorylation rend la kinase de la chaîne légère de la myosine moins sensible au complexe Ca^{2+} -calmoduline, et ceci diminue ainsi son activité [15]. Par conséquent, la diminution de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine conduit à la relaxation des CML.

Enfin, la phosphorylation des chaînes légères de la myosine peut être diminuée suite à l'activation de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine. Il a été démontré que cette phosphatase est stimulée par une voie dépendante de l'oxyde nitrique et de GMPc [16, 17].

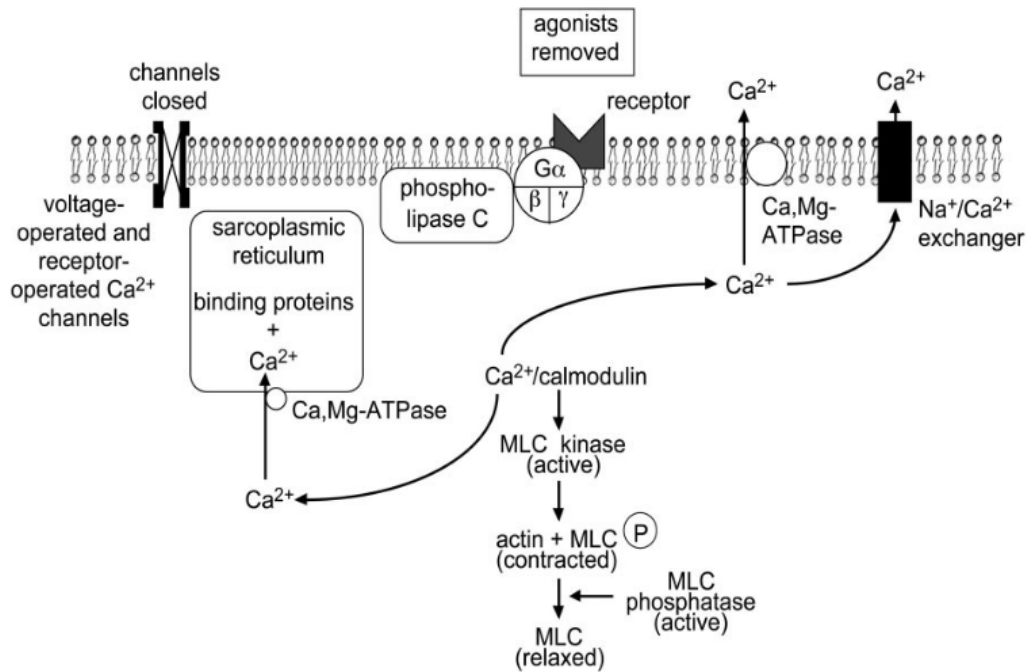


Figure 4 : Régulation de la relaxation du muscle lisse.

La relaxation du muscle lisse a lieu suite au retrait du stimulus contractile ou l'action directe d'une substance qui stimule l'inhibition du mécanisme contractile. Dans les deux cas, le processus de relaxation nécessite une diminution de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et une augmentation de l'activité de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLC pour *myosin light chain*). Le réticulum sarcoplasmique et la membrane plasmique contiennent des Ca, Mg-ATPases qui pompent le Ca^{2+} du cytosol. Les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont aussi localisés sur la membrane plasmique et participent à la réduction du Ca^{2+} intracellulaire. Durant la relaxation, les canaux calciques dépendants des ligands ou du voltage au niveau de la membrane plasmique sont fermés, causant donc une entrée réduite de Ca^{2+} dans la cellule. De [13].

C. Pathologie du système circulatoire pulmonaire: l'hypertension artérielle pulmonaire

1. Définition et épidémiologie

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est un syndrome très complexe, défini hémodynamiquement par une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25 mmHg au repos, mesurée par cathétérisme du cœur droit [18, 19]. Dans cette condition, la pression artérielle pulmonaire occluse, qui reflète la pression veineuse pulmonaire et, donc, la pression capillaire, est inférieure à 15 mmHg. Ces caractéristiques se présentent en absence de causes secondaires comme des maladies pulmonaires parenchymateuses ou thromboemboliques [20]. Il s'agit donc d'une maladie primaire des artères pulmonaires de moyenne et petite taille, qui subissent un important remodelage prolifératif, qui amène à la réduction progressive de leur lumière (figure 5). Cela conduit à une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire au-delà de 3 unités Wood (1 Wood = 1 mmHg/min/L) et, par conséquent, de la pression artérielle pulmonaire [21]. Le ventricule droit après une brève hypertrophie compensatoire provoquée

par cette surcharge [22], progresse vers une phase de décompensation et une diminution du débit cardiaque. Les patients meurent d'insuffisance cardiaque droite, condition définie comme l'incapacité du ventricule droit à éjecter un volume suffisant de sang dans la circulation pulmonaire.

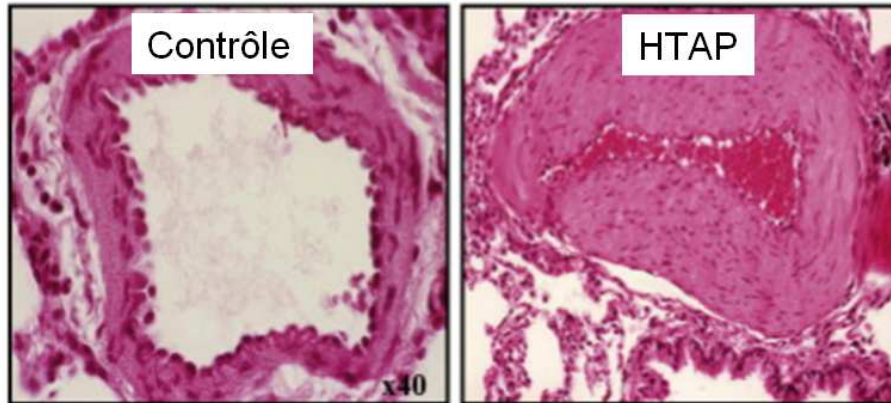


Figure 5 : Le remodelage vasculaire dans l'HTAP.

Ces sections histologiques des artères pulmonaires de taille moyenne montrent l'épaississement de la média caractéristique de l'HTAP, menant à la réduction de la lumière vasculaire. Adapté de [23]

Etant donné que la circulation pulmonaire a une capacitance plus haute et une pression plus faible par rapport aux lits vasculaires systémiques, le remodelage vasculaire peut augmenter considérablement avant que les symptômes ne se manifestent. En conséquence, l'HTAP devient visible tardivement dans le développement de la maladie. De plus, les symptômes sont non spécifiques, car ils sont principalement dus à la réduction du débit cardiaque : essoufflement, faiblesse, et rétention des fluides [20].

Le taux exact de survie des patients atteints d'HTAP est encore inconnu. Des rapports récents semblent suggérer que la survie actuelle à 5 ans serait d'environ 50%, et la plus grande base de données REVEAL (*Registry to Evaluate Early and Long-term PAH disease management*) des Etats Unis indique une survie à 3 et 5 ans de 68% et 57%, respectivement [24]. Néanmoins, il faut souligner que des sous-populations de patients atteints d'HTAP associée à une sclérodémie ou à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont des taux de survie inférieurs, de 40% et 20% à 3 et 5 ans respectivement [20].

L'HTAP est une maladie rare, avec une prévalence, c'est à dire le nombre des cas à un moment donné, estimée à 15-50/million d'habitants, même si cela peut être sous-estimé [25]. Cependant, pour certains groupes à haut risque, la prévalence est majeure : chez les patients présentant une infection par le VIH, la prévalence est de 0,5% [26], et chez les patients avec une sclérodémie la prévalence atteint 12% [27]. En France, l'incidence annuelle d'HTAP,

soit le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en un an, est de 2,4 cas/million d'habitants [28].

L'HTAP peut se développer à tout âge, avec une moyenne qui varie selon le sous types d'HTAP analysés, qui seront décrit ci-après : les patients atteints d'HTAP familiale, par exemple, sont les plus jeunes au moment du diagnostic (37 ± 11 ans). L'âge au moment de la découverte de la présence d'HTAP chez les patients des autres sous-groupes est autour de la 5^{ème} décennie de vie [28, 29]. Les patients sont majoritairement des femmes, avec un ratio entre femmes/hommes touché(e)s qui varie de 1,9 à 10, selon le sous type d'HTAP et le registre des patients [30].

Bien qu'elle soit une maladie rare, son impact sur la société est très important : il s'agit en effet d'une maladie mortelle qui touche des patients relativement jeunes (entre les 30 et 50 ans) et qui coûte extrêmement cher en termes de traitement [31, 32].

2. Classification Clinique

L'HTAP est la forme la plus grave d'hypertension pulmonaire (HTP).

L'HTP était précédemment distinguée en HTP primaire, dont les causes sont inconnues, et HTP secondaire, déterminée par une autre condition sous-jacente, comme une maladie du cœur gauche, des poumons, ou une chute persistante des niveaux d'oxygène (hypoxie chronique) [33]. Suite au 5^{ème} Symposium Mondiale tenu en 2013 à Nice, en France, l'HTP est répartie dans les 5 classes suivantes [34]:

1) **hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)**

L'HTAP peut apparaître seule ou associée à diverses conditions cliniques. Pour cela elle peut être distinguée en différentes classes :

- a) HTAP idiopathique, qui n'est associée à aucun facteur de risque ni aucun cas familial ;
- b) HTAP familiale, associée à une mutation génétique ;
- c) HTAP induite par des drogues et des toxines ;
- d) HTAP associée à différentes pathologies (maladies du tissu conjonctif, infection de VIH, hypertension portale, anémie hémolytique chronique, maladies cardiaques congénitales, schistosomiase).

2) **HTP causées par cardiopathies gauches :**

- a) dysfonction systolique ;
- b) dysfonction diastolique ;
- c) maladie valvulaire.

3) **HTP déterminée par des maladies des poumons et/ou hypoxie :**

- a) maladie pulmonaire obstructive chronique ;
- b) maladie pulmonaire interstitielle ;
- c) autres maladies pulmonaires avec un mélange de motifs restrictifs et obstructifs ;
- d) respiration désordonnée lors du sommeil ;
- e) désordres d'hypoventilation alvéolaire ;
- f) exposition chronique à haute altitude ;
- g) anomalies de développement.

4) **HTP thromboembolique chronique**

5) **HTP liée à mécanismes multifactoriels inconnus :**

- a) désordres hématologiques : désordres myéloprolifératifs, splénectomie ;
- b) désordres systémiques, sarcoïdose, vascularite ;
- c) désordres métaboliques : maladie du stockage du glycogène, maladie de Gaucher, désordres de la thyroïde ;
- d) autres : obstruction tumorale, insuffisance rénale chronique en dialyse.

3. Anatomie pathologique de l'HTAP

L'HTAP est une pan-vasculopathie qui affecte surtout les petites artères pulmonaires (avec un diamètre < 500µm), appelées aussi artères de résistance car elles régulent le flux sanguin local dans le poumon. Dans cette pathologie, elles sont caractérisées par une vasoconstriction chronique et par des lésions souvent obstructives qui participent à l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire et, par conséquent, de la pression artérielle pulmonaire. Ces lésions, schématisées en figure 6, comprennent une hypertrophie de la média des artères pulmonaires et une musculation des artères pulmonaires distales, une fibrose intimale concentrique et excentrique, différents degrés d'inflammation, une prolifération de l'adventice, un remodelage de la matrice extracellulaire, des lésions plexiformes proprement dites (dont l'existence n'est pas obligatoire), des lésions thrombotiques, et la perte de petites artères précapillaires [35]. Ces événements conduisent finalement à la raréfaction capillaire due à l'occlusion des artères pulmonaires et à la dégénération microvasculaire des artères pulmonaires distales [36]. La compréhension de l'évolution des lésions vasculaires dans l'HTAP est limitée, car les biopsies sont rarement obtenues chez les patients adultes. Cependant, d'après des observations de formation de fibrose intimale et de lésions plexiformes chez des enfants atteints d'HTAP *versus* des patients adultes, certains proposent

que l'hypertrophie de la média soit une lésion plus précoce et réversible que la fibrose de l'intima ou l'artériopathie plexogénique [37].

La **vasoconstriction chronique** occasionne une réduction de la lumière vasculaire, et est caractérisée par une lamina élastique interne profondément repliée, avec des cellules endothéliales confinées dans les plis.

L'**hypertrophie de la média** comporte une muscularisation augmentée des artères pulmonaires déjà muscularisés [38], ainsi qu'une augmentation de la matrice conjonctive et des fibres élastiques [39]. Elle est principalement due à l'hyper-prolifération et à la résistance à l'apoptose des CML-AP [38], phénomènes qui seront discutés en détail dans la section ci-dessous.

La **néo-muscularisation** des artérioles précapillaires distales consiste en l'apparition de CML dans ces vaisseaux normalement non-muscularisés. Diverses études ont proposé différentes sources cellulaires qui seraient responsables de l'excès de CML dans l'HTAP, telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les péricytes, et les cellules hématopoïétiques [40–44]. Notamment, le processus via lequel les cellules endothéliales migrent vers la média et acquièrent un phénotype musculaire est appelé transition endothéliale-mésenchymateuse, dont l'existence dans l'HTAP humaine a été prouvé *in situ* [45]. Néanmoins, selon une étude très récente [46], ces sources de cellules non-musculaires ne fournissent qu'une contribution secondaire à l'apparition de CML dans les artérioles distales, qui serait plutôt due à la dédifférenciation de CML différenciées préexistantes. Ces cellules dédifférenciées, surexprimant le récepteur du facteur de croissance PDGF (*platelet-derived growth factor*), migrent à travers la frontière moyenne-distale des artérioles puis prolifèrent fortement. Ensuite, les cellules commencent à réduire l'expression du récepteur de PDGF et à augmenter celle de la chaîne lourde de la myosine. Finalement, l'artériole distale est muscularisée par des CML matures et différenciées [46].

Les **lésions plexiformes** apparaissent dans les stades tardifs de la maladie [47]. Au niveau morphologique, elles consistent en des amas de vaisseaux désorganisés constitués de cellules endothéliales, de CML, de myofibroblastes et de cellules inflammatoires, en particulier macrophagiques. Ces lésions vasculaires proliférantes sont issues d'une artère parentale et se développent avec prédilection dans des zones de turbulence (divisions artérielles). Des facteurs de croissance ont été impliqués dans leur constitution et certains ont suggéré qu'elles seraient dérivées d'une prolifération monoclonale des cellules endothéliales, reflétant une dysfonction de la prolifération endothéliale [48]. Alternativement, les lésions plexiformes pourraient représenter une réponse angiogénique à l'ischémie ou hypoxie locales [49].

Au cours de l'artériopathie pulmonaire thrombotique, les lésions prédominantes sont endothéliales, sous la forme d'une **fibrose intimale** [50], qui peut être laminaire concentrique, excentrique, ou concentrique non laminaire. L'épaississement intimal laminaire concentrique, aussi appelé néointima, peut être soit cellulaire soit fibrotique. Les cellules néointimales présentent des caractéristiques des fibroblastes, des myofibroblastes, et des CML. Cependant, ces caractéristiques morphologiques ne permettent pas de conclure sur leur dérivation car des travaux récents ont montré la capacité des cellules endothéliales et des fibroblastes à acquérir un phénotype musculaire lisse [51]. L'épaississement excentrique et concentrique nonlaminaire sont pour la plupart composés de fibroblastes et de tissu connectif de la matrice [52].

Les **lésions thrombotiques *in situ*** sont des thrombus parfois recanalisés, dont la formation est favorisée par l'altération du processus de coagulation dans l'HTAP, caractérisée par une augmentation de l'activité de la thrombine [53], des plaquettes [54] et de l'expression du facteur tissulaire [55].

Le **remodelage de la matrice extracellulaire** contribue au microenvironnement aberrant dans la paroi vasculaire pulmonaire dans l'HTAP via la création d'un environnement péricellulaire/extracellulaire favorisant la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Notamment, un remodelage inapproprié de la matrice extracellulaire peut faciliter le remodelage vasculaire via la génération de fragments de ses composants connus pour moduler directement la prolifération, la migration, et l'activation de protéases, ainsi que par le relargage excessif de facteurs de croissance et d'autres molécules qui y sont normalement enchâssées [56]. Dans l'HTAP, plusieurs études montrent un déséquilibre entre les protéases et les inhibiteurs des protéases, qui pourrait contribuer au remodelage de la matrice extracellulaire [57].

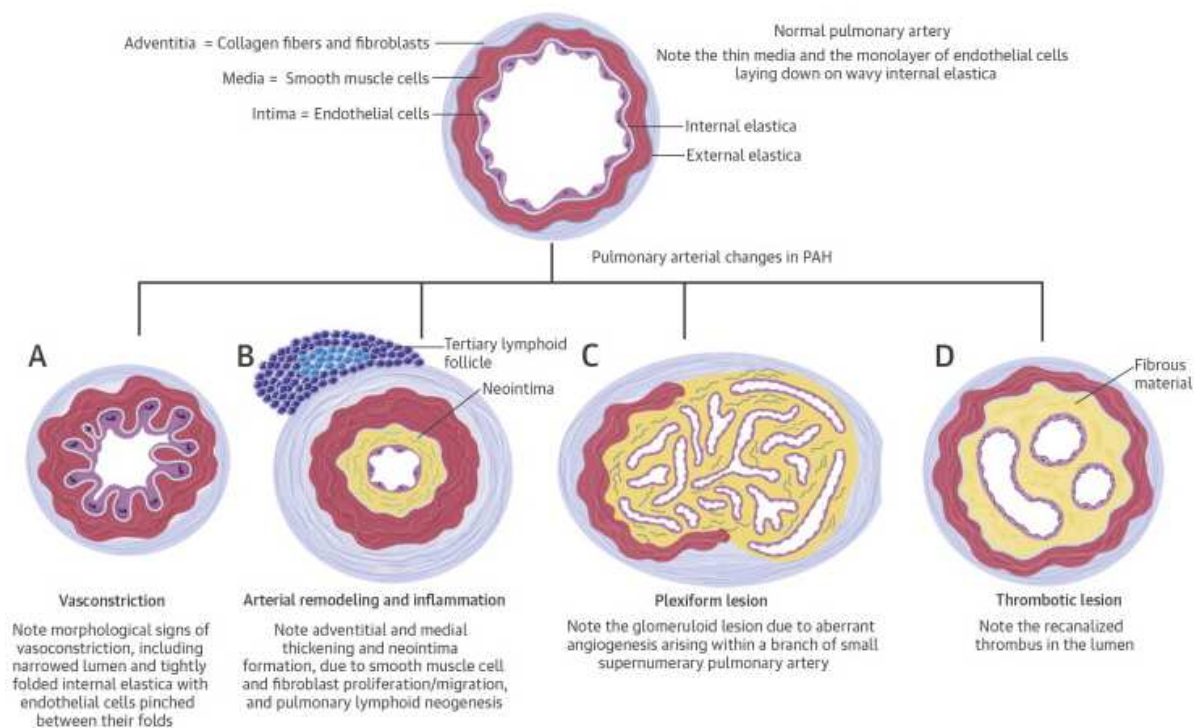


Figure 6 : Représentation de l'anatomie pathologique de l'HTAP.

(A) La vasoconstriction pulmonaire semble être un événement précoce dans la pathogenèse de l'HTAP. Cette vasoconstriction pulmonaire excessive a été liée à une dysfonction ou une expression anormale des canaux potassiques dans les CML, ainsi qu'à une production réduite de vasodilatateurs (oxyde nitrique et prostacycline) et une surproduction de vasoconstricteurs (endothéline-1) par les cellules endothéliales. (B) Les cytokines proinflammatoires, les chémokines, la sérotonine, l'angiopoïétine, les facteurs de croissance, les membres de la superfamille TGF (*transforming growth factor*)- β , mais aussi la protéolyse de la matrice extracellulaire ainsi que l'auto-immunité, stimulent la prolifération et la migration des CML, des cellules endothéliales, des fibroblastes et des péricytes, et, par conséquent, le remodelage vasculaire. (C) La prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules endothéliales, causées par la production excessive de facteurs de croissance angiogéniques, ainsi que par des anomalies génétiques dans la signalisation TGF- β , peuvent favoriser une angiogénèse aberrante dans l'HTAP. (D) L'artériopathie thrombotique est une caractéristique pathophysiologique importante de l'HTAP, due à la dysfonction endothéliale. De [35].

Hyperprolifération et résistance à l'apoptose des CML

Une des caractéristiques prédominantes du remodelage vasculaire observé dans l'HTAP est, comme cité ci-dessus, l'hypertrophie de la média. En conditions physiologiques, l'épaisseur de la média de l'artère pulmonaire est maintenue à un niveau optimal par un équilibre entre la prolifération et l'apoptose des CML. Si cet équilibre est altéré vers une augmentation de la prolifération ou une diminution de l'apoptose, la média devient plus épaisse, réduisant et finalement obstruant la lumière vasculaire pour ainsi conduire à une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire [58].

L'**hyperprolifération** et l'hypertrophie des CML ont été impliquées dans le développement de l'HTAP idiopathique [59]. Il a été proposé que la prolifération cellulaire et la vasoconstriction partagent une voie commune. En effet, l'augmentation de la prolifération

semble être reliée, elle aussi, à une homéostasie altérée de la concentration de Ca^{2+} cytosolique dans les CML [60].

Il a été montré que la concentration de Ca^{2+} cytosolique au repos est significativement élevée dans les CML en prolifération comparée à celle des cellules quiescentes, supportant l'idée qu'une élévation du flux de Ca^{2+} dans le cytoplasme est requise non seulement pour la contraction des CML mais aussi pour la prolifération cellulaire [61, 62].

En effet, une concentration de Ca^{2+} cytosolique élevée pousse les cellules quiescentes à rentrer dans le cycle cellulaire, où elles se divisent par mitose [63]. Au moins quatre étapes du cycle cellulaire sont sensibles à l'activation par le complexe Ca^{2+} /calmoduline: (a) la transition de la phase G_0 à la G_1 (d'un état de repos au début de la synthèse d'ADN), (b) la transition de la phase G_1 à la S (synthèse d'ADN), (c) la transition de la phase G_2 à la M (mitose), et (d) la mitose en soi.

Des concentrations élevées de Ca^{2+} cytosolique engendrent une augmentation rapide de la concentration de Ca^{2+} nucléaire [64], qui est un composant essentiel de la prolifération des CML. En effet, une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique est impliquée dans la stimulation de l'expression de gènes importants pour la prolifération cellulaire, dont le promoteur contient des éléments sensibles au Ca^{2+} [63].

De plus, certaines protéines cytoplasmiques de transduction de signal impliquées dans la prolifération cellulaire sont aussi Ca^{2+} -dépendantes. Par exemple, la MAP (*mitogen-activated protein*) kinase II, une enzyme participant à la cascade de phosphorylation qui mène à l'activation du facteur qui soutient la synthèse d'ADN, est activée par une élévation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique [65].

De façon intéressante, il a été démontré qu'une quantité suffisante de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique, et non seulement dans le cytoplasme, est requise pour la prolifération des CML. En effet, le Ca^{2+} emmagasiné dans le réticulum sarcoplasmique joue un rôle important dans l'initiation de la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire. La réduction des réserves de Ca^{2+} sensibles à l'inositol triphosphate avec les inhibiteurs des Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique provoque l'inhibition de la prolifération cellulaire, alors que sa restauration via les pompes SERCA permet la reprise de la phase S du cycle cellulaire [66].

Enfin, des concentrations élevées de Ca^{2+} cytosolique dans les cellules endothéliales sont aussi responsables de l'hyperprolifération des CML, en augmentant l'activité de liaison d'AP-1 (*activating protein-1*), une famille de facteurs de transcription [67] codés par des gènes sensibles au Ca^{2+} . Une élévation prolongée de la concentration de Ca^{2+} cytosolique active en fait leur expression [68]. Les gènes cibles d'AP-1, tels que l'endothéline-1 et PDGF, sont

impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, la migration, et l'apoptose, et notamment sont oncogènes [69]. Leur expression est augmentée dans l'HTP induite par l'hypoxie chronique [70], qui provoque l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique dans les cellules endothéliales via l'activation de l'expression de TRPC4 (*transient receptor potential-canonical*), une sous-unité d'un canal cationique perméable au Ca^{2+} [12].

La **résistance à l'apoptose** a été démontrée dans le développement et la conservation de l'HTP sévère [71], alors que l'induction de l'apoptose provoque la régression de l'hypertrophie de la paroi pulmonaire chez des modèles animaux d'HTAP [72].

La diminution du volume cellulaire est un phénomène précoce du processus apoptotique [73]. Une concentration élevée de K^+ cytoplasmique est requise pour maintenir un volume cellulaire normal [73, 74]. Les canaux potassiques voltage-dépendants de la membrane plasmique, qui régulent le flux de K^+ dans la cellule, jouent donc un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose. En effet, il a été démontré que leur activation induit ou accélère l'apoptose via la facilitation de la perte de K^+ cytoplasmique, alors que leur inhibition permet une concentration de K^+ cytosolique suffisamment élevée pour ralentir la diminution du volume cellulaire et inhiber l'apoptose [75, 76].

De plus, une concentration de K^+ cytosolique élevée est nécessaire pour l'inhibition des caspases et nucléases, qui sont les médiateurs finaux de l'apoptose [75, 77, 78]. Une diminution de l'expression et de la fonction des canaux potassiques voltage-dépendants dans les CML, comme observé dans l'HTAP idiopathique, affaiblit l'apoptose inhibant la diminution du volume cellulaire et l'activité des caspases cytoplasmiques, ce qui amène à l'hypertrophie de la média [71].

La protéine antiapoptotique *B cell lymphoma 2* (Bcl-2) inhibe les canaux potassiques dépendants du voltage [79] et augmente la survie cellulaire. Bcl-2 atténue l'apoptose aussi en inhibant la libération du cytochrome *c* de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytosol [80], prévenant ainsi la formation de l'apoptosome et, donc, l'activation des caspases effectrices, processus qui seront décrits dans le chapitre II de l'introduction. De plus, il inhibe la chute du potentiel de la membrane mitochondriale qui précède l'apoptose en régulant le flux des protons dans les mitochondries [81]. La surexpression de Bcl-2 dans les CML diminue l'expression des sous-unités du canal potassique voltage-dépendant, réduisant ainsi la perte de K^+ et, donc, l'apoptose [79, 82]. Dans les tissus pulmonaires des patients atteints d'HTAP idiopathique ou d'HTAP familiale l'expression de l'ARN messager (ARNm) de Bcl-2 est activée [83]. De plus, l'apoptose médiée par les protéines BMP (*bone morphogenetic*

protein), qui diminuent l'expression de Bcl-2, est fortement inhibée dans les CML des patients HTAP idiopathique [71]. Etant donné que des mutations dans le gène du récepteur de BMP, BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor 2*) sont associées avec l'HTAP idiopathique et l'HTAP familiale [84], il paraît raisonnable de formuler l'hypothèse que la surexpression de Bcl-2 dans les CML des patients HTAP idiopathique peut être en partie due aux mutations du gène BMPR2 et/ou à la dysfonction de la signalisation contrôlée par BMP.

4. Bases moléculaires de l'HTAP

L'étiologie et la pathogenèse de l'HTAP sont très complexes. Son développement peut être déterminé par un fond génétique (mutations ou changements épigénétiques), par un large éventail de facteurs environnementaux (par exemple l'hypoxie, les agents anorexiques et les virus), et/ou par de mécanismes de déclenchement, comme l'inflammation, qui dans l'ensemble influencent différentes voies de signalisation. Pendant les 20 dernières années, un important investissement de la recherche fondamentale visant à mieux comprendre cette (encore) mystérieuse maladie mortelle a permis d'identifier de nombreuses voies de signalisation altérées chez les modèles expérimentaux et les patients et, par conséquent, une myriade de cibles thérapeutique potentielles a émergé [85].

a) La prédisposition génétique

Des études génétiques ont démontré qu'au moins 70% des patients avec l'HTAP familiale, et que 3,5 à 40% des patients atteints d'HTAP idiopathique, sont hétérozygotes pour une mutation du gène codant pour BMPR2, récepteur de type 2 de BMP [86]. BMPR2, membre de la superfamille des récepteurs aux facteurs de croissance TGF (*transforming growth factor*)- β , est exprimé de façon ubiquitaire et sa signalisation permet l'inhibition de la prolifération de CML-AP [87] et l'induction de la mort cellulaire des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire [88]. Des études chez des modèles animaux et des patients HTAP ont en outre montré que l'HTAP d'étiologies diverses est associée à une diminution de l'expression de BMPR2 [86]. Cependant, seulement 20% des personnes qui portent une mutation hétérozygote de BMPR2 sont atteintes d'HTAP, ce qui suggère que, pour déclarer la maladie, plusieurs facteurs environnementaux ou génétiques sont requis.

Plus rarement, des mutations des gènes de l'*activin receptor-like kinase 1* ALK1 (récepteur dans la voie de signalisation TGF- β), de la cavéoline-1 (protéine membranaire d'assemblage qui interagit, entre autres, avec le récepteur 1 du TGF- β [89]) et de KCNK3 (protéine du canal

potassique qui intervient dans la vasoconstriction induite par l'endothéline [90]) sont impliquées dans le développement de la maladie.

Pour finir, quelques cas d'HTAP associée à des mutations des gènes de l'endogline (glycoprotéine faisant partie du complexe du récepteur TGF- β) et Smad 1/5/8 (protéines intracellulaires permettant la transduction du signal des ligands TGF- β au noyau) ont été reportés [91].

b) La prédisposition épigénétique

Diverses études ont montré que, en plus de mutations de la lignée germinale, l'HTAP présente des changements épigénétiques. Par exemple, une surexpression spécifiquement pulmonaire de l'ADN méthyltransférase 3b a été observée, associée à une hyper méthylation inhibant la transcription du gène de la superoxyde dismutase (SOD2), responsable de la conversion de l'ion superoxyde (O_2^-) mitochondrial en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une entité chimique plus stable [92].

Il a été montré que les tissus pulmonaires des patients HTAP présentent aussi une augmentation de l'expression des histones désacétylases. Elles sont peut être impliquées dans la signalisation inflammatoire, étant donné que leur inhibition conduit à une diminution de l'expression de l'interleukine 6, et PDGF- β [93].

Enfin, il a été décrit que le processus de production des micro-ARN est altéré dans l'HTAP [91]; différents micro-ARN ont été démontrés comme étant impliqués dans l'HTAP expérimentale et clinique, certains étant augmentés ou encore d'autres diminués dans les tissus des patients au regard des tissus contrôles [85, 91].

c) La voie de l'endothéline

L'endothéline-1 est un peptide de 21 acides aminés produit par l'endothélium vasculaire (et, en petite partie, par les CML-AP et les fibroblastes pulmonaires) à partir d'un précurseur de 39 acides aminés, la proendothéline-1, via l'action d'une enzyme membranaire. L'endothéline-1 étant un puissant vasoconstricteur avec propriétés mitogéniques, elle a été indiquée comme un contributeur possible de l'augmentation du tonus de l'artère pulmonaire et de la prolifération des CML-AP observée chez les patients HTAP.

En effet, il a été montré que l'HTAP présente une forte augmentation de l'expression de l'endothéline-1 dans le plasma des patients HTAP, et en particulier dans le plasma artériel systémique, suggérant une production de l'endothéline-1 au niveau des poumons [94]. Cette

hypothèse a été vérifiée et confirmée par Giaid et ses collaborateurs, qui ont démontré une augmentation de l'endothéline-1 dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire [95] (figure 7).

Comme déjà mentionné, les effets contractiles induits par l'endothéline-1 impliquent l'activation de récepteurs à la surface cellulaire couplés à des protéines G spécifiques. Il y a deux types de récepteurs de l'endothéline-1: ET_A et ET_B. Ces récepteurs sont tous deux présents à la membrane plasmique des CML vasculaires, alors que les cellules endothéliales présentent uniquement les récepteurs ET_B. Les récepteurs exprimés au niveau des CML servent d'intermédiaires pour la vasoconstriction. Les récepteurs ET_B localisés sur les cellules endothéliales, quant à eux, stimulent la libération d'oxyde nitrique et des prostacyclines, et participent à l'élimination de l'endothéline-1 circulante, même si cet effet n'a qu'un petit impact sur l'induction de la relaxation de la paroi vasculaire [96].

d) La voie de l'oxyde nitrique

Si l'endothéline-1, qui est un vasoconstricteur, est augmenté chez les patients HTAP, l'oxyde nitrique, puissant vasodilatateur et suppresseur de la prolifération des CML, est au contraire diminué (figure 7). En effet, les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire des patients HTAP présentent des quantités réduites d'oxyde nitrique, ce qui peut être expliqué par les hauts niveaux d'arginase, enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'L-arginine en L-ornithine et urée, dans le sérum et les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire des patients HTAP [97]. En fait, l'L-arginine est un substrat de l'eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*), enzyme essentielle pour la production d'oxyde nitrique [98], dont l'activité et l'expression sont diminuées dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire des patients HTAP [99]. Etant donné que l'oxyde nitrique est un activateur de la guanylate cyclase, il est naturel de supposer que sa diminution engendre une baisse de l'activation de cette enzyme. En effet, il a été démontré que l'activation de la guanylate cyclase inverse les changements hémodynamiques et structuraux dans des modèles animaux d'HTAP [100, 101]. De façon intéressante, dans l'HTAP idiopathique, de même que dans des modèles expérimentaux, la guanylate cyclase est surexprimée par rapport aux sujets contrôles [102]. Cette augmentation pourrait refléter un mécanisme de compensation aux niveaux élevés des guanylate cyclases non-fonctionnelles.

En conséquence de la diminution de l'activité de la guanylate cyclase, les niveaux de GMPc, produit de la réaction de cette enzyme, sont diminués. Le GMPc possède une activité antiproliférative et vasodilatatrice. Il active notamment les protéines kinases G qui, en

déclenchant une cascade de phosphorylation sur diverses protéines cibles, contrôlent l'ouverture des canaux potassiques voltage-dépendants avec l'efflux du K^+ hors de la cellule, entraînant ainsi l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire [103]. Par ailleurs, les protéines kinases G phosphorylent également certaines protéines, comme la phospholamban, qui sont impliquées dans les mouvements de recapture et/ou d'expulsion du Ca^{2+} entre les compartiments intracellulaires et le cytosol [104]. La voie finale commune de ces réactions de phosphorylation dépendantes des protéines kinases G est la diminution de la concentration de Ca^{2+} cytosolique qui constitue le phénomène intracellulaire indispensable à la vasodilatation et à la suppression de la prolifération.

La concentration intracellulaire de GMPc dépend aussi d'une autre famille d'enzymes, celle des phosphodiesterases, dont l'isoforme 5 agit de façon spécifique sur le GMPc en le transformant en GMP [105]. Contrairement au GMPc, le GMP semble dépourvu d'effets sur les protéines contractiles de la cellule musculaire lisse [106]. De façon intéressante, il a été montré que la phosphodiesterase 5 est surexprimée dans l'HTAP [107].

e) La voie de la prostacycline

Un autre puissant vasodilatateur (qui de plus montre des propriétés anti-thrombotiques) est la prostacycline PGI₂ (prostaglandine I₂), qui est produite à partir de l'acide arachidonique dans les cellules endothéliales et agit sur les CML voisines et aussi sur les plaquettes et cellules circulantes. Les patients atteints d'HTAP idiopathique présentent un déséquilibre dans le métabolisme de l'acide arachidonique avec une augmentation du thromboxane A₂ et une diminution de PGI₂ [108] (figure 7). De plus, l'enzyme responsable de la synthèse de PGI₂, la PGI₂ synthase, est moins exprimée dans les artères pulmonaires des patients HTAP par rapport aux patients contrôles [109]. Les effets induits par PGI₂ dépendent de sa liaison aux récepteurs situés à la surface cellulaire ou aux récepteurs PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*) nucléaires. Quand PGI₂ se lie à ses récepteurs en surface, elle provoque l'activation des protéines G qui stimulent l'adénylate cyclase, qui à son tour détermine l'augmentation d'AMPc intracellulaire [110] et, donc, l'inhibition de la kinase de la chaîne légère de la myosine. Par conséquent, le niveau de phosphorylation des chaînes légères de la myosine diminue, ce qui entraîne la relaxation des CML. Quand elle se lie aux récepteurs PPAR, PGI₂ engendre l'activation de l'expression de plusieurs gènes ayant de fonctions antiprolifératives, antithrombotiques et anti inflammatoires [111–113].

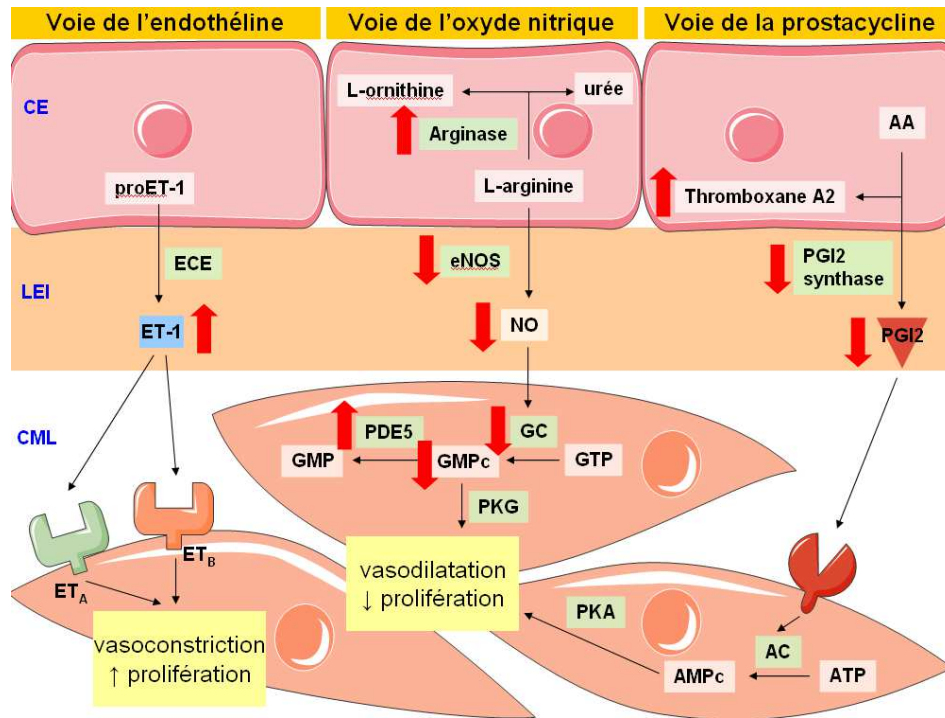


Figure 7 : Représentation schématique des voies de l'endothéline, de l'oxyde nitrique et de la prostacycline.

L'**endothéline** (ET-1) est obtenue suite à l'action de l'enzyme *endothelin converting enzyme* (ECE) sur son précurseur proET-1, produit par les cellules endothéliales (CE). L'endothéline-1, une fois libérée par les CE, lie ses récepteurs spécifiques ET_A et ET_B localisés au niveau de la membrane des cellules musculaires lisses (CML), déclenchant ainsi des voies menant à la vasoconstriction et à la prolifération cellulaire. L'**oxyde nitrique** (NO) est produit par l'enzyme *endothelial NO synthase* (eNOS), dont la L-arginine est un substrat. La L-arginine est convertie en urée et en L-ornithine par l'action de l'enzyme arginase. Le NO libéré par les CE engendre l'activation de la guanylate cyclase (GC) dans les CML, menant ainsi à une augmentation de la concentration de GMPc. Ce dernier active la protéine kinase G (PKG) qui, via la phosphorylation de plusieurs cibles, occasionne la vasodilatation et la diminution de la prolifération cellulaire. Le niveau de GMPc est diminué par l'action de la phosphodiésterase 5 (PDE5), qui le convertit en GMP, molécule n'ayant pas d'effet sur le tonus cellulaire. La **prostacycline** (PGI₂) est produite par la PGI₂ synthase dans les CE, à partir de l'acide arachidonique (AA). Une fois libérée, elle se lie à ses récepteurs spécifiques sur les CML, provoquant ainsi l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et, donc, l'augmentation de l'AMPc. Ce dernier active la protéine kinase A (PKA) qui, comme la PKG, a des effets vasodilatateurs et antiprolifératifs. Les flèches rouges montrent les altérations observées chez les patients atteints d'HTAP.

f) La voie de la sérotonine

Des niveaux élevés de sérotonine et de son transporteur ont été impliqués dans la pathologie de l'HTAP expérimentale et clinique. Pour preuve, des souris déficientes pour le gène du récepteur de la sérotonine sont relativement protégées alors que des souris le surexprimant de façon ubiquitaire ou spécifiquement dans les CML développent une HTAP induite par hypoxie chronique plus sévère [114]. Des patients atteints d'HTAP idiopathique montrent un stockage altéré de la sérotonine par les plaquettes, entraînant une augmentation du taux de sérotonine dans le plasma [115].

La sérotonine se lie à son récepteur, déterminant la génération d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui induit la phosphorylation de p42/44 ERK (*extracellular signal-regulated*

kinase) MAP Kinases [116]. Toutefois, la prolifération induite par la sérotonine nécessite aussi l'activation de la kinase ROCK (*Rho-associated protein kinase*) par les récepteurs 5-HT_{1B/D} [117]. Cela permet la translocation nucléaire d'ERK et l'activation de voies de transcription impliquées dans la favorisation de la prolifération [117, 118]. L'activation de ROCK favorise aussi la vasoconstriction pulmonaire hypoxique [119], ce qui explique les propriétés vasoconstrictrices de la sérotonine [120].

g) La voie de RhoA/Rho kinase (ROCK)

Comme anticipé ci-dessus, la voie RhoA/ROCK joue un rôle important dans la vasoconstriction et le remodelage vasculaire, suite à son activation par différentes molécules en amont, telles que la sérotonine, le PDGF, l'endothéline-1 et l'angiotensine II [121]. RhoA est une petite protéine G qui est active dans sa conformation liant une molécule de GTP. Son activation détermine l'activation de ROCK, qui phosphoryle différents cibles, comme la phosphatase de la chaîne légère de la myosine et/ou la protéine inhibitrice de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine, CPI-17 (*C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor of 17 kDa*) [122]. Dans les deux cas, l'effet est le même, à savoir l'inhibition de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine ayant pour conséquence l'hyper phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et, donc, l'augmentation de la contraction. L'expression de ROCK et l'activité de RhoA sont doublées dans les poumons des patients HTAP par rapport aux poumons des patients contrôles [123]. De plus, des effets bénéfiques de l'inhibition de ROCK ont été observés dans différents modèles animaux d'HTAP [124–128].

h) La voie du peptide intestinal vasoactif

Le peptide intestinal vasoactif est un neuromédiateur ayant un important rôle vasodilatateur dans la circulation pulmonaire et inhibiteur de la prolifération des CML-AP. Les patients HTAP montrent une déficience de ce peptide dans les sérum et tissus pulmonaires, et l'inhalation du peptide a un effet thérapeutique bénéfique sur ces patients [129]. De plus, des souris males déficientes pour le gène du peptide intestinal vasoactif développent spontanément une HTAP modérément sévère, qui est atténuée par l'administration de ce peptide [130].

i) L'inflammation chronique et l'auto-immunité

L'**inflammation** semble jouer un rôle important dans l'HTAP, comme indiqué par la prévalence relativement élevée d'HTAP dans des maladies du tissu conjonctif, comme par exemple la sclérose systémique, et dans des conditions inflammatoires comme l'infection du VIH [131].

Il a été montré que des cytokines et chémokines pro-inflammatoires, ainsi que des facteurs de croissance et des cellules inflammatoires, sont présents dans les infiltrats cellulaires inflammatoires retrouvés dans la plupart de formes d'HTAP, suggérant leur implication dans la pathogenèse de cette maladie [132, 133].

En particulier, une augmentation des concentrations des interleukines 1 et 6 a été observée dans le sérum et les tissus pulmonaires des patients atteints d'HTAP idiopathique et HTAP associée à la sclérose systémique [134]. De façon intéressante, des modèles animaux d'HTAP sont aussi associés à une surexpression de l'interleukine 6 [135, 136].

Les chémokines semblent aussi participer au développement de l'HTAP : la fractalkine, par exemple, surexprimée par les cellules endothéliales et détectée à hauts niveaux dans le sérum des patients d'HTAP sévère [133], agit en tant que facteur de croissance pour les CML *in vitro* [137].

Plusieurs facteurs de croissance ont été impliqués dans la pathogenèse de l'HTAP, tels que PDGF et EGF (*epidermal growth factor*) [132]. PDGF est relargué par les CML vasculaires, les cellules endothéliales, et les macrophages [138], et est impliqué dans le remodelage vasculaire qui amène à l'HTAP, puisqu'il facilite la prolifération et la migration des CML et des fibroblastes [139]. La surexpression de PDGF et de ces récepteurs a été détectée chez des patients avec une HTAP sévère, principalement dans les cellules endothéliales et certaines cellules inflammatoires périvasculaires [140]. L'implication d'EGF dans la modulation de la prolifération cellulaire et le remodelage vasculaire a aussi été démontrée [141].

Enfin, des infiltrats de cellules inflammatoires, composés de lymphocytes T et B, macrophages, mastocytes et cellules dendritiques sont présents autour des artères pulmonaires remodelées des patients atteints d'HTAP [142].

Le lien entre **auto-immunité** et HTAP, soupçonné de longue date [143], a été renforcé récemment grâce à la détection d'auto-anticorps dans le sérum de patients atteints d'HTAP idiopathique ou HTAP associée à la sclérose systémique. Les auto-anticorps identifiés comprenaient les anticorps anti-cellules endothéliales [144, 145] et anti-fibroblastes [146]. Les anticorps anti-cellules endothéliales semblent pouvoir jouer un rôle dans la pathogenèse de l'HTAP, étant donné que ces anticorps, qui sont associés à une incidence majeure d'HTAP chez les patients atteints de sclérose systémique [147], activent les cellules endothéliales *in*

vitro, induisant l'expression de molécules d'adhésion [148] et l'apoptose des cellules endothéliales [149].

l) Drogues et toxines

Diverses substances ont été associées au développement de l'HTAP. L'aminorex et les dérivés de la fenfluramine, par exemple, ont donné lieu à des épidémies d'HTAP dans les années 70 et 90 respectivement, durant les périodes de commercialisation de ces anorexigènes [150, 151].

Plus récemment, un ester du benzoate qui présente des caractéristiques structurales et pharmacologique similaires à celles de la fenfluramine, le benfluorex, a été associé au développement de l'HTAP [152].

Aux substances anorexigènes s'ajoutent d'autres classes. Par exemple, le dasatinib, un inhibiteur des tyrosines kinases utilisé dans le traitement de patients atteints de leucémie myéloïde chronique, a été signalé pour sa capacité à augmenter le risque d'HTAP [153]. Les interférons de type 1, glycoprotéines de la famille de cytokines produites en présence d'une double hélice d'ADN étranger, ont aussi suscité de l'intérêt pour leur étroite association avec l'HTAP [153, 154].

Enfin, l'abus de composés comme la cocaïne et l'amphétamine a aussi été associé à l'HTAP [155].

m) Genre et métabolisme des œstrogènes

L'œstradiol 17β , qui est l'œstrogène circulant le plus abondant, augmente la prolifération de CML-AP, et une synthèse ou un métabolisme anormaux de cet œstrogène ont été associés au développement de l'HTAP [156–158]. Une expression réduite de BMPR2 à partir de l'allèle normal peut distinguer, entre les membres familiaux qui portent une mutation sur le gène de BMPR2, ceux qui sont atteints d'HTAP de ceux qui ne le sont pas [159], et cela semble être dépendant des œstrogènes [160].

n) Métabolisme cellulaire

Des études récentes ont montré que les cellules vasculaires pulmonaires dérivées de patients HTAP présentent, de façon similaire aux cellules cancéreuses, un remodelage métabolique, avec une sous-régulation de l'oxydation phosphorylante mitochondriale (qui sera décrite dans le deuxième chapitre de l'introduction) et une augmentation de la glycolyse même en

normoxie [23, 161–164], modulations métaboliques définies comme l’effet de Warburg. Les cellules vasculaires pulmonaires dérivant de patients HTAP, tout comme les cellules cancéreuses, sont caractérisées par une réduction de l’activité du complexe enzymatique mitochondrial pyruvate déshydrogénase [165, 166] et de la production d’H₂O₂ [92]. Dans les deux types cellulaires, ce remodelage métabolique, qui en conditions physiologiques a lieu en réponse à l’hypoxie permettant la vasoconstriction pulmonaire hypoxique [3], crée un environnement pseudohypoxique avec l’activation en normoxie de HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor-1 α*) et, par conséquent, une prédominance de la glycolyse [176, 177]. En effet, ce facteur de transcription stabilisé en hypoxie active de nombreux gènes, tels que les enzymes glycolytiques, pour favoriser la survie dans des conditions où les niveaux d’O₂ sont faibles. Ce remodelage métabolique inhibe l’expression des canaux potassiques dépendants du voltage K_v1.5, menant à la dépolarisation de la membrane cellulaire et à l’augmentation des concentrations de K⁺ et Ca²⁺ cytosoliques [43]. Cela conduit les cellules vasculaires de patients HTAP et les cellules cancéreuses à un phénotype hyperprolifératif et résistant à l’apoptose.

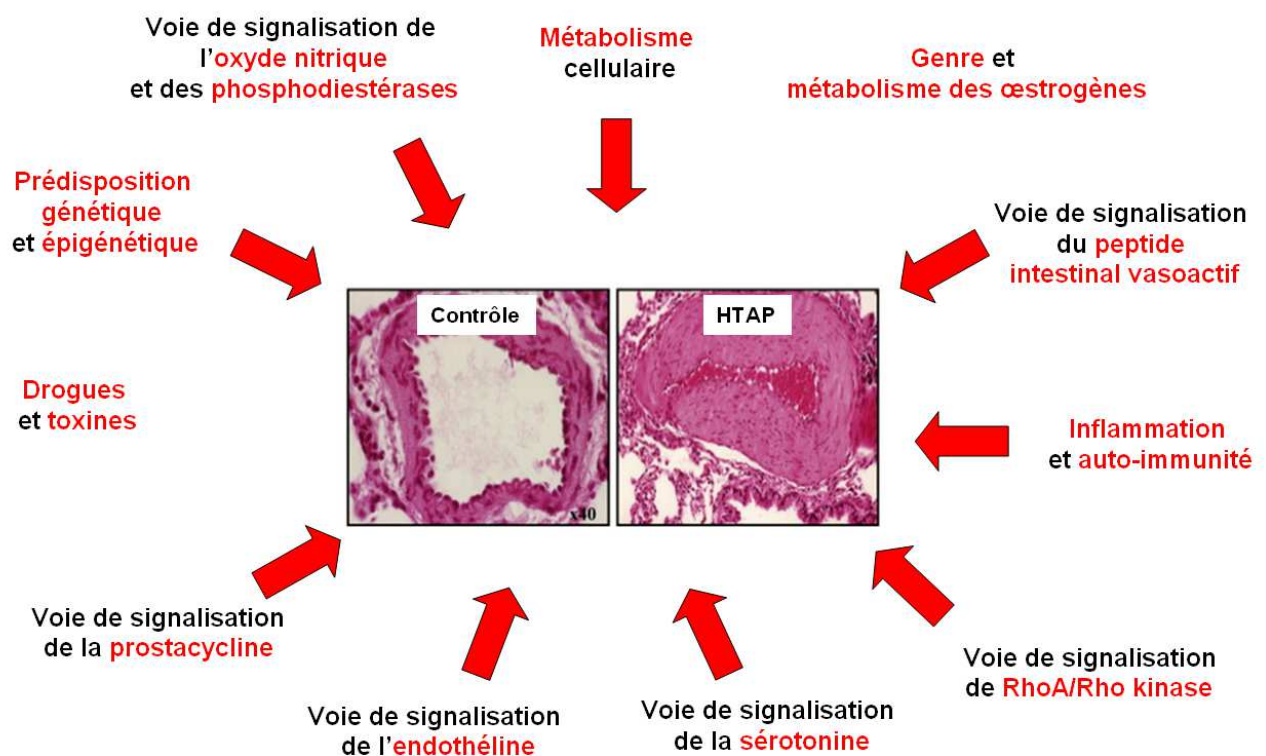


Figure 8 : Schéma des voies de signalisation altérées dans l’HTAP.

L’HTAP est une pathologie très complexe dont le développement peut être influencé par un large éventail de facteurs. Des altérations dans les voies de signalisation illustrées dans cette figure ont été mises en évidence dans cette maladie. Toutes participent à divers degrés au remodelage vasculaire qui est la signature de l’HTAP.

5. Traitements

Avant le développement des récentes options thérapeutiques, l'HTAP idiopathique avait une évolution rapide et conduisait brièvement à l'insuffisance cardiaque droite et à la mort. Durant les dernières 20 années, de nouveaux traitements ont permis de prolonger la vie des patients atteints d'HTAP, ainsi que d'en améliorer la qualité. Cependant, aucun traitement est réellement capable de complètement soigner cette maladie [85, 169].

Les traitements actuellement disponibles peuvent être distingués selon qu'ils sont spécifiques et non spécifiques. Les **traitements non spécifiques** incluent les diurétiques, les anticoagulants oraux et les bloqueurs des canaux calciques. Les diurétiques réduisent les signes de la surcharge et améliorent la symptomatologie, les anticoagulants oraux (warfarine) permettent de diminuer la mortalité des patients souffrant d'HTAP, probablement en réduisant les phénomènes de thrombose *in situ*, et les bloqueurs des canaux calciques (diltiazem, nifédipine, amlodipine), pour leur part, aident à élargir ou à dilater les artères rétrécies des personnes atteintes d'HTAP de manière à faciliter la circulation du sang et à réduire l'effort fourni par le cœur [170].

Les **traitements spécifiques** ciblent la voie de l'endothéline, de l'oxyde nitrique, et des prostacyclines [169].

Les traitements qui visent la voie de l'endothéline incluent le bosentan, l'ambrisentan et le macitentan qui sont tous des antagonistes du récepteur de l'endothéline.

Parmi les traitements ciblant la voie de l'oxyde nitrique, le sildenafil, le tadalafil et le vardenafil, qui sont des inhibiteurs de la phosphodiesterase 5, ainsi que le riociguat, activateur de la guanylate cyclase, peuvent être cités.

Les traitements ciblant la voie des prostacyclines comprennent l'époprosténol (une prostacycline injectée en continu par voie intraveineuse), le treprostinil, le beraprost et l'iloprost (des analogues des prostacyclines), et enfin le selexipag (un agoniste du récepteur de la prostacycline dont l'autorisation de la mise sur le marché est à l'étude).

Si les médicaments ne permettent pas de contrôler l'HTAP, la chirurgie à cœur ouvert peut être une option. En atrioseptostomie, une ouverture est réalisée entre les chambres gauche et droite du cœur afin de diminuer les pressions droites pour améliorer le débit cardiaque [171]. Cependant, l'atrioseptostomie peut avoir des complications graves, y compris des troubles du rythme cardiaque (arythmies). Ensuite, la transplantation bipulmonaire ou cardio-pulmonaire représente l'ultime recours en cas d'HTAP sévère qui n'est pas améliorée par un traitement médicamenteux maximal [172].

6. Modèles expérimentaux

a) Modèles in vivo

Les modèles animaux principalement utilisés pour l'étude de l'étiologie de l'HTAP sont les modèles d'hypoxie chronique et de lésion induite par la monocrotaline.

L'**hypoxie chronique** en condition normo- et hypobare est fréquemment utilisée pour induire l'HTAP chez plusieurs espèces animales ; les effets sont très reproductibles au sein d'une espèce, alors qu'il y a beaucoup de variabilité de réponse entre les différentes espèces. La réponse diffère aussi selon l'âge, les individus plus jeunes étant plus susceptibles au stimulus [173].

Les espèces les plus utilisées sont le rat et la souris ; de toute façon, chez tous les mammifères jusqu'à maintenant étudiés, l'hypoxie chronique provoque des changements très similaires dans la structure des vaisseaux. En effet, une muscularisation des petites artères non musculaires au niveau de la paroi alvéolaire apparaît rapidement.

Par la suite, un épaississement de la paroi des artères pulmonaires précapillaires est observé. Cela est dû à l'hyperprolifération des CML-AP et à leur hypertrophie. L'inflammation aussi joue un rôle important dans ce modèle : l'apparition de certains récepteurs chémokine-chémokine précède celle de cellules inflammatoires, surtout mononucléaires. De plus, des infiltrats inflammatoires et la présence de cytokines et de molécules d'adhésion dans la paroi vasculaire sont observés. Les infiltrats cellulaires contiennent des précurseurs des cellules mésenchymateuses qui semblent jouer un rôle clé dans le remodelage, étant donné que leur élimination le prévient [174].

De plus, un épaississement significatif et une fibrose des artères pulmonaires proximales ont été documentés, en plus de leur raidissement [175].

Après deux semaines d'hypoxie chronique, les rats développent une légère HTAP avec un doublement de la pression artérielle pulmonaire ; même si une hypertrophie du ventricule droit est observée, une insuffisance cardiaque droite n'a pas été signalée [173].

La **lésion due à la monocrotaline** est un autre modèle, très utilisé, pour induire l'HTAP chez l'animale. La monocrotaline est un alcaloïde pyrrolizidinique toxique présent dans la plante *Crotalaria spectabilis*. Cette substance doit être activée *in vivo* par différentes oxydases au niveau du foie pour former l'agent de réticulation monocrotaline pyrrole, qui cause la lésion vasculaire [173].

Une injection unique de monocrotaline sous-cutanée ou intra péritonéale est suffisante pour induire la maladie, ce qui rend ce modèle très attractif pour sa simplicité. Cependant, la

réponse à la monocrotaline varie beaucoup selon les espèces, et même selon les individus, en raison de différences de métabolisme hépatique par le cytochrome P-450. Tout de même, l'espèce la plus utilisée pour ce type de modèle d'HTAP est le rat.

Bien que le mécanisme exacte d'action de la monocrotaline soit inconnu, une partie de la communauté scientifique croit qu'elle détermine une lésion endothéliale, qui entraîne progressivement un développement de la maladie vers une HTAP sévère et, finalement, létale [176].

Un autre modèle d'HTAP, très largement utilisé actuellement, est l'**hypoxie chronique associée au Sugén 5416**. Ce composé inhibe le récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, très important pour le maintien et la différenciation des cellules endothéliales. Le Sugén 5416 provoque une HTP modérée et un remodelage vasculaire pulmonaire chez des rats en normoxie, mais une HTP sévère, associée à une prolifération endothéliale dans les artères pulmonaires précapillaires chez des rats en hypoxie chronique [177]. Les animaux injectés avec Sugén 5416 présentent aussi une augmentation de la prolifération des CML [177], suggérant que cette dernière peut être régulée par les récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire des cellules endothéliales.

L'hypoxie chronique associée au blocage du récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire provoque une HTP sévère, qui persiste et progresse même après que les animaux ont été enlevés du stimulus hypoxique [177]. La persistance et la progression de la maladie pulmonaire vasculaire et l'insuffisance cardiaque droite associée à la mort de certains animaux seulement est similaire à la progression inexorable de l'HTP humaine.

Au niveau moléculaire, l'injection de Sugén 5416 associée à l'hypoxie chronique pendant 2 semaines induit une forte augmentation de l'expression des ARNm de molécules pro-survie, telles que Bcl-2 et Bcl-xL (*B cell lymphoma-extra large protein*) [177].

b) Modèles in vitro

Les cultures cellulaires d'artère pulmonaire sont utiles aux études s'intéressant aux voies de signalisation, spécifiques ou croisées. Davantage de données expérimentales animales et humaines restent nécessaires afin de préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse de l'HTAP.

Les CML-AP humaines peuvent être cultivées *in vitro* pour étudier les effets d'agents mitogènes et de thérapies à potentiel antiprolifératif [107, 178]. Notamment, les CML isolées à partir d'artère pulmonaire de patients HTAP présentent un phénotype prolifératif, avec des réponses anormales à différents agents, tels que les BMP et TGF- β [87, 179]. Eddahibi et ses

collaborateurs [180] ont montré que ce phénotype prolifératif des CML s'accroît en présence de surnageant de culture de cellules endothéliales également isolées à partir d'artère pulmonaire de patients HTAP [180], et que les médiateurs de ce dialogue croisé sont le facteur de croissance angiopoïétine-1 du muscle lisse, et la sérotonine et l'endothéline-1 endothéliales, libérées par l'action de l'angiopoïétine-1 sur son récepteur [180, 181]. Un phénotype prolifératif a été démontré aussi pour les fibroblastes adventitiels de l'artère pulmonaire de rongeurs hypoxiques. Ces fibroblastes prolifèrent davantage *in vitro* que des fibroblastes contrôlés provenant d'artère pulmonaire d'animaux normoxiques, ou d'artères systémiques [182]. Cette observation paraît liée à une anomalie de la signalisation de la sérotonine [183].

Chapitre II : Les mitochondries

A. La structure des mitochondries

Selon l'hypothèse de l'endosymbiose, les mitochondries sont des organites dérivant d'une symbiose primitive d'eubactéries aérobies avec des eucaryotes primordiaux anaérobies ; cet événement coïncide probablement avec l'origine des cellules eucaryotes [184].

Ainsi, les mitochondries possèdent leur propre système génétique, qui présente des caractéristiques généralement rencontrées chez les procaryotes, telles qu'un génome circulaire compact, des transcrits multigéniques ou encore une sensibilité de l'appareil traductionnel aux antibiotiques comparable à celle des bactéries.

L'ADN mitochondrial ne porte que 37 gènes codant pour 13 protéines des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, dont l'importance sera discutée ci-dessous, ainsi que 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiaux nécessaires pour la traduction de ces entités. En effet, la plupart des gènes des bactéries procaryotes originelles ont été transférés vers le génome nucléaire durant l'évolution [185, 186].

La théorie de l'endosymbiose repose également sur le fait que la mitochondrie possède une double membrane, qui définit deux compartiments distincts: l'espace intermembranaire et la matrice.

La membrane mitochondriale externe sépare les mitochondries du cytoplasme, et la membrane mitochondriale interne délimite la matrice de l'espace intermembranaire. La membrane mitochondriale externe est relativement perméable, en raison de la présence de canaux anioniques dépendants de voltage, VDACs (*Voltage-Gated Anion Channels*), qui permettent le mouvement d'ions, de métabolites et de petites molécules entre le cytoplasme et

les mitochondries. La membrane mitochondriale interne est au contraire fortement imperméable et constitue ainsi un très bon isolant électrique. D'une surface bien plus importante que la membrane mitochondriale externe, elle présente de nombreuses invaginations, appelées crêtes, qui délimitent les jonctions des crêtes, un compartiment additionnel qui communique avec l'espace intermembranaire à travers des goulots d'étranglement (figure 9).

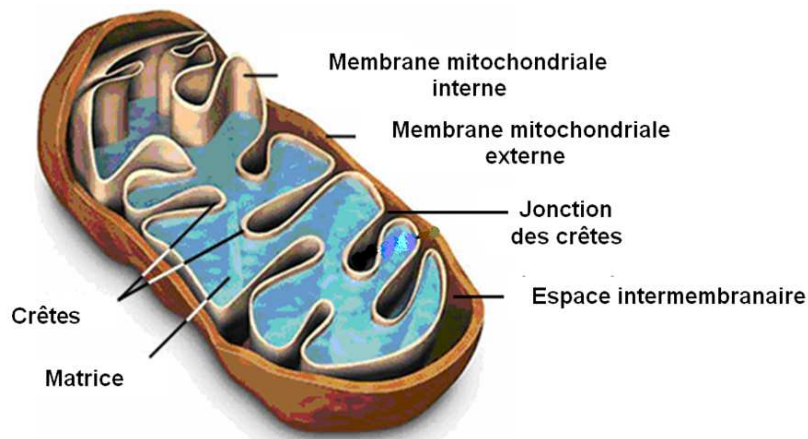


Figure 9 : Représentation schématique de la compartimentation mitochondriale.

La mitochondrie présente un système à double membrane qui définit deux compartiments bien distincts : l'espace intermembranaire et la matrice. La membrane mitochondriale externe sépare la mitochondrie du cytoplasme, alors que la membrane mitochondriale interne sépare l'espace intermembranaire de la matrice. La membrane mitochondriale interne, à la différence de la membrane mitochondriale externe, est hautement imperméable et présente de nombreuses invaginations, appelées crêtes, qui délimitent un troisième compartiment, les jonctions des crêtes, qui communique avec l'espace intermembranaire via des goulots d'étranglement. Adaptée de <http://micro.magnet.fsu.edu/celluleules/mitochondria/mitochondria.html>

B. La physiologie mitochondriale

Les mitochondries jouent un rôle critique dans la vie et la mort des cellules eucaryotes puisqu'elles sont entre autres directement impliquées dans la production d'énergie, dans l'équilibre réduction-oxydation, dans l'homéostasie de Ca^{2+} , dans l'apoptose.

1. Fonctions énergétiques des mitochondries

En ce qui concerne la production d'ATP, les mitochondries utilisent principalement les deux sources de substrats que sont les carbohydrates et les acides gras. Les carbohydrates (glucose, glycogène ou lactate) sont transformés, dans le cytosol, en pyruvate qui peut être transporté à travers la membrane mitochondriale interne pour accéder à la matrice. Les acides gras cytosoliques, pour leur part, dérivent soit des acides gras circulants, soit des triglycérides. Pour être oxydés, les acides gras à longue chaîne (ayant un nombre de carbones supérieur à 10) doivent préalablement être activés, c'est-à-dire qu'ils sont transformés en acyl-coenzyme

A (acyl-CoA). Ces substances formées au niveau de la membrane mitochondriale externe ne traversent pas directement la membrane mitochondriale interne. Pour ce faire, le groupe acyl est lié de façon transitoire à la L-carnitine par l'enzyme carnitine palmitoyltransférase 1, et l'acyl-carnitine, ainsi formé, est transporté à travers la membrane mitochondriale interne via la carnitine-acylcarnitine translocase. L'acyl-CoA est ensuite régénéré grâce à l'action de la carnitine palmitoyltransférase 2, puis libéré dans la matrice. Les acides gras à courte chaîne peuvent en revanche être directement transportés dans la matrice mitochondriale pour y être activés. Le pyruvate et les acyl-CoA ayant pénétré la matrice sont ensuite transformés en acétyl coenzyme A (acétyl-CoA), intermédiaire métabolique crucial, sous l'action d'enzymes matricielles. Le pyruvate est ainsi converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase, alors que les acyl-CoA mènent à la génération d'acétyl-CoA à travers une série de réactions nommée β oxydation des acides gras. Les groupements acétyl de l'acétyl-CoA sont alors oxydés dans la matrice via le cycle de l'acide citrique (appelé aussi cycle de Krebs), qui génère des électrons à haute énergie et convertit les atomes de carbone de l'acétyl-CoA en CO_2 , relargué ensuite par la cellule en tant que déchet métabolique. Ces électrons sont transférés à la chaîne respiratoire par les équivalents réduits que sont le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et la flavine adénine dinucléotide (FADH_2), qui sont respectivement oxydés en NAD^+ et FAD (figure 10).

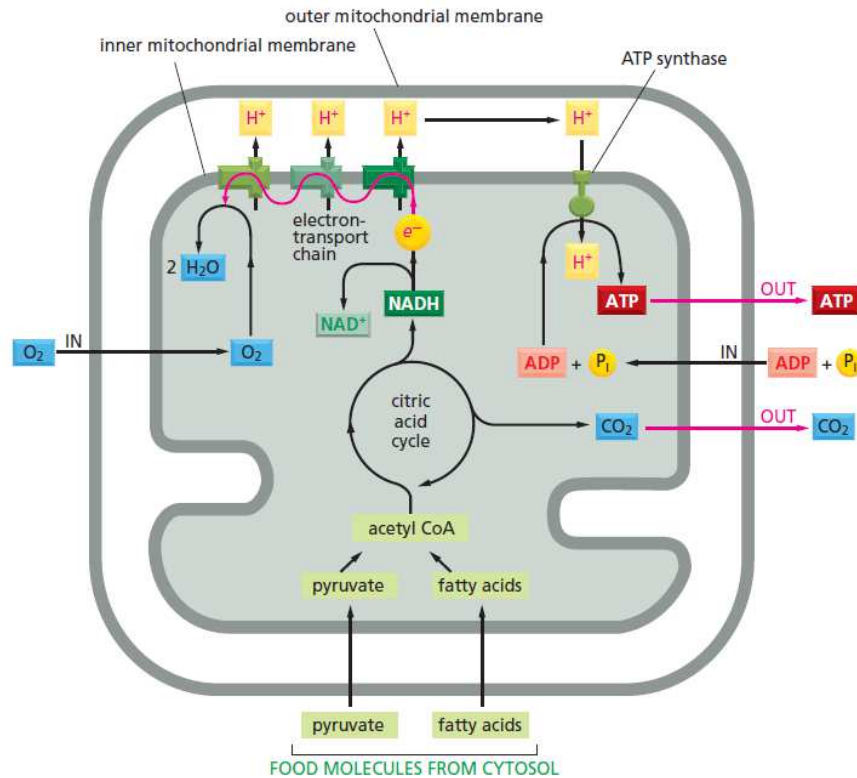


Figure 10 : Schéma des mécanismes mitochondriaux pour la production d'énergie.

Le pyruvate et les acides gras entrent dans la mitochondrie, sont convertis en acétyl-CoA puis métabolisés par le cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs), qui réduit le NAD^+ en NADH (et le FAD en FADH_2 , non représentés sur la figure). Durant l'oxydation phosphorylante, les électrons à haute énergie sont transférés du NADH (et FADH_2) à travers la chaîne respiratoire jusqu'à l' O_2 . Ce transport d'électrons forme un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne, qui permet la production d'ATP par l'ATP synthase.

De <http://www.ju.edu.jo/sites/Academic/tamimi/Material/photo%20et%20res.pdf>.

Située au niveau de la membrane mitochondriale interne, la chaîne respiratoire est constituée de 4 complexes (complexes I à IV). Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) catalyse le transfert de deux électrons du NADH au Coenzyme Q. Le Coenzyme Q peut aussi être réduit par le succinate à travers une réaction catalysée par le complexe II (succinate déshydrogénase). Le complexe III (ubiquinone-cytochrome réductase) permet le transfert des électrons du Coenzyme Q réduit au cytochrome *c*. Le complexe IV (cytochrome *c* oxydase) est enfin responsable de l'étape finale de la chaîne de transport d'électrons qui consiste au transfert de 4 électrons du cytochrome *c* à l' O_2 , en le réduisant pour conduire à la production d'eau (H_2O).

Ce passage d'électrons du NADH et du FADH_2 à l' O_2 dégage de l'énergie qui est utilisée par les complexes I, III et IV pour pomper des protons à travers la membrane mitochondriale interne. Étant donné que cette dernière est hautement imperméable, un gradient de protons est établi. Ce dernier permet la synthèse d'ATP par un cinquième complexe, l'ATP synthase, également enchâssée dans la membrane mitochondriale interne : les protons circulent le long de leur gradient électrochimique à travers ce complexe, qui catalyse alors la synthèse d'ATP

énergie-dépendante à partir de l'adénosine di phosphate (ADP) et du phosphate inorganique (figure 11).

Le gradient protonique généré à travers la membrane mitochondriale interne permet ainsi d'utiliser l'énergie des électrons du NADH (ou du FADH₂) pour créer la liaison à haute-énergie de phosphate de l'ATP. Ce mécanisme chimiosmotique de synthèse d'ATP, proposé par P. Mitchell en 1961 [187], est appelé oxydation phosphorylante, car il implique le couplage entre la consommation d'O₂ et l'addition d'un groupement phosphate à l'ADP pour former l'ATP.

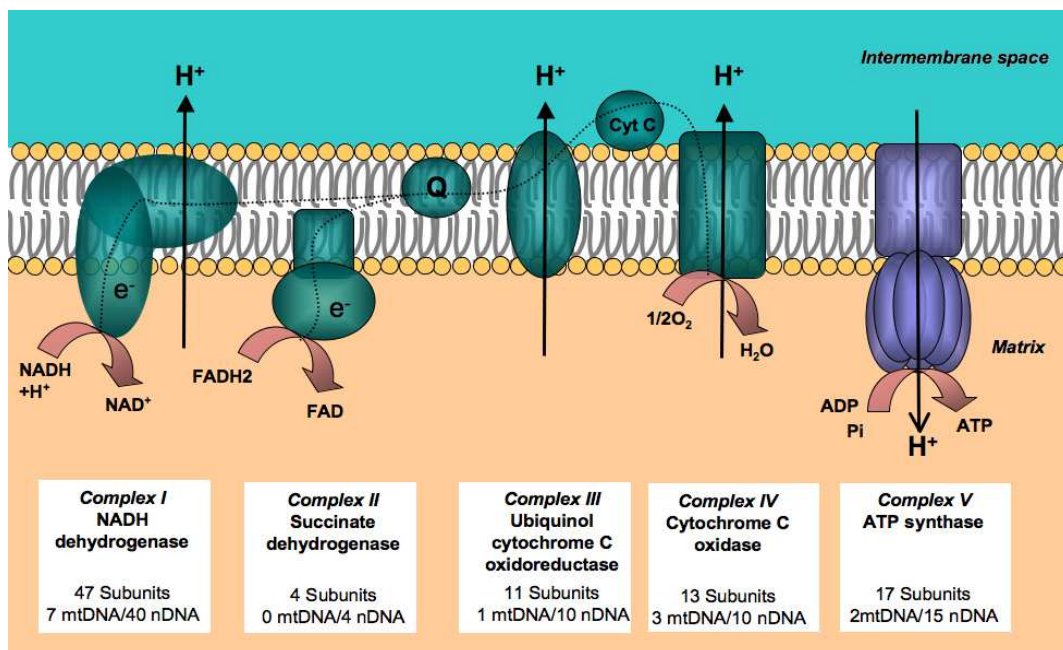


Figure 11 : Représentation simplifiée de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les électrons dérivant du NADH et FADH₂ sont transférés à travers les complexes de la chaîne respiratoire (complexes I-IV), pour réduire l'oxygène moléculaire en eau. L'énergie libérée par ce transfert est exploitée pour générer un gradient électrochimique de protons à travers la membrane mitochondriale interne. Les protons circulent le long de leur gradient électrochimique à travers le complexe V, qui catalyse alors la synthèse d'ATP à partir de l'adénosine di phosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi). La composition en sous-unités de différents complexes est spécifiée dans les cadres situés dans la partie inférieure de la figure.

De <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/fulltext.asp?bframe=figures.htm&doi=yes>

L'autre processus cellulaire permettant la production d'ATP est la glycolyse qui, elle, a lieu dans le cytoplasme. Ce processus convertit le glucose en pyruvate via l'intervention successive de différentes enzymes. Ceci mène à la génération de 2 molécules d'ATP seulement par molécule de glucose ce qui paraît bien maigre au regard du rendement que les mitochondries affichent. Dans ces organites, le métabolisme du sucre est complet, et l'énergie dégagée est si efficacement exploitée qu'environ 30 molécules d'ATP sont produites pour chaque molécule de glucose oxydé.

La β oxydation des acides gras, qui se déroule dans la matrice mitochondriale, produit aussi une quantité importante de NADH et de FADH₂, permettent la production de nombreuses molécules d'ATP via l'oxydation phosphorylante.

2. L'équilibre d'oxydoréduction

Le maintien à l'équilibre de la balance réduction-oxydation est une fonction mitochondriale très importante, étant donné qu'elle détermine la concentration cellulaire des espèces réactives de l'oxygène via la régulation de deux processus opposés, à savoir la production d'espèces réactives de l'oxygène et la défense antioxydante. Les mitochondries, avec le complexe enzymatique membranaire nicotinamide dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et de l'oxydoréductase xanthine oxydase, représentent la principale source d'espèces réactives de l'oxygène ; d'un autre côté, elles contiennent des enzymes antioxydantes qui protègent la mitochondrie contre une concentration trop élevée d'espèces réactives de l'oxygène, qui conduit à un stress oxydant.

Dans les mitochondries, les espèces réactives de l'oxygène sont produites durant l'oxydation phosphorylante : quand les électrons passent à travers la chaîne respiratoire, ils peuvent réduire l'O₂ prématurément et de façon incomplète pour former l'ion superoxyde O₂⁻ au niveau de sites précis dans les complexes I, II, et III. Alors que les complexes I et II produisent O₂⁻ seulement dans la matrice, le complexe III peut le libérer des deux côtés de la membrane mitochondriale interne. Puisque l'O₂⁻ ne peut pas traverser librement les membranes, cette production dans l'espace intermembranaire facilite son accès au cytosol [188]. Cependant, il a récemment été démontré que l'O₂⁻ peut passer dans le cytosol aussi en passant par VDAC [189].

Une fois formé, l'O₂⁻ peut être réduit en H₂O₂ par l'action des superoxyde dismutases SOD présentes dans les mitochondries (SOD2) et également dans le cytosol (SOD1). L'H₂O₂ est une molécule plus stable et, par conséquent, moins réactive que l'O₂⁻; cependant, en présence de fer, elle peut être à l'origine de la production, via la réaction de Fenton, du radical hydroxyle (HO[•]), une espèce extrêmement réactive. Ainsi, une deuxième défense visant à empêcher une accumulation d'H₂O₂ est constituée des catalases, des glutathion peroxydases et des peroxyrédoxines, enzymes qui le réduisent en eau (H₂O). Les catalases catalysent notamment la conversion d'H₂O₂ en O₂ et H₂O, alors que les glutathion peroxydases et les peroxyrédoxines permettent la réduction d'H₂O₂ pour générer deux molécules d'H₂O, via l'oxydation de deux molécules de glutathion monomérique et de la peroxyrédoxine réduite,

respectivement. Les glutathion réductases complètent le cycle des glutathion peroxydases, catalysant la régénération de glutathion monomérique du glutathion disulfure via l'oxydation de NADPH. Pour ce qui concerne les peroxyrédoxines, leur forme réduite est régénérée via l'oxydation de la thiorédoxine, qui a son tour est réduite via l'oxydation de NADPH par les thiorédoxine réductases (figure 12).

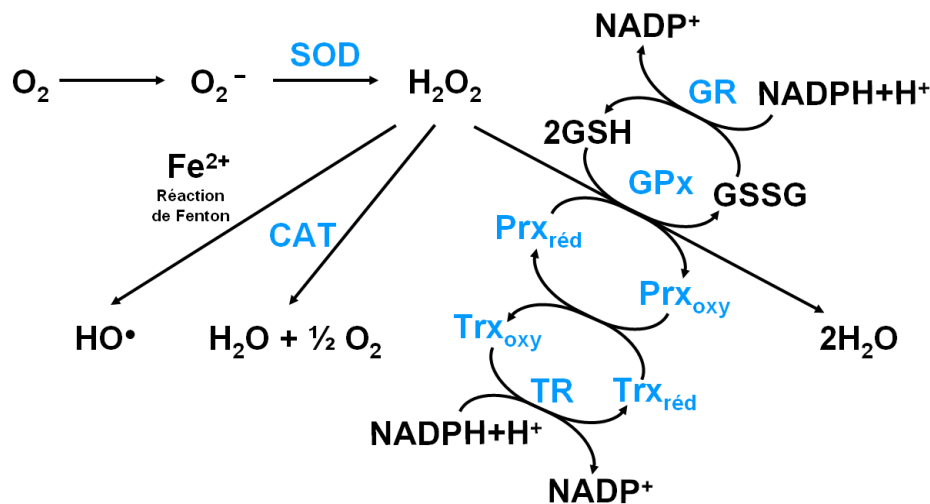


Figure 12 : Les principales réactions qui mènent à la génération des espèces réactives de l'oxygène.

Le dioxygène (O_2) peut être prématurément réduit au niveau de la chaîne respiratoire, menant à la formation de l'ion superoxyde (O_2^-), espèce très réactive. Les superoxyde dismutases (SOD) permettent sa conversion en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), espèce moins réactive ; néanmoins, en présence de fer (Fe^{2+}), elle peut être à l'origine, via la réaction de Fenton, de la formation du radical hydroxyle (HO^\bullet) qui est extrêmement réactif. Ainsi, les catalases (CAT) permettent la conversion d' H_2O_2 en eau (H_2O) et en O_2 , et les glutathion peroxydases (GPx) et les peroxyrédoxines (Prx) le convertissent en deux molécules d' H_2O via l'oxydation de deux molécules de glutathion monomérique (GSH) et de la Prx réduite ($Prx_{\text{réd}}$), respectivement. Ensuite, la régénération de GSH à partir du glutathion disulfure (GSSH) est assurée par les glutathion réductases (GR), alors que la forme réduite de la Prx est obtenue suite à l'oxydation de la thiorédoxine réduite ($Trx_{\text{réd}}$). Cette dernière est enfin régénérée grâce à l'action de la thiorédoxine réductase (TR).

Historiquement, les espèces réactives de l'oxygène étaient considérées comme des déchets métaboliques menant à des modifications non-spécifiques délétères des lipides, des protéines, et des acides nucléiques. Des études plus récentes montrent, au contraire, que les espèces réactives de l'oxygène sont d'importants intermédiaires de voies de signalisation cellulaires. Selon la théorie de la signalisation cellulaire par la balance réduction-oxydation [190], des dommages non-spécifiques et irréversibles des composants cellulaires ne se vérifient que dans le cas de niveaux très élevés d'espèces réactives de l'oxygène dans la cellule. En revanche, de faibles quantités d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales activent de multiples voies impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, une augmentation dans la production d'espèces réactives de l'oxygène peut activer des

programmes adaptifs tels que la surexpression transcriptionnelle de gènes antioxydants, et une augmentation encore plus importante peut déclencher la sénescence et l'apoptose.

Il a été montré que les espèces réactives de l'oxygène régulent ces processus cellulaires à travers l'activation de cibles spécifiques, comprenant les tyrosine phosphatases, les tyrosine kinases, des facteurs de transcription, des canaux ioniques et des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases [188, 190].

3. L'homéostasie du Ca^{2+}

En conditions physiologiques, les mitochondries participent à l'homéostasie calcique via l'activité de canaux et de transporteurs localisés dans la membrane mitochondriale interne et la membrane mitochondriale externe, de même que par leur interaction avec le réticulum sarco/endoplasmique (figure 13). Par exemple, dans les CML, l'ouverture des récepteurs de l'inositol triphosphate déclenchée par l'inositol triphosphate engendre la libération du Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarco/endoplasmique ; le canal mitochondrial VDAC contrôle alors la diffusion de Ca^{2+} à travers la membrane mitochondriale externe et facilite son accumulation dans l'espace intermembranaire. Le Ca^{2+} peut ensuite être transporté dans la matrice via un uniport électrogénique (*mitochondrial calcium uniporter*, MCU), en suivant son gradient électrochimique stabilisé par l'action de la chaîne respiratoire. Quand la concentration de Ca^{2+} cytosolique revient à des valeurs plus basses, le Ca^{2+} est expulsé des mitochondries via l'action d'échangeurs mitochondriaux et la SERCA2b permet sa réaccumulation dans le réticulum sarco/endoplasmique.

Le pore de transition de perméabilité mitochondrial, qui est un megacanal perméable aux solutés d'une masse moléculaire inférieure à 1500 Da, joue différents rôles dans l'homéostasie du Ca^{2+} , son ouverture brève permettant une sortie rapide de Ca^{2+} vers le cytosol, alors que son ouverture prolongée mène au processus de la mort cellulaire [191].

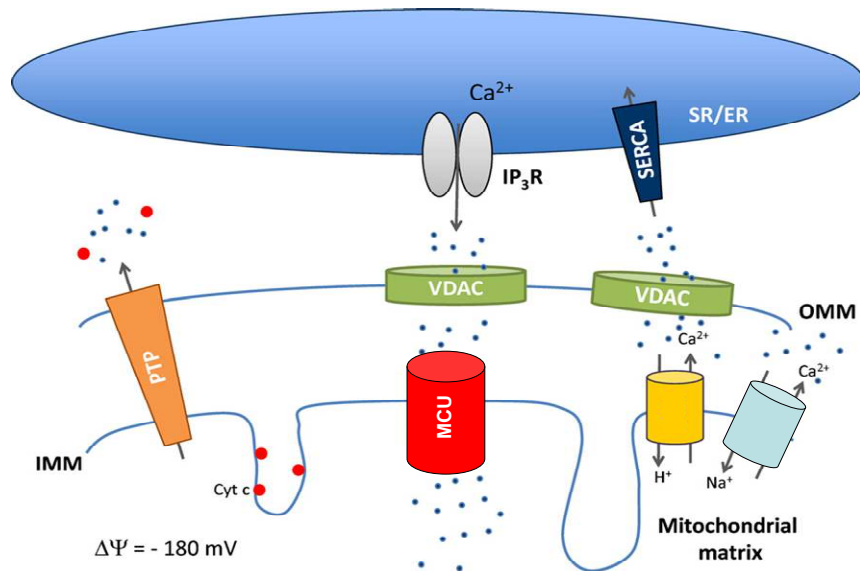


Figure 13 : Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie du Ca²⁺

La signalisation mitochondriale du Ca²⁺ dépend des canaux et des transporteurs des membranes mitochondriales externe et interne et de l'interaction entre le réticulum sarco/endoplasmique et la mitochondrie. L'ouverture des récepteurs de l'inositol triphosphate (IP₃R) cause la libération de Ca²⁺ par le réticulum sarco/endoplasmique (RS/RE). Le canal VDAC (*voltage dependent anion channel*) contrôle la diffusion de Ca²⁺ à travers la membrane mitochondriale externe, facilitant ainsi l'accumulation de Ca²⁺ dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Ensuite, les mitochondries accumulent le Ca²⁺ dans la matrice via un uniport de Ca²⁺ électrogénique (MCU), localisé dans la membrane mitochondriale interne, selon le gradient électrochimique généré par la chaîne respiratoire. Quand la cellule revient aux conditions physiologiques, les échangeurs Na⁺/Ca²⁺ et H⁺/Ca²⁺ permettent l'extrusion du Ca²⁺ de la cellule. Le Ca²⁺ est aussi réaccumulé dans le réticulum sarco/endoplasmique par l'ATPase SERCA (Ca²⁺-ATPase). L'ouverture du PTP (pore de transition de perméabilité) joue différents rôles : sa brève ouverture permet la libération rapide de Ca²⁺, alors que son ouverture prolongée cause la mort cellulaire. D'après [191].

4. L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus hautement régulé qui permet l'élimination de cellules non désirées ou non-fonctionnelles. La mort par apoptose est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une fragmentation nucléaire, la condensation de la chromatine, et la fragmentation de l'ADN chromosomique. Les caspases jouent un rôle clé dans ce processus : il s'agit de cystéines protéases cellulaires, qui peuvent être soit initiateuses soit effectrices, selon leur point d'entrée dans la voie apoptotique. Les initiateuses, comme leur nom le suggère, sont les premières à être activées au cours du programme de mort cellulaire, de manière à activer les caspases effectrices, qui clivent un large éventail de substrats, menant ainsi au démantèlement de la cellule.

L'équilibre entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques constitue également un facteur essentiel de la cascade apoptotique. BAX (*Bcl2-associated X protein*), BID (*BH3 interacting domain death agonist*), et BAK (*Bcl-2 antagonist killer*) appartiennent à la

première classe, Bcl-2 et Bcl-xL (*B cell lymphoma-extra large protein*) quant à eux font partie de la deuxième.

L'apoptose peut être déclenchée via une voie intrinsèque ou une voie extrinsèque. Les mitochondries sont essentielles dans la première voie, mais sont également impliquées dans la deuxième en amplifiant la signalisation apoptotique (figure 14). La **voie intrinsèque** est déclenchée par un stress cellulaire, comme un dommage à l'ADN (induit, par exemple, par la lumière ultraviolette ou la chimiothérapie) ou un choc thermique. Dès lors que le signal de stress est reçu, les protéines pro-apoptotiques cytosoliques, BAX et BID, se lient à la membrane mitochondriale externe et induisent alors une perméabilisation complète de cette dernière. Cet événement cause la libération du cytochrome *c* de l'espace intermembranaire dans le cytoplasme [192]. BAK, une autre protéine pro-apoptotique qui est localisée dans les mitochondries, est aussi requise pour permettre une libération complète du cytochrome *c*. Dans le cytosol, ce dernier forme un complexe avec l'ATP et la protéine adaptatrice Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*), qui active la caspase-9, une protéine initiateur. La caspase-9 agit avec le complexe constitué du cytochrome *c*, de l'ATP et d'Apaf-1 pour former un apoptosome, qui ensuite active la caspase-3, la protéine effectrice qui commence la dégradation. Lors de l'apoptose, la migration du cytochrome *c* de la mitochondrie vers le cytosol n'est pas un cas isolé ; d'autres protéines apoptogéniques sont libérées de l'espace intermembranaire, comme les protéines Smac (*small mitochondria-derived activator of caspases*)/DIABLO, qui inhibent les protéines inhibitrices de l'apoptose, favorisant ainsi la mort cellulaire.

En ce qui concerne la voie **extrinsèque**, des signaux moléculaires, libérés par ou liés à d'autres cellules, se fixent à des récepteurs de mort transmembranaires exprimés par la cellule cible et induisent l'apoptose. Par exemple, la liaison du ligand FasL (*Fetal alcohol syndrome ligand*) aux récepteurs de mort Fas déclenche l'agrégation de plusieurs de ces récepteurs, menant au recrutement d'une protéine adaptatrice appelée FADD (*Fas-associated death domain protein*) du côté cytoplasmique des récepteurs [193, 194]. FADD, à son tour, recrute la caspase-8, une protéine initiateur [195] qui, ainsi activée, peut donc activer directement la caspase-3 pour commencer la dégradation de la cellule; de plus, elle clive la protéine BID générant la forme tronquée tBID (*truncated BID*), qui agit comme un signal sur la membrane des mitochondries pour faciliter la libération du cytochrome *c* dans la voie intrinsèque [196].

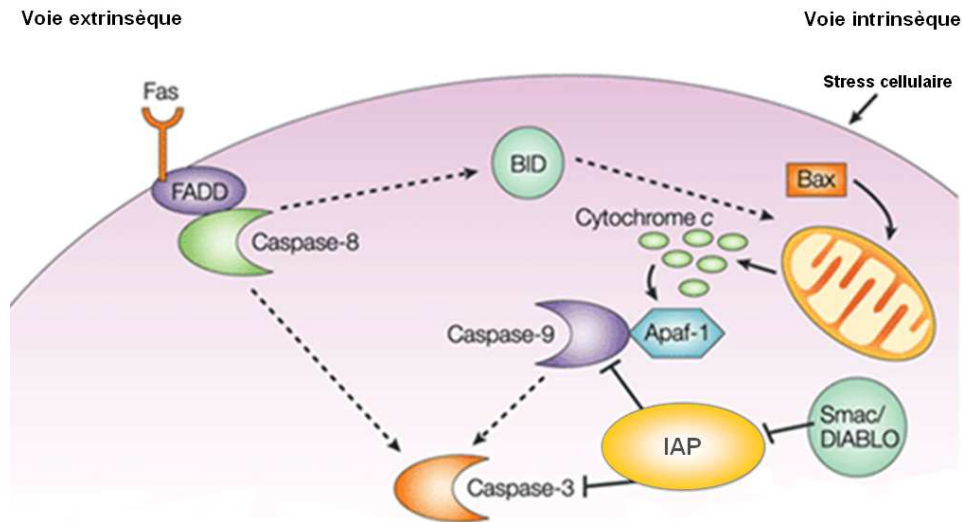


Figure 14 : Les voies de signalisation intrinsèque et extrinsèque de la mort cellulaire par apoptose.

La voie intrinsèque de la mort cellulaire est activée par un stress tel que la lumière ultraviolette (UV) ou la chimiothérapie menant à l'activation des protéines cytosoliques pro-apoptotiques BAX et BID, qui se lient à la membrane mitochondriale externe induisant la libération du cytochrome *c* et de protéines apoptogéniques telles que les protéines Smac (*small-mitochondria-derived activator of caspases*)/DIABLO, qui inhibent les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP). Le cytochrome *c* libéré dans le cytosol forme un complexe, appelé apoptosome, avec Apaf-1, l'ATP (non illustré) et la caspase-9, une protéine initiatrice. Cette dernière, ainsi activée, active la caspase-3, qui commence le démantèlement de la cellule. Dans la voie extrinsèque, des ligands de mort tels que FASL se lient à leurs récepteurs spécifiques sur la membrane cellulaire, menant au recrutement de la protéine adaptatrice FADD (*FAS-associated DEATH domain protein*), qui à son tour recrute et active la caspase-8, une protéine initiatrice. La caspase-8 active alors la caspase-3 et clive la protéine BID. La forme tronquée de cette dernière facilite ensuite la libération du cytochrome *c* dans la voie intrinsèque. Adaptée de [197].

C. Le cycle de vie mitochondrial

Pendant les années 80, les scientifiques ont réalisé que dans la cellule, les mitochondries ne sont pas ces petits organites ronds isolés qui sont récupérés après isolement à partir de tissu. Dans les cellules saines, elles constituent un réseau hautement dynamique, qui est remodelé en continu en réponse aux stimuli environnementaux, à l'état du développement, et à la demande énergétique des cellules [198].

Les mitochondries s'engagent dans un cycle de vie qui commence avec la croissance et division d'organites préexistants, via un processus appelé la biogenèse mitochondriale, et termine avec l'élimination sélective d'organites non-fonctionnels ou non nécessaires via le processus autophagique sélectif nommé la mitophagie. Au cours de la vie de l'organite, la morphologie mitochondriale change fréquemment sous l'action de deux événements opposés : la fusion et la fission, constituant collectivement la dynamique mitochondriale. La présence de plusieurs mitochondries isolées ou d'un réseau réticulaire de mitochondries fusionnées est dictée par les conditions physiologiques cellulaires [199] (figure 15).

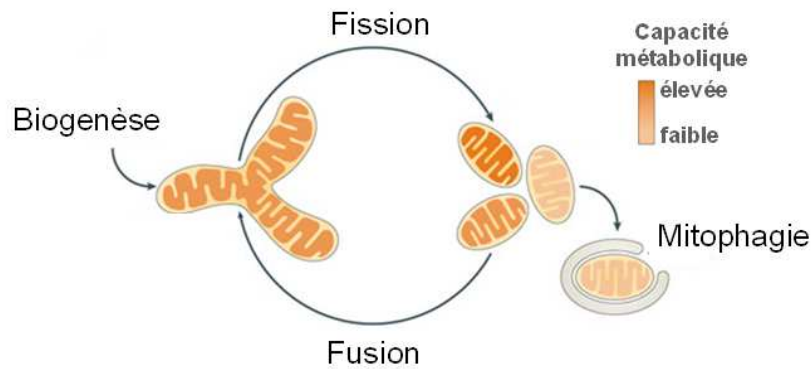


Figure 15: Représentation schématique du cycle de vie mitochondrial

Les mitochondries sont générées au moyen d'un processus appelé biogenèse mitochondriale, consistant en la croissance et en la division de mitochondries préexistantes. Pendant leur vie, ces organites changent de forme en continu, sous l'action de deux événements opposés : la fusion, qui permet la formation d'un réseau bien connecté à partir d'organites séparés, et la fission, qui occasionne la séparation d'une mitochondrie en plusieurs organites distincts. La fission est essentielle pour isoler les mitochondries dysfonctionnelles, pour qu'elles soient sélectivement dégradées par mitophagie. Adaptée de [199].

1. La biogenèse mitochondriale

Les mitochondries ne peuvent être formées *de novo*; elles prolifèrent par croissance et division de mitochondries préexistantes, processus appelé biogenèse mitochondriale. Ce mécanisme permet d'ajuster le nombre, la structure et les fonctions de ces organites aux demandes cellulaires, via la synthèse de nouveaux composants mitochondriaux.

Les mitochondries se divisent pendant la mitose de manière à apporter un échantillon conséquent d'organites à chacune des cellules filles. Cependant, il a été montré que les mitochondries prolifèrent aussi dans des conditions qui ne sont pas corrélées au cycle cellulaire. Par exemple, la masse mitochondriale est augmentée dans le muscle squelettique adulte en réponse à l'exercice [200] ou à une stimulation électrique chronique [201], très probablement pour faciliter l'utilisation de l' O_2 , permettant une production d'énergie accrue dans des muscles se contractant plus et demandant donc plus d'énergie. En outre, il a été démontré que la biogenèse mitochondriale est aussi stimulée par d'autres voies, comme les espèces réactives de l'oxygène, l'oxyde nitrique, les flux de Ca^{2+} , et l'hypoxie [202].

Dans un chapitre précédent, il a été mentionné que l'ADN mitochondrial ne comprend qu'une petite fraction des gènes nécessaires pour la fonction biologique et la structure de ces organites. Les mitochondries ne sont ainsi qu'en semi-autonomie sur le plan génétique puisqu'elles dépendent fortement de l'expression de gènes nucléaires pour accomplir leurs fonctions. L'architecture du réseau mitochondrial est donc dépendante d'un dialogue entre la mitochondrie et le noyau finement contrôlé afin de satisfaire les demandes énergétiques cellulaires [185, 186, 203, 204].

La génération de nouveaux composants mitochondriaux demande l'importation de protéines codées dans le noyau, l'incorporation de lipides synthétisés par la mitochondrie, l'amplification du génome mitochondrial, et la traduction de protéines codées par l'ADN mitochondrial. Ceci nécessite donc une coordination parfaite qui est notamment permise par l'action conjuguée de plusieurs facteurs de transcription. Dans le noyau, les facteurs de transcription NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*) et GAPB (*GA-binding protein*), ainsi que ERRA (*estrogen-related receptor α*) activent les promoteurs des gènes codant pour des protéines mitochondriales.

NRF-1 a été identifié comme étant le facteur de transcription capable de lier un site de reconnaissance palindromique situé dans la région de control du cytochrome *c* [205]. Des sites d'ancrage spécifiques de NRF-1 ont ensuite été identifiés dans les promoteurs de plusieurs gènes nucléaires requis pour la fonction métabolique mitochondriale [206, 207], comprenant la plupart des gènes codant les sous-unités des cinq complexes respiratoires [208]. NRF-1 lie ses sites de reconnaissance et fonctionne comme un régulateur positif de la transcription [209, 210], présentant un domaine d'activation transcriptionnelle C-terminal [211]. Il semble coordonner l'expression des sous-unités respiratoires avec celle de la machinerie de transcription mitochondriale. En effet, il lie et active les promoteurs du facteur de transcription mitochondrial TFAM (*mitochondrial transcription factor A*) [212], ainsi que des deux gènes codant les isoformes de TFB (*mitochondrial transcription factor B*), TFB1 et TFB2 [213], dont les produits sont les régulateurs majeurs de la transcription mitochondriale. NRF-1 participe aussi à l'expression de deux enzymes clé dans la voie de biosynthèse de l'hème, un cofacteur essentiel pour la fonction des transporteurs d'électrons [264, 234], et d'une sous-unité clé du récepteur TOM (*the outer membrane multisubunit receptor complex*) [216], étant requise pour l'importation de milliers de protéines mitochondriales [217].

De façon intéressante, un site de reconnaissance de NRF-1 a été identifié dans le promoteur du gène humain VHL (*von Hippel–Lindau tumor suppressor*) [218]. VHL est un régulateur négatif de HIF-1, un activateur transcriptionnel de plusieurs gènes notamment impliqués dans la voie glycolytique, tels que le transporteur de glucose (GLUT) et la pyruvate déshydrogénase kinase 1. Cette kinase inhibe la pyruvate déshydrogénase, responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, causant ainsi une diminution de l'oxydation des carbohydrates. De plus, HIF-1 inhibe l'activité transcriptionnelle de c-myc [219], qui est un régulateur positif des gènes mitochondriaux codés par l'ADN nucléaire [220]. Il est donc raisonnable de formuler l'hypothèse que NRF-1 pourrait induire le métabolisme oxydatif mitochondrial en partie via l'activation de l'expression de VHL (figure 16).

GABP, quant à lui, a été identifié sur la base de sa liaison spécifique au promoteur de la sous-unité IV de la cytochrome *c* oxydase [186]. Le facteur GABP humain est constitué de cinq sous-unités, comprenant une sous-unité qui lie l'ADN (sous-unité α) et quatre autres sous-unités ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, et $\gamma 2$). Ces dernières forment des complexes avec l'ADN mais sans le lier directement, et présentent un domaine d'activation de la transcription similaire à celui de NRF-1 [211].

Comme observé pour la sous-unité IV de la cytochrome *c* oxydase, la transcription de la sous-unité Vb est également activée par GABP, suggérant que GABP est un activateur général de l'expression des gènes codant pour les sous-unités de la cytochrome *c* oxydase [221]. En effet, plusieurs études montrent un rôle direct de GABP dans l'expression des 10 sous-unités de la cytochrome *c* oxydase codées par le noyau [222, 223].

TFAM, dont la transcription, comme énoncé précédemment, est régulée par NRF-1, est le premier facteur de transcription des mitochondries de vertébrés à avoir été bien caractérisé [224]. Il est un régulateur clé de la transcription d'une part, mais aussi de la réplication de l'ADN mitochondrial *in vivo*, ce qui est essentiel pour la biogenèse mitochondriale et le développement embryonnaire [225]. Il lie son site de reconnaissance sur l'ADN mitochondrial pour favoriser la transcription bidirectionnelle en facilitant l'interaction symétrique avec d'autres composants transcriptionnels [226]. La fonction d'activation transcriptionnelle de TFAM réside dans son domaine d'activation C-terminal, qui est nécessaire aussi pour son ancrage spécifique aux sites de reconnaissance sur le promoteur [227]. De façon intéressante, il a été montré qu'il lie également des sites de façon non-spécifique, suggérant qu'il peut jouer un rôle dans la stabilisation et le maintien du génome mitochondrial [228]. Etant donné qu'il est responsable de la réplication de l'ADN mitochondrial, les niveaux de TFAM sont associés au nombre de copies du génome mitochondrial. En effet, des souris hétérozygotes pour TFAM montrent un nombre réduit de copies d'ADN mitochondrial et des déficiences de la chaîne respiratoire dans le cœur, tandis que l'oxydation phosphorylante est totalement abolie chez les souris totalement déficientes en TFAM [225].

ERR α , pour sa part, appartient à une famille de récepteurs nucléaires orphelins, incluant ERR β et ERR γ ; bien qu'il ressemble aux récepteurs aux estrogènes, il ne lie pas d'estrogènes ou d'autres ligands. Sa fonction consiste notamment en la régulation du métabolisme oxydatif : il est en effet fortement exprimé dans les tissus oxydatifs comme le rein, le cœur et la graisse brune. Ce facteur permet notamment la transcription de la déshydrogénase MCAD (*medium-chain acyl-coenzyme A*) qui est une enzyme clé de l'oxydation des acides gras [229].

Les souris ayant un déficit d'expression de $ERR\alpha$ ont une masse grasse réduite et sont résistantes à l'obésité induite par le régime riche en graisse, suggérant des défauts dans le métabolisme des lipides [230]. $PPAR\alpha$ (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), un autre facteur de transcription activé par $PGC-1\alpha$, permet aussi la régulation de l'oxydation des acides gras. En effet, il contrôle la transcription des transporteurs des acides gras et des enzymes catalysant leur oxydation [231].

$ERR\alpha$ a aussi été impliqué dans l'induction de la biogenèse mitochondriale par $PGC-1\alpha$: ce co-activateur transcriptionnel, qui sera décrit ci-dessous, cible $ERR\alpha$ conjointement avec GABP pour réguler des gènes respiratoires tels que le cytochrome *c* et la β -ATP synthase [232, 233].

Au regard des connaissances qui ont été accumulées dans un premier temps, il est apparu qu'un nombre relativement faible de facteurs de transcription nucléaires contrôlent la coordination de l'expression de protéines nucléaires et mitochondriales ; ceci a soulevé la question de leur intégration dans le programme complexe de la biogenèse mitochondriale. La réponse a été amenée par la découverte de la famille de co-activateurs transcriptionnels $PGC-1$ (*peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ -coactivator-1*), qui comprend $PGC-1\alpha$, $PGC-1\beta$ et PRC (*PGC-1 related co-activator*). **$PGC-1\alpha$** est le premier membre de cette famille à avoir été découvert ; il a été identifié sur la base de son induction durant la thermogénèse adaptative dans le tissu adipeux brun et de son interaction avec $PPAR\gamma$, qui est un important régulateur de la différenciation des adipocytes [234]. Il ne montre pas d'activité de modification d'histone lui même, mais il interagit, via un puissant domaine d'activation transcriptionnelle N-terminal, avec des cofacteurs dotés d'une activité intrinsèque de remodelage de la chromatine [235]. Des motifs de signature de co-activateur des récepteurs aux hormones nucléaires adjacents au domaine d'activation sont essentiels pour la co-activation via certains récepteurs nucléaires. Enfin, un couplage de la transcription au processus de maturation de l'ARN par $PGC-1\alpha$ se produit à travers des motifs de reconnaissance de l'ARN et un C-terminal riche en arginine/serine [236], qui ressemblent à ceux trouvés dans les facteurs d'épissage de l'ARN. En plus de $PPAR\gamma$, $PGC-1\alpha$ lie un large éventail de facteurs de transcription et de récepteurs hormonaux nucléaires. Parmi ceux qui sont directement liés à la fonction respiratoire mitochondriale, $PPAR\alpha$, NRF-1 et $ERR\alpha$ peuvent notamment être cités. Liant ces facteurs de transcription nucléaires il peut *trans-activer* leur gènes cibles qui sont impliqués dans la respiration mitochondriale, la transcription et réplication de l'ADN mitochondrial, l'oxydation des acides gras, et la machinerie d'importation et d'exportation des protéines mitochondriales [202] (figure 17). Il a été

démontré que l'expression de PGC-1 α est activée en réponse aux demandes énergétiques cellulaires. Par exemple, une hausse prolongée de la concentration de Ca²⁺ cytosolique, provoquée par une augmentation de l'activité contractile, conduit à une augmentation du contenu mitochondrial dépendante de PGC-1 α , permettant ainsi une meilleure réponse de la cellule au changement de conditions [237].

Dans les cellules en culture, l'expression ectopique de PGC-1 α augmente les niveaux protéiques de la sous-unité IV de la cytochrome *c* oxydase et du cytochrome *c* ainsi que le niveau d'ADN mitochondrial à l'équilibre [238]. Chez les souris, la surexpression cardiospécifique de PGC-1 α résulte en l'augmentation massive du contenu en mitochondrie des cardiomyocytes, ceci menant à une cardiomyopathie dilatée [239].

De façon surprenante, des souris présentant une délétion de PGC-1 α dans la lignée germinale sont viables et affichent une masse et une morphologie mitochondriales normales dans le foie ou le gras brun [240, 241]. Cependant, en condition de stress physiologique, ces souris présentent des phénotypes plus sévères tels qu'une incapacité à maintenir leur température corporelle et une réduction de la production d'ATP dans le cœur [240–242]. D'autres souris, ayant quant à elles une délétion de PGC-1 α spécifiquement dans le muscle squelettique, présentent plusieurs défauts musculaires tels qu'une tolérance réduite à l'effort et des anomalies dans le maintien de la composition des fibres musculaires [243]. L'ensemble des résultats mis en avant par ces différentes études doit être interprété en gardant à l'esprit qu'il ne peut être exclu que la déficience en PGC-1 α pourrait être compensée par PGC-1 β , une autre protéine de la même famille.

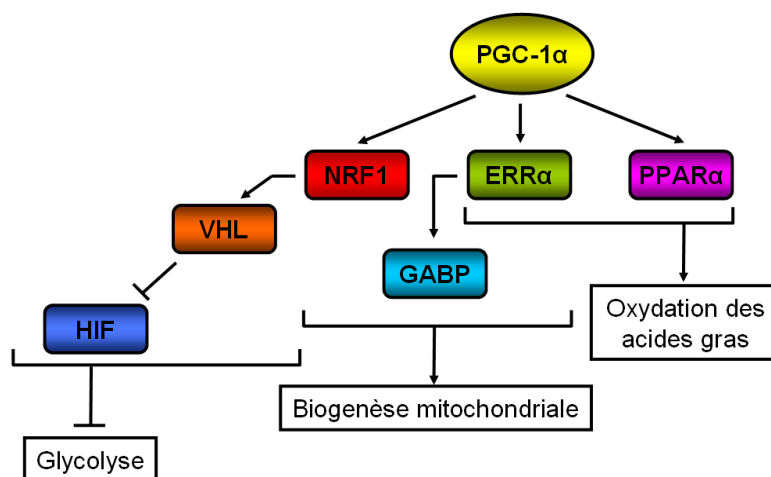


Figure 16 : Réseau dirigé par PGC-1 α pour réguler les fonctions mitochondriales.

Parmi les cibles du co-activateur transcriptionnel PGC-1 α , les facteurs de transcription NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*) et GABP (*GA-binding protein*), ERR α (*estrogen related receptor α*) et PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) peuvent être cités. En activant les gènes contrôlés par NRF1, par GABP et par ERR α , PGC-1 α active le processus de la biogenèse mitochondriale. En effet, NRF1 stimule l'expression de la plupart des sous-unités de la chaîne respiratoire et celle des facteurs de transcription mitochondriaux TFAM (*mitochondrial transcription factor A*), TFB1 et TFB2 (*mitochondrial transcription factor B1 and 2*). GABP active l'expression des sous-unités de la cytochrome oxydase et ERR α contrôle, conjointement avec GABP, l'expression de gènes respiratoires tels que le cytochrome *c* et la β -ATP synthase. La stimulation de l'activité transcriptionnelle d'ERR α mène aussi à la régulation de l'oxydation des acides gras. En effet, ERR α contrôle l'expression de la déshydrogénase MCAD (*medium-chain acyl-coenzyme A*), enzyme clé de l'oxydation des acides gras. PGC-1 α active cette voie métabolique aussi via la trans-activation de PPAR α , régulateur de l'expression des gènes codant les protéines de transport des acides gras et les enzymes impliquées dans leur oxydation. Enfin, PGC-1 α régule, de façon négative cette fois, une autre voie énergétique, la glycolyse, via l'activation de NRF1 qui contrôle l'expression de VHL (*Von Hippel Lindau*), régulateur négatif d'HIF-1 α . Ce facteur de transcription, responsable de l'activation des gènes glycolytiques pour la survie de la cellule en présence de faibles concentrations d'O₂, est donc inhibé suite à l'activation PGC-1 α -dépendante de NRF1.

PGC-1 β partage une similarité de séquence avec PGC-1 α sur toute sa longueur. Il présente en effet un domaine d'activation N-terminal, des signatures de co-activateur des récepteurs aux hormones nucléaires, et un motif C-terminal de reconnaissance de l'ARN [244, 245]. Cependant, il ne présente pas le domaine riche en arginine/serine associé à l'épissage de l'ARN. L'expression en ARNm de PGC-1 β est calquée sur celle de PGC-1 α avec des niveaux plus élevés dans le tissu adipeux brun, le cœur et le muscle squelettique, tissus caractérisés par un haut contenu en mitochondries et un métabolisme oxydatif. De même que PGC-1 α , PGC-1 β lie aussi NRF-1 et GABP et est un puissant co-activateur des gènes cibles de NRF-1 menant à une augmentation de l'expression des gènes mitochondriaux [202].

Néanmoins, PGC-1 α et - β présentent de différences : PGC-1 β n'est pas induit dans le tissu adipeux brun après exposition au froid, et il induit faiblement l'expression des gènes gluconéogéniques dans les hépatocytes et foie [246]. Il est donc reconnu que PGC-1 β participe au maintien de la fonction mitochondriale en condition basale, alors que PGC-1 α

agit en augmentant la masse mitochondriale, permettant ainsi l'adaptation du tissu à une demande énergétique élevée.

Deux lignées de souris invalidées pour le gène de PGC-1 β [247, 248] et une lignée homozygote d'une variante hypomorphe qui maintient en partie la capacité de *trans*-activation via ERR α [249], ont été générées de façon indépendante. Dans les trois cas, les souris sont viables et fertiles [247, 249]. Néanmoins, toutes ces souris présentent des dysfonctions mitochondriales et notamment lorsqu'elles sont sujettes à un stress. En effet, les ARNm codant plusieurs protéines respiratoires sont sous-exprimés et les animaux présentent des problèmes de thermorégulation. De façon intéressante, le contenu mitochondrial est réduit dans le muscle squelettique oxydatif et dans le cœur, et cela est associé à de modestes réductions de l'expression des gènes respiratoires. Cependant, les mitochondries montrent une structure interne normale et la fonction respiratoire des mitochondries isolées est impossible à distinguer entre les souris sauvages et les souris invalidées pour PGC-1 β [247–249].

Une redondance fonctionnelle partielle entre PGC-1 α et β a été récemment révélée via la construction et l'analyse de souris ayant un déficit d'expression pour les deux co-activateurs [250]. Malgré que ces souris soient viables à la naissance, la majorité meurt d'insuffisance cardiaque dans les 24 heures suivant la naissance et aucune souris ne survit au-delà de 14 jours. Contrairement aux souris déficientes pour un seul co-activateur, la densité mitochondriale dans le tissu adipeux brun des ces souris est fortement réduite, et les mitochondries présentent une diminution de la densité des crêtes coïncidant avec une expression réduite de plusieurs gènes respiratoires. Chez ces souris déficientes en PGC-1 α et β , l'insuffisance cardiaque est en outre accompagnée d'anomalies mitochondriales dans le cœur, caractérisées par une réduction du nombre et de la taille des mitochondries, ainsi que par la présence de vacuoles internes associées à une diminution du nombre de crêtes [251]. L'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et l'oxydation phosphorylante, tels que des gènes cibles d'ERR α et d'ERR γ , sont également diminuée chez ces animaux [250].

PRC est une autre protéine qui partage de nombreuses caractéristiques avec PGC-1 α et $-\beta$. Il lie NRF-1, *trans*-activant ainsi ses gènes cibles, il présente un domaine d'activation N-terminal qui est fortement similaire à celui de PGC-1 α et il est requis pour la *trans*-activation dépendante de NRF-1. Pourtant, à la différence de PGC-1 α et $-\beta$, l'expression de PRC n'est pas particulièrement élevée dans des tissus hautement oxydatifs riches en mitochondries, et n'est pas induite après exposition au froid [252]. PRC est plus exprimé dans les cellules en prolifération que dans les cellules quiescentes [251, 252], et est rapidement induit après un

traitement avec du sérum et ce en absence de synthèse protéique *de novo*, suggérant une induction à partir de facteurs préexistants [251]. De façon importante, l'induction de PRC avec du sérum est accompagnée d'un profil d'expression génique qui est qualitativement similaire à celui observé après induction de PGC-1 α [253], à savoir une augmentation de l'expression de l'ARNm de TFAM et des sous-unités respiratoires codées par l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial [202].

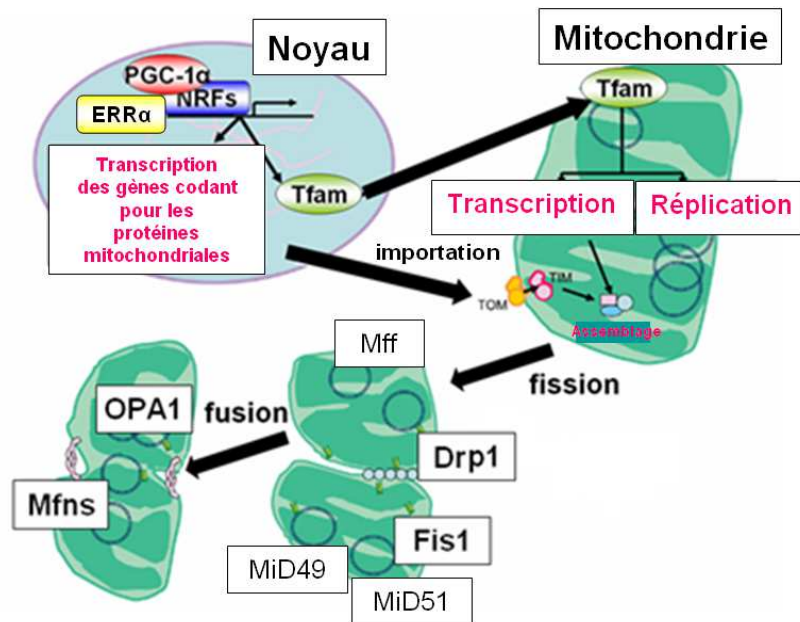


Figure 17 : Mécanisme schématisé de la biogenèse mitochondriale.

La biogenèse mitochondriale commence avec l'activation de NRFs et ERR α induite par PGC-1 α , déterminant ainsi la transcription des gènes nucléaires codant les protéines mitochondriales telles que des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire et le facteur de transcription mitochondrial TFAM. Ce dernier, tout comme les autres protéines mitochondriales codées par le noyau, est importé dans la mitochondrie grâce à la machinerie de transport des membranes externe et interne (TOM et TIM, respectivement). TFAM permet alors la transcription et la réplication du génome mitochondrial. De nouveaux organites sont formés après division de mitochondries préexistantes, via l'action de protéines comme *dynamin-related protein 1* (DRP1), *mitochondrial fission protein 1* (FIS1), *mitochondrial fission factor* (Mff) et *mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 KDa* (MiD49 et MiD51). Une organisation correcte du réseau mitochondrial est assurée par la coordination de ces événements de fission avec ceux de la fusion, faisant intervenir *optic atrophy 1 protein* (OPA1) et les mitofusines (MFNs). Adapté de [231].

2. La dynamique mitochondriale: fission et fusion

Il a précédemment été mentionné que, durant leur vie, les mitochondries sont sujettes à de fréquents changements de morphologie via l'action opposée des deux événements que sont la fusion et la fission, conjointement désignés sous le terme générique de « dynamique mitochondriale ». La **fission** correspond à la division d'une mitochondrie en deux. Sachant que les mitochondries ne peuvent pas être créées *de novo*, ce processus est indispensable pour

assurer la transmission d'un nombre de mitochondries suffisant à chacune des cellules filles lors de la mitose. Elle est aussi fondamentale pour éliminer les mitochondries vieillissantes et/ou endommagées de la cellule par la mitophagie, permettant ainsi le renouvellement mitochondrial [199].

Les protéines responsables de la fission comprennent *Dynamamin related protein 1* (DRP1), *mitochondrial Fission protein 1* (FIS1), *mitochondrial fission factor* (MFF) et *mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 KDa* (MiD49 et MiD51).

DRP1 appartient à la famille des dynamines GTPasiques. A différence de la dynamine-1, DRP1 ne présente pas de domaine pour la liaison à la membrane, exigeant ainsi de récepteurs membranaires pour être recrutée à la membrane mitochondriale externe, où elle accomplit ses fonctions [254]. Après son recrutement, DRP1 se rassemble en complexes multimériques annulaires au niveau de sites de scission sur la surface externe des mitochondries ; ces anneaux ainsi formés se resserrent suite à l'hydrolyse du GTP pour permettre la scission de la double membrane (figure 18). Puis, DRP1 est à nouveau libéré dans le cytosol [255].

Une des protéines proposée pour le recrutement de DRP1 est **FIS1**, qui est uniformément localisée sur la membrane mitochondriale externe ancrée par un unique domaine transmembranaire C-terminal [254]. En prenant en considération le fait que DRP1 peut encore être recrutée à la membrane mitochondriale externe après la sous-expression de FIS1, il a été suggéré que d'autres protéines contribuent probablement à l'assemblage de DRP1 au niveau des mitochondries. **MFF** et **MiD49** et **MiD51** sont des candidats qui ont été proposés pour accomplir cette fonction. La surexpression de ces protéines entraîne en effet la translocation de la fraction cytosolique de DRP1 à la membrane mitochondriale externe ; à l'inverse, la sous-expression de MFF cause une élévation mitochondriale et une réduction de DRP1 à la surface mitochondriale [255].

Différentes modifications post-traductionnelles de DRP1, telles que la phosphorylation, la S-nitrosylation, l'ubiquitination, et la sumoylation, ont été proposées pour réguler ce processus complexe. Durant la mitose, DRP1 est activé par la phosphorylation par le complexe constitué de la kinase 1 dépendante de la cycline (CDK1) et la cycline B ; ceci mène alors à la fragmentation mitochondriale [256]. Au contraire, la phosphorylation de la Ser637 par la protéine kinase A engendre l'inhibition de l'activité GTPasique de DRP1, et par conséquent une diminution de la fission mitochondriale [257]. Au contraire, la phosphatase calcineurine déphosphoryle DRP1 sur la Ser637 en réponse à une augmentation chronique de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, favorisant ainsi son recrutement sur les mitochondries et,

par conséquent, une fragmentation généralisée qui peut être associée à la fission mitochondriale apoptotique [258].

Il a été montré que la S-nitrosylation de DRP1 par l'oxyde nitrique induit la dimérisation de DRP1, stimulant ainsi l'activité GTPasique de DRP1 et par conséquent la fission mitochondriale [259]. D'un autre côté, l'ubiquitine ligase de la membrane mitochondriale externe s'associe avec DRP1 et l'ubiquitinyne, l'orientant ainsi vers sa dégradation par le protéasome. Enfin, la sumoylation régule positivement la fission en protégeant DRP1 de la dégradation [255].

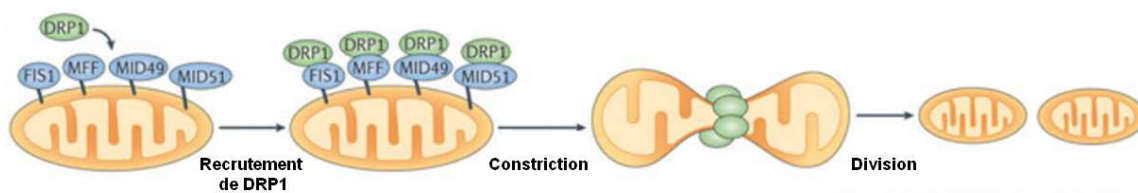


Figure 18: Représentation schématisée de la fission mitochondriale.

La fission nécessite le recrutement de la GTPase cytosolique DRP1 (*dynamamin-related protein 1*) à la membrane mitochondriale externe. L'assemblage de DRP1 à la surface mitochondriale engendre la constriction de la mitochondrie, qui a pour conséquence la division de l'organite en deux entités distinctes. Chez les mammifères, il existe quatre récepteurs de DRP1, à savoir FIS1 (*mitochondrial fission 1*), MFF (*mitochondrial fission factor*), MID49 et MID51 (*Mitochondrial dynamics protein of 49 kDa and 51 kDa*), qui sont tous localisés au niveau de la membrane mitochondriale externe. MFF, MID49 et MID51 ont un rôle essentiel dans la fission ; quant à FIS1, il ne semble jouer qu'un rôle marginal. Adapté de [260].

La **fusion** est un processus complexe qui implique la fusion des deux membranes lipidiques : la membrane mitochondriale interne et la membrane mitochondriale externe. Les protéines responsables de ce mécanisme sont les Mitofusines (MFNs) [261], et OPA1 (*optic atrophy 1 protein*) [262].

Il a été démontré que la fusion est un processus essentiel chez les mammifères. Les souris présentant un déficit d'expression de MFN1 ou de MFN2 meurent *in utero* [263]. En effet, les événements de fusion sont nécessaires à une fonction respiratoire normale dans les cellules, et sont un processus de base permettant l'inter-complémentation de l'ADN mitochondrial [264]. Les MFNs sont de grosses GTPases conservées, localisées sur la membrane mitochondriale externe. Chez les mammifères, il y a deux homologues étroitement apparentés, MFN1 et MFN2. La génération de souris ayant des mutations punctiformes a montré leur rôle fondamental dans la fusion mitochondriale. Des fibroblastes embryonnaires déficients en MFN1 ou MFN2 présentent des niveaux réduits de fusion mitochondriale, menant à une perte complète des tubules mitochondriaux [263].

La **MFN1**, ancrée dans la membrane mitochondriale externe, présente un domaine en superhélice au niveau de la partie C-terminale, qui est impliqué dans la liaison de deux mitochondries adjacentes à travers une structure dimérique [265] homotypique (MFN1-MFN1) ou hétérotypique (MFN1-MFN2) [263, 265]. Ce domaine semble être important pour les événements de fusion : des mutations ont été signalées comme étant responsables de la perte de la capacité d'ancrage de la membrane [265], empêchant l'agrégation périnucléaire mitochondriale qui est observée suite à la surexpression de MFN1 [266]. La fusion mitochondriale dépend aussi de l'activité GTPase. En effet, des mutations dans le domaine GTPasique altèrent la capacité des mitochondries de s'allonger ou de fusionner [263, 266].

La **MFN2**, ancrée elle aussi dans la membrane mitochondriale externe, présente les mêmes domaines fonctionnels que MFN1. Les parties N- et C-terminales peuvent interagir, suggérant la formation de cis-oligomères de MFN2 [267]. Les homologues de MFNs ont une activité biochimique très similaire. En effet, MFN1 et MFN2 peuvent se remplacer fonctionnellement : des cellules déficientes en MFN1 peuvent être « sauvées » par la surexpression de MFN2, et vice versa. Cependant, dans des fibroblastes en culture, il a été montré que MFN1 joue un rôle plus actif. MFN2 présente une activité GTPase plus faible et a une plus grande affinité pour le GTP, comparé à MFN1. De plus, il a été montré que la fonction d'OPA1 dépend de MFN1 mais pas de MFN2 [254].

OPA1 est une GTPase de la famille des dynamines localisée dans l'espace intermembranaire et associée avec la membrane mitochondriale interne. Comme les MFNs, OPA1 est indispensable à la fusion mitochondriale. Sa sous expression cause la fragmentation mitochondriale, en raison d'une incapacité des mitochondries à fusionner, et entraîne d'importantes aberrations structurales des crêtes. Le contrôle de la morphologie des crêtes mitochondriales semble être une caractéristique spécifique d'OPA1, étant donné que le déficit de MFN1 et/ou de MFN2 n'affecte pas leur géométrie [267].

La biogenèse d'OPA1 est régulée au niveau transcriptionnel et post traductionnel. L'épissage alternatif de pre-ARNm d'Opa1 conduit à la génération de huit isoformes exprimées de façon tissu-dépendante [268] et pouvant moduler différentes fonctions d'OPA1 [269]. La présence des deux sites de clivage protéolytique introduit un autre niveau de complexité [270]. La protéolyse au niveau de ces sites occasionne la perte du domaine transmembranaire d'OPA1 et mène à la formation de formes courtes d'OPA1 (*short* OPA1, S-OPA1). A l'état basal, OPA1 mature subit cette protéolyse, conduisant à l'accumulation de formes longues, non-clivées d'OPA1 (*long* OPA1, L-OPA1) et de S-OPA1. La fusion mitochondriale dépend de la présence de L- et S-OPA1 [271], qui se rassemblent en complexes oligomériques qui

maintiennent la structure des crêtes [272, 273]. De nombreuses conditions de stress, telle que la stimulation apoptotique, détruisent ces complexes et induisent la conversion complète de L-OPA1 en S-OPA1, inhibant ainsi la fusion mitochondriale [270, 271, 274]. Les événements de fission fragmentent alors le réseau mitochondrial, permettant la suppression sélective de mitochondries endommagées par mitophagie ou la progression de l'apoptose [275]. La protéolyse d'OPA1 est donc cruciale pour garantir l'intégrité et le contrôle de qualité mitochondriaux.

Tout comme la fission, la fusion consiste en un processus à plusieurs étapes, qui est dépendant du potentiel de la membrane mitochondriale et du GTP. Ce mécanisme commence avec la liaison des membranes externes de deux mitochondries voisines par la dimérisation de MFN1/2. Ceci est ensuite suivi par une étape d'amarrage de deux membranes de façon GTP-dépendante avant que la fusion ne soit finalisée (figure 19).

Les fusions de la membrane mitochondriale externe et de la membrane mitochondriale interne constituent deux étapes distinctes. Toutefois, la détection des MFNs et OPA1 au sein d'un même complexe protéique a suggéré une coordination et une co-régulation de ces deux étapes qui permettrait de maintenir la compartimentalisation mitochondriale [199, 254].

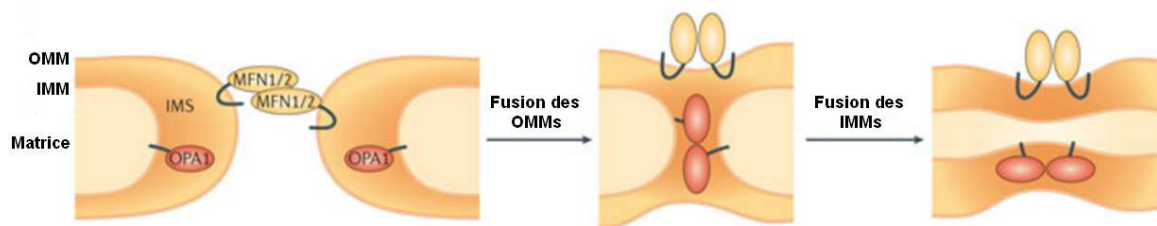


Figure 19 : Représentation schématisée de la fusion mitochondriale.

La fusion mitochondriale prévoit la fusion des membranes mitochondriales externes de deux mitochondries, suivie par la fusion des membranes mitochondriales internes. La fusion des membranes mitochondriales externes est régulée par les Mitofusines 1 (MFN1) et 2 (MFN2), deux GTPases de la famille des dynamines localisées au niveau de l'OMM. La fusion des membranes mitochondriales internes, pour sa part, est contrôlée par une autre GTPase de la famille des dynamines, OPA1 (*optic atrophy 1 protein*). Cette dernière existe sous deux formes: une forme longue, qui est fortement associée à la membrane mitochondriale interne, et une forme courte (non illustrée), qui est dirigée à l'espace intermembranaire. Adaptée de [260].

3. La mitophagie

Les mitochondries nécessitent un mécanisme de contrôle permettant d'en assurer la qualité et la quantité optimale pour satisfaire les besoins de la cellule qui varient en fonction des changements bioénergétiques and environnementaux [276, 277].

Ce mécanisme est la balance entre la biogenèse mitochondriale et la mitophagie (ou autophagie mitochondriale), qui définit la dégradation sélective des mitochondries dysfonctionnelles par les lysosomes [278].

Des travaux récents sur deux gènes mutés dans la maladie familiale de Parkinson, PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) et Parkin, ont contribué à étayer un mécanisme moléculaire de ce processus (figure 20). L'expression de la kinase PINK1 est réprimée de manière constitutive dans les mitochondries saines via son importation dans la membrane mitochondriale interne et sa dégradation. Quand une mitochondrie est dépolarisée, l'importation des protéines dans la membrane mitochondriale interne devient alors impossible. PINK1 s'accumule ainsi à la membrane mitochondriale externe des mitochondries endommagées, et recrute alors l'E3 ligase Parkin cytosolique via son activité de kinase. Ainsi, Parkin ubiquitinye les protéines de la membrane mitochondriale externe qui constitueront alors un signal pour orienter ces mitochondries coiffées de chaînes de polyubiquitine vers l'élimination autophagique [279].

La mitophagie semble être intimement liée à la fission et à la fusion mitochondriales. En effet, une étude de la dynamique mitochondriale dans des fibroblastes a montré qu'une mitochondrie sur cinq mitochondries filles est dépolarisée et éliminée par mitophagie [280]. Dans la plupart des événements de fission, une mitochondrie fille est transitoirement hyper polarisée alors que la mitochondrie « sœur » est hypopolarisée, suggérant que la fission est un « test de stress » qui peut pousser une mitochondrie fille à une dépolarisation complète si elle ne fonctionne pas de façon optimale. La mitophagie peut être entravée par un mutant dominant-négatif de DRP1, suggérant que la fission est nécessaire pour le processus mitophagique [280].

L'importance de ce processus est démontrée par l'accumulation de mitochondries gonflées et défectueuses dans des cellules dérivants de souris affichant un déficit d'expression pour des gènes clé de l'autophagie [281, 282].

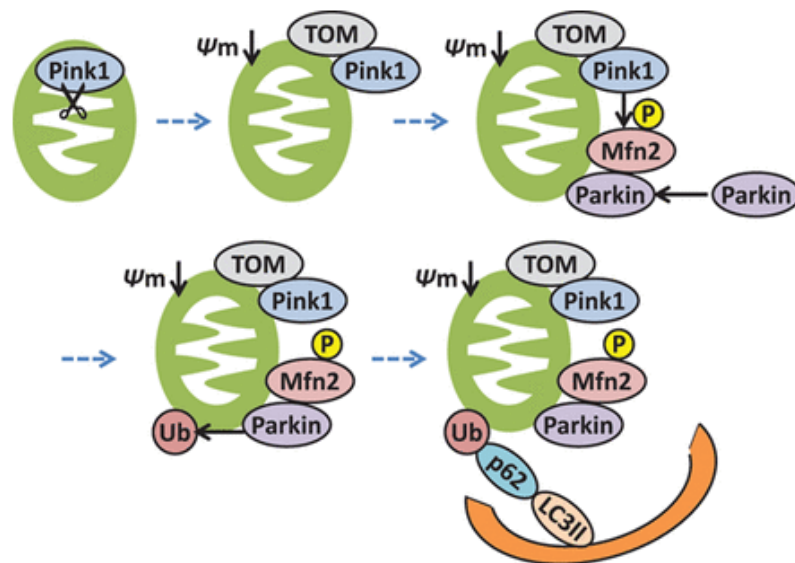


Figure 20 : Mécanisme moléculaire proposé pour la mitophagie induite par Parkin.

La protéine PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) est normalement dégradée au niveau de la membrane mitochondriale interne, ce qui limite la quantité de cette kinase à la surface des mitochondries saines. Quand une mitochondrie est endommagée et présente alors une dépolariation membranaire, l'importation de PINK1 à la membrane mitochondriale interne et, donc, sa dégradation sont inhibées, causant ainsi sa séquestration et son accumulation sur la membrane mitochondriale externe. PINK1 phosphoryle alors MFN2 (*mitofusin 2*), ce qui permet le recrutement du cytosol de l'E3 ligase Parkin. Parkin transfère l'ubiquitine (Ub) à diverses protéines sur la membrane mitochondriale externe. Les protéines ubiquitinées sont reconnues par la protéine adaptatrice p62 liant l'ubiquitine et LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), induisant ainsi l'englobement de la mitochondrie par l'autophagosome. Ce dernier se fusionne ensuite avec le lysosome, engendrant ainsi la dégradation de la mitochondrie dysfonctionnelle (non illustré). D'après [275].

D. La dysfonction mitochondriale de l'HTAP

La minoration du métabolisme des mitochondries observée dans les cellules vasculaires dérivant des patients atteints d'HTAP, discutée dans le premier chapitre, a poussé plusieurs chercheurs à centrer leur attention sur ces organites cellulaires essentiels. De part leur rôle de régulateurs métaboliques et leur implication dans différentes fonctions cellulaires, les mitochondries participent à la régulation de plusieurs voies de signalisation de la prolifération et de la mort cellulaire. Il n'est donc pas surprenant qu'elles ont été considérées comme des facteurs potentiellement importants dans le remodelage vasculaire pulmonaire caractéristique de l'HTAP, et que plusieurs dysfonctions, schématisées en figure 21, ont été mises en évidence [283].

1. Le cycle de vie mitochondriale est perturbé dans l'HTAP

Il a été démontré que le cycle de vie mitochondrial est profondément perturbé dans l'HTAP. Dans les CML-AP des patients HTAP, les mitochondries apparaissent hautement fragmentées [284], suggérant un déséquilibre vers la fission mitochondriale. En effet, la protéine

responsable de la fission mitochondriale DRP1 est hyperactive dans les cellules de malade [284].

Si la fission mitochondriale est exacerbée dans les CML-AP de patient HTAP, son antagoniste, la fusion, est diminuée : l'expression de MFN2 est en effet diminuée dans les CML-AP de patient et des modèles animaux d'HTAP [285]. De façon intéressante, l'expression de MFN2 est strictement liée à celle de son co-activateur transcriptionnel, PGC-1 α : ainsi, dans les CML-AP des patients atteints d'HTAP, la diminution d'expression de MFN2 est associée à celle de PGC-1 α [285]. Ce dernier étant le régulateur majeur de la biogénèse mitochondriale, il est fascinant de formuler l'hypothèse que cet autre aspect important du cycle de vie mitochondrial pourrait aussi être affecté dans l'HTAP.

Très récemment, Haslip et ses collaborateurs [286] ont conduit une étude qui suggère que la mitophagie est également affectée dans l'HTAP. En effet, une diminution de l'expression de la protéine découplante UCP2 (*uncoupling protein 2*), régulateur du potentiel de la membrane mitochondriale, et une augmentation d'une des protéines clés de la mitophagie, PINK1, sont observées dans les cellules endothéliales issues de l'artère pulmonaire de patients HTAP [286].

2. La production d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales est altérée dans l'HTAP

Les espèces réactives de l'oxygène produites par les complexes mitochondriaux I et III semblent jouer un rôle important dans le remodelage pulmonaire ; cependant, il n'est pas clair si les espèces réactives de l'oxygène sont augmentées ou diminuées dans l'HTAP [283, 287], d'autant plus que l'augmentation d'une espèce peut être associée avec la diminution d'une autre.

L'expression de l'enzyme mitochondriale antioxydant SOD2 est diminuée dans l'HTAP [92]. Cela favorise une accumulation des ions superoxydes O₂⁻ au niveau des mitochondries mais diminue dans le même temps la production de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Etant donné que l'H₂O₂ déstabilise HIF-1 α , sa sous-production entraîne la stabilisation de ce facteur de transcription, qui active l'expression de gènes impliqués dans le transport du glucose (GLUT1) et dans la production du lactate (lactate déshydrogénase). Au-delà de son effet sur la stabilité de HIF-1 α , H₂O₂ régule aussi le tonus vasculaire pulmonaire via l'activation du canal potassique dépendant du voltage K_v1.5. Les niveaux plus faibles de H₂O₂ déterminent en effet une inhibition de ces canaux, dont l'activité est déjà réduite en raison d'une baisse de leur expression chez les patients HTAP et chez les modèles animaux d'HTAP [168, 288].

Cela conduit à une augmentation de la concentration de K^+ cytosolique, qui inhibe les caspases et les nucléases déclenchant l'apoptose [76, 289]. En même temps, l'augmentation d'ions chargés positivement à l'intérieur de la cellule cause une dépolarisation de la membrane cellulaire, qui entraîne l'activation des canaux calciques voltage-dépendants, qui à leur tour causent une augmentation de l'entrée de Ca^{2+} . Ce dernier est ensuite impliqué dans la stimulation de la contraction et prolifération des CML-AP [61, 288].

3. Le métabolisme mitochondriale est sous-régulé dans l'HTAP

La pyruvate déshydrogénase, enzyme clé pour la conversion de pyruvate en acétyl-CoA, est centrale dans l'effet de Warburg. Tout comme dans le cancer, cette enzyme est inhibée dans l'HTAP [165, 166]. L'inhibition de la pyruvate déshydrogénase est induite par différentes voies. Son inhibiteur enzymatique, la pyruvate déshydrogénase kinase, peut être activé par l'axe des tyrosines kinases et par des facteurs de transcription comme HIF-1 α , les deux étant surexprimés dans l'HTAP [168]. La pyruvate déshydrogénase peut aussi être inhibée en présence de faibles niveaux de Ca^{2+} mitochondrial, caractéristique de l'HTAP, étant donné qu'elle est activée par une phosphatase Ca^{2+} -dépendante [290]. Enfin, la pyruvate déshydrogénase peut être activée par la désacétylase mitochondriale sirtuine 3 (SIRT3), qui est sousexprimée dans les CML-AP des patients HTAP [291].

De plus, l'activité de la chaîne respiratoire est aussi dérégulée : les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire dérivées des patients HTAP idiopathique présentent une consommation d'oxygène réduite en comparaison avec les cellules contrôles, et cette diminution est associée à une moindre activité du complexe IV [292].

Une carence en fer sans anémie a été observée chez les patients atteints d'HTAP idiopathique, associée à une capacité réduite d'exercice et une diminution de la survie [293] ; en parallèle, elle est aussi liée à une augmentation du risque de développer un cancer [294]. De façon intéressante, plusieurs complexes importants pour la fonction mitochondriale sont dépendants du fer ; par exemple, les complexes I et II de la chaîne respiratoire ont de multiples groupes fer-soufre [295]. Cela suggère qu'une carence en fer pourrait affecter la fonction mitochondriale ; en effet, il a été montré qu'elle induit un remodelage métabolique, avec une diminution de l'oxydation du glucose et une augmentation de la glycolyse [296]. Une étude récente a montré que des rats nourris pendant 4 semaines avec un régime dépourvu en fer développent une HTAP ; fait intéressant, une réduction de l'activité du complexe I

mitochondrial a été observée dans les mitochondries dérivées des artères pulmonaires de ces rats [297].

4. Les mitochondries dans l'HTAP présentent faibles niveaux de Ca^{2+}

A la fin des années 80, il a été montré que les principales enzymes limitantes du métabolisme mitochondrial sont toutes activées par le Ca^{2+} [298]: notamment, la pyruvate déshydrogénase, enzyme très peu active dans l'HTAP, est activée, comme énoncé dans la section précédente, via une déphosphorylation par une phosphatase Ca^{2+} -dépendante [290]. Plus récemment, la transfection de cellules avec la luciférase de luciole a permis une démonstration claire et non équivoque que la capture de Ca^{2+} mitochondriale augmente la production mitochondriale d'ATP [299]. En effet, il a été montré que le complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale, responsable de la production d'ATP, est activé par le Ca^{2+} [300].

La présence de faibles niveaux de Ca^{2+} mitochondrial est une caractéristique de l'HTAP, qui peut être due à un stress du réticulum endoplasmique déclenché par des stimuli comme l'inflammation, l'hypoxie ou des mutations [301]. Le stress du réticulum endoplasmique, à son tour, cause l'activation de la protéine NOGO, déterminant une rupture de l'unité mitochondrie-réticulum endoplasmique et, donc, du transfert de Ca^{2+} du réticulum à la mitochondrie [302]. Le Ca^{2+} mitochondrial peut être régulé aussi par UCP2, qui agit comme uniport de Ca^{2+} ; son absence détermine une diminution du taux de Ca^{2+} dans la mitochondrie et un développement spontané de l'HTAP [303].

5. Le potentiel de membrane mitochondriale est altéré dans l'HTAP

Le potentiel de membrane mitochondriale est atteint dans des modèles d'HTAP. Néanmoins, son altération est l'objet de débat, étant donné que certains chercheurs ont trouvé une augmentation (hyperpolarisation) [283] et d'autres une diminution (dépolérisation) [304] du potentiel de membrane mitochondriale dans des modèles d'HTAP.

Le potentiel de membrane mitochondriale est lié au développement de l'HTAP étant donné qu'il peut moduler la balance fission/fusion (pour revue, [305]), le niveau d'absorption de Ca^{2+} [306], et la production d'ATP [307] et des espèces réactives de l'oxygène mitochondriales [283].

Ainsi, il reste à clarifier si le potentiel de membrane mitochondriale est diminué ou augmenté dans l'HTAP, à savoir comment ces altérations sont liées à la respiration mitochondriale, et si

des altérations du potentiel de membrane mitochondriale ont une importance pathophysiologique.

6. La voie apoptotique mitochondriale est altérée dans l'HTAP

L'apoptose dépendante des mitochondries est supprimée dans les CML-AP humaines en hypoxie *in vitro* et dans les CML-AP dérivées de patients et rats avec HTAP [308]. Dans l'HTAP, en fait, les facteurs pro-apoptotiques stockés dans l'espace intermembranaire mitochondrial, tels que le cytochrome *c*, ne s'échappent pas. Les auteurs expliquent cela avec la libération de ces facteurs suite à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, un méga-canal qui, en étant sensible au voltage et à l'état de réduction-oxydation cellulaire, est fermé quand le potentiel de membrane mitochondriale est élevé et le niveau d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales est faible [308]. En effet, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial met en communication le milieu intracellulaire et matriciel, causant le gonflement mitochondrial, la rupture de la membrane mitochondriale externe et, par conséquent, la fuite de ces molécules pro-apoptotiques.

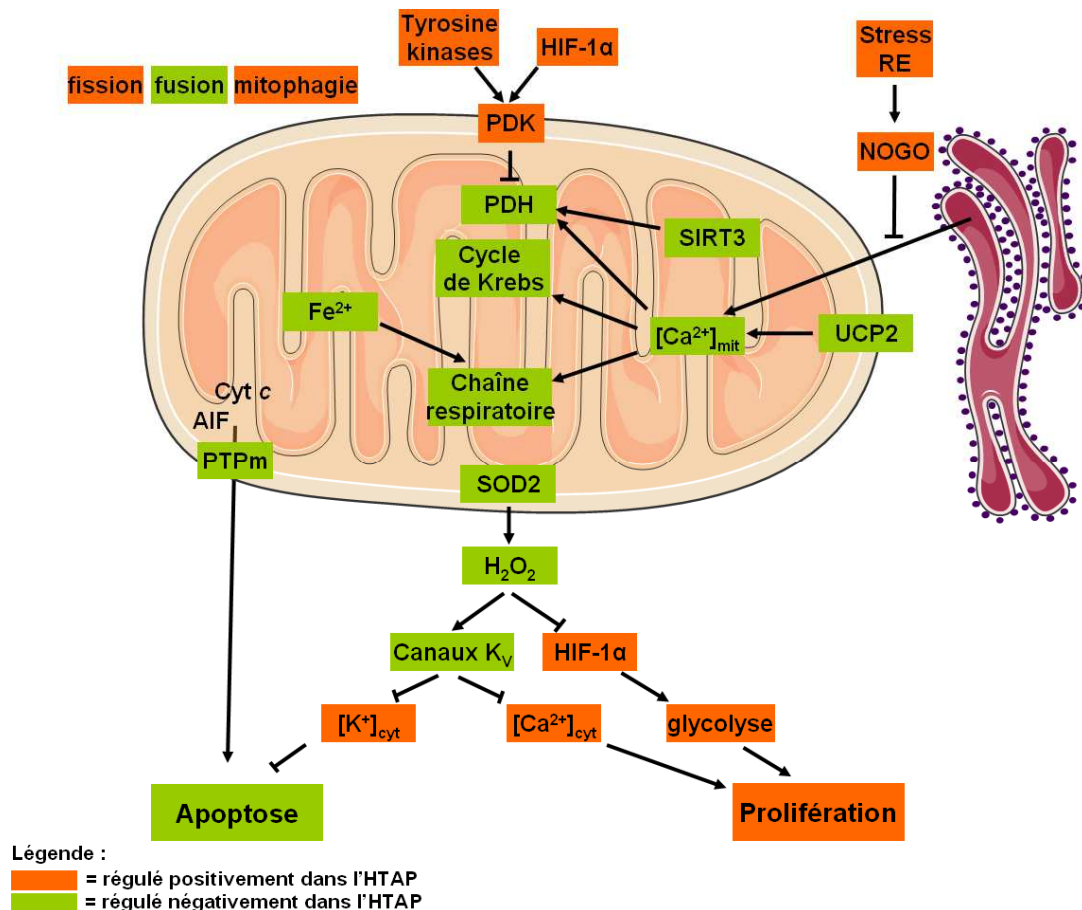


Figure 21 : La dysfonction mitochondriale dans l'HTAP.

Plusieurs anomalies mitochondriales ont été observées chez les patients atteints d'HTAP. Ainsi, des enzymes impliquées dans le métabolisme mitochondrial, tels que la pyruvate déshydrogénase (PDH) et des complexes de la chaîne respiratoire, sont moins actives. L'activité réduite de la pyruvate déshydrogénase peut avoir différentes causes, telles que la sous-expression de la sirtuine 3 (SIRT3), son activateur, la surexpression de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), son inhibiteur, ainsi que la concentration réduite du Ca^{2+} mitochondriale ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$). Cette dernière à son tour peut être expliquée par la sous-expression d'UCP2 (*uncoupling protein 2*), impliquée dans l'absorption de Ca^{2+} par la mitochondrie, ainsi que par l'activation de la protéine NOGO suite au stress du réticulum endoplasmique et, donc, par la rupture de l'unité réticulum endoplasmique-mitochondrie. La réduction de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, quant à elle, peut être causée par la réduction de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ et de la concentration du fer (Fe^{2+}), étant donné que plusieurs enzymes sont Ca^{2+} -dépendantes et contiennent de groupes fer-soufre. Une autre anomalie mitochondriale observée est la sous-expression de l'enzyme antioxydante SOD2, menant à une augmentation de la concentration de l'extrêmement réactif anion superoxyde et une diminution de la concentration du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier déstabilise le facteur de transcription HIF (*hypoxia inducible factor*)-1 α et active les canaux potassique voltage-dépendants (K_v) ; par conséquent, sa réduction cause l'activation du premier et l'inhibition des deuxièmes. Cela engendre l'activation de la prolifération via l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique et de la glycolyse, et une inhibition de la voie apoptotique à travers une augmentation de la $[\text{K}^+]_{\text{cyt}}$. L'apoptose est aussi empêchée par l'augmentation du seuil d'ouverture du PTPm (pore de transition de perméabilité mitochondriale), qui permet la libération par la mitochondrie de facteurs apoptogéniques tels que le cytochrome *c* et AIF (*apoptosis-inducing factor*).

Le cycle de vie mitochondrial apparait aussi fortement altéré dans l'HTAP, étant donné qu'un déséquilibre fusion-fission est observé en faveur de la fission, et que la mitophagie semble être augmentée.

E. La régulation de PGC-1 α

Comme énoncé précédemment, PGC-1 α coordonne l'activité de facteurs de transcription pour moduler le métabolisme énergétique et d'autres processus cellulaires en réponse à différents

signaux environnementaux et physiologiques. L'ampleur de la réponse induite par ces stimuli dépend souvent de la **synthèse de novo** des protéines PGC-1 α . Par exemple, dans le tissu adipeux brun, l'exposition au froid induit fortement l'expression de PGC-1 α , ce qui entraîne une augmentation remarquable de l'expression d'UCP1 de manière à faciliter la thermogenèse et le maintien de la température corporelle [240, 241]. De façon similaire, l'induction de PGC-1 α dans le foie après le jeûne cause l'augmentation de l'expression des gènes gluconéogéniques pour favoriser la production hépatique de glucose et pour maintenir l'homéostasie du glucose [309].

Au-delà de la modulation de son niveau d'expression, l'activité de PGC-1 α peut aussi être modifiée par sa localisation subcellulaire, par des modifications post-traductionnelles et par sa biodisponibilité. En ce qui concerne sa **localisation subcellulaire**, il a été récemment démontré qu'à différence de l'isoforme de PGC-1 α *full-length*, qui réside principalement dans le noyau, l'isoforme courte NT-PGC1-1 α est localisée de façon prédominante dans le cytoplasme et transférée au noyau après phosphorylation par la protéine kinase A [310]. L'accumulation nucléaire de PGC-1 α peut être initiée aussi par sa désacétylation [311]. De plus, des études ont récemment démontré que PGC-1 α peut aussi être localisé dans les mitochondries, où il forme des complexes associés aux nucléoïdes avec la sirtuine 1 (SIRT1) et TFAM [312, 313]. La localisation mitochondriale de PGC-1 α offre un mécanisme plausible à travers lequel il pourrait directement coordonner la transcription des gènes codés par les génomes nucléaires et mitochondriaux pour réguler le processus global de la biogenèse mitochondriale.

Les **modifications post-traductionnelles** de PGC-1 α , qui d'une part modulent sa localisation, affectent également positivement ou négativement sa capacité à recruter les complexes de remodelage de la chromatine et donc à activer la transcription génique. Ces modifications post-traductionnelles ne sont pas seulement responsables de la régulation de l'intensité de la réponse PGC-1-dépendante, mais elles semblent aussi spécifier quels réseaux géniques vont être exprimés en particulier. Elles engendrent en effet l'interaction de PGC-1 α avec des partenaires de régulation spécifiques qui sont soit des facteurs de transcription soit d'autres co-régulateurs. Les modifications post-traductionnelles de PGC-1 α sont multiples :

- Phosphorylation

L'**AMPK** (*AMP-activated protein kinase*) stimule la biogenèse mitochondriale non seulement via l'induction de la transcription de PGC-1 α mais aussi par l'activation de l'activité co-

transcriptionnelle de PGC-1 α à travers la phosphorylation de la thréonine-177 et serine-538 [314]. L'insuline, en plus de réduire l'expression génique de PGC-1 α [315], provoque la phosphorylation de PGC-1 α au niveau de la serine-570 via l'action de la **protéine kinase B** et inhibe ainsi son activité [316]. Récemment, un autre mécanisme de régulation de PGC-1 α via la voie insuline/protéine kinase B a été découvert : la phosphorylation et la stabilisation de la protéine kinase Clk2 (*Cdc2 like kinase 2*), qui à son tour phosphoryle PGC-1 α dans son domaine riche en arginine/serine, réduit ainsi son activité co-transcriptionnelle [317] spécifiquement vers FOXO1 (*forkhead box protein O1*), ceci qui diminue la gluconéogenèse. La **p38 MAPK** phosphoryle la thréonine-262, la serine-265, et la thréonine-298 de PGC-1 α en réponse à la stimulation des cytokines dans les cellules musculaires [318]. La phosphorylation par la p38 MAPK augmente l'activité de PGC-1 α en augmentant sa stabilité [318] et en prévenant l'interaction inhibitrice entre PGC-1 α et le corépresseur p160MBP (*p160 myb binding protein*) dans les myoblastes [319]. PGC-1 α est aussi phosphorylé et inhibé par **GSK3 β** (*glycogen synthase kinase 3 β*) [311], qui augmente sa dégradation par le protéasome dans le noyau durant le stress oxydant. Etant donné que SIRT1 et GSK3 β sont tous deux activés par le stress oxydant, la phosphorylation inhibitrice de GSK3 β pourrait limiter l'activation de PGC-1 α par SIRT1.

- Méthylation

PGC-1 α est méthylé par **PRMT1** (*protein arginine methyltransferase 1*) au niveau des arginines 665, 667 et 669, ce qui provoque une augmentation de la transcription contrôlée par PGC-1 α [320].

- Acétylation

PGC-1 α est acétylé par l'acétyltransférase **GCN5** (*general control of amino acid synthesis protein 5-like 2*), dont l'action est contrebalancée par la désacétylase **SIRT1**, qui fera l'objet du chapitre suivant. Ces deux protéines sont des senseurs de l'état énergétique de la cellule (figure 22). En effet, SIRT1 nécessite en tant que substrat du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), impliqué dans les réactions de réduction-oxydation en transportant des électrons [321]. L'activité de SIRT1 augmente donc en période de demande énergétique, notamment lors du jeun, à l'exercice, ou lors d'un stress oxydant, quand les niveaux de NAD⁺ ou du ratio NAD⁺/NADH sont très élevés. La désacétylation de PGC-1 α par SIRT1 augmente la co-activation de ses facteurs de transcription cibles [322, 323]. Ceci favorise la biogenèse

mitochondriale, constituant une réponse visant à augmenter la charge énergétique cellulaire pour faire face à ces situations.

L'AMPK, en plus d'induire l'expression de PGC-1 α et augmenter directement son activité via la phosphorylation, comme énoncé précédemment, régule l'activité de PGC-1 α aussi indirectement, augmentant les niveaux de NAD⁺ en activant sa biogenèse via Nampt [324] ou en activant l'oxydation des acides gras [322]. Cela renforce ainsi l'activité de SIRT1 et induit la désacétylation et l'activation de PGC-1 α [322]. Il est important de souligner que la phosphorylation de PGC-1 α par l'AMPK est requise pour la désacétylation par SIRT1, suggérant que ces deux modifications post traductionnelles augmentent la spécificité [322].

PGC-1 α interagit avec plusieurs acétyl transférases [235, 325, 326], mais seule l'histone acétyltransférase GCN5 acétyle et inhibe l'activité de PGC-1 α (et PGC-1 β) *in vitro* et *in vivo* [325, 327]. L'expression de GCN5 est induite par l'excès calorique, menant à l'acétylation et, donc, l'inhibition de PGC-1 α . Au contraire, lors d'une privation énergétique, l'expression de GCN5 est réduite et celle de SIRT1 est induite, favorisant donc la désacétylation et l'activité de PGC-1 α [326]. Un autre mécanisme potentiel de régulation de l'acétylation de PGC-1 α par GCN5 serait le contrôle des réserves d'acétyl-CoA nucléaire dans la cellule. Une étude récente suggère que, chez les mammifères, les niveaux nucléaires d'acétyl-CoA sont contrôlés par l'enzyme ATP-citrate lyase, qui génère l'acétyl-CoA à partir de citrate [328]. De façon intéressante, l'inhibition de l'acétylation des histones après le *silencing* d'ATP-citrate lyase était très similaire à celle observée après celui de GCN5, suggérant que GCN5 est la principale acétyltransférase responsable de l'acétylation des histones induite par l'ATP-citrate lyase [328]. Il est donc tentant de supposer que l'acétylation de PGC-1 α pourrait dépendre des niveaux d'acétyl-CoA nucléaire au même titre que l'acétylation des histones.

Il a été montré que les modifications post-traductionnelles influencent aussi la **biodisponibilité** de PGC-1 α . PGC-1 α , en fait, est une protéine à courte durée de vie (2 à 3 heures), en raison de sa dégradation rapide par le système de protéasome médiée par l'ubiquitine [329]. Sa stabilité est augmentée via la phosphorylation par P38 MAPK qui favorise son accumulation cellulaire et son activité transcriptionnelle [330]. Au contraire, la phosphorylation par GSK3 β régule négativement PGC-1 α , en favorisant sa dégradation via le protéasome [311].

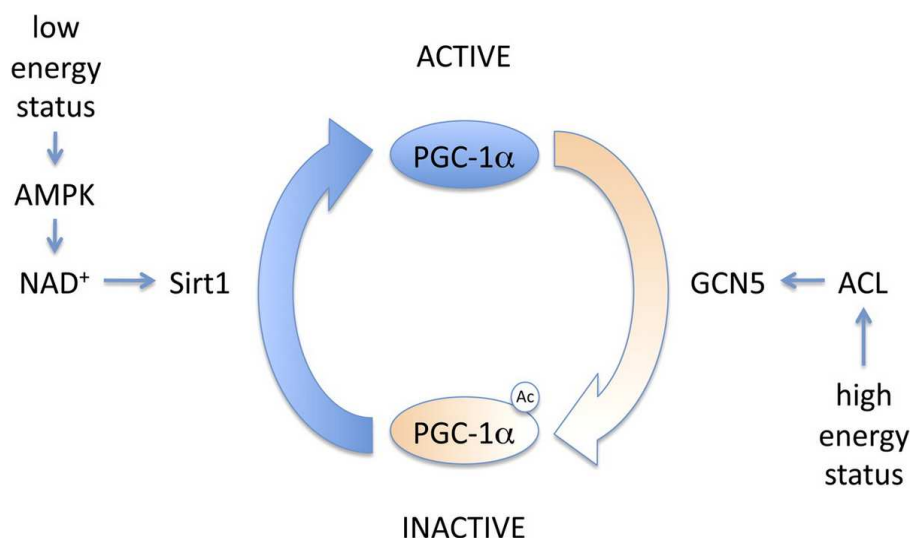


Figure 22 : Modèle pour la régulation de l'acétylation de PGC-1 α selon la disponibilité des nutriments

Dans des situations de déficits énergétiques, l'augmentation AMPK (*AMP-activated protein kinase*)-dépendante de la quantité de NAD^+ stimule l'activité de SIRT1 et mène à la désacétylation et, donc, à l'activation de PGC-1 α , ce qui engendre une activation du programme de la biogenèse mitochondriale et améliore la fonction des mitochondries. Au contraire, quand les niveaux énergétiques cellulaires sont élevés, GCN5 (*general control of amino acid synthesis*) inhibe PGC-1 α , en l'acétylant ; l'acétyl-CoA nécessaire pour cette réaction est fourni par l'ATP-citrate lyase (ACL), qui agit comme un facteur limitant de l'acétylation de PGC-1 α par GCN5. De [331].

Chapitre III : SIRT1

Les histones désacétylases catalysent la désacétylation des résidus d'acétyl-N ϵ -lysine, affectant alors les propriétés fonctionnelles de la protéine cible. Il existe quatre familles d'histone désacétylases distinctes, allant de la classe I à la classe IV. Le nom de «sirtuines» est en fait un terme générique donné aux histone désacétylases de la classe III. Chez les mammifères cette famille des sirtuines est composée de sept membres (appelés SIRT1-7), qui partagent un domaine catalytique conservé et sont exprimées de façon ubiquitaire.

Sir2 (*Silent information regulator 2*), l'homologue de levure de SIRT1, a été découvert en tant que facteur nécessaire au *silencing* transcriptionnel des loci pour l'accouplement et des zones télomériques en induisant l'hétérochromatinisation de l'ADN [332]. D'autres homologues ont aussi été trouvés chez de nombreuses espèces telles que les bactéries, les vers, les mouches, les souris et l'homme, mettant en évidence la conservation de la famille Sir2 [333].

Les histones ayant été le premier substrat protéique identifié de ces désacétylases [334], les sirtuines furent originellement appelées histone désacétylases de classe III. Cependant, cette définition est trop réductrice pour décrire leur action catalytique puisque certaines d'entre elles ne se retrouvent jamais dans le noyau (SIRT2-5), et SIRT1, par exemple, désacétyle d'autres substrats en plus des histones. Tandis que les histone désacétylases des classes I et II utilisent le zinc comme cofacteur, les sirtuines requièrent une molécule de NAD^+ pour chaque

groupe acétyl clivé. La réaction complexe de désacétylation des sirtuines forme les produits 2'-O-acétyl-ADP-ribose, qui s'équilibre en solution avec 3'-O-acétyl-ADP-ribose, la nicotinamide, et le substrat désacétylé [335] (figure 23). Lorsque la nicotinamide est présente à de fortes concentrations, elle peut lier de façon non compétitive la sirtuine ce qui conduit à l'inhibition de celle-ci [336]. Le dinucléotide réduit, NADH, est également un inhibiteur des sirtuines [336].

De manière intéressante, comme il a été énoncé précédemment, le NAD⁺ est une molécule centrale du métabolisme et c'est pourquoi il a largement été avancé que ce composé serait le lien entre l'activité désacétylase des sirtuines et le métabolisme [337] ; ceci fera l'objet d'une description détaillée dans ce même chapitre.

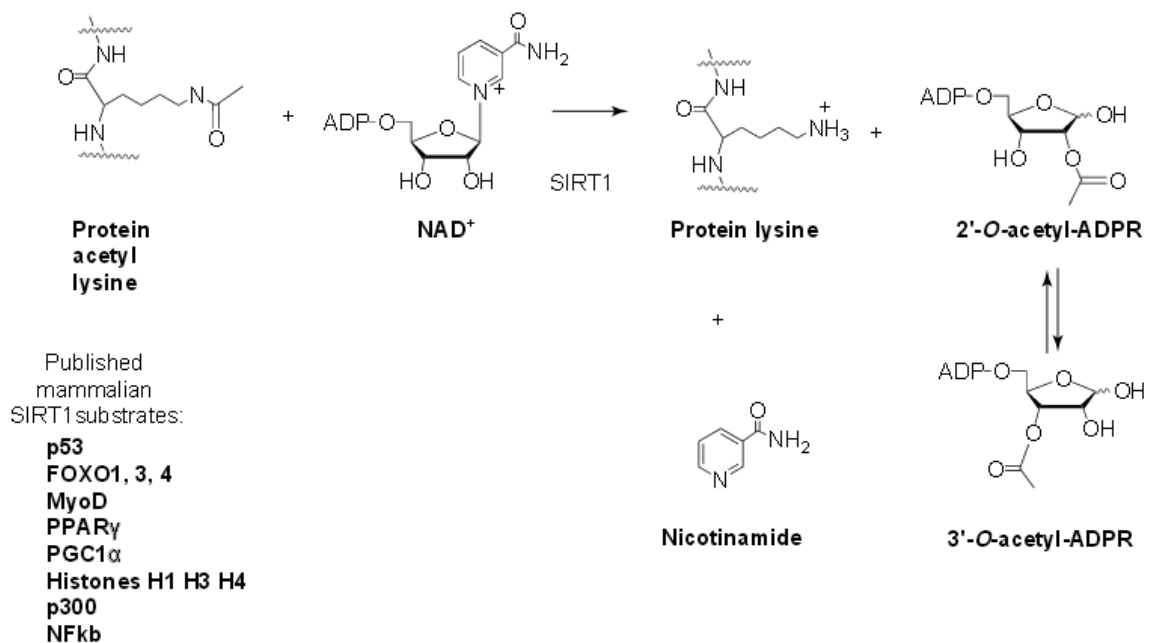


Figure 23 : Représentation de la réaction catalysée par SIRT1.

Le NAD⁺ et la protéine acétylée sont convertis par SIRT1 pour donner le nicotinamide, la protéine avec la chaîne latérale de la lysine libre et le 2'-O-acétyl-ADP-ribose ; ce dernier s'équilibre en solution avec le 3'-O-acétyl-ADP-ribose. Une liste incomplète des substrats de la SIRT1 humaine est fournie dans la partie inférieure gauche de la figure. De [338].

Les sirtuines des mammifères sont caractérisées par différentes fonctions : SIRT1, SIRT2, SIRT3 et SIRT7 agissent comme des lysine-désacétylases, SIRT4 comme une adenosinediphospho (ADP)-ribosyltransférase [339], SIRT5 comme une désacétylase [340], une démalolynase et une désuccinylase [341], et SIRT6 comme une ADP-ribosyltransférase [342] et une désacétylase [343, 344]. De plus, la localisation primaire de ces protéines dans la cellule varie significativement d'une sirtuine à l'autre (Tableau 1), reflétant une distinction

fonctionnelle des membres de cette famille. En accord avec le rôle important de Sir2 dans la régulation de la structure de la chromatine et de l'expression génique, SIRT1, SIRT6, and SIRT7 sont des protéines nucléaires, particulièrement présentes dans le nucléoplasme, au niveau de l'hétérochromatine, et dans les nucléoli respectivement [345]. SIRT2 est surtout localisée dans le cytoplasme, bien qu'elle peut aussi réguler l'expression de gènes via la désacétylation de facteurs de transcription qui se délocalisent du cytoplasme vers le noyau [346]. Elle contribue en outre à la compaction de la chromatine lors du désassemblage du noyau cellulaire durant la mitose [347]. Les membres restants de la famille des sirtuines (SIRT 3, SIRT 4, and SIRT 5) sont principalement des protéines mitochondriales [345]. La compartimentation des sirtuines peut être dynamique et est marquée par la mobilisation de ces protéines dans des compartiments cellulaires précis durant des étapes spécifiques du développement ou lors d'un stress cellulaire. En effet, des études récentes ont signalé que SIRT1 est capable de transiter entre le noyau et le cytoplasme [348] et que les substrats de SIRT1 peuvent aussi bien être des protéines cytosoliques que l'acétyl-CoA synthétase 1 [349]. De façon similaire, SIRT3 migre entre le noyau et les mitochondries lorsque la cellule subit un stress [350], même si cela est encore sujet à débat [351].

Sirtuine	Activité enzymatique	Localisation	Cibles
SIRT1	désacétylation	Noyau, cytosol	PGC-1 α , FOXO1, histone H1, FOXO3, p53, Notch, NF-kB, HIF-1 α , LXR, FXR, SREBP1, autres
SIRT2	désacétylation	cytosol	Tubuline, PEPCK, FOXO1, PAR3
SIRT3	désacétylation	mitochondries	LCAD, HMGCS2, GDH, complexes OXPHOS, SOD2, IDH2, autres
SIRT4	ADP-rybosylation	mitochondries	GDH
SIRT5	désacétylation, démanolnation, désuccinylation	mitochondries	CPS1
SIRT6	désacétylation, ADP-rybosylation	noyau	H3K9, H3K56
SIRT7	inconnue	nucléole	inconnues

Tableau 1 : Activité enzymatique, localisation et cibles des sirtuines de mammifère.

Les sept sirtuines de mammifère (SIRT1-7) sont affichent des différences dans leurs fonctions (désacétylation, ADP-rybosylation, démanolnation et désuccinylation), leurs localisations cellulaires (noyau, cytosol, mitochondrie, nucléole) et leurs cibles spécifiques. L'activité enzymatique et les cibles de SIRT7 restent inconnues.

A. La fonction de SIRT1

SIRT1 est, sans conteste, le membre le plus étudié de la famille des sirtuines. Elle a, à l'origine, été décrite comme une histone désacétylase avant que la liste des protéines cibles qu'elle peut désacétyler s'étende de manière significative (tableau 1). Ainsi p53 a été la première cible de SIRT1, n'étant pas une histone, a avoir été mise en avant. Cette cible est désacétylée et réprimée suite au dommage à l'ADN ou au stress oxydatif, entraînant ainsi une diminution de l'apoptose [352, 353]. De là est née l'idée qu'une augmentation de l'activité de SIRT1 pourrait être cancérigène, mais il semble finalement que ce ne soit pas la cas, bien au contraire (revue dans [354]). De façon importante, comme il a été décrit précédemment, l'activité de PGC-1 α , co-activateur transcriptionnel orchestrant la biogenèse et l'activité mitochondriale, est strictement contrôlée par une acétylation réversible [325, 355]. La désacétylation de PGC-1 α par SIRT1 conduit à son activation et à l'induction de voies de signalisation en aval qui contrôlent l'expression de gènes mitochondriaux [322, 356–360]. De façon similaire, SIRT1 contrôle l'acétylation des facteurs de transcription FOXO (*forkhead box O*), qui sont d'importants régulateurs du métabolisme des lipides et du glucose, et des réponses au stress. Il semble que la désacétylation opérée par SIRT1 active ou inhibe FOXO d'une part, mais dirige également sélectivement FOXO vers certaines cibles [361–363].

1. SIRT1 comme senseur métabolique

Chez la levure, il a été montré que Sir2 et NAD⁺ sont tous deux requis pour l'extension de la durée de vie liée à la restriction calorique, qui consiste en une réduction de la prise alimentaire tout en maintenant une nutrition adéquate [334]. Chez les mammifères, la restriction calorique induit un profil de changements physiologiques et comportementaux complexe, et plusieurs éléments ont démontré que SIRT1 peut en servir d'intermédiaire. Par exemple, les protéines n'étant pas des histones et étant ciblées par SIRT1 sont impliquées dans des voies de signalisation importantes pour l'adaptation métabolique à la restriction calorique, telles que le métabolisme oxydatif dans les mitochondries [364]. La restriction calorique induit l'expression de SIRT1 chez la souris [365] et chez l'homme [366]. A l'inverse, un régime riche en graisse peut induire une perte de SIRT1 chez la souris via une protéolyse [367], et l'obésité peut conduire à la réduction de son expression chez l'homme [368, 369]. De plus, des souris ayant un déficit d'expression de SIRT1 ne montrent pas l'augmentation d'activité physique normalement induite par ce régime [370], et ne voient pas leur durée de vie allongée lorsqu'elles subissent une restriction calorique [371, 372]. La surexpression de SIRT1 chez la

souris peut atténuer, de façon similaire à la restriction calorique, des maladies telles que le diabète, les désordres neurodégénératifs, la stéatose du foie, la perte osseuse, et l'inflammation [356, 357, 373–375]. De plus, les activateurs de SIRT1 comme le resvératrol [376] et des composés plus récents activant les sirtuines, les Stacs (*sirtuin-activating compounds*) [377], produisent des effets similaires à ceux de la restriction calorique, comme le révèlent des mesures physiologiques sur l'animal entier [378] ou le profil transcriptionnel [379]. Au contraire, l'inhibition de l'activité de SIRT1 contribue au syndrome métabolique et au diabète, et exacerbe les effets d'un régime riche en graisse chez la souris et l'homme [367, 380].

Pendant les dernières années, de nouvelles études ont apporté la preuve de l'importance des orthologues de Sir2 dans le ralentissement du vieillissement et dans l'extension de la durée de vie aussi chez d'autres espèces que la levure, telles que le ver [381, 382], la drosophile [383], et la souris [384, 385]. Ainsi, il y a de plus en plus d'arguments convaincants qui laissent penser que les sirtuines régulent le vieillissement, ce qui d'ailleurs est tout à fait en accord avec le rôle important qu'elles jouent dans la restriction calorique.

2. Régulation métabolique par SIRT1 dans les différents tissus

SIRT1 module les réponses métaboliques au sein de plusieurs tissus lors de différents stimuli physiologiques (figure 24). Dans le foie, SIRT1 diminue la glycolyse en inhibant l'enzyme glycolytique PGAM-1 (phosphoglycérate mutase-1) et diminue l'accumulation de lipides en supprimant la synthèse à travers l'inhibition de SREBP1c (*sterol-response element-binding protein 1c*) [386] et en favorisant l'utilisation grâce à l'activation de PGC-1 α et PPAR α [387]. De plus, SIRT1 régule la production hépatique de glucose via PGC-1 α [355], CRT2 (*CREB-regulated transcription co-activator 2*) [388] et FOXO1 (*forkhead box O1*) [389].

Dans le muscle squelettique, SIRT1 atténue la glycolyse via l'activation de PGC-1 α et améliore l'utilisation des lipides via la stimulation de PGC-1 α et PPAR α [323]. Dans cet organe, SIRT1 et AMPK constituent un circuit réciproquement positif de régulation. AMPK active SIRT1 via la régulation positive du gène de NAMPT qui, comme discuté avant, produit le cofacteur NAD⁺ [322, 324]. À son tour, SIRT1 active l'AMPK en agissant sur la kinase qui l'active, LKB1 (*liver kinase B1*) [390] : en effet, sa désacétylation engendre une augmentation de son activité, de sa localisation cytosolique et de son association avec l'activateur STRAD (*STE-related adapter*) [390].

En réponse à une privation en nutriments, SIRT1 inhibe l'adipogenèse et facilite la lipolyse dans le tissu adipeux via la répression de PPAR γ [391]. De plus, SIRT1 permet l'acquisition des caractéristiques typiques du tissu adipeux brun par des adipocytes du tissu adipeux blanc via l'activation de PPAR α et Prdm16 (*PR domain containing 16*) [392].

Dans le cœur, SIRT1 augmente la tolérance à l'ischémie activant l'enzyme endothéliale oxyde nitrique synthétase (eNOS) [393], et protège contre l'hypertrophie via l'activation de PPAR α [394].

Dans le pancréas, SIRT1 augmente la sécrétion d'insuline à travers l'inhibition de la transcription d'UCP2 [395].

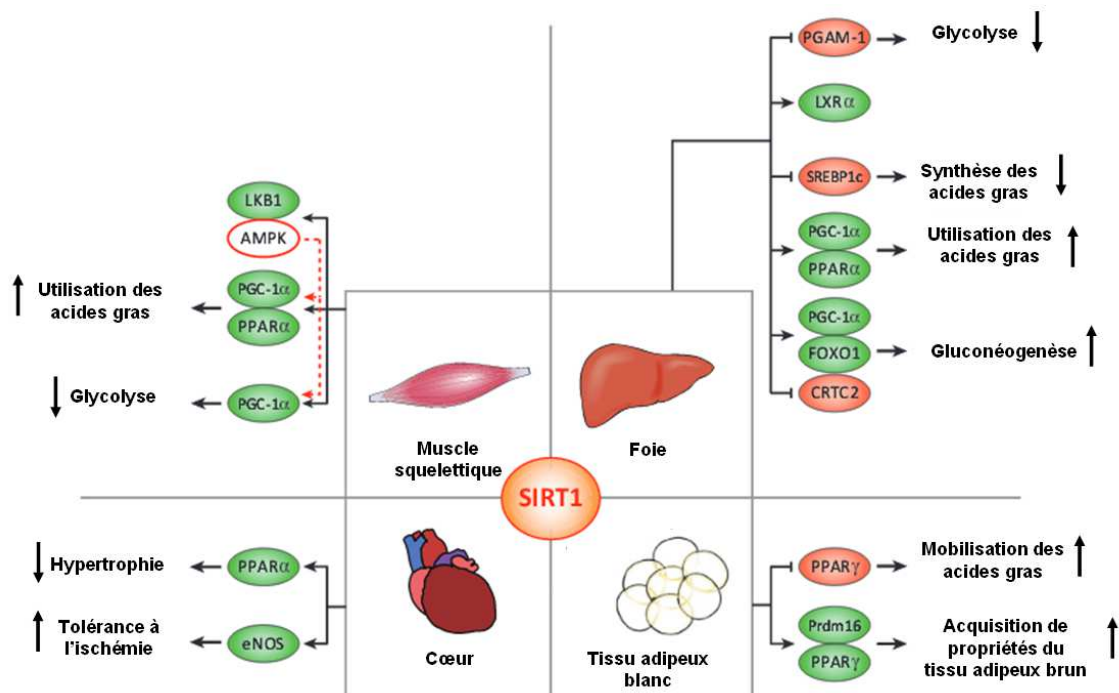


Figure 24 : Schéma des voies de signalisation métaboliques contrôlées par SIRT1 dans les différents tissus.

Les fonctions de SIRT1 dans les majeurs tissus métaboliques, tels que le foie, le cœur, le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique sont représentées dans cette figure. Dans le foie, SIRT1 active la gluconéogenèse via PGC-1 α et FOXO1, et facilite la dégradation de CRCT2 suite au jeun prolongé. SIRT1 inhibe la glycolyse à travers la répression de l'enzyme glycolytique PGAM-1. De plus, SIRT1 répond au jeun et favorise l'oxydation des acides gras via l'activation de PPAR α , inhibant la synthèse des acides gras en orientant SREBP1c vers la dégradation. SIRT1 est un régulateur positif de LXR, modulant ainsi l'homéostasie du cholestérol de l'organisme. Dans le muscle squelettique, SIRT1 exerce des actions similaires, augmentant l'utilisation des acides gras et réduisant la glycolyse comme décrit ci-dessus. Dans ce tissu, SIRT1 et AMPK se régulent positivement de façon réciproque. AMPK active SIRT1 en stimulant l'expression du gène codant pour NAMPT, enzyme responsable de la synthèse de NAD $^+$. SIRT1 active l'AMPK en désacétylant LKB1. Dans le tissu adipeux blanc, SIRT1 mobilise la graisse du tissu adipeux blanc via PPAR γ pour réguler l'utilisation des lipides dans le foie et le muscle. De plus, via la désacétylation de PPAR γ pour faciliter la liaison de Prdm16, SIRT1 régule l'acquisition par le tissu adipeux blanc de propriétés du tissu adipeux brun afin d'augmenter la dépense d'énergie. SIRT1 est dégradée suite à un régime riche en graisse via la caspase 1 activée, et peut être régulée positivement par l'adiponectine. SIRT1 est également bénéfique dans le cœur en augmentant la tolérance à l'ischémie via l'activation d'eNOS et en le protégeant contre l'hypertrophie via l'activation de PPAR α . Les cibles qui sont directement activées par SIRT1 sont montrées en vert. Celles qui sont réprimées ou inhibées par SIRT1 sont représentées en orange. Adapté de [396]

B. SIRT1 et HTAP

Plusieurs études ont montré que SIRT1 joue un rôle important dans le système vasculaire. Par exemple SIRT1, dont l'expression est induite par un flux lumineux *in vitro*, active eNOS, favorisant ainsi la production d'oxyde nitrique, puissant vasodilatateur et inhibiteur de la prolifération des CML [397]. SIRT1 améliore les fonctions endothéliales aussi en supprimant l'expression du récepteur de l'angiotensine II de type I dans les CML, empêchant ainsi la contraction vasculaire et l'augmentation de la pression artérielle [398]. L'amélioration de la fonction endothéliale par SIRT1 a été prouvée aussi *in vivo*. La surexpression de SIRT1 au niveau de l'endothélium prévient le développement de l'athérosclérose chez des souris susceptibles de développer cette maladie, nourries avec une alimentation riche en graisse [399]. SIRT1 exerce en outre des effets anti-inflammatoires dans les cellules endothéliales [400–402] permettant la réduction de l'expression de molécules d'adhésion endothéliales [402]. Il a été démontré que SIRT1 est aussi impliqué dans d'autres phénomènes qui protègent de l'athérosclérose, tels que la stabilisation des plaques athérosclérotiques [403, 404], la diminution de la capture du cholestérol et de la formation des cellules spumeuses [405] ou encore l'inhibition de l'expression et de l'activation du facteur du tissu endothélial qui induit l'agrégation des plaquettes et une augmentation du thrombus naissant [406].

Si le rôle de SIRT1 dans le système vasculaire systémique a été largement étudié, son rôle dans les vaisseaux pulmonaires, et notamment dans l'HTAP, demeure largement inconnu. Cependant, au regard de ce qui précède, SIRT1 pourrait jouer un rôle très important dans ce contexte. En effet, cette désacétylase est un régulateur clé du métabolisme énergétique qui induit l'activation de la biogenèse et des fonctions mitochondriales. D'un autre côté, les cellules vasculaires dérivant de patients atteints d'HTAP sont caractérisées par une réduction de leur capacité oxydative en faveur de la glycolyse, associée à diverses dysfonctions mitochondriales. L'hypothèse que la signalisation de SIRT1 pourrait être altérée dans l'HTAP semble donc tout à fait raisonnable. Effectivement, des travaux ont suggéré que SIRT1 pourrait être un régulateur négatif du développement de l'HTAP. Le resvératrol, polyphénol qui active plusieurs cibles, dont SIRT1, prévient en fait le développement de l'HTAP induit par la monocrotaline, via des actions antiprolifératives, anti-inflammatoires, et anti-oxydatives [407]. De plus, la fonction endothéliale est aussi améliorée dans les petites artères pulmonaires où l'expression d'eNOS est renforcée par le traitement avec le resvératrol [407]. Le traitement préventif avec le resvératrol empêche aussi l'hypertrophie du ventricule droit en diminuant en partie l'apoptose des cardiomyocytes et les dommages structuraux des

mitochondries induits par la monocrotaline [408]. Dans une autre étude, il a été montré que le resvératrol prévient non seulement le développement de l'HTAP induite par la monocrotaline, mais permet aussi sa régression ; ceci est associé au maintien de l'expression de l'ubiquitine ligase atrogin-1 (*atrophy-related E3 ubiquitin ligase*) qui est modulée par SIRT1 dans les CML-AP humaines [409]. Chen et ses collaborateurs [410] ont récemment exploré les effets du resvératrol dans le cadre d'une hypoxie chronique, montrant que le resvératrol normalise l'hypertrophie du ventricule droit chez des rat néonataux *in vivo*, et inhibe la prolifération des CML-AP humaines *in vitro*, ce qui est associé à une atténuation de l'induction de l'arginase [410]. Une étude très récente a avancé l'idée que SIRT1 pourrait jouer un rôle protecteur dans l'HTAP en montrant qu'une restriction calorique à courte terme améliore l'HTAP induite par la monocrotaline et que ces effets bénéfiques sont associés à l'activation de la voie de signalisation SIRT1/eNOS [411]. De plus, la surexpression de SIRT1 augmente la phosphorylation et, donc, l'activité d'eNOS, exerçant une protection similaire sur l'HTAP en absence de restriction calorique [411].

C. La régulation de l'activité de SIRT1

La régulation de l'activité de SIRT1 se produit à différents niveaux (figure 25). S'il a déjà été indiqué que sa localisation subcellulaire détermine en partie son activité, une régulation additionnelle est cependant nécessaire, étant donné que plusieurs sirtuines partagent les mêmes compartiments et qu'elles doivent pour autant agir sur des substrats spécifiques.

1. Régulation de son expression génique

L'expression de SIRT1 change selon les conditions physiologiques. Elle est induite quand les niveaux d'énergie sont faibles, par exemple lors d'une privation en nutriment [412], et réprimée quand les niveaux d'énergie sont excessifs, par exemple lors d'un régime riche en graisse [326]. L'analyse du promoteur de SIRT1 a révélé des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription : son expression est activée par FOXO1 [412], PPAR α [413], PPAR β [414] et CREB (*cAMP response element-binding*) [415], alors qu'elle est réprimée par PPAR γ [416] et CHREBP (*carbohydrate response element-binding protein*) [415]. La transcription de SIRT1 est aussi réprimée par HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) [417] et l'enzyme de réparation de l'ADN poly(ADP-ribose) polymérase 2 [418].

A un niveau différent de régulation, les micro-ARNs (miRs) modulent les niveaux d'ARNm via la dégradation du transcrit primaire ou l'inhibition de sa traduction. Ainsi, le miR-34a

murin réprime l'expression de SIRT1 suite à un stress génotoxique [419]. De façon intéressante, l'inhibition de SIRT1 induite par miR-34a est accentuée dans l'obésité due à un régime riche en graisse [420], suggérant que cette interaction est physiologiquement pertinente. Le miR-199a réprime également l'expression de SIRT1 et celle du senseur d'oxygène HIF-1 α [350]. Durant l'hypoxie, miR-199a est régulé en baisse dans les cardiomyocytes, permettant ainsi l'expression de SIRT1 et HIF-1 α , et, par conséquent, la stabilisation de p53 et la diminution de l'apoptose [421].

2. Régulation par des modifications post-traductionnelles

La régulation de l'activité de SIRT1 par des modifications post-traductionnelles est peu connue. Néanmoins, plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés [422]. Le complexe cycline B–CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*) lie SIRT1 et le phosphoryle *in vitro*. Des mutations dans les sites de phosphorylation perturbent la progression normale du cycle cellulaire, même si les voies impliquées dans cet effet de SIRT1 sur la prolifération restent inconnues [422]. SIRT1 est aussi phosphorylée sur trois résidus par JNK (*JUN N-terminal kinase*), notamment durant le stress oxydatif [423]. Cela provoque la désacétylation de l'histone H3, mais pas celle de p53 [423], suggérant que la phosphorylation dirige SIRT1 vers des cibles spécifiques. Il a été montré que la phosphorylation par cette kinase augmente seulement de manière transitoire l'activité de SIRT1, étant donné qu'elle rend cette désacétylase plus sujette à l'ubiquitination et, donc, à la dégradation [424]. De plus, les kinases *Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1* (DYRK1) et 3 (DYRK3) phosphorylent SIRT1 au niveau de la Thr522 [425], occasionnant une augmentation de la désacétylation de p53 par SIRT1 et empêchant l'apoptose dans le cadre d'un stress génotoxique [425].

SIRT1 est aussi sujette à la sumoylation, qui augmente l'activité de SIRT1 dans des cellules en culture [426]. Suite à un stress génotoxique, comme la lumière ultraviolette ou le H₂O₂, l'enzyme desumoylant SENP (*sentrin-specific protease*) inactive SIRT1, favorisant la mort cellulaire [426]. Shinozaki et ses collaborateurs [427] ont récemment montré que SIRT1 peut aussi être nitrosylée et ainsi inhibée suite à un stimulus inflammatoire, ce qui a pour conséquence l'activation de p53 et p65 et donc la stimulation de la réponse proinflammatoire et de l'apoptose. Enfin, la méthyltransférase Set7/9 méthyle et inhibe SIRT1, prévenant son interaction avec p53 [428].

3. Régulation par la formation de complexes

Les sirtuines sont aussi régulées via la formation de complexes avec d'autres protéines.

AROS (*active regulator of SIRT1*) est la seule protéine connue pour réguler positivement SIRT1 suite à la formation d'un complexe qui mène à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la cible de SIRT1, p53 [429]. Plusieurs régulateurs négatifs ont en revanche été décrits. NCoR1 (*nuclear receptor co-repressor 1*) et SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*) forment un complexe avec SIRT1 et PPAR γ en condition de privation pour inhiber l'induction de l'adipogenèse contrôlée par PPAR γ [391].

DBC1 (*deleted in breast cancer 1*) lie le domaine catalytique de SIRT1 et inhibe son activité *in vitro* suite à un stress génotoxique [430, 431]. La pertinence physiologique du complexe DBC1–SIRT1 a été confirmé puisque la formation du complexe est inhibée durant la restriction calorique mais augmentée chez les souris sont maintenues en régime riche en graisse [432].

4. Régulation par le NAD⁺

Il a déjà été mentionné que les sirtuines dépendent du cofacteur NAD⁺ pour leur activité et il n'est donc pas surprenant que la disponibilité du NAD⁺ soit un point crucial de la régulation. Les niveaux de NAD⁺ augmentent dans le muscle, le foie et le tissu adipeux blanc durant la privation, la restriction calorique et l'exercice [322, 359], occasionnant l'activation de SIRT1. A l'inverse, un régime riche en graisse chez les souris réduit le rapport NAD⁺/NADH [433]. La disponibilité du NAD⁺ est aussi modulée par sa synthèse. La biosynthèse *de novo* se fait à partir du tryptophane et a essentiellement lieu dans le foie et dans le rein (pour une revue [321]). Néanmoins, le NAD⁺ peut aussi être synthétisé à partir de l'acide nicotinique (via la voie Preiss–Handler) ou du nicotinamide (à travers la voie de sauvetage) qui sont tous deux présents dans l'alimentation humaine sous la forme de la vitamine B3 [434]. De façon intéressante, il a récemment été montré que le nicotinamide riboside, qui est présent dans le lait et est déjà connu comme étant un activateur de la synthèse de NAD⁺ dans les bactéries, agit comme un précurseur du NAD⁺ et comme activateur de la synthèse du NAD⁺ dans la voie de sauvetage des cellules eucaryotes [435]. En outre, le traitement avec un autre précurseur de NAD⁺, le nicotinamide mononucléotide, active SIRT1 et améliore la tolérance au glucose chez les souris [436], même si il faut préciser que ce précurseur n'est pas présent dans le régime humain.

En plus de la biosynthèse, la manipulation des activités des enzymes consommant NAD^+ peut aussi altérer les niveaux de NAD^+ , régulant ainsi l'activité des sirtuines. Les poly(ADP-ribose) polymérasés (PARPs) sont considérées comme les principales enzymes dégradant le NAD^+ [437, 438]. Dès lors qu'elles sont activées par des dommages à l'ADN, ces enzymes catalysent le transfert d'unités d'ADP-ribose du NAD^+ à des protéines substrats pour former des polymères branchés d'ADP-ribose, menant au déclin des niveaux intracellulaires de NAD^+ . Etant donné que SIRT1 et PARPs utilisent la même réserve intracellulaire de NAD^+ , un lien fonctionnel entre PARPs et SIRT1 a été proposé. Deux études récentes ont révélé que la délétion de PARP1 et PARP2 active SIRT1 chez la souris et conduit à une augmentation du nombre de mitochondries, à une augmentation de la dépense d'énergie et à la protection de l'obésité induite par le régime [418, 439]. Les délétions de PARP1 et PARP2 activent SIRT1 selon deux mécanismes distincts : la délétion de PARP1 augmente les niveaux intracellulaires de NAD^+ , et la délétion de PARP2, qui est un répresseur de l'expression de SIRT1, augmente l'expression de SIRT1. Le traitement de cellules ou de souris avec l'inhibiteur pan-PARP PJ34 conduit aussi à l'activation de SIRT1, suivant ces mêmes mécanismes [439]. La délétion de CD38 (*cluster of differentiation 38*), un autre consommateur important de NAD^+ , augmente aussi les niveaux de NAD^+ et l'activité de SIRT1 [440]. CD38 catalyse la synthèse et hydrolyse de l'ADP-ribose cyclique du NAD^+ à ADP-ribose, produit étant impliqué dans la régulation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique [441]. De façon intéressante, des inhibiteurs spécifiques de CD38 ont été développés [442] et ouvrent, avec les inhibiteurs de PARPs, de nouvelles possibilités pour activer pharmacologiquement certaines sirtuines.

5. Composés régulant l'activité des sirtuines

Des **activateurs** naturels de SIRT1 ont été identifiés et ont permis d'affiner les connaissances relatives à la régulation des sirtuines [443]. Plusieurs polyphénols issus de plantes, notamment le resvératrol, peuvent induire, *in vitro*, l'activation de Sir2. Le traitement de la levure avec ces composés augmente sa durée de vie [376]. Le resvératrol augmente l'activité de SIRT1 et stimule aussi la fonction mitochondriale chez la souris [356, 357], la protégeant de l'obésité induite par le régime et améliorant la performance à l'exercice et la résistance au froid [357]. Quand les souris nourries avec un régime riche en graisse sont traitées avec le resvératrol, elles vivent en outre plus longtemps [356, 444]. Il a été montré que le resvératrol améliore l'activité mitochondriale et le contrôle métabolique également chez l'homme [445].

Plusieurs composés synthétiques capables d'activer SIRT1, appelés Stacs (*sirtuin activating compounds*), ont été décrits. Un de plus utilisé *in vivo* est SRT1720 [377], qui, similairement au resvératrol, protège contre l'obésité induite par le régime via l'amélioration de la fonction mitochondriale [358] et augmente la durée de vie des souris obèses [360]. Bien que les effets physiologiques du resvératrol et de SRT1720 soient largement acceptés, le mécanisme par lequel ils activent SIRT1 est encore largement débattu [410, 411, 496–499, 500].

Il a été suggéré que le resvératrol activerait l'AMPK au lieu d'activer SIRT1 [356, 358]. En accord avec cela, l'effet du resvératrol sur l'activité mitochondriale et le contrôle métabolique est perdu chez les souris déficientes en AMPK [359, 449], même si cela ne démontre pas forcément une interaction directe AMPK–SIRT1. Cependant, la même étude a montré que le resvératrol augmente le ratio NAD^+/NADH d'une façon dépendante de l'AMPK, permettant l'activation des sirtuines en aval [449]. Par analogie, des agonistes de l'AMPK, tels que le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR), augmentent les niveaux de NAD^+ et activent la désacétylation de PGC-1 α dépendante de SIRT1 [322]. Des expériences ont révélé que l'activation de l'AMPK par l'exercice ou la restriction calorique précède une augmentation des niveaux de NAD^+ et l'activation de SIRT1 [359].

Les effets bénéfiques de l'activation de SIRT1 observés chez plusieurs modèles animaux ont favorisé la découverte et la conception d'activateurs pharmacologiques des sirtuines, vraisemblablement comme mimétiques de la restriction calorique. Dans le même temps, des **inhibiteurs** des sirtuines ont été proposés pour le traitement de quelques cancers, où SIRT1 est surexprimé [451–453], de la maladie de Parkinson [454], et de l'infection du VIH [455]. Le sirtinol a été identifié dans un test cellulaire pour sa capacité à inhiber la Sir2 de levure et la SIRT2 humaine *in vitro* [456]. Deux analogues, le *m*- et le *p*-sirtinol, sont de 2 à 10 fois plus puissants que le sirtinol contre la SIRT1 et la SIRT2 humaines [457]. Parmi les autres inhibiteurs de la SIRT1 il est possible de citer la suramine [458] et le cambinol [459], qui inhibent aussi la SIRT2 [458] et la SIRT5 [460], et les dérivés de l'indole (EX-527).

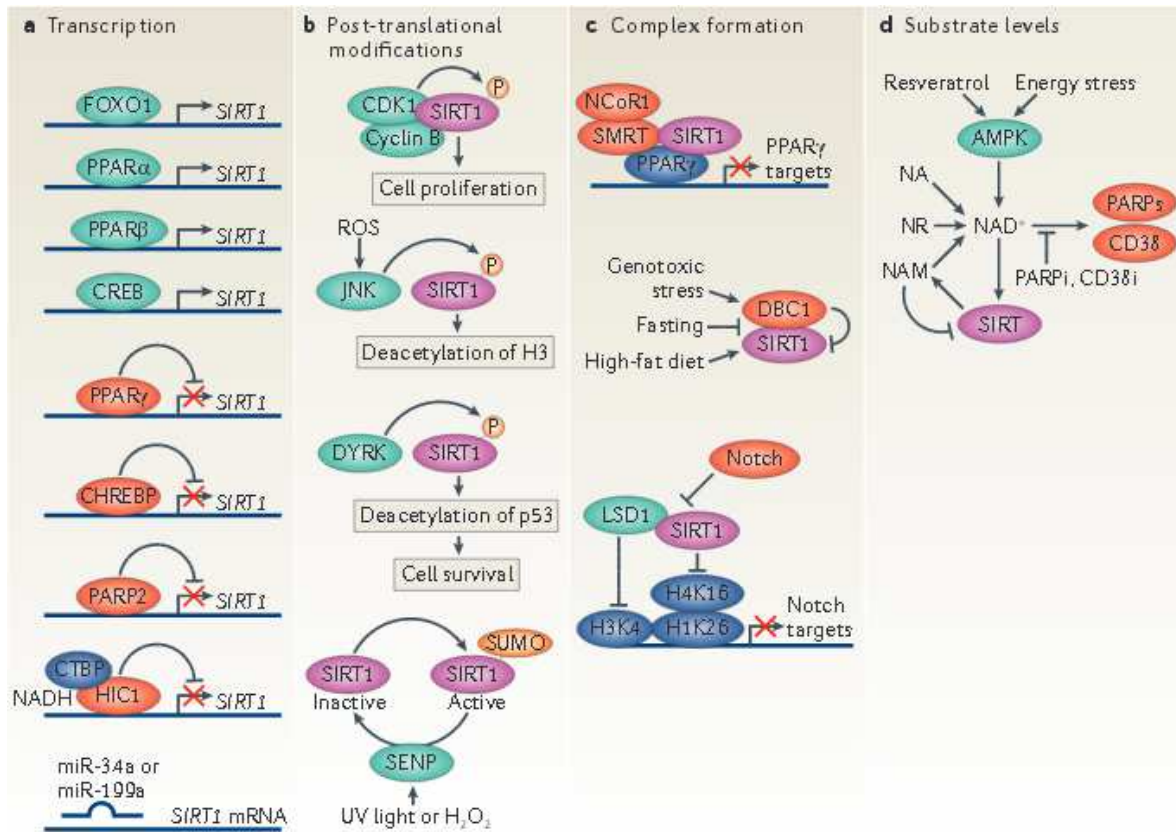


Figure 25 : Représentation schématique des mécanismes régulant l'activité de SIRT1.

a) L'expression de SIRT1 est régulée par divers facteurs de transcription. Notamment, FOXO1 (*forkhead box O1*), PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor a*), PPAR β et CREB (*cAMP response element-binding*) la modulent positivement, alors que PPAR γ , CHREBP (*carbohydrate response element-binding protein*), PARP2 (*poly(ADP-ribose) polymerase 2*) et HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) la répriment. L'expression de SIRT1 est aussi inhibée par les microARNs miR-34a et miR-199a. b) Des modifications post-traductionnelles réversibles influencent l'activité de SIRT1. Le complexe cycline B-CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*) phosphoryle SIRT1, permettant ainsi la progression dans le cycle cellulaire. L'activation de la kinase JNK (*JUN N-terminal kinase*) par les espèces réactives de l'oxygène engendre la phosphorylation de SIRT1, suivie par la désacétylation de l'histone H3. DYRK1 (*dual specificity Tyr-phosphorylated and regulated kinase 1*) et DYRK3 activent SIRT1 en la phosphorylant, menant à la désacétylation de p53 et, donc, à une augmentation de la survie cellulaire. Un stress génotoxique, tel que la lumière ultraviolette (UV) ou l'exposition au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) occasionne la désumoylation de SIRT1 par SENP (*senptrin-specific protease*), inactivant ainsi SIRT1. L'enzyme responsable de la sumoylation activatrice de SIRT1 est inconnue. c) La formation de complexes avec d'autres protéines influence l'activité enzymatique de SIRT1. NCoR1-SMRT (*nuclear receptor co-repressor 1-silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) et SIRT1 inhibent l'activité transcriptionnelle de PPAR γ . Un stress génotoxique et métabolique (régime riche en graisse) induit la formation du complexe DBC1 (*deleted in breast cancer 1*)-SIRT1, menant à l'inactivation de SIRT1. Le complexe LSD1 (*Lys-specific demethylase 1*)-SIRT1 réprime l'expression des cibles de Notch via la déméthylation et désacétylation d'histones spécifiques, mais cet effet est contrebalancé par l'activation de la voie Notch. d) Les niveaux du cofacteur NAD⁺ influencent profondément la fonction de SIRT1. Le contenu en NAD⁺ est augmenté en présence des précurseurs NA (*nicotinic acid*), NAM (*nicotinamide*) ou NR (*nicotinamide riboside*) par l'activation de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) suite à des situations telles qu'un stress énergétique, le traitement avec l'activateur de l'AMPK resvératrol ou l'inhibition de la consommation de NAD⁺ par les inhibiteurs de PARP ou CD38 (PARPi or CD38i, respectivement). L'élévation des niveaux de NAD⁺ conduit à l'activation de SIRT1, qui à son tour mène à la génération de nicotinamide à partir de NAD⁺. Le nicotinamide peut aussi inhiber SIRT1 via un mécanisme de rétrocontrôle négatif. De [461]

Objectifs de l'étude

Au travers de cette introduction, l'HTAP apparaît comme une pathologie très complexe, dont le développement peut être influencé par un fond génétique, des mécanismes de déclenchement tel que l'inflammation et/ou des facteurs environnementaux. Sa complexité est démontrée par l'absence à ce jour de traitements étiologiques ou pathogéniques capables de soigner cette maladie.

Néanmoins, des études récentes ont mis en évidence un rôle important de la mitochondrie et du métabolisme dans la pathogénèse de l'HTAP. En effet, les CML-AP de patients présentent un remodelage métabolique caractérisé par une réduction de l'oxydation phosphorylante mitochondriale associée à une augmentation de la glycolyse même en présence d'oxygène. Ce remodelage est accompagné par diverses dysfonctions mitochondriales, notamment une raréfaction du réseau mitochondrial, qui engendrent l'activation de plusieurs voies de signalisation convergeant vers l'augmentation de la prolifération et la résistance à la mort cellulaire.

La désacétylase SIRT1 est un important régulateur métabolique, notamment via l'activation du régulateur clé de la biogenèse mitochondriale PGC-1 α , dont l'expression est diminuée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP. Ainsi, la question d'une possible implication de SIRT1 dans la pathogénèse de l'HTAP se pose.

Différentes études [407–411] suggèrent en effet un rôle protecteur de SIRT1 dans l'HTAP, au regard de l'effet bénéfique obtenu suite à son activation par le resvératrol ou la restriction calorique. Néanmoins, il est important de noter que ces deux activateurs possèdent un large éventail de cibles [462, 463], et que ces études n'explorent pas les effets métaboliques de SIRT1 sur le développement de l'HTAP. En général, l'implication de SIRT1 dans l'hyperprolifération des CML-AP n'a pas été étudiée.

Les objectifs principaux de cette étude ont donc été les suivants :

- **l'étude de l'état d'activation de SIRT1 dans les CML-AP humaines et de rat en hyperprolifération ;**
- **l'exploration du possible rôle causal de SIRT1 dans la prolifération des CML-AP, au moyen d'outils pour réguler cette désacétylase de façon spécifique ;**
- **l'investigation des effets potentiels de l'absence génétique de SIRT1 dans le remodelage vasculaire *in vivo* ;**

- **l'analyse des voies métaboliques pouvant contribuer à l'effet de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP.**

Matériel et méthodes

Modèles *in vitro*

A. Culture primaire de cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire de rat

Les cultures primaires de cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire (CML-AP) de rat sont dérivées de rats Wistar mâles de 250-300 g. Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (100 mg/kg). L'ensemble constitué de la trachée, du cœur et des poumons est rapidement isolé et rincé dans une solution de Krebs (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,17 mM MgSO₄, 1,18 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucose) froide. En utilisant des ciseaux et des pinces de dissection, l'artère pulmonaire est isolée, transférée dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) préalablement chauffé et supplémenté avec 1% antibiotique/antimycotique et dénudée de l'adventice résiduelle. L'artère pulmonaire est ensuite coupée en petits morceaux et incubée dans du DMEM 1% antibiotique/antimycotique enrichi de collagénase de type I (150 U/ml) et d'élastase (0,125 mg/ml) à 37°C pendant 90 minutes sous agitation. Le lysat tissulaire obtenu est ensuite homogénéisé et filtré à 70 µm. Les CML-AP sont collectées après une centrifugation de 5 minutes à 300 g, resuspendues dans du DMEM contenant 15% de SVF (sérum de veau fœtal) et 1% antibiotique/antimycotique, et ensemencées dans une flasque de 25-cm² tapissée de collagène I. Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère de 95% d'air et 5% CO₂ jusqu'à la sous-confluence, puis trypsinisées et transférées sur des flasques de 75-cm². Le milieu est changé tous les 2 jours. Chaque support de culture est préalablement tapissé de collagène I (50 µg/ml in 0,02 N acide acétique) par une incubation d'une heure à température ambiante ; avant d'ensemencer les cellules, les supports sont rincés une fois avec du PBS (*phosphate buffered saline*).

Toutes les expériences sont effectuées entre le 2^{ème} et le 6^{ème} passage.

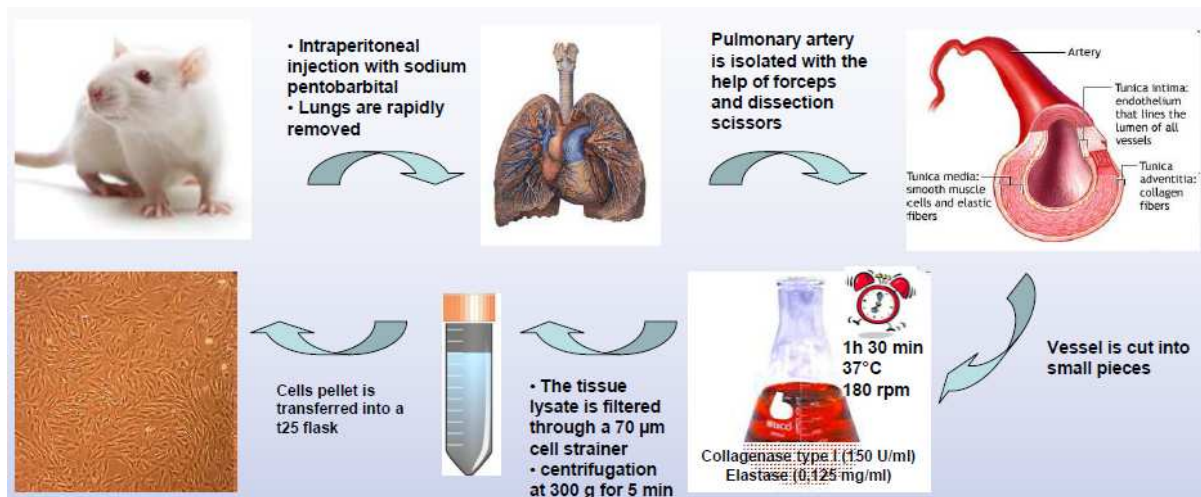


Figure 26 : Représentation schématique de la procédure d'isolement des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire de rat.

L'artère pulmonaire isolée des poumons de rats Wistar est dénudée du tissu adventitial résiduel, coupée en petit morceaux et sujette à une digestion enzymatique par la collagénase de type I (150 U/ml) et l'élastase (0,125 mg/ml) pendant 90 minutes à 37°C. Le lysat est ensuite filtré à 70 µm, les CML-AP sont collectées après une centrifugation de 5 minutes à 300 g et ensemencées dans une flasque de 25-cm².

B. Culture des cellules humaines de muscle lisse de l'artère pulmonaire

Les CML-AP humaines ont gracieusement été fournies par nos collaborateurs de l'unité Inserm UMR-S999 du Centre Chirurgical Marie Lannelongue. Ces cellules sont obtenues à partir d'explants d'artère pulmonaire (diamètre: 5-10 mm) de patients atteints d'HTAP idiopathique (CML-AP-HTAP) ou d'autres maladies pulmonaires, notamment de cancer (contrôles, CML-AP-CTL). Ces explants sont réalisés lors de prélèvements chirurgicaux et sont stockés dans du DMEM à 4°C pendant 48 heures maximum. L'intima et le tissu adventitial résiduels sont ensuite enlevés à l'aide de pinces. La média des vaisseaux est coupée en petits morceaux (3-5 mm²), qui sont transférés dans des flasques de culture cellulaire. Pour permettre la prolifération des CML-AP, les tissus vasculaires sont incubés dans un milieu complet composé de DMEM contenant glucose (4,5 g/L), SVF (15%), L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), EGF (10 U/ml), insuline transferrine sélénium 1X, antibiotiques (penicilline 100 U/ml et streptomycine 0,1 mg/ml) et un fongicide (fungizone 0,05 mg/ml). Après 2 semaines d'incubation environ, les CML-AP collectées dans le milieu de culture et le tissu vasculaire sont transférés sur de nouvelles flasques. Les explants de la même artère pulmonaire sont transférés plusieurs fois [464]. Les CML-AP, qui nous sont fournies congelées entre le 2ème et le 3ème passage, sont utilisées jusqu'au 6ème passage.

1. Phénotypage des CML-AP de rat

Cinquante mille CML-AP de rat sont ensemencées dans des plaques de 12 puits contenant des lamelles en verre de 18 mm de diamètre, et incubées 24 heures à 37°C pour permettre leur adhésion. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, fixées pendant 15 minutes avec du PBS froid supplémenté avec 4% de paraformaldéhyde (pH 7,4), puis elles sont perméabilisées avec du PBS enrichi de 0,2% TRITON X-100 pendant 5 minutes.

L'autofluorescence qui peut dériver d'aldéhydes libres est prévenue par une incubation avec du NH₄Cl (50 mM dans du PBS) pendant 30 minutes.

Les sites non spécifiques sont bloqués dans du PBS supplémenté de 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 45 minutes sous agitation lente (10 rpm/min). L'incubation avec l'anticorps primaire est effectuée pendant la nuit à 4°C sous agitation lente. Pour vérifier le phénotype musculaire lisse des CML-AP, les anticorps suivants, dilués dans 500 µl de PBS additionné de 1% de BSA, sont utilisés :

- α actine du muscle lisse (Acris antibodies, AP16262PU-N, 2,5 µg/ml) ;
- calponine (Santa Cruz, sc-28545, 1 : 200), autre composant des filaments fins de l'appareil contractile des CML ;
- transgeline (Santa Cruz, sc-50446, 1 : 50), protéine liant l'actine faisant partie de la famille des calponines.

Pour chacun des anticorps secondaires un contrôle négatif est réalisé au moyen d'un puits contenant 500 µl de PBS avec 1% de BSA exempt d'anticorps primaire.

Les cellules sont ensuite incubées, sous agitation lente et dans l'obscurité (pour protéger la sonde couplée à l'anticorps), avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure.

Enfin, une incubation de 5 minutes sous agitation lente avec 4µM de Hoechst est réalisée afin de marquer les noyaux.

Les incubations ci-dessus, à moins qu'il ne soit spécifié autrement, sont effectuées à température ambiante. En outre, entre chaque étape, trois lavages avec du PBS sont effectués.

Les lames, montées sur une goutte de milieu de montage mowiol, sont stockées dans l'obscurité à 4°C jusqu'à leur visualisation au microscope confocal TCS SP8-gated STED Leica.

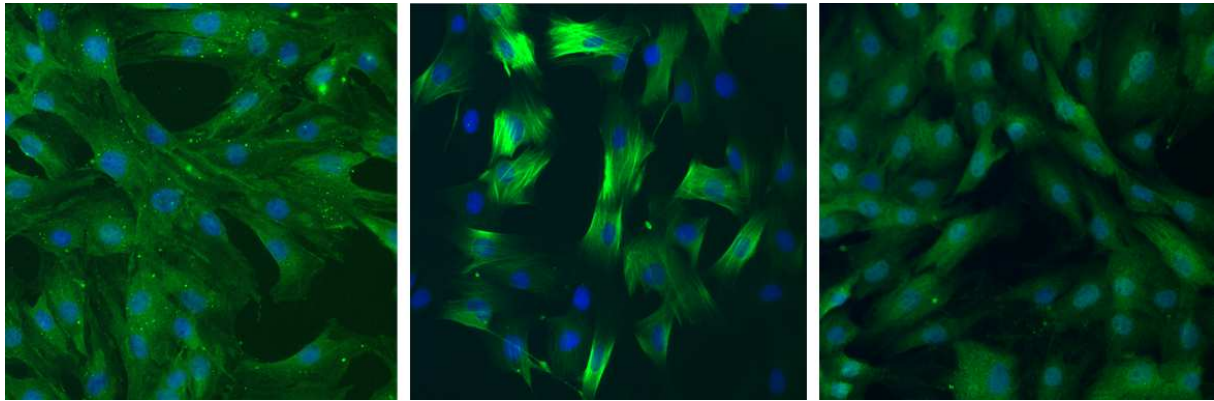


Figure 27 : Images représentatives du phénotypage des CML-AP de rat.

Le marquage de l' α -actine du muscle lisse (à gauche), de la calponine (au centre) et de la transgeline (à droite), trois protéines spécifiques du muscle lisse, a permis de vérifier le phénotype musculaire lisse des cellules isolées de l'artère pulmonaire de rat.

2. Transfection transitoire des cellules

Pour diminuer l'expression de SIRT1 dans les CML-AP, une transfection inverse est effectuée. Les cellules sont ensemencées dans un milieu de transfection (Santa Cruz, sc-36868) contenant un réactif de transfection (Santa Cruz, sc-29528) et un mélange de trois ARN d'interférence (siARN) dirigés spécifiquement contre SIRT1 (siSIRT1, Santa Cruz, sc-108043 pour les CML-AP de rat et sc-40986 pour les CML-AP humaines) ou n'ayant pour cible aucun ARNm connu (control siARN-A, sc-37007). De manière plus détaillée, une solution contenant le milieu de transfection (8 μ l) et le réactif de transfection (0,48 μ l) (solution A) ainsi qu'un volume similaire du milieu de transfection supplémenté par 5 pmol du siARN (solution B) sont préparés. La solution A est ajoutée à la solution B et ce mélange est incubé pendant 45 minutes à température ambiante dans l'obscurité, et est ensuite dilué dans du milieu de transfection pour obtenir un volume final de 48 μ l. Les volumes définis ci-dessus sont utilisés pour la transfection de 20 000 CML-AP de rat ou 15 000 CML-AP humaines, dans un puits d'une plaque 96 puits. Les cellules sont centrifugées, lavées une fois avec du milieu de transfection, et resuspendues avec le mélange A+B, pour ensuite être ensemencées. Six heures après la transfection, 48 μ l de DMEM supplémenté de 30% de SVF et 2% antibiotique/antimycotique sont ajoutés au milieu de transfection. Vingt-quatre heures après le début de la transfection, les cellules transfectées avec le siARN contrôle ou dirigé contre SIRT1 sont rincées puis cultivées 24 heures dans un milieu contenant 0,5% de SVF ; les cellules ensuite sont traitées. Le taux de transfection, évalué par cytométrie en flux en utilisant un siARN couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine FITC (Santa Cruz, sc-36869), est d'environ 60%. L'évaluation de l'efficacité de la transfection par détection de la protéine SIRT1 indique qu'après 48 heures de transfection, et donc au moment où le traitement est

appliqué, la quantité de cette désacétylase est réduite de 70% dans les CML-AP de rat et de 85% dans les CML-AP-CTL humaines ; ce niveau reste en outre stable jusqu'à la fin du traitement qui dure 24 heures.

3. Infection des cellules

Pour augmenter l'expression de SIRT1 dans les CML-AP, une infection par adénovirus est réalisée. Trois mille CML-AP de rat par puits sont alorsensemencées dans des plaques 96 puits et incubées pendant 24 heures à 37°C pour permettre leur adhésion. Cent microlitres de milieu de culture composé de 0,5% SVF et 1% antibiotique/antimycotique et contenant 300 000 particules virales sont ensuite ajoutés par puits. Les cellules sont notamment infectées par des adénovirus de sérotype 5 surexprimant la β galactosidase, utilisés en tant que contrôle, ou par des adénovirus surexprimant la séquence codant la forme sauvage de la SIRT1 murine (Vector Biolabs). La MOI (*multiplicity of infection*) utilisée, c'est-à-dire le rapport entre les adénovirus utilisés et le nombre de cellules à infecter, est de 100. Vingt-quatre heures après le début de l'infection les cellules sont stimulées, et après 24 heures supplémentaires la prolifération est mesurée au moyen du test WST-1. L'efficacité de l'infection est évaluée par détection de la protéine SIRT1 après 24 heures d'infection, et donc au moment où le traitement est appliqué : le niveau protéique est augmenté de 470%, et reste stable jusqu'à la fin du traitement.

4. Stimulation des cellules

Après 24 heures d'incubation dans le milieu contenant 0,5% de SVF et 1% antibiotique/antimycotique, les CML-AP sont pré-incubées avec l'un des composés suivants : STAC-3 10 μ M (Santa Cruz, sc-222315), sirtinol 5 μ M (Santa Cruz, sc-205976) et SRT1720 1 μ M (APExBIO A4180). L'incubation est réalisée, dans ce même milieu additionné de 0,5% de SVF et 1% antibiotique/antimycotique pendant 2 heures. Les cellules contrôles sont traitées avec le même volume de diméthylsulfoxyde qui est le solvant utilisé pour solubiliser les composés, La prolifération de ces CML-AP de rat est ensuite induite avec du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (10 nM) pendant 24 heures. Etant donné que les CML-AP dérivées de patients HTAP gardent leur phénotype hyperprolifératif en culture, aucune molécule n'est utilisée pour stimuler leur croissance.

Vingt-six heures après le début de la pré-incubation, soit la prolifération cellulaire est mesurée, soit les cellules sont rincées deux fois avec du PBS préalablement chauffé avant

d'être congelées et stockées à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures, soit ces cellules sont marquées pour être ensuite observées au microscope confocale.

5. Etude de la prolifération des CML-AP

a) Incorporation du BrdU

L'incorporation du BrdU, un analogue de la thymidine qui est un composant de l'ADN, a été évaluée à l'aide d'un kit commercial (Millipore, 2750). Pour faire court, le BrdU a été ajouté au milieu de culture juste après l'induction de la prolifération avec le PDGF. Après les 24 heures de stimulation, les cellules (20 000 CML-AP de rat ou 15 000 CML-AP humaines par puits dans de plaques p96) ont été fixées et perméabilisées pour permettre l'entrée de l'anticorps primaire dirigé contre le BrdU. Un anticorps secondaire couplé à la peroxydase a alors permis, après ajout de son substrat, d'estimer la quantité de BrdU en mesurant l'absorbance à 450 nm ; ceci a ainsi permis de révéler les cellules en réplication dans chaque condition.

b) WST-1 (Water Soluble Tetrazolium salt)

Le WST-1 est un sel de tétrazolium stable qui est clivé en formazan par des déshydrogénases mitochondriales. Après 24 heures d'incubation avec le PDGF, les cellules (3 000 par puits d'une plaque p96) sont incubées avec le WST-1 (Roche, 11644807001) pendant 4 heures. A l'issue de cette incubation, le formazan produit est quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre. Sachant que le clivage du WST-1 n'est réalisé que par des enzymes actifs, la quantité de formazan est un index du nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture.

c) Comptage de cellules

Pour réaliser le comptage de cellules, 30 000 CML-AP de rat sontensemencées dans des plaques de 24 puits (p24). Après 24 heures de stimulation avec le PDGF, les cellules sont trypsinisées et comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, un hématimètre. Au moins 3 comptages par puits sont effectués.

d) Détection de PCNA

La prolifération des CML-AP est aussi évaluée via la détection par Western blot de PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*), une protéine faisant partie de la famille de clamps glissant, dont le rôle est d'augmenter la processivité des ADN polymérases réplcatives. Son niveau d'expression est ainsi un index de l'état de prolifération cellulaire : la réplication d'ADN est d'autant plus importante que l'expression de cette protéine est élevée.

6. Etude de la mortalité des CML-AP

La sonde fluorescéine diacétate a été utilisée pour mesurer le taux de mortalité cellulaire ; la nécrose pour sa part a spécifiquement été évaluée avec l'iodure de propidium. Après traitement, les cellules ont été incubées avec 0,1 µg/ml de fluorescéine diacétate pendant 10 min à température ambiante. Une concentration finale de 10 µg/ml d'iodure de propidium est ajoutée à chaque échantillon quelques minutes avant la mesure au cymomètre Cell Lab Quanta MPL (Beckman Coulter, Villepinte, France). Pour chaque échantillon, au moins 7 500 cellules sont analysées. Les débris et les agrégats cellulaires sont exclus de l'analyse. Le fluorescéine diacétate est clivé par les estérases cellulaires, ce qui libère le produit fluorescent (la fluorescéine). Ainsi, seules les cellules vivantes peuvent être fluorescentes puisque les estérases ne sont plus actives dans les cellules mortes. En ce qui concerne l'iodure de propidium, seules les cellules nécrotiques, qui ont perdu leur intégrité membranaire, peuvent être marquées par cette molécule fluorescente s'intercalant entre les acides nucléiques (ADN et ARN).

7. Observation du réseau mitochondrial

Les cellules sontensemencées sur des lames de 18 mm de diamètre tapissées de collagène I et incubées toute la nuit à 37°C. Après 24 heures d'incubation dans un milieu contenant 0,5% de SVF puis 24 heures de stimulation, les cellules sont mises en présence de Mito-Tracker Orange (500 nM) à 37°C pendant 15 minutes afin de marquer les mitochondries. Pour marquer la cellule entière, la calcéine AM (*aceto-methoxy*) (1 µM) est ajoutée et incubée à 37°C pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 min à 37°C, traitées avec 50 mM de NH₄Cl pendant 5 min à température ambiante et montées à l'aide du milieu de montage mowiol.

La fluorescence est observée à l'aide d'un microscope confocal Carl Zeiss LSM-510. Le Mito-Tracker Orange et la calcéine sont respectivement excités à une longueur d'onde de 568nm et 488nm, et leur fluorescence est récupérée à une longueur d'onde de 570nm et 515-530nm.

Après la reconstruction en trois dimensions des cellules à partir d'une série d'images de chaque cellule à différentes hauteurs, les données sont importées et subissent une déconvolution à l'aide du logiciel AutoDeblur AutoVisualize (MediaCybernetics, Bethesda, MD). Les images ainsi traitées sont alors analysées par le logiciel IMARIS (Bitplane Company, Zurich) qui, grâce à une fonction permettant la reconnaissance d'objets, est capable

de reconnaître chaque mitochondrie de la cellule analysée et d'en donner les caractéristiques telles que le volume, la surface et la sphéricité. La fluorescence émise par la calcéïne permet un calcul précis du volume cellulaire par ce même logiciel. Les informations délivrées par IMARIS permettent ainsi de faire des tests statistiques sur l'ensemble de la population mitochondriale de la cellule.

8. Extraction d'ARN messager et analyse de PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les ARNs totaux sont extraits des cellules en ayant recours à la procédure standard du TRIzol (phénol + guanidine isothicyanate, Molecular Research Center). Le protocole est composé des étapes successives que sont l'homogénéisation, la séparation des phases, la précipitation, le rinçage et enfin la solubilisation des ARNs.

La solution de TRIzol est répartie à raison de 1 ml par boîte de Petri de 60 mm de diamètre (300 000 CML-AP) ; après avoir gratté les CML-AP, la suspension obtenue est transférée dans un tube conique contenant des billes en céramique (MoBio) pour être broyée à l'aide d'un microbroyeur Precellys 24 (Bertin Technologies) ; la procédure de broyage s'effectue selon deux séquences de 5 secondes avec 5 secondes d'une pause intermédiaire.

Un volume de 200 µl de chloroforme est alors ajouté à l'homogénat ; après une agitation vigoureuse, les échantillons sont centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La centrifugation permet la séparation de trois phases : une phase inférieure organique rose claire correspondant au phénol-chloroforme contenant les protéines, une interphase blanche correspondant à l'ADN génomique et une phase aqueuse supérieure incolore contenant les ARNs.

La précipitation des ARNs est ensuite permise par l'ajout de 500 µl d'alcool isopropylique à la phase aqueuse. Après une incubation à -20°C durant la nuit, les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 g à 4°C : les ARNs forment alors un culot blanc. Ce culot d'ARNs est rincé deux fois avec de l'éthanol à 75%, et ensuite séché à l'air libre pendant 15 minutes à température ambiante. Les ARNs sont resuspendus dans 15 µl d'eau exempte de nucléases.

La quantité et la qualité des ARNs sont vérifiées en mesurant l'absorbance aux longueurs d'onde de 260 nm (pique d'absorbance des acides nucléiques) et 280 nm (pique d'absorbance des protéines). Notons ici qu'une unité d'absorbance (UA) à 260 nm équivaut à 40µg/ml

d'ARN et qu'un rapport A260/A280 compris entre 1,8 et 2 est un index d'une préparation pure d'ARN.

La transcription inverse est effectuée à partir d'1 µg d'ARN en utilisant un kit (BioRad) de synthèse d'ADN complémentaire, en suivant le protocole du fabricant. Brièvement, un mélange réactionnel et l'enzyme transcriptase inverse sont ajoutés à 1 µg d'ARN ; l'échantillon est ensuite chauffé à 25°C pendant 5 minutes, puis à 42°C pendant 30 minutes, et enfin à 85°C pendant 5 minutes. En fin de réaction, les ADN complémentaires sont dilués à 1 ng/µl. Des contrôles négatifs sont réalisés sans la transcriptase inverse pour s'assurer de l'absence d'ADN génomique.

L'estimation du niveau d'expression génique est réalisée au moyen d'un système de détection rapide de réaction en chaîne par polymérase (PCR) quantitative (BioRad) en utilisant la méthode SYBR-Green. Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume de 15µl dans des p96 pour une quantité de matrice (ADN complémentaire) de 5 ng. Le mélange réactionnel contient les amorces sens et anti-sens (0,5 µM). Pour vérifier l'absence de contaminations exogènes, un contrôle sans aucun échantillon est réalisé. Le protocole de PCR comprend une première étape à 95°C pendant 30 secondes, suivie par 40 cycles avec une étape à 95°C de 5 secondes et une autre de 20 secondes entre 58-65°C selon les amorces (Tableau 2). La courbe de fusion est réalisée pour vérifier qu'un seul produit est amplifié, ce qui se manifeste par la présence d'un pic unique sur le tracé.

Pour chaque gène, une courbe de calibration est construite après l'analyse de dilutions en série d'ADN complémentaire, et est utilisée pour calculer la concentration des échantillons et déterminer l'efficacité d'amplification. TBP (*TATA-Binding Protein*), RPL32 (*Ribosomal Protein Large 32*), RPLP2 (*Ribosomal Protein Large P2*) et la protéine 14-3-3 zeta/delta (YWHAZ) sont utilisés comme gènes de référence des CML-AP de rat pour obtenir un facteur de normalisation calculé par le logiciel GeNorm. Pour ce qui est des CML-AP humaines, les gènes de référence utilisés sont RPL32, TBP, RPLP0 (*Ribosomal Protein Large P0*) et RPL4 (*Ribosomal Protein Large 4*).

Gènes	Amorce sens (5'→3') Amorce anti-sens (5'→3')	Température d'hybridation (°C)
ERRα (homme)	CTA TGG TGT GGC ATC CTG TG GTG ATC TCG CAC TCG TTG G	60
ERRα (rat)	TCA AGG AGG GTG TGC GTC TG CTT GGC CCA GCT GAT GGT GA	65
GABP (rat)	CAC TCA ACA TTT CGG GAA GAG CTC ATT CAT CTG TTG CTC TTG G	60
GCN5 (homme)	CTA TGG GGC AAA CTC TCC AA TCC AGA CTC AGG GAG CTG TT	60
GPX1 (rat)	GTT TCC CGT GCA ATC AGT TC TCA CTT CGC ACT TCT CAA ACA	60
NAMPT (rat)	TGA ATT GCT CCT TCA AGT GC TTT GTT GGG ATC AGC AAC TG	60
PPARα (homme)	CCT CTC AGG AAA GGC CAG TA CAG TGA AAG ATG CGG ACC TC	60
PPARα (rat)	ATG AGT CCC CTG GCA ATG GGC ATT CTT CCA AAA CGG	58
RPLP0 (homme)	GCG ACC TGG AAG TCC AAC TA TTG TCT GCT CCC ACA ATG AA	60
RPLP2 (rat)	GCT GTG GCT GTT TCT GCT TC ATG TCG TCA TCC GAC TCC TC	62
RPL4 (homme)	GCA AGC TGA ACA TTT TGA TTG GAT CTC TGG GCT TTT C	61
RPL32 (homme, rat)	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG	60
SIRT1 (homme)	ATT TAT GCT CGC CTT GCT GT CCA GCG TGT CTA TGT TCT GG	60
SIRT3 (rat)	TAC ATG CAC GGT CTG TCG AA ACA ACG CCA GTA CAG ACA GG	60
SOD2 (homme)	CGT CAC CGA GGA GAA GTA CC AGT CAC GTT TGA TGG CTT CC	60
TBP (homme, rat)	AAA GAC CAT TGC ACT TCG TG GCT CCT GTG CAC ACC ATT TT	60
Tfam (rat)	GAA AGC ACA AAT CAA GAG GAG CTG CTT TTC ATC ATG AGA CAG	60
YWHAZ (rat)	AGA CGG AAG GTG CTG AGA AA GAA GCA TTG GGG ATC AAG AA	60

Tableau 2 : Séquences et températures d'hybridation des amorces utilisées.

ERRα : *estrogen related receptor* ; GABP : *GA-binding protein* ; GCN5 : *general control of amino acid synthesis protein 5-like 2* ; GPX1 : *glutathion peroxydase 1* ; NAMPT : *nicotinamide phosphoribosyltransferase* ; PPARα : *peroxisome proliferator-activated receptor α* ; RPLP0/2 ; RPLA/32 : *ribosomal protein L4/32* ; SIRT1/3 : *sirtuine 1/3* ; SOD2 : *superoxyde dismutase 2* ; TBP : *TATA binding protein* ; TFAM : *mitochondrial transcription factor* ; YWHAZ : *14-3-3 protein zeta/delta*.

9. Etude de l'expression protéique via Western blot

Grâce à la technique de Western blot, il est possible de mettre en évidence une protéine spécifique au sein d'un lysat cellulaire. Une étape d'électrophorèse permet de séparer les protéines, une étape de transfert les rend accessibles à la détection par les anticorps, et enfin une étape de révélation permet leur détection.

Les protéines sont extraites des cellules à l'aide d'un tampon de lyse, dont la composition est décrite dans le tableau 3. Après 30 min d'incubation dans la glace, une centrifugation à 15

000 g pendant 20 minutes est effectuée pour précipiter les fragments de membrane cellulaire. Le surnageant est récupéré et la concentration protéique est déterminée par la technique colorimétrique du kit SMART™ BCA (iNtRON Biotechnology), qui utilise de l'acide bicinchoninique à 98% et du sulfate de cuivre II à 2% (Sigma Aldrich). Les ions cuivriques Cu^{2+} sont réduits en ions cuivreux Cu^+ par les protéines, formant ainsi avec l'acide bicinchoninique un complexe pourpre dont l'absorbance à 540 nm mesurée par un spectrofluorimètre (TECAN-Genios) est proportionnelle à la quantité protéique. Leur concentration est déterminée par rapport à une gamme de BSA.

Entre 30 et 50 μg de protéines sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide (8-15%). Les échantillons sont dilués au demi dans du tampon de charge (62,5mM Tris, 25% glycérol, 0,01% bleu de bromophénol, 2% dodécylsulfate de sodium, 5% dithiothréitol), puis incubés pendant 5 min à 95°C. Les protéines sont ainsi dénaturées et chargées négativement par le *dithiothréitol* et le dodécylsulfate de sodium. Les échantillons migrent ensuite sous l'action d'un champ électrique de 120 V dans un premier gel de concentration à 5% d'acrylamide (17% bis acrylamide 30:0.8, 0,189 mM Tris pH 6.8, 0,1% dodécylsulfate de sodium, 0,1% ammonium persulfate, 0,001% Temed), et ensuite dans un gel de séparation à 8-15% d'acrylamide (selon la taille de la protéine d'intérêt) (pH 8,3) immergé dans un tampon de migration (0,3% Tris, 1,44% glycine, 0,1% dodécylsulfate de sodium).

En fin d'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de polyvinylidène difluoride (Immobilon, Millipore) pendant 1h30 à 4°C sous l'action d'un champ électrique de 110 V. La membrane est préalablement activée par de l'éthanol et équilibrée par du tampon de transfert (0.3% glycine, 0.3% Tris, 20% éthanol). Cette étape permet de charger la membrane positivement afin qu'elle retienne les protéines (chargées négativement).

Après l'étape de transfert, les sites de liaisons non spécifiques des anticorps sont saturés par incubation des membranes pendant 1 heure dans du tampon PBS additionné de 0,1% de Tween (PBS-T 0,1%) contenant 5% de lait écrémé en poudre. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C ou 2 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire dirigé spécifiquement contre la protéine d'intérêt (tableau 4), puis 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme peroxydase. Entre chaque étape, les membranes sont lavées 3 fois avec du PBS-T 0,1% pendant 10 min. Les protéines d'intérêt sont enfin mises en évidence par chimioluminescence. Pour ce faire, les membranes sont incubées pendant 5 min avec le substrat de la peroxydase (Luminata Crescendo ou Forte,

Millipore ou Femto, ThermoScientific). Le substrat est oxydé par l'enzyme et émet un signal lumineux visible à l'aide d'une caméra CCD (ChemiDoc XRS+Bio-rad). Le signal est quantifié à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-rad) et normalisé par un contrôle de charge (β -actine pour les CML-AP humaines ou vinculine pour les CML-AP de rat).

Produit	Concentration finale
Tampon RIPA (<i>Radio-ImmunoPrecipitation Assay</i>) :	
Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane (Tris)	50mM
TRITON X-100	1%
Acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)	1mM
Chlorure de sodium (NaCl)	150mM
Dodécylsulfate de sodium	0,1%
Acide désoxycholique	0,5%
Fluorure de sodium (NaF)	50mM
Pyrophosphate de sodium (NaPPi)	5mM
Dithiothréitol	1mM
β glycerophosphate ($C_3H_7O_6PNa_2$)	1mM
Fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF)	0,2 mM
Orthovanadate de sodium (Na_3VO_4)	1mM
Anti-protéase (ROCHE)	1mM
Anti-désacétylase (Santa Cruz)	1mM

Tableau 3 : Composition du tampon de lyse pour l'extraction des protéines.

Le TRITON X-100, le dodécylsulfate de sodium et l'acide désoxycholique présents dans le tampon RIPA (*Radio-ImmunoPrecipitation Assay*) sont des détergents utilisés pour dissocier les interactions protéine-protéine, protéine-lipide et lipide-lipide et pour dénaturer la structure protéique. Tous les produits ne faisant pas partie du tampon RIPA sont ajoutés extemporanément. Le fluorure de sodium (NaF), le pyrophosphate de sodium (NaPPi), le glycerophosphate ($C_3H_7O_6PNa_2$) et l'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) sont des inhibiteurs de phosphatases. Le fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) est un inhibiteur de protéase, qui agit de concert avec le mix anti-protéase (ROCHE) et l'EDTA présent dans le tampon RIPA qui inhibe, notamment, les métalloprotéases. Le dithiothréitol, quant à lui, est un agent réducteur.

Anticorps	Dilution	Fournisseur	Référence
Ac-FOXO1	1:500	Santa Cruz	sc-49437
Ac-histone H1	1:1000	Sigma	H7789
Citrate synthase	1:500	Abcam	ab96600
GLUT1	1:500	Abcam	ab32551
FOXO1	1:1000	Cell signaling	2880S
HIF-1 α	1:500	Santa Cruz	sc-10790
Histone H1	1:500	Santa Cruz	sc-10806
NAMPT	1:250	Abcam	ab45890
PCNA	1:1000	Santa Cruz	sc-56
PGC-1 α	1:500	Santa Cruz	sc-13067
SIRT1	1:4000	Abcam	sc-13067
TFAM	1:500	Santa Cruz	sc-23588
VDAC	1:1000	Fait maison	
Vinculine	1:2000	Sigma	V9131
β actine	1:10000	Santa Cruz	sc-47778

Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les Western blots.

Ac-FOXO1 : FOXO1 acétylé ; Ac-histone H1 : histone H1 acétylé; GLUT1 : *glucose transporter 1* ; HIF-1 α : *hypoxia-inducible factor-1 α* ; NAMPT : *nicotinamide phosphoribosyltransferase* ; PCNA : *proliferating cell nuclear antigen* ; PGC-1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α* ; SIRT1 : sirtuine 1 ; TFAM : *mitochondrial transcription factor A* ; VDAC : *voltage-gated anion channel*.

10. Immunoprécipitation

Pour mesurer l'acétylation de protéines d'intérêt, une approche d'immunoprécipitation (IP) en condition dénaturante est utilisée.

Les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse dénaturant (1% dodécylsulfate de sodium, 50mM Tris HCL, 5 mM EDTA, 10 mM dithiothréitol, 1 mM PMSF, 15 U/ml de DNase I à pH 7,4), additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche + PMSF 0,2 mM) et un cocktail d'inhibiteurs de désacétylases (Santa Cruz), puis le lysat est chauffé à 95°C pendant 5 minutes. Pour éviter que le dodécylsulfate de sodium dégrade les anticorps pendant l'IP, le lysat est resuspendu dans un tampon de lyse non dénaturant (1% Triton, 50

mM Tris HCl, 5mM EDTA, 300 mM NaCl, 0,02% azide de sodium, 1 mM PMSF, à pH 7,4) complété par les cocktails d'anti-protéases et anti-désacétylases cités ci-dessus. Ici, le Triton interagit avec le dodécylsulfate de sodium, formant ainsi des micelles. La lyse est achevée avec une seringue munie d'une aiguille 25G, puis le lysat est centrifugé 30 minutes à 20 000 g, à 4°C.

Ensuite, les complexes billes/anticorps sont préparées. Des billes magnétiques (Millipore) sont lavées dans du PBS-T 0,1%, puis bloquées dans un tampon PBS-T 0,1% supplémenté de 2% BSA pendant une heure à 4°C. Après rinçage dans du PBS-T 0,1%, les billes sont incubées avec l'anticorps dirigé contre les lysines acétylées (Cell signalling, 9681) pendant une heure à 4°C.

Après lavage des complexes billes/anticorps avec du PBS-T 0,1%, l'IP est effectuée. Ainsi, le lysat protéique est ajouté à ces complexes puis incubé pendant la nuit à 4°C. Les complexes billes/anticorps/antigènes sont ensuite rincés dans du PBS-T 0,1%, resuspendus dans du tampon Laemmli, chauffés 10 minutes à 70°C puis vortexés.

L'immunoprécipitat est récupéré puis déposé sur gel pour être ensuite analysé par western blot.

Modèle in vivo : les souris KO SIRT1 générales inductibles soumises à hypoxie chronique

A. Description des souris

Les souris *knock out* (KO) SIRT1 générales inductibles ont été gracieusement fournies à notre équipe par le Dr David Sinclair. Au sein de son laboratoire, des souris C57BL/6J ont été croisées avec des souris exprimant, de façon ubiquitaire (sous le contrôle du promoteur de l'ubiquitine, Ub), la protéine de fusion Cre-ERT2, constituée par la recombinaise Cre et le domaine de liaison du récepteur des œstrogènes (ERT2) muté. En absence de tamoxifène, qui est un modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes, Cre-ERT2 est retenue dans le cytoplasme. La liaison du tamoxifène à l'ERT2 engendre la translocation de Cre-ERT2 dans le noyau, où elle peut recombiner ces substrats, à savoir des séquences d'ADN flanquées des séquences loxP (flox), en causant ainsi leur excision du génome. La descendance de ce croisement (C57BL/6J Ub-CreERT2) a ensuite été croisée avec des souris où l'exon 4 de la SIRT1, qui fait partie du domaine catalytique (exons 3-8), était flanqué (SIRT1 flox/flox). Le résultat est la production de souris où il est possible d'induire, après injection de tamoxifène,

la délétion de SIRT1 au stade adulte, ce qui permet de s'affranchir des problèmes développementaux observés chez les souris KO SIRT1 dans la lignée germinale [465].

1. Le génotypage des souris

Afin de vérifier l'invalidation du gène SIRT1, un génotypage des souris est effectué. L'ADN génomique est extrait de la queue de souris avec la méthode « à la soude » (NaOH) : une partie de la queue est incubée avec du NaOH à 50mM à 95°C pendant 45 minutes, du trisHCl est ajouté et les queues désagrégées sont enfin centrifugées pendant 15 minutes à 4°C à 14000 rpm.

Une PCR est ensuite effectuée à partir de 2 µl de surnageant avec les amorces détaillées ci-dessous, afin d'amplifier un segment, présent uniquement chez les souris SIRT1 KO, qui contient une partie du promoteur de l'ubiquitine et une partie du gène codant pour la protéine de fusion CreERT2.

Ubc-Pro : 5'- GAG GGG AGG GAT AAG TGA GG -3'

Cre2 : 5'- GCA AAC GGA CAG AAG CAT TT -3'

Pour avoir la certitude que l'absence de bande correspond bien à une souris contrôle et non à un problème pendant la PCR ou un oubli de charge, le gène XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), qui est toujours présent est également amplifié. Les amorces utilisées sont les suivantes :

XIAP (s) : 5'- GCA CGG ATC GTT ACT TTT GG -3'

XIAP (as): 5'- GGC TGC TAA GAT TGC TGG AA -3'

Précisons ici que l'invalidation du gène SIRT1 est également vérifiée par Western blot.

2. Le traitement des souris

Des souris femelles SIRT1 flox/flox, exprimant ou non CreERT2, sont injectées à environ 3 mois d'âge avec une dose de 120 mg/kg de tamoxifène (une injection de 30 mg/kg/jour pendant quatre jours consécutifs). Chez les souris présentant CreERT2, le tamoxifène induit la translocation de cette protéine de fusion dans le noyau où elle excise l'exon 4 de SIRT1 (souris KO SIRT1) ; chez les souris qui n'expriment pas la CreERT2, le tamoxifène ne peut pas s'y lier, et par conséquent l'exon 4 n'est pas excisé (souris contrôles). Après 21 jours, temps auquel la délétion de SIRT1 est induite, les souris contrôles et KO sont divisées en deux groupes : 11 souris (5 contrôles et 6 KO) sont gardées en normoxie (21% O₂), alors que

12 souris (6 contrôles et 6 KO) sont placées, pour induire le remodelage vasculaire de l'artère pulmonaire, dans un caisson à hypoxie (10% O₂) généreusement mis à disposition par nos collaborateurs de l'hôpital Marie Lannelongue. A l'issue de 21 jours de normoxie ou d'hypoxie, la pression systolique du ventricule droit est mesurée, l'index de Fulton est déterminé pour évaluer l'hypertrophie cardiaque droite (Index Fulton = poids du ventricule droit/(poids du ventricule gauche+septum)), et les poumons sont congelés pour des analyses d'immunohistochimie afin d'évaluer la musculation vasculaire et d'autres analyses biochimiques, tels que des Western blot.

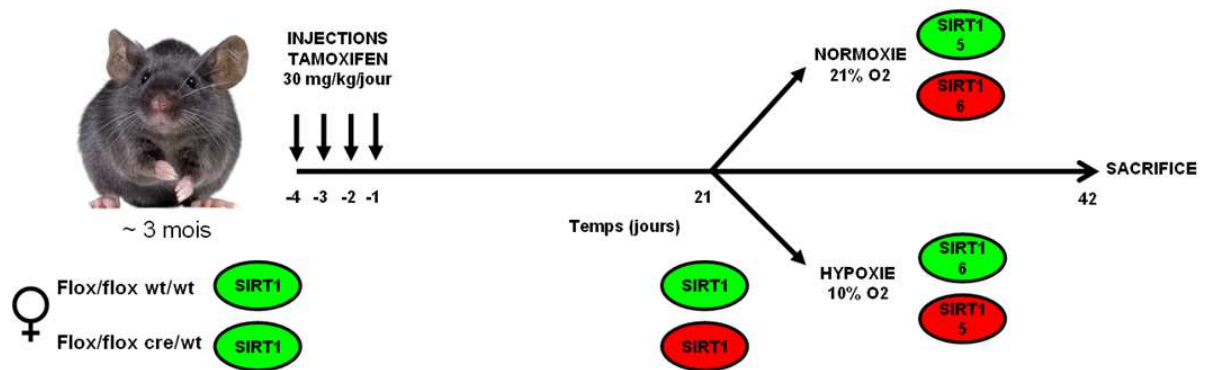


Figure 28 : Représentation schématique du protocole utilisé pour l'étude *in vivo*.

Des souris femelles âgées d'environ trois mois sont injectées une fois par jour pendant 4 jours consécutifs avec du tamoxifène (dose finale 120 mg/kg) pour induire la délétion de SIRT1 chez les souris présentant l'exon 4 du gène de cette désacétylase flanqué des séquences flox. Trois semaines après ces injections, les souris sont sujettes soit à une normoxie (21% O₂) soit à une hypoxie chronique (10% O₂) pendant trois semaines. A l'issue de cette période, la pression du ventricule droit est mesurée, les animaux sont sacrifiés, et d'autres paramètres pour l'évaluation du remodelage vasculaire et cardiaque sont analysés.

3. Evaluation du remodelage vasculaire et cardiaque chez les souris

a. Paramètres hémodynamiques

La mesure des paramètres hémodynamiques est réalisée au Centre Chirurgical Marie Lannelongue du Plessis Robinson après l'anesthésie des souris avec de l'isoflurane (4%, 3 L/min) via une chambre à induction (Minerve, Esternay, France). Les souris sont ensuite pesées et maintenues endormies à l'aide d'un masque, qui diffuse du gaz à un débit de 1 L/min avec 1-2% d'isoflurane.

Après une incision cutanée en regard du sternum, un cathéter est inséré dans le ventricule droit par voie transthoracique afin de mesurer la pression ventriculaire droite et la fréquence cardiaque.

Les mesures sont enregistrées par une station d'acquisition (PowerLab 4/35) et analysées en utilisant le logiciel LabChart (ADInstruments, Oxford, United Kingdom).

Les souris sont ensuite euthanasiées par exsanguination via l'artère aorte puis par dislocation cervicale.

b. Hypertrophie cardiaque droite

Après le sacrifice, le cœur est rapidement prélevé. Une fois les oreillettes enlevées, le ventricule droit est minutieusement séparé du ventricule gauche et du septum. En cas d'hypoxie chronique, le ventricule droit s'hypertrophie afin de s'adapter à l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire. Pour apprécier ce remodelage cardiaque, le ventricule droit et le ventricule gauche plus le septum sont pesés, ce qui permet de calculer ensuite l'index de Fulton, obtenu en divisant le poids du ventricule droit par celui du ventricule gauche+septum.

c. Muscularisation des artères pulmonaires

Après avoir prélevé le cœur, une ligature est réalisée au niveau du hile du poumon gauche. Le lobe est sectionné en aval et congelé dans de l'azote liquide pour analyses biochimiques. En ce qui concerne le poumon droit, une solution 1 :1 de matrice OCT (*optimal cutting temperature*) et de sérum physiologique y est injectée par un prolongateur de cathéter inséré dans la trachée. Quand le poumon est distendu, la trachée est ligaturée, le poumon est prélevé et congelé dans de l'isopentane préalablement refroidi dans de la carboglace puis stocké à -80°C. Des coupes de 7µm des poumons congelés sont ensuite réalisées en utilisant un cryomicrotome LEICA CM3050, et sont stockées à -80°C jusqu'au marquage ultérieure. Les coupes sont séchées à l'air libre à température ambiante pendant une heure, et sont enfin rehydratées avec du PBS pendant 10 minutes. La fixation des tissus est ensuite effectuée avec du paraformaldéhyde froid pendant 10 minutes à température ambiante. Trois lavages de 5 minutes avec du NH₄Cl 50mM sont réalisés pour éteindre l'autofluorescence du tissu. Les coupes sont saturées pendant une heure à température ambiante dans du PBS supplémenté de 2% de BSA.

Les tissus sont ensuite incubés pendant une heure à 37°C avec les anticorps primaires dirigés contre l'α actine du muscle lisse (Sigma, F3777, 1 : 200) et le facteur endothélial de Von Willebrand (DAKO, A0082, 1 : 600) dans du PBS contenant 2% de BSA.

L'incubation avec l'anticorps secondaire est réalisée pendant une heure à température ambiante. Pour marquer les noyaux, la sonde Hoechst (4 µM) diluée dans du PBS est incubée pendant une minute à température ambiante. Toutes les étapes sont séparées par trois lavages

de 5 minutes avec du PBS. Le montage est effectué en utilisant le milieu de montage DAKO (DAKO, S3023).

Les échantillons sont observés au videomicroscope AXIO-OBSERVER Z1 – COLIBRI® – TIRF 3 : les artères pulmonaires de résistance (avec un diamètre inférieure à 50 μm) sont discriminées en artères pulmonaires non muscularisées, partiellement muscularisées ou totalement muscularisées. La première classe comprend les vaisseaux qui ne sont pas composés de muscle lisse, la deuxième présente les vaisseaux ayant une couche de muscle lisse présente uniquement sur une partie de la circonférence de l'artère et les vaisseaux faisant partie de la troisième classe montrent une muscularisation sur l'ensemble du pourtour de l'artère (figure 29).

Au moins 100 artères pulmonaires sont analysées pour chaque souris.

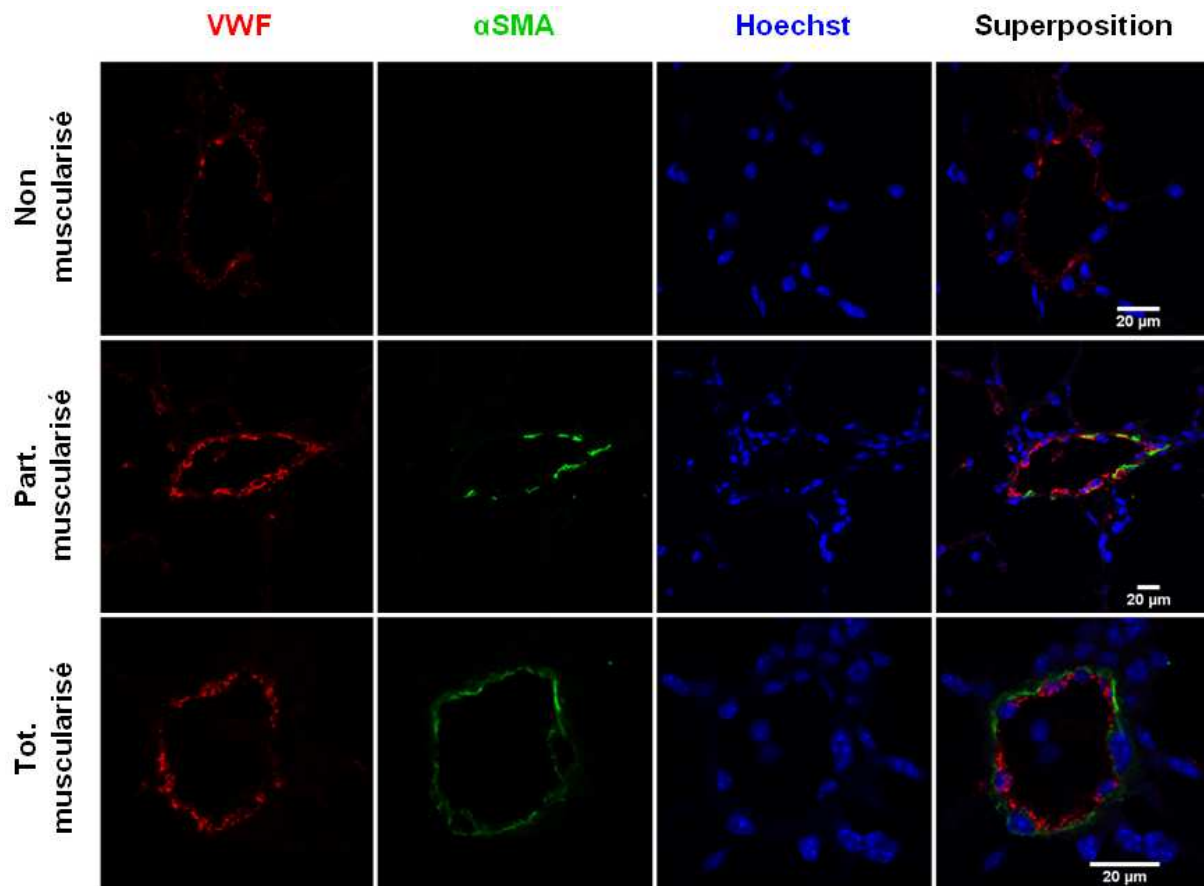


Figure 29 : Images représentatives des artères pulmonaires de souris non muscularisée, partiellement muscularisée et totalement muscularisée.

Des sections (7 μm) sont réalisées à partir de poumons congelés, et sont marquées avec un anticorps dirigé contre le facteur endothélial de Von Willebrand (VWF) et un anticorps dirigé contre l' α -actine de muscle lisse (αSMA) couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine, un dérivé de la fluorescéine. L'anticorps primaire contre le facteur de Von Willebrand est détecté via un anticorps secondaire couplé à Alexa Fluor 546. Les noyaux sont visualisés au moyen d'un marquage avec la sonde fluorescente Hoechst.

4. Etude de l'expression protéique via Western blot

Les protéines contenues dans environ 10 mg de tissu pulmonaire sont extraites à 4°C dans 250 µl de tampon de lyse dont la composition est décrite dans le Tableau 3 à l'aide d'une homogénéisation mécanique au moyen d'un micro-broyeur Precellys 24 (Bertin, France). Pour les étapes suivantes, le protocole est identique à celui utilisé pour détecter les protéines issues des cellules.

Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

Les éventuelles différences entre les traitements (véhicule, PDGF, PDGF+Stac-3 ou PDGF+SRT1720) sur les CML-AP de rat sont déterminées en utilisant un test ANOVA (*analysis of variance*) à une voie suivi d'un test post-hoc non paramétrique Newman-Keuls. En ce qui concerne les expériences d'interférence par ARN et de stimulation avec le sirtinol, les différences entre les quatre groupes (véhicule ou scramble, sirtinol ou siSIRT1, PDGF et PDGF+sirtinol ou PDGF+siSIRT1) sont évaluées via un test ANOVA à deux voies suivi d'un test post-hoc non paramétrique Newman-Keuls.

Concernant l'étude menée sur les souris KO SIRT1 ou contrôles, les quatre groupes (contrôle en normoxie, KO SIRT1 en normoxie, contrôle en hypoxie, et KO SIRT1 en hypoxie) sont confrontés au moyen d'un test ANOVA à deux voies suivi d'un test post-hoc non paramétrique Newman-Keuls.

Les CML-AP provenant de patients HTAP et de patients contrôles sont comparées en utilisant le test U non paramétrique Mann-Whitney.

Les différences sont considérées comme significatives lorsque la valeur p est inférieure à 0,05.

Résultats

I. Le profil métabolique des CML-AP dérivées de patients atteints d'HTAP

Le niveau protéique de la citrate synthase, enzyme de la matrice mitochondriale catalysant la première réaction du cycle de Krebs, et de VDAC (*voltage-gated anion channel*), canal ionique localisé sur la membrane mitochondriale externe, est diminué dans les CML-AP de patients HTAP (CML-AP-HTAP) en comparaison avec les CML-AP contrôles (CML-AP-CTL) (figure 30A). Etant donné que ces enzymes sont considérées comme des marqueurs de la masse mitochondriale, nous pouvons suggérer que dans l'HTAP, les CML-AP présentent une perte partielle de cette masse. Cela pourrait être le résultat d'une diminution de la production de nouvelles mitochondries en raison d'une inhibition de la biogénèse mitochondriale. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré le contenu du régulateur clé de la biogénèse mitochondriale, PGC-1 α . Effectivement, l'expression de ce co-activateur transcriptionnel est réduite d'environ 30% dans les CML-AP-HTAP, confirmant ce qui a été observé dans une étude précédente [285]. De plus, le contenu en ARNm des facteurs de transcriptions PPAR α et ERR α , dont l'activité est stimulée par PGC-1 α , et de l'enzyme antioxydante SOD2, dont PGC-1 α trans-active la transcription, est aussi diminué dans le CML-AP dérivant de patients atteints d'HTAP (figure 30B). Dans le même temps, le niveau d'expression de GLUT1 (*glucose transporter 1*), protéine uniport facilitant le transport du glucose à travers la membrane plasmique, et de la lactate déshydrogénase, enzyme qui convertie le pyruvate en lactate, est augmenté (figure 30C). Ces résultats suggèrent donc un déséquilibre du métabolisme énergétique favorisant l'augmentation de la voie glycolytique cellulaire au détriment des phosphorylations oxydatives.

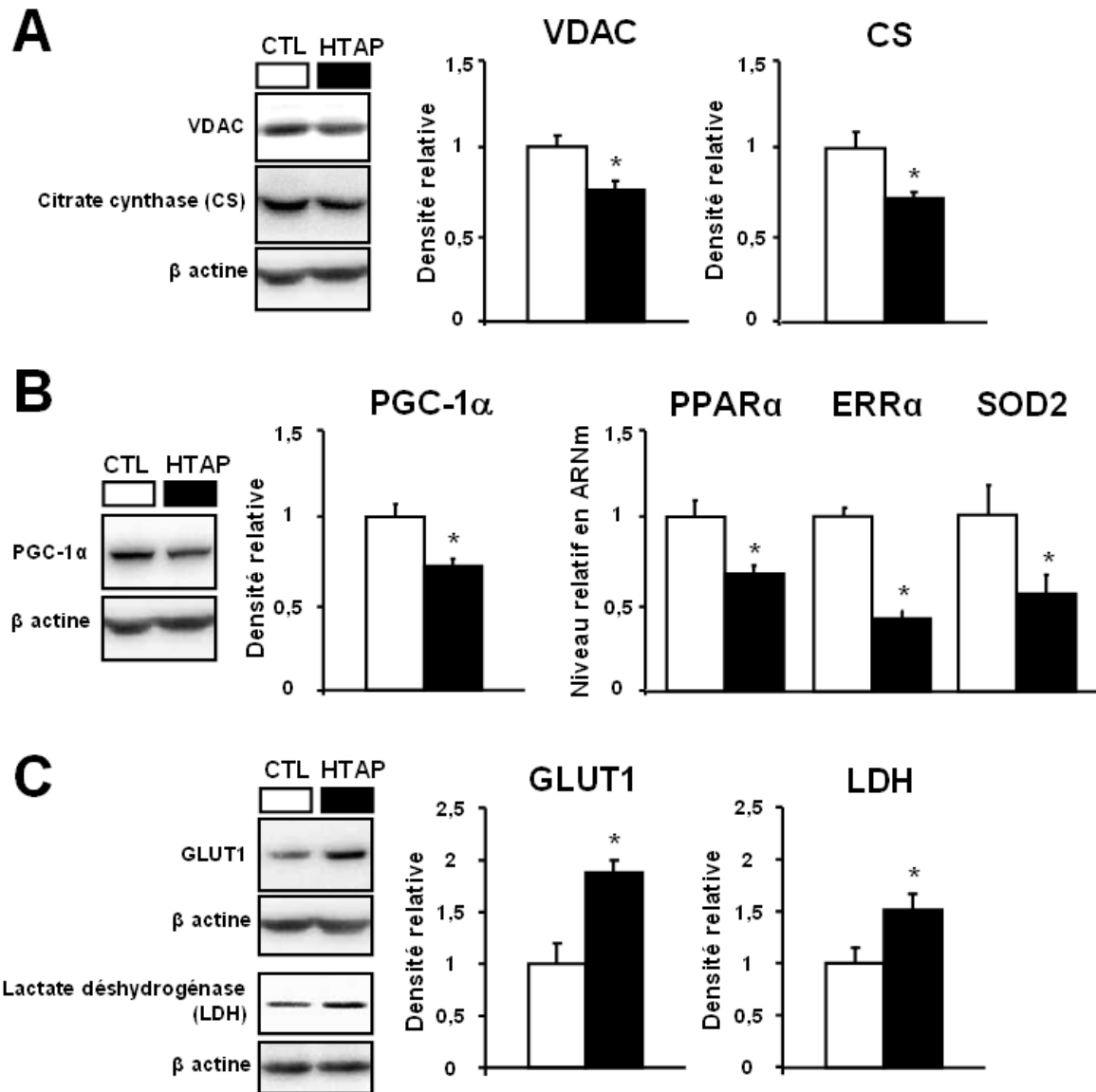


Figure 30 : Le profil métabolique des CML-AP-HTAP.

(A) Les blots représentatifs, à gauche, et les histogrammes relatifs, à droite, révèlent une diminution de l'expression protéique des deux marqueurs de la masse mitochondriale VDAC et la citrate synthase dans les CML-AP-HTAP (n=4). (B) Le co-activateur transcriptionnel PGC-1 α est moins exprimé dans les CML-AP de patients HTAP, qui présentent aussi une réduction du niveau d'ARNm des facteurs de transcription PPAR α et ERR α et de l'enzyme antioxydante SOD2 (n=4). (C) L'image représentative des blots, à gauche, et l'histogramme correspondant, à droite, montrent que le contenu de GLUT1 et de la lactate déshydrogénase (LDH) est augmenté dans les CML-AP dérivant des patients HTAP (n=4). *p<0,05 versus CML-AP-CTL.

II. La balance acétylation/désacétylation dans les CML-AP de patients HTAP

La diminution de la masse mitochondriale et des régulateurs de la biogenèse mitochondriale observée dans les CML-AP-HTAP suggère que le métabolisme mitochondrial est régulé négativement dans ces cellules. Un des régulateurs clés de l'activité de PGC-1 α , qui contrôle la biogénèse mitochondriale, est la balance acétylation/désacétylation qui est contrôlée par la

désacétylase SIRT1 et l'acétyltransférase GCN5. L'expression en ARNm de GCN5 est augmentée de plus de 50% dans les CML-AP-HTAP, alors que celle de SIRT1, que ce soit en ARNm ou en protéine, ne varie pas par rapport aux cellules contrôles (figure 31A et 31B). L'expression de NAMPT, enzyme générant NAD^+ qui est le cofacteur essentiel de SIRT1, est également inchangée (figure 31B). Ces résultats suggèrent que les CML-AP-HTAP présentent un déséquilibre de la balance acétylation/désacétylation en faveur de l'acétylation.

L'analyse des activités fonctionnelles des enzymes qui contrôlent l'état d'acétylation/désacétylation démontre que ces activités sont effectivement déséquilibrées. Le niveau d'acétylation de PGC-1 α et de l'histone H1, deux cibles de SIRT1, augmente dans les cellules de malades, évoquant une diminution de l'activité de cette désacétylase par rapport à GCN5 (figure 31C). Pour explorer si ce déséquilibre est associé à la hyperprolifération des CML-AP, l'activité de SIRT1 a été analysée aussi dans les CML-AP de rat induites à proliférer par le facteur de croissance PDGF. Une augmentation du niveau d'acétylation de PGC-1 α , de l'histone H1 et du facteur de transcription FOXO1, une autre cible de SIRT1, est également observée dans ces cellules (figure 31D).

L'ensemble de ces résultats suggère que la balance acétylation/désacétylation est à faveur de l'acétylation dans les CML-AP en hyperprolifération.

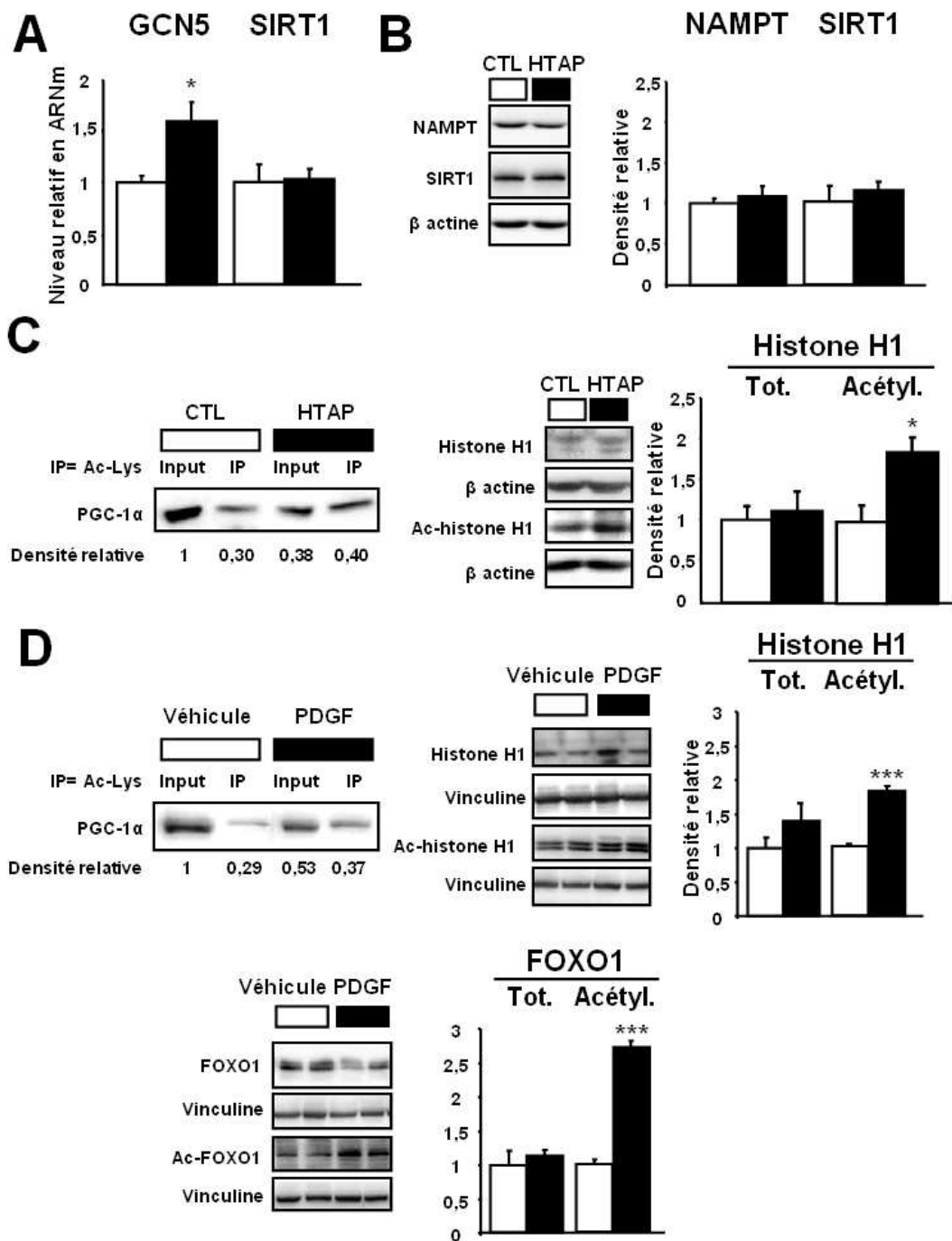


Figure 31 : La balance acétylation/désacétylation dans les CML-AP.

(A) L'expression en ARNm de l'acétyltransférase GCN5 est augmentée, alors que celle de SIRT1 est inaltérée, dans les CML-AP-HTAP (n=4). (B) Le niveau protéique de SIRT1 et de NAMPT est inchangé dans les CML-AP-HTAP en comparaison avec les CML-AP-CTL (n=4). (C) La forme acétylée des deux cibles de SIRT1, PGC-1α (n=3) et l'histone H1 (n=4), est augmentée dans les CML-AP dérivant des patients atteints d'HTAP. (D) Les formes acétylées des cibles de SIRT1, PGC-1α (n=3), l'histone H1 et FOXO1 (n=4-6), sont augmentées dans les CML-AP de rat induites à proliférer par le facteur de croissance PDGF (10 ng/ml). *p<0,05, ***p<0,001 *versus* contrôle.

III. Effet d'une régulation négative de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP

Une augmentation de la prolifération semble être associée à une activité relativement réduite de SIRT1. Pour vérifier si la SIRT1 peut être mise en cause dans l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire, le niveau protéique de cette désacétylase a été réduit d'environ 85% au moyen d'une interférence par ARN dans les CML-AP-CTL. Ainsi, comme il est indiqué en figure 32A, la prolifération, estimée par l'incorporation de l'analogue de la thymidine bromodésoxyuridine (BrdU) dans l'ADN des cellules en cours de réplication, est significativement augmentée de 50% lorsque SIRT1 est diminuée. Le même effet de facilitation de la prolifération est reproduit dans un autre modèle cellulaire, les CML-AP de rat. En effet, les résultats présentés en figure 32B indiquent que la baisse du niveau d'expression de SIRT1 d'environ 70% engendre une élévation du nombre de cellules, du clivage du sel WST-1 par de cellules viables et de l'incorporation du BrdU (pour cette dernière, $p= 0,06$) en présence du facteur de croissance PDGF. Le niveau réduit de la protéine SIRT1 augmente le nombre de cellules, et semble favoriser le clivage de WST-1 ($p= 0,07$) et l'incorporation de BrdU ($p= 0,09$), même en condition basale. Pour confirmer l'effet antiprolifératif de SIRT1, l'inhibiteur spécifique de SIRT1, le sirtinol, a été testé sur les CML-AP de rat. En absence de PDGF l'inhibition ne provoque pas d'augmentation significative de la prolifération, même s'il est possible de remarquer une petite tendance à l'augmentation, alors qu'en présence de PDGF l'effet de sirtinol mime celui de la sous-régulation de SIRT1 (figure 32C). Ces résultats montrent que SIRT1 régule négativement la prolifération des CML-AP, étant donné que la diminution de son expression et son inhibition la facilitent.

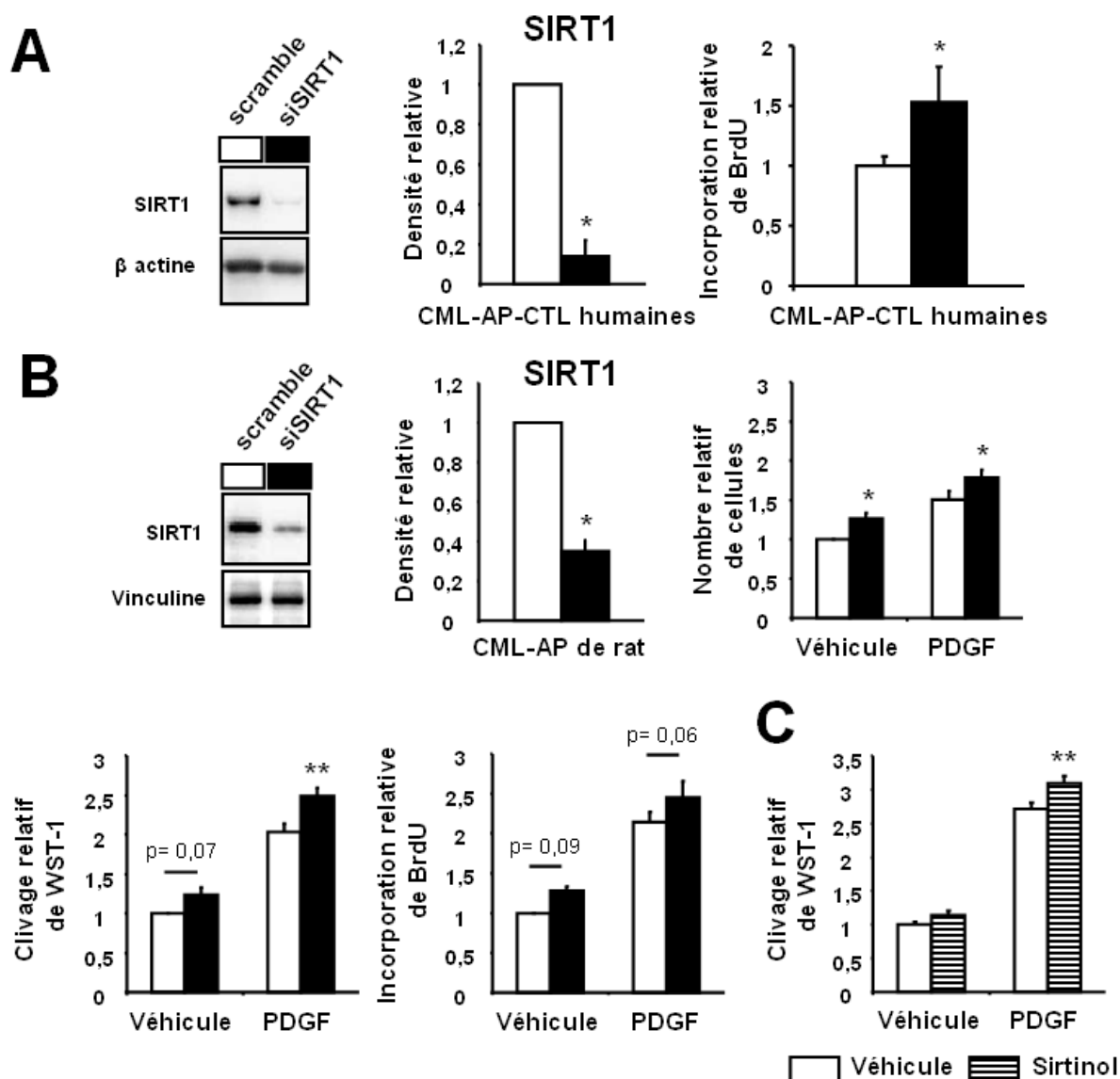


Figure 32 : Effet d'une régulation négative de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP.

(A) La sous-régulation de l'expression protéique de SIRT1 via l'interférence par ARN, illustrée par un blot représentatif à gauche, engendre une diminution du contenu protéique de SIRT1 de 85% et une augmentation de l'incorporation de BrdU par les CML-AP-CTL de 50% (n=3). (B) L'interférence par ARN dirigée spécifiquement contre SIRT1 dans les CML-AP de rat engendre une baisse d'environ 70% du niveau protéique de SIRT1 et augmente la prolifération induite par le PDGF, mise notamment en évidence par une augmentation du nombre de cellules, du clivage de WST-1 et de l'incorporation de BrdU (pour cette dernière, $p=0,06$). La diminution de la protéine SIRT1 favorise aussi une augmentation du nombre de cellules des CML-AP de rat en basal, et une tendance à l'augmentation du clivage de WST-1 ($p=0,07$) et de l'incorporation de BrdU ($p=0,09$) (n=5-6). (C) L'inhibiteur pharmacologique de SIRT1, le sirtinol (5 μ M), favorise la prolifération des CML-AP da rat traitées avec PDGF (10 ng/ml) (n=7). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ versus les contrôles respectifs.

IV. Effet de la délétion génétique de SIRT1 sur le remodelage vasculaire *in vivo*

Étant donné qu'une régulation négative de SIRT1 favorise la prolifération des CML-AP, l'effet de sa délétion sur le remodelage vasculaire pulmonaire induit par l'hypoxie chronique a été étudié. Ainsi, des souris invalidées pour le gène de SIRT1 (SIRT1 KO pour *knock out*) et

des souris contrôles (WT pour *wild type*) issues de la même lignée ont été soumises soit à une hypoxie chronique soit à une normoxie pendant 3 semaines. Les résultats obtenus et présentés en figure 33 montrent que la délétion de l'exon 4 de SIRT1, faisant partie du domaine catalytique, conduit à la production d'une protéine tronquée. Le niveau de la forme sauvage de SIRT1 est significativement réduit chez les souris KO en normoxie et en hypoxie, respectivement de 67% et 80%. De façon intéressante, les poumons des souris SIRT1 KO présentent un niveau de PGC-1 α inférieure en condition d'hypoxie. Chez ces souris, l'hypoxie chronique provoque une augmentation du facteur de transcription HIF-1 α beaucoup moins prononcée que celle affichée par les souris WT. Enfin, l'induction du niveau du transporteur de glucose GLUT1 suite à l'hypoxie chronique est beaucoup plus marquée chez les souris SIRT1 KO.

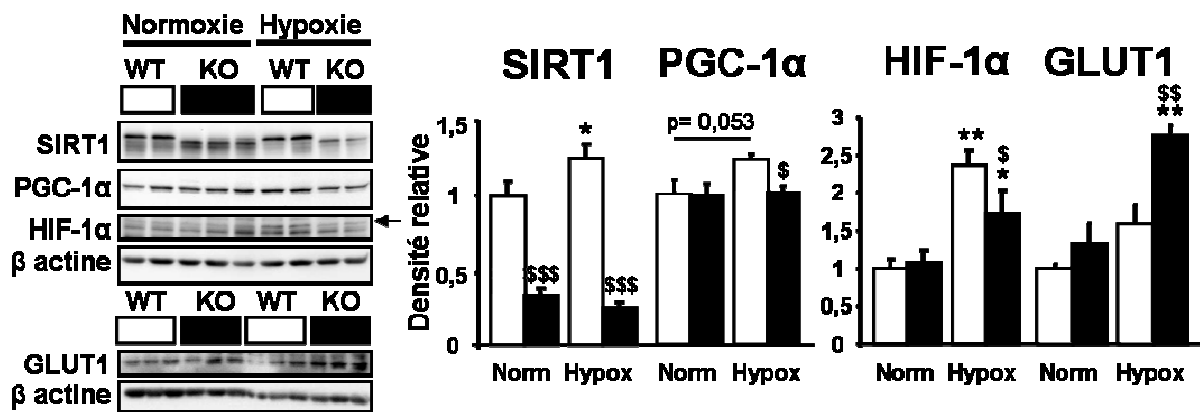


Figure 33 : Effets de la délétion de SIRT1 d'un point de vue moléculaire

La délétion de l'exon 4, faisant partie du domaine catalytique de SIRT1, cause la production d'une protéine tronquée. Le niveau de la forme sauvage de SIRT1 est significativement réduit dans les poumons des souris déficientes en SIRT1 (SIRT1 KO), en normoxie et en hypoxie (n=5-6). Les poumons des souris SIRT1 KO montrent une diminution de l'expression de PGC-1 α et de HIF-1 α (n=5-6), et une augmentation de GLUT1 (n=3), suite à l'hypoxie chronique.

Bien que la délétion de SIRT1 n'a pas d'effet en normoxie, suite à l'hypoxie chronique le remodelage des petites artères pulmonaires (diamètre inférieur à 50 μm) est plus intense dans les poumons des souris SIRT1 KO. Une diminution du pourcentage des vaisseaux non muscularisés, associée à une augmentation du pourcentage des vaisseaux totalement muscularisés, est notamment observée. La proportion d'artères pulmonaires partiellement muscularisées montre aussi une tendance à l'augmentation chez les souris déficientes en SIRT1 (figure 34A).

Cela est associé à une augmentation accentuée de la pression systolique et de l'hypertrophie du ventricule droit, cette dernière étant révélée par une augmentation du rapport entre le poids du ventricule droit (VD) et celui du ventricule gauche (VG) avec le septum (S) (rapport de Fulton) (figure 34B).

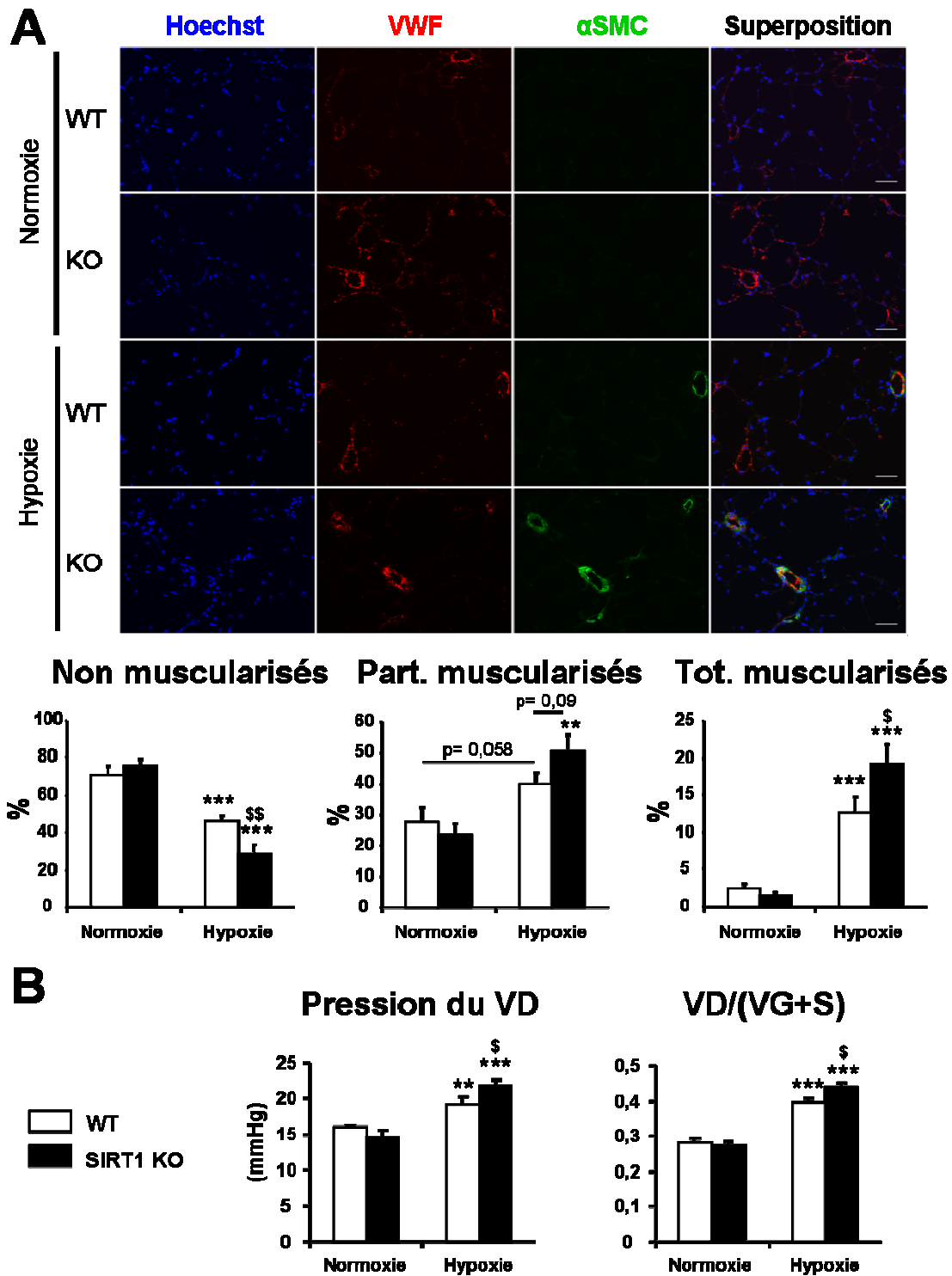


Figure 34 : Effet de la délétion de SIRT1 sur le remodelage vasculaire *in vivo*.

(A) Images représentatives des artères pulmonaires de souris après marquage avec (de gauche à droite) la sonde fluorescente Hoechst, l'anticorps dirigé contre le facteur endothélial de Von Willebrand (VWF) et contre l' α actine du muscle lisse (α SMC). La barre d'échelle en bas à droite représente une dimension réelle de 50 μ m. Le remodelage vasculaire suite à l'hypoxie chronique est plus marqué dans les poumons des souris SIRT1 KO : le pourcentage des vaisseaux non muscularisés diminue, alors que celui des vaisseaux entièrement muscularisés augmente, de façon encore plus importante après la délétion de SIRT1 (n=5-6). (B) La pression du ventricule droit est aggravée chez les souris SIRT1 KO par rapport aux souris WT après exposition à l'hypoxie chronique (n=4-5). L'index de Fulton, calculé en divisant le poids du ventricule droit (VD) par celui du ventricule gauche et du septum (VG+S) est plus important chez les souris SIRT1 KO que chez les WT sujettes à l'hypoxie chronique (n=5-6). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* normoxie ; \$p<0,05, \$\$p<0,01 *versus* wild-type.

V. Effet d'une régulation positive de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP

Pour confirmer ces résultats qui tendent à montrer que SIRT1 régule négativement la prolifération des CML-AP, l'effet de sa surexpression a été étudié. De façon surprenante, l'augmentation de SIRT1 de 470% induite via l'infection par adénovirus n'a aucun effet sur la prolifération des CML-AP de rat, comme illustré par le clivage de WST-1 en figure 35.

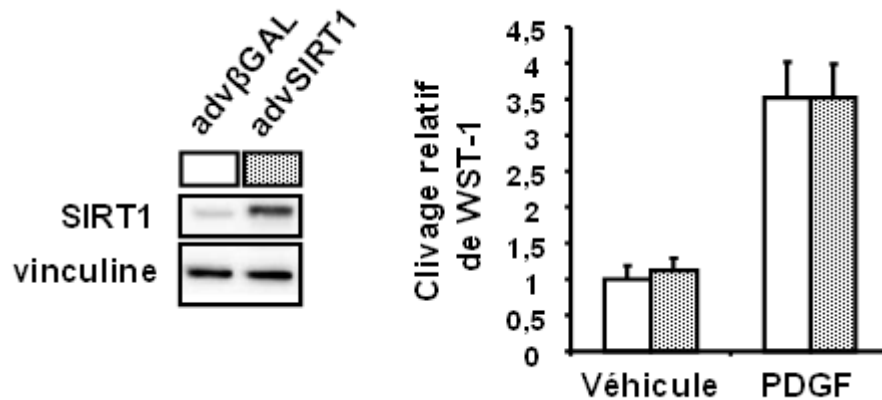


Figure 35 : Effet de la surexpression de SIRT1 sur la prolifération des CML-AP de rat.

L'augmentation du niveau protéique de SIRT1 au moyen d'une infection par adénovirus (multiplicité d'infection de 100) n'a pas d'effet sur la prolifération des CML-AP de rat, comme indiqué par l'inaltération du clivage de WST-1 (n=3). advβGAL : adénovirus contrôles surexprimant la β galactosidase ; advSIRT1 : adénovirus surexprimant SIRT1.

En parallèle, l'effet de l'activation de SIRT1 a été étudié. Tout d'abord, la spécificité de l'activateur Stac-3 a été vérifiée, via la détection de l'acétylation de certaines cibles de SIRT1, telles que l'histone H1, FOXO1 et PGC-1α. En figure 36, il apparaît que la présence de Stac-3 entraîne la réduction significative du niveau d'acétylation de ces trois cibles, confirmant ainsi que la désacétylase SIRT1 est activée. Le traitement avec Stac-3 augmente en outre de 65% l'expression de NAMPT, enzyme qui permet la production de NAD⁺, le cofacteur de SIRT1.

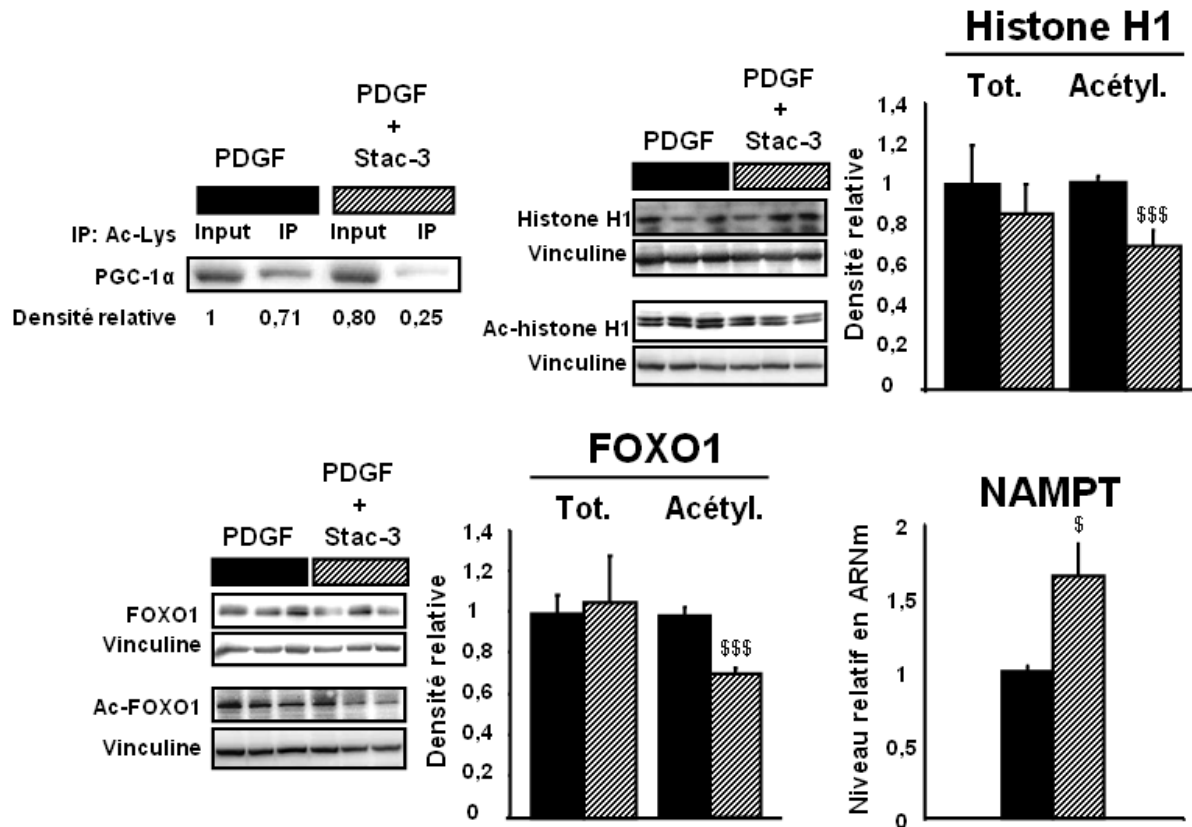


Figure 36 : Effet de Stac-3 sur l'activité de SIRT1.

Le traitement avec Stac-3 (10 μ M) cause une réduction significative du niveau d'acétylation des cibles de SIRT1, à savoir PGC-1 α (n=3), l'histone H1 et FOXO1 (n=4-6). Stac-3 provoque l'augmentation de la quantité en ARNm de NAMPT, enzyme nécessaire à l'activité de SIRT1 (n=4). \$p<0,05, \$\$\$p<0,001 *versus* les CML-AP traitées avec le PDGF.

Stac-3 a été donc testé dans les CML-AP de rat, pour explorer ses effets potentiels sur la prolifération. Stac-3 annihile complètement les effets stimulateurs de PDGF. En effet, le nombre de cellules, le clivage de WST-1 et l'incorporation de BrdU reviennent aux niveaux du contrôle suite au traitement avec cet activateur (figure 37A). Cette observation est aussi confirmée par la détection du PCNA, qui augmente seulement suite au traitement avec PDGF seul, et non en présence de Stac-3 (figure 37B). Pour prouver que les effets de Stac-3 sont dépendants de l'activation de SIRT1, un autre activateur spécifique (SRT1720) a été utilisé. Cet agent inhibe aussi la prolifération, comme l'indique la réduction significative du clivage de WST-1, confirmant l'effet antiprolifératif de SIRT1 (figure 37C).

De manière importante, l'effet de Stac-3 n'est pas associé à une augmentation de la mort cellulaire. Le pourcentage de cellules incapables de cliver et de rendre fluorescente la sonde fluorescéine diacétate n'augmente pas suite au traitement avec Stac-3 ; il en est de même pour le pourcentage de cellules nécrotiques, perméables à l'iodure de propidium (figure 37D).

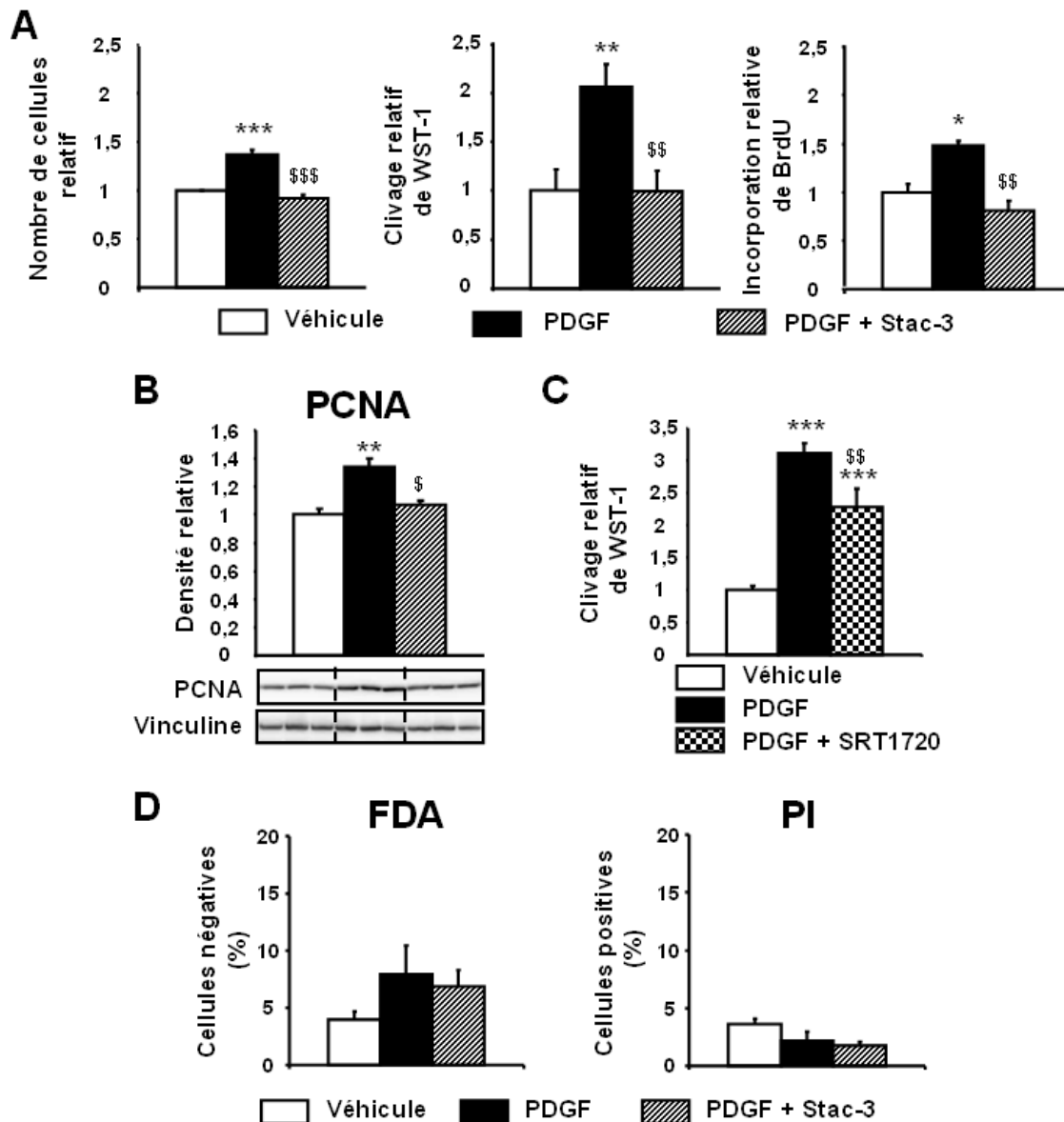


Figure 37 : Effets de Stac-3 sur la prolifération et la mortalité des CML-AP de rat.

(A) Stac-3 (10 μ M) inhibe fortement la prolifération des CML-AP de rat induite par le facteur de croissance PDGF (10 ng/ml), comme le montrent les diminutions du nombre de cellules, du clivage de WST-1 et de l'incorporation de l'analogue de la thymidine BrdU (n=4-7). (B) Stac-3 ramène au niveau du contrôle la quantité du marqueur de prolifération PCNA, augmentée suite au traitement avec PDGF (n=6). (C) L'activateur spécifique de SIRT1 SRT1720 (1 μ M) inhibe aussi la prolifération des CML-AP puisqu'il diminue significativement le clivage de WST-1 (n=6). (D) Stac-3 n'affecte pas la mortalité des CML-AP de rat : le pourcentage de cellules mortes, n'ayant pas d'estérases actives pour cliver la sonde fluorescéine diacétate (FDA) en la rendant fluorescente, n'augmente pas suite au traitement avec Stac-3 (n=7). En parallèle, le pourcentage de cellules nécrotiques, perméables à la sonde intercalant l'ADN iodure de propidium (PI), est aussi inaltéré (n=4). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* les CML-AP contrôles non traitées ; \$p<0,05, \$\$p<0,01 *versus* les CML-AP traitées avec le PDGF.

Au vu des effets importants de Stac-3 sur la prolifération des CML-AP de rat, cette molécule a été testée par la suite dans les CML-AP-HTAP. Cet activateur inhibe puissamment aussi leur prolifération, comme l'indique la réduction de 50% du clivage de WST-1 et la diminution de 80% de l'incorporation de BrdU (figure 38A). Stac-3 montre également un effet

antiprolifératif sur les CML-AP-CTL, bien qu'il soit plus faible : le clivage de WST-1 n'est en effet pas réduit de manière significative, et la diminution de l'incorporation de BrdU est moins importante (figure 38B). Enfin, Stac-3 prévient l'augmentation du marqueur de la prolifération PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) dans les CML-AP-HTAP (figure 38C).

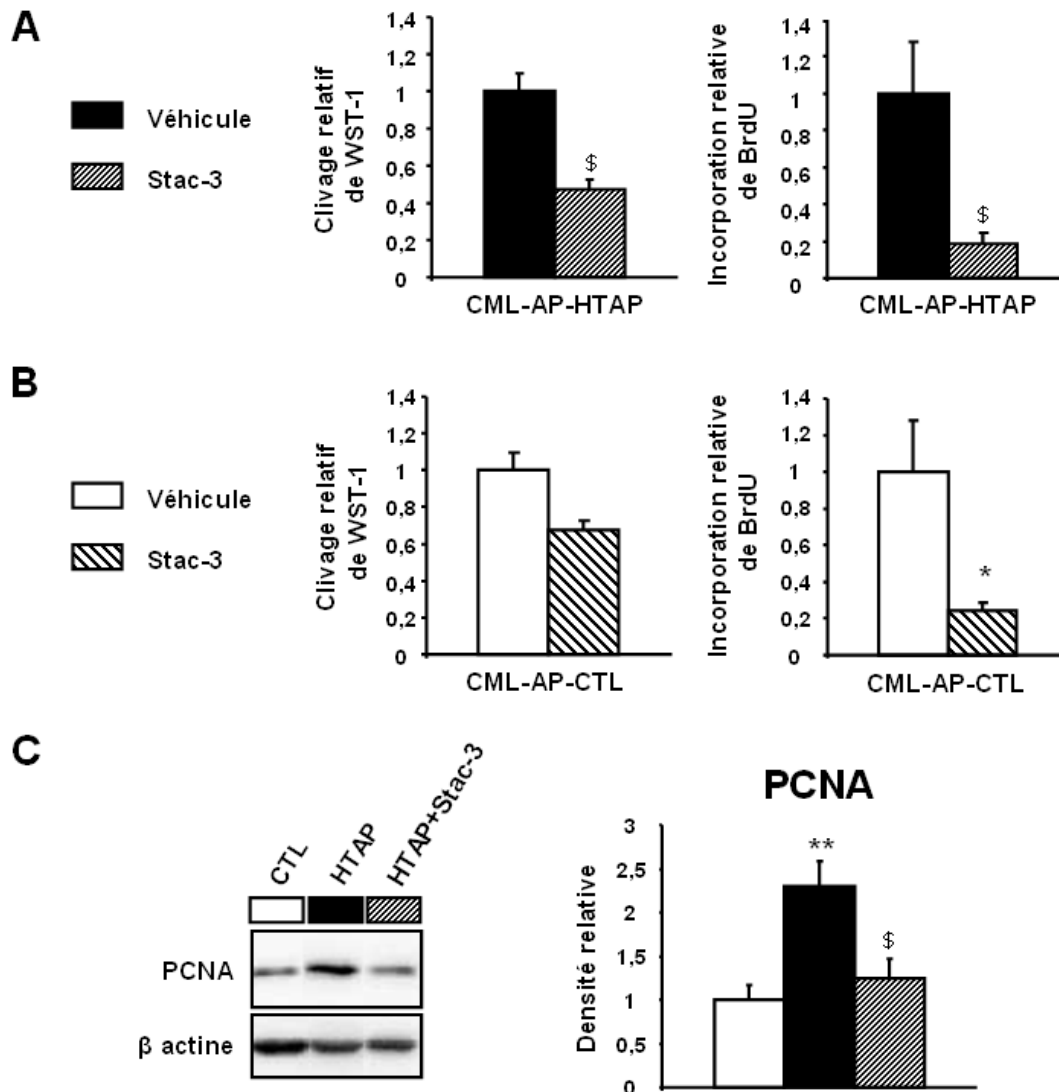


Figure 38 : Effet de Stac-3 sur la prolifération des CML-AP humaines.

(A) Stac-3 (10 μ M) inhibe fortement la prolifération des CML-AP-HTAP, comme le montre la diminution du clivage de WST-1 par les cellules viables et la diminution de l'incorporation de l'analogue de la thymidine BrdU par les cellules en répliation (n=4). (B) L'effet antiprolifératif de Stac-3 est confirmé dans les CML-AP-CTL, même s'il est moins marqué que dans les cellules dérivées de patients HTAP (n=3). (C) Stac-3 empêche l'élévation du niveau du marqueur de prolifération PCNA des CML-AP-HTAP, le ramenant à la valeur des CML-AP-CTL (n=4). *p<0,05, **p<0,01 *versus* CML-AP-HTAP ; \$p<0,05 *versus* CML-AP-HTAP.

VI. Effets métaboliques de l'activation de SIRT1

L'activation de SIRT1 montre un puissant effet antiprolifératif sur les CML-AP. Pour décortiquer les voies métaboliques qui peuvent être impliquées dans cet effet, les niveaux en ARNm et protéine de plusieurs acteurs de la bioénergétique des mitochondries ont été analysés.

Ainsi, l'activation de SIRT1 par Stac-3 engendre l'augmentation de la masse mitochondriale dans les CML-AP dérivant de patients atteints d'HTAP, comme l'indique l'élévation du niveau protéique de VDAC et de la citrate synthase (figure 39A), marqueurs de la masse mitochondriale.

Cette augmentation peut être provoquée par l'activation du programme de la biogenèse mitochondriale. Etant donné que SIRT1 est un des activateurs majeurs du régulateur clé de ce processus, PGC-1 α , l'expression génique des composants de la cascade transcriptionnelle initiée par ce co-activateur a été mesurée. L'expression en ARNm de plusieurs cibles de PGC-1 α , telles que les facteurs transcriptionnels ERR α , PPAR α , et l'enzyme antioxydante SOD2 est augmentée dans les CML-AP-HTAP suite au traitement avec Stac-3 (figure 39B), suggérant donc une activation de ce co-activateur suite à l'activation de SIRT1 par Stac-3.

En parallèle, Stac-3 engendre une augmentation de la masse mitochondriale aussi dans un autre modèle cellulaire, les CML-AP de rat. En effet, Stac-3 augmente le niveau protéique de VDAC et de la citrate synthase et, de façon cohérente, aussi la quantité du facteur de transcription mitochondrial TFAM, impliqué dans la transcription et la réplication du génome des mitochondries (figure 39C). Cette augmentation de la masse mitochondriale est associée à l'activation de l'expression génique de facteurs de transcription activés par PGC-1 tels que ERR α , PPAR α , GABP, ainsi que des cibles TFAM, l'enzyme antioxydante GPx1 et la sirtuine SIRT3 (figure 39D).

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent une activation de PGC-1 α SIRT1-dépendante dans les deux modèles cellulaires, qui mène à son tour à l'activation du programme de la biogenèse mitochondriale.

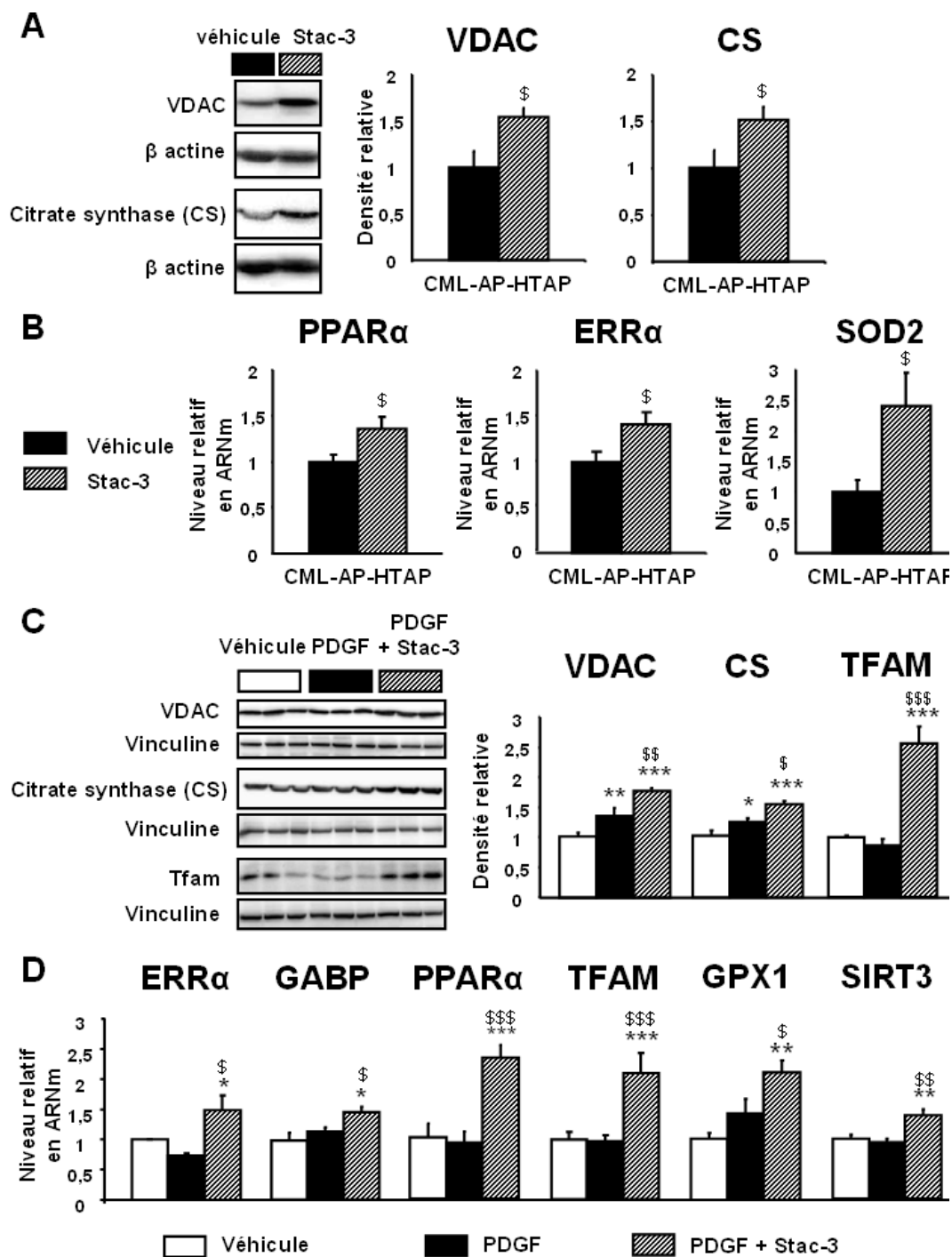


Figure 39 : Effets métaboliques de l'activation de SIRT1.

(A) Stac-3 (10 μ M) engendre l'augmentation de la masse mitochondriale dans les CML-AP dérivant de patients atteints d'HTAP, comme le montre l'élévation du contenu de VDAC et de la citrate synthase (n=3). (B) L'augmentation de la masse mitochondriale suite au traitement avec Stac-3 est associée à une augmentation de l'expression génique de certains cibles du régulateur clé de la biogenèse mitochondriale PGC-1 α , telles que les facteurs de transcription ERR α et PPAR α , ainsi que l'enzyme antioxydante SOD2 (n=4). (C) Stac-3 occasionne l'augmentation de la masse mitochondriale aussi dans le modèle des CML-AP de rat : le niveau protéique de VDAC et de la citrate synthase est plus élevé suite au traitement avec Stac-3, et cela est associé à une importante augmentation du facteur de transcription mitochondrial TFAM, impliqué dans la transcription et dans la réplication du génome mitochondrial (n=4-7). (D) L'augmentation de la masse mitochondriale par Stac-3 est associée à l'activation de l'expression de plusieurs cibles de PGC-1 α , telles que les facteurs de transcription ERR α , PPAR α , TFAM et GABP, ainsi que l'enzyme antioxydante GPx1 et la sirtuine 3 (n=4). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* les CML-AP non traitées ; \$p<0,05, \$\$p<0,01, \$\$\$p<0,001 *versus* les CML-AP traitées avec le PDGF ou les CML-AP-HTAP.

VII. Effets de l'activation de SIRT1 sur la morphologie mitochondriale

Etant donné que la fragmentation mitochondriale peut être un facteur favorisant l'hyperprolifération, nous avons étudié l'effet de l'activation de SIRT1 sur la morphologie mitochondriale. En effet, comme l'indique la figure 40, le traitement avec Stac-3 prévient les changements du réseau mitochondrial induits par la prolifération PDGF-dépendante. Ainsi, l'augmentation du pourcentage de petites mitochondries ($\leq 1 \mu\text{m}^3$) et, en parallèle, la diminution du pourcentage de grosses mitochondries ($> 5 \mu\text{m}^3$) sont prévenues par le traitement avec Stac-3. La forte tendance ($p = 0,059$) à la réduction de la présence de mitochondries de taille moyenne, ayant un volume compris entre 1 et $5 \mu\text{m}^3$, en présence de PDGF est aussi évitée par l'activation de Stac-3. Nous pouvons donc conclure que l'activation de SIRT1 normalise la morphologie mitochondriale en bloquant la fragmentation excessive associée à l'hyperprolifération cellulaire.

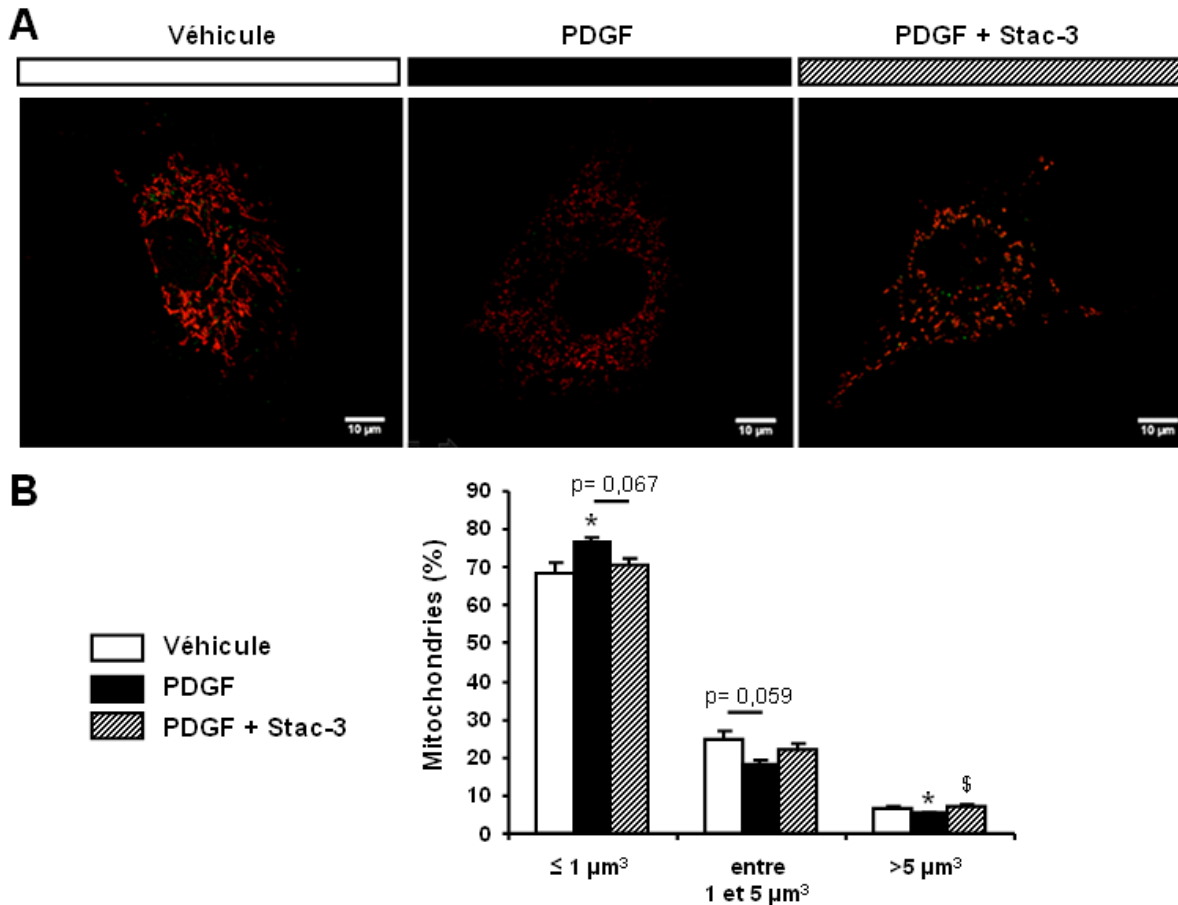


Figure 40 : Effets de l'activation de SIRT1 sur la morphologie mitochondriale.

(A) Photographies, obtenues par imagerie confocale, représentatives du réseau mitochondrial des CML-AP de rat marqué par la sonde fluorescente MTO (*MitoTracker Orange*). La présence de Stac-3 (10 μM) atténue la fragmentation des mitochondries induite par le facteur de croissance PDGF (10 ng/ml). (B) L'histogramme révèle que Stac-3 prévient l'augmentation du pourcentage de petites mitochondries ($\leq 1 \mu\text{m}^3$) et la diminution du pourcentage de grosses mitochondries ($> 5 \mu\text{m}^3$) causées par le traitement avec PDGF. Stac-3 inhibe aussi la forte tendance ($p=0,059$) à la diminution du pourcentage de mitochondries de taille moyenne (entre 1 et $5 \mu\text{m}^3$), observée suite au traitement avec PDGF. La moyenne et l'erreur standard de quatre expériences indépendantes sont illustrées. Pour chaque expérience, au moins dix cellules par condition ont été analysées. * $p < 0,05$ versus les CML-AP non traitées ; \$ $p < 0,05$ versus les CML-AP traitées avec le PDGF.

Discussion

Principaux résultats obtenus

Cette étude a mis en évidence un rôle potentiel de SIRT1 dans la pathogenèse de l'HTAP. En effet, cette désacétylase est moins active dans les cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire (CML-AP) présentant un phénotype hyperprolifératif, telles que les CML-AP issues de patients atteints d'HTAP idiopathique et les CML-AP de rat traitées avec le facteur de croissance PDGF. L'inhibition pharmacologique et la sous-expression spécifique de SIRT1 favorisent la prolifération des CML-AP de rat et humaines. En outre, la délétion génétique de cette désacétylase aggrave le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie chronique chez la souris, et cela est associé à une augmentation plus accentuée de la pression systolique et de l'hypertrophie du ventricule droit. A l'inverse, l'activation pharmacologique de SIRT1 inhibe profondément la prolifération des CML-AP de rat et des patients HTAP, sans affecter la mortalité cellulaire. Cette régulation négative de la prolifération cellulaire est associée à une amélioration du métabolisme mitochondrial, connu comme étant régulé négativement dans les CML-AP dérivant des patients atteints d'HTAP. En général, cette étude identifie SIRT1 comme cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'HTAP.

Discussion des résultats et perspectives

A. Les CML-AP des patients atteints d'HTAP présentent un remodelage métabolique

Un remodelage métabolique caractérisé par une diminution de l'oxydation du glucose en faveur de la glycolyse, et ce même en présence d'oxygène, est une caractéristique de l'HTAP. Ceci tend à rapprocher cette maladie du cancer, pathologie dans laquelle ce phénotype a été décrit pour la première fois par Otto Warburg [466], donnant à ce phénomène le nom d'effet de Warburg. Ce remodelage a été observé dans les cellules vasculaires pulmonaires telles que les CML, les cellules endothéliales et les fibroblastes [467], et il a été démontré que, de façon similaire au cancer, il participe au phénotype hyperprolifératif et antiapoptotique cellulaire, contribuant de ce fait au remodelage vasculaire qui est une des signatures de l'HTAP [468].

La plupart des informations concernant l'altération du métabolisme dans les CML-AP dérive des modèles animaux d'HTAP. Une dysfonction des complexe I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale a été ainsi mise en évidence dans les CML-AP de rats ayant subi

une injection unique de monocrotaline [469]. Bonnet et ses collaborateurs [168] ont montré que les CML isolées de l'artère pulmonaire de rat FH (*fawn hooded*), développant spontanément l'HTAP, présentent un réseau mitochondrial raréfié, une diminution de l'expression de l'enzyme antioxydante SOD2 et une activation du facteur de transcription HIF-1 α en normoxie, connu pour activer la voie glycolytique. En ce qui concerne les CML-AP dérivées de patients atteints d'HTAP, il a été montré que ces dernières affichent aussi un réseau mitochondrial raréfié et une diminution de l'activité de SOD2 [168]. En outre, l'expression globale du complexe I et d'HIF dans les petits vaisseaux de patients HTAP est diminuée [168].

La collaboration avec l'équipe de l'hôpital Marie Lannelongue nous a permis d'obtenir de précieuses CML-AP dérivées de patients atteints d'HTAP idiopathique ainsi que des CML-AP de patients non atteints par cette maladie, qui ont servi de contrôles. Cela nous a donné la possibilité d'approfondir les connaissances relatives à l'altération métabolique dans les CML-AP humaines.

Comme il était attendu, les cellules dérivant de patients HTAP présentent plusieurs éléments soutenant l'idée d'un remodelage métabolique. En effet, des marqueurs de la masse mitochondriale, tels que VDAC et la citrate synthase, sont moins exprimés ; ceci est tout à fait en accord avec l'observation d'un réseau mitochondrial raréfié dans les CML-AP des patients HTAP [168]. Cette diminution de la masse mitochondriale est associée à une régulation négative du régulateur clé de la biogenèse mitochondriale PGC-1 α . Ce résultat est cohérent avec les études ayant montré que les niveaux d'ARNm [291] et de protéine [285] de ce co-activateur transcriptionnel sont réduits dans les CML-AP de patients HTAP, et qu'il existe une corrélation négative entre le niveau de PGC-1 α sanguin des patients et leurs pression artérielle et résistance vasculaire pulmonaires [470]. De plus, nous avons montré que les facteurs de transcriptions ERR α et PPAR α , des cibles de ce co-activateur, sont également diminués de manière significative. Le gène de l'enzyme antioxydante SOD2, dont la transcription est trans-activée par PGC-1 α , est aussi moins exprimé dans les CML-AP-HTAP, confirmant ce qui a été observé dans une étude précédente [92]. Ces résultats suggèrent une régulation négative de la cascade transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale dans les cellules de patients HTAP.

Il a été énoncé précédemment que la masse mitochondriale est finement régulée par la balance de deux processus opposés : la biogenèse mitochondriale et la mitophagie. Par conséquent, les diminutions de VDAC et de la citrate synthase observées chez les CML-AP de patients HTAP pourraient aussi être dues à une augmentation de la dégradation sélective de ces organites qui

s'ajouterait à la diminution de la production de nouvelles mitochondries. Cette voie n'a toutefois pas été explorée dans ce travail et il serait par conséquent très intéressant d'étudier les processus mitophagiques dans cette maladie, d'autant plus que très peu d'informations à ce sujet sont aujourd'hui disponibles. En effet, un seul travail suggère une hyperactivation de l'autophagie dans l'HTAP, en s'appuyant sur une élévation du contenu des protéines PINK1 et d'ATG5 (*autophagy-related gene 5*) clivée dans les cellules endothéliales dérivant de patients [286]. La dégradation sélective des mitochondries non fonctionnelles est essentielle pour garantir une bonne qualité de la population mitochondriale. Cependant, une augmentation de la dégradation de mitochondries devrait être accompagnée d'une augmentation de la production de nouveaux organites sans quoi le résultat pourrait être délétère. La quantité de mitochondries pourrait en fait ne pas être suffisante pour répondre aux exigences métaboliques cellulaires.

En opposition aux diminutions d'expression des acteurs du métabolisme mitochondrial, celle du transporteur du glucose GLUT1, un des marqueurs de la voie glycolytique, est augmentée dans les CML-AP-HTAP. L'augmentation de GLUT1 est en accord avec l'observation de l'augmentation de la capture du FDG (*18F-labeled deoxyglucose*), un analogue du glucose, par les poumons de patients atteints d'HTAP idiopathique [471]. La régulation positive de son expression corrèle avec un renforcement de la glycolyse, et est caractéristique d'un large éventail de types cellulaires cancéreux [472].

L'expression de la lactate déshydrogénase est aussi augmentée, ce qui suggère une favorisation de la fermentation du glucose, c'est-à-dire le découplage de la glycolyse de l'oxydation du glucose. Ce remodelage pourrait contribuer à l'élévation des niveaux de lactate observée dans le plasma des patients atteints d'HTAP idiopathique [473].

Le recours à la fermentation du glucose durant une prolifération rapide pourrait paraître surprenant en raison de la présence d'oxygène. La réplication cellulaire est en effet un processus qui demande beaucoup d'énergie pour maintenir les fonctions cellulaires et les réactions biosynthétiques, et l'oxydation du glucose au niveau des mitochondries est un processus beaucoup plus efficace pour la production d'ATP que la fermentation du glucose. Cependant, une augmentation de la glycolyse permet de maintenir de hauts niveaux d'intermédiaires glycolytiques qui sont pour leur part nécessaires à la biosynthèse [474]. La génération de cellules filles demande effectivement la réplication de tous les composants cellulaires, tels que l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines, et la dégradation du glucose assure l'apport des précurseurs de composants chimiques (nucléotides, lipides et acides aminés) utilisés pour former les diverses macromolécules [474]. Dans cette théorie, la

régulation négative du métabolisme mitochondrial serait donc un aspect secondaire, influençant de façon indirecte la prolifération cellulaire via le renforcement de la voie glycolytique.

En parallèle, il a été montré qu'une dysfonction mitochondriale *per se* peut influencer la prolifération des CML-AP. En effet, l'altération de la dynamique mitochondriale dans les CML-AP de patients HTAP, qui présentent notamment une augmentation de la fission, est nécessaire pour leur hyperprolifération : l'inhibition pharmacologique de la protéine de la fission DRP1, en fait, bloque le cycle cellulaire et améliore l'HTAP expérimentale [284]. De façon intéressante, l'activation anormale de la fission mitochondriale a aussi été observée dans le cadre du cancer [475]. La fusion apparaît également altérée dans l'HTAP. L'expression de la protéine MFN2 est en effet diminuée dans les CML-AP de patients et de modèles animaux [285]. Sa surexpression inhibe la prolifération des CML-AP, et a des effets bénéfiques sur des paramètres de l'HTAP expérimentale tels que l'épaississement de la media de l'artère pulmonaire et la résistance vasculaire [285].

La dysfonction mitochondriale peut en outre agir directement sur le remodelage vasculaire de l'HTAP et sur la formation tumorale en modulant l'apoptose. En effet, l'accumulation cellulaire est le résultat d'un déséquilibre entre les deux phénomènes opposés de prolifération et mort cellulaire. Les mitochondries sont essentielles pour le déclenchement de l'apoptose notamment par la libération des facteurs pro apoptotiques cytochrome *c* et Diablo dans le cytoplasme. Étant donné que cette libération peut avoir lieu suite à une dépolarisation membranaire causant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial, méga-canal voltage-dépendant, l'hyperpolarisation des mitochondries inhibe l'apoptose. De manière intéressante, les mitochondries apparaissent hyperpolarisées dans l'HTAP [166] et le cancer [476], ce qui pourrait par conséquent contribuer à leur résistance à la mort cellulaire.

Une diminution de la respiration mitochondriale conduit à une diminution du potentiel car moins de protons sont pompés à travers la membrane mitochondriale interne [477, 478] ; le fait que les mitochondries dans l'HTAP et le cancer, maladies toutes deux caractérisées par une diminution du métabolisme mitochondrial, soient hyperpolarisées pourrait donc apparaître comme une contradiction. Cela peut être expliqué par la diminution du Ca^{2+} mitochondrial observée dans ces deux pathologies [201, 531] : le Ca^{2+} contient deux charges positives, donc un contenu inférieur de cet ion dans la matrice mitochondriale provoque une différence importante de charges positives entre l'espace intermembranaire et la matrice. L'importance du Ca^{2+} dans la modulation du potentiel de membrane mitochondriale a été montrée, par exemple, par Haslip et ses collaborateurs [286]. Ils montrent que la sous-

expression d'UCP2 (*uncoupling protein 2*), qui contribue à la fuite dépolarisante de protons à travers la membrane mitochondriale interne [480], occasionne une diminution inattendue du potentiel due à une réduction de la capture du Ca^{2+} dans la mitochondrie [286]. En effet, UCP2 est un régulateur clé de l'absorption mitochondriale de Ca^{2+} [481], et l'utilisation d'un chélateur de Ca^{2+} prévient la dépolarisation causée par sa sous-expression [286]. Une autre explication possible pourrait être une diminution de la sensibilité de l'ATP synthase (complexe V) à l'ADP. Dans ce cas-là, malgré la diminution de la synthèse d'ATP, le potentiel de membrane mitochondrial est élevé. En effet l'oligomycine, antibiotique capable de bloquer le canal protonique de l'ATP synthase inhibant ainsi la synthèse d'ATP, engendre l'hyperpolarisation des mitochondries [478].

Au phénotype hyperprolifératif, à la résistance à l'apoptose et au métabolisme énergétique altéré des cellules vasculaires pulmonaires des patients HTAP s'ajoutent d'autres caractéristiques communes au cancer. Par exemple, une expansion monoclonale de cellules endothéliales a été révélée dans des poumons de patients atteints d'HTAP idiopathique [48], des preuves d'instabilité de courtes séquences d'ADN (ADN microsatellites) au niveau des lésions plexiformes [482] et une autosuffisance en facteurs de croissance tels que le PDGF [140, 483, 484], l'endothéline-1 [94, 485], la sérotonine [181] et l'angiotensine II [486] ont également été montrées. Les poumons et les cellules en culture issus des patients HTAP présentent, en outre, des anomalies chromosomiques somatiques [487]. Il est cependant crucial de noter que des différences importantes distinguent le cancer de l'HTAP. L'absence d'invasion et de métastase dans l'HTAP [488], les gènes pathogéniques impliqués et le degré d'instabilité génomique et d'angiogénèse sont au nombre de ces différences.

B. La balance acétylation/désacétylation penche vers l'acétylation dans les CML-AP en hyperprolifération

Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'avait exploré l'état d'activation de SIRT1 dans l'HTAP. Cependant, Paulin et ses collaborateurs [291] ont montré qu'une autre sirtuine impliquée dans le métabolisme, SIRT3, est sous-exprimée dans l'HTAP idiopathique. En effet, des extraits protéiques mitochondriaux dérivés d'échantillons de poumon de patients, ainsi que de modèles animaux d'HTAP, présentent une réduction du contenu en SIRT3 qui serait due, au moins en partie, à la diminution de son activateur transcriptionnel PGC-1 α [291]. Ceci est associé à une augmentation du niveau d'acétylation des protéines mitochondriales par rapport aux contrôles [291]. Il est à noter que SIRT3 n'est pas la seule sirtuine mitochondriale ;

néanmoins, son activité est prépondérante, étant donné que parmi les souris déficientes en SIRT3, SIRT4 et SIRT5, seules les premières montrent une élévation de l'acétylation des protéines mitochondriales [489]. De façon intéressante, chez les patients HTAP la diminution de l'expression de SIRT3 est associée à l'augmentation de l'expression d'une isoforme non active de SIRT3, présentant un polymorphisme d'un seul nucléotide [291]. Chez la souris, l'absence de SIRT3 entraîne une augmentation de l'acétylation inhibitrice des protéines mitochondriales impliquées dans le cycle de Krebs (isocitrate déshydrogénase 2 [490]) et de l'oxydation phosphorylante (complexes I, II, III et V [491]). Il s'en suit une diminution de l'oxydation du glucose et une augmentation de la glycolyse qui, comme discuté précédemment, sont de caractéristiques partagées entre l'HTAP et le cancer. Une diminution de SIRT3, pouvant atteindre 40%, a été observée dans les cancers du sein et des ovaires [492]. Étant donné que SIRT3 et SIRT1 travaillent de concert pour stimuler le métabolisme mitochondrial même si leur localisation est différente, il semble raisonnable de penser que SIRT1 pourrait également être un suppresseur de tumeurs. En effet, des travaux récents utilisant des souris génétiquement modifiées ont montré le rôle protecteur de SIRT1 dans de nombreux cancers [354]. De plus, certaines données soupçonnent l'implication de SIRT1 dans le développement d'HTAP. Ainsi, le resvératrol et la restriction calorique, qui activent, entre autres, SIRT1, ont montré des effets bénéfiques dans des modèles animaux d'HTAP [407–411].

A la lumière de ce qui précède, la question d'un possible rôle de SIRT1 dans l'HTAP se pose. Nous avons montré que des cibles de SIRT1 telles que l'histone 1 et PGC-1 α sont hyperacétylées dans les CML-AP dérivées de patients HTAP, suggérant une baisse d'activité de cette désacétylase. De plus, cette inhibition semblerait être intimement liée à la prolifération, puisque les CML-AP de rat présentent une augmentation de l'acétylation des cibles PGC-1 α , l'histone H1 et FOXO1 lorsqu'elles sont stimulées avec le facteur de croissance PDGF. Pour évaluer les changements d'activité de SIRT1 nous avons préféré la mesure de l'état d'acétylation des ses substrats spécifiques [493] à l'utilisation de divers kits commerciaux disponibles. Ces derniers prévoient en effet l'isolement d'une SIRT1 immunopurifiée à partir de cellules ou de tissus, ce qui perturbe les interactions régulatrices protéine-protéine. De plus, l'enzyme est retirée de son contexte naturel, où la concentration et la localisation du NAD⁺, du nicotinamide et de l'O-acétyl-ADP ribose, qui influencent la réaction, peuvent varier selon les diverses conditions physiologiques.

Nous avons ensuite mesuré le niveau de SIRT1 dans les CML-AP de patients HTAP. Bien que son activité semble être diminuée, son contenu en ARNm et en protéine ressemble à celui

des cellules contrôles. Ainsi, il se pourrait que la protéine *per se* soit moins active. Pour vérifier cela, il serait judicieux d'explorer s'il existe des polymorphismes perte de fonction pour cette sirtuine. Une autre explication, plus probable, pourrait être formulée en avançant que l'environnement dans les CML-AP des patients atteints d'HTAP serait moins favorable à son activité de désacétylase. Dans les cellules cancéreuses, l'importante augmentation du flux glycolytique génère rapidement de l'ATP dans le cytoplasme, augmentant le rapport NADH/NAD⁺ cytoplasmique. Le pyruvate issu de la glycolyse est ensuite préférentiellement converti en lactate par la lactate déshydrogénase A, au lieu d'être transformé en acétyl-CoA dans la mitochondrie par la pyruvate déshydrogénase, régénérant ainsi le NAD⁺ à partir du NADH pour maintenir la glycolyse [494]. L'accumulation de lactate provoque une augmentation de NADH comparé au NAD⁺, le rapport entre la concentration de lactate et celle du pyruvate étant directement proportionnel au rapport entre le NADH et le NAD⁺ [495]. Etant donné que les CML-AP de patients HTAP sont aussi caractérisées par ce remodelage métabolique, l'hypothèse qu'elles présentent également un rapport NADH/NAD⁺ augmenté est tentante. Sachant que l'activité de SIRT1 dépend du cofacteur NAD⁺, cela pourrait expliquer l'inhibition de SIRT1 observée. Pour confirmer cette hypothèse, le rapport NADH/NAD⁺ dans les CML-AP de patients devrait être mesuré. Récemment, Christensen et ses collaborateurs [496] ont conçu une méthode non invasive utilisant du glucose hyperpolarisé qui permet de calculer les concentrations cellulaires de lactate et pyruvate et, donc, du rapport NADH/NAD⁺.

Nous avons ensuite exploré l'expression d'autres acteurs participant à la balance acétylation/désacétylation, tels que NAMPT et GCN5. Le premier, indispensable pour l'activité de SIRT1, affiche des niveaux d'expression similaires chez les CML-AP de patients et contrôles. GCN5, l'acétyltransférase antagoniste de SIRT1, est surexprimée chez les patients HTAP, au moins pour ce qui concerne son ARNm. Il serait très intéressant d'approfondir l'étude de son rôle dans cette maladie. En effet, l'hyperacétylation et, par conséquent, l'activité diminuée de PGC-1 α peuvent être causées par une inhibition de SIRT1 ou une activation de GCN5.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la balance acétylation/désacétylation penche vers l'acétylation dans les CML-AP dérivées de patients HTAP.

C. La régulation négative de SIRT1 facilite la prolifération des CML-AP

Le rôle causal de SIRT1 dans la prolifération dépend du contexte cellulaire : par exemple, il a été démontré qu'elle agit en tant qu'oncogène dans les cellules endothéliales aortiques de porc et les cellules de mélanome humaines [497, 498], alors qu'elle inhibe la prolifération des cellules humaines du carcinome du colon et du cancer gastrique [499, 500].

Aucune étude n'a exploré la régulation de la prolifération des CML-AP par cette désacétylase. Nous avons montré que l'inhibition pharmacologique de SIRT1 par le sirtinol augmente la prolifération des CML-AP de rat induite par le facteur de croissance PDGF. Etant donné que les activateurs et inhibiteurs pharmacologiques peuvent ne pas être spécifiques selon la dose utilisée, nous avons spécifiquement sous-régulé cette désacétylase via la technique de l'interférence par ARN pour vérifier que l'effet sur la prolifération dérivait bien de l'inactivation de SIRT1. Nous avons confirmé le rôle de suppresseur de tumeur de SIRT1 dans les CML-AP de rat et humaines, montrant que la diminution de son expression facilite la prolifération de ces cellules. Cela témoigne le rôle pathogénique de l'altération de la balance acétylation/désacétylation dans l'hyperprolifération des CML-AP.

D. La délétion génétique de SIRT1 aggrave le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie chronique chez la souris

Diverses études ont suggéré un rôle protecteur de SIRT1 dans le développement de l'HTAP *in vivo* [407–411]. Néanmoins, les activateurs de SIRT1 utilisés dans ces travaux, le resvératrol et la restriction calorique, ne sont pas spécifiques puisqu'ils ont plusieurs autres cibles [462, 463]. Par conséquent, les effets observés peuvent dériver de l'activation d'autres voies que celle de SIRT1. La seule preuve que SIRT1 peut effectivement améliorer l'HTAP dérive de sa surexpression, qui montre un effet bénéfique sur de rats ayant subi une injection de monocrotaline [411].

Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude n'avait été conduite sur les effets potentiels d'une régulation négative de SIRT1 dans le remodelage vasculaire pulmonaire, signature de l'HTAP. Ainsi, nous avons exploré les conséquences d'une délétion génétique de SIRT1 chez la souris dans des conditions d'hypoxie chronique, connue pour induire un remodelage vasculaire. Nous avons montré que les souris invalidées pour le gène de SIRT1 (souris SIRT1 KO) présentent un remodelage vasculaire plus intense que les souris contrôles issues de la même lignée après 3 semaines d'hypoxie chronique. Cela est associé à une aggravation de la pression systolique et de l'hypertrophie du ventricule droit. Au vu de l'effet pro-prolifératif de la sous-régulation de SIRT1 *in vitro*, il est tentant d'imaginer que l'augmentation des cellules

positives à l'actine du muscle lisse observée dans les vaisseaux pulmonaires des souris SIRT1 KO soit provoquée par l'augmentation de la prolifération des CML-AP. Cependant, comme il a été discuté dans l'introduction, l'épaississement de la media et la néomuscularisation peuvent aussi être causés par d'autres phénomènes, tels que la migration d'autres types cellulaires. Ainsi, pour vérifier si les CML-AP des souris KO hyperprolifèrent, une expérience complémentaire d'immunohistochimie devrait être conduite, telle qu'un double marquage du muscle lisse et d'un marqueur de prolifération, pour vérifier si ces souris présentent une augmentation de leur colocalisation.

D'un point de vue moléculaire, les souris SIRT1 KO en hypoxie montrent un niveau réduit de PGC-1 α par rapport aux souris contrôles, suggérant que SIRT1 peut moduler non seulement son activation mais également son expression ou sa stabilité. Bien que SIRT1 soit surtout connue comme un activateur post traductionnel de ce co-activateur, elle semble agir aussi sur son expression génique. En effet, Amat et ses collaborateurs [501] ont montré que, dans le muscle squelettique, SIRT1 contrôle sa transcription via une boucle d'autorégulation de PGC-1 α , suite à la formation d'un complexe avec ce co-activateur et le facteur myogénique MyoD (*myogenic determining factor*). La diminution d'expression de PGC-1 α pourrait donc engendrer une baisse du métabolisme mitochondrial, qui, comme il a été discuté précédemment, favorise la prolifération des cellules vasculaires pulmonaires dans l'HTAP. Il est cependant important de noter que, contrairement à ce qui est observé dans l'HTAP humaine, l'hypoxie chronique chez la souris augmente le niveau protéique de PGC-1 α . Plusieurs études ont montré une activation de ce co-activateur transcriptionnel suite à l'hypoxie. En effet, son expression est induite dans les myotubes en culture par des conditions mimant l'ischémie [502]. De façon similaire, l'hypoxia hypobare active PGC-1 α et la biogenèse mitochondriale dans le sous-cortex cérébral murin [503].

Cette induction en condition hypoxique pourrait être un mécanisme permettant d'augmenter la production d'ATP et de limiter les dommages provoqués par la carence d'oxygène. La réduction de l'expression de PGC-1 α après la délétion de SIRT1 pourrait donc prévenir cette réponse, et la production d'énergie devrait être fournie principalement par la glycolyse, qui permettrait donc la production des intermédiaires nécessaires pour la biosynthèse durant la prolifération cellulaire. En effet, les poumons des souris SIRT1 KO présentent une augmentation du transporteur du glucose GLUT1, suggérant que la voie glycolytique est activée. Cependant, cette observation reste à être confirmée, par exemple via la détection d'autres marqueurs glycolytiques, tels que la phosphofructokinase et le glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase.

Récemment il a été démontré que, dans le muscle squelettique, SIRT1 peut aussi améliorer l'activité mitochondriale via une voie PGC-1 α -indépendante [504]. En effet, SIRT1 stabilise l'ubiquitine ligase Von Hippel-Lindau, qui reconnaît des résidus de lysine hydroxylés sur HIF-1 α , provoquant ainsi une dégradation majeure de ce facteur de transcription. Or HIF-1 α inhibe c-myc, un facteur de transcription qui régule la transcription de TFAM. Ainsi en diminuant indirectement le niveau protéique d'HIF-1 α , SIRT1 module positivement l'expression de TFAM et, par conséquent, l'expression des gènes mitochondriaux [504]. De façon inattendue, le contenu protéique d'HIF-1 α est inaltéré entre les souris SIRT1 KO et les contrôles en normoxie, et suite à l'hypoxie chronique, les souris déficientes en SIRT1 présentent même un niveau d'HIF-1 α inférieur à celui des souris contrôles. Il a été montré que SIRT1 régule négativement HIF-1 α aussi en le désacétylant directement, bloquant ainsi le recrutement du co-activateur transcriptionnel p300 et réduisant alors son activité [505].

Ce facteur de transcription joue un rôle clé dans la pathogenèse de l'HTAP, induisant l'expression de gènes de la voie glycolytique ; toutefois, au regard de son expression chez les souris SIRT1 KO, l'aggravation du remodelage vasculaire observée chez les souris SIRT1 KO ne passerait pas par cette voie.

L'hypoxie chronique chez la souris induit une augmentation du niveau de SIRT1. L'induction de SIRT1 par l'hypoxie a déjà été observée au niveau des cardiomyocytes : la régulation négative du microARN miR-199a, qui déstabilise l'ARNm de SIRT1 et HIF-1 α , mène en effet à l'augmentation de l'expression de ces derniers et donc à la diminution de l'apoptose due à la destabilisation de p53 [421]. Une autre étude montre au contraire que l'hypoxie, occasionnant une baisse des niveaux de NAD⁺, cause la régulation négative de SIRT1, prévenant donc l'action inhibitrice de cette désacétylase sur HIF-1 α [505]. Ainsi, la régulation de SIRT1 par l'hypoxie semble être un mécanisme complexe, probablement dépendant du type cellulaire.

Si à la suite de l'hypoxie chronique la délétion de SIRT1 a des conséquences sur le remodelage vasculaire et cardiaque, aucune différence est observée entre les deux génotypes en normoxie. Cela contraste avec ce qui a été observé par Paulin et ses collaborateurs [291] suite à la délétion de SIRT3 : en effet, les souris SIRT3 KO développent spontanément l'HTAP. Cependant, quelques observations sont nécessaires. Bien que les deux sirtuines soient impliquées dans le métabolisme, leurs fonctions sont bien distinctes. SIRT1 agit via la transcription AMPK- et PGC-1 α -dépendante de gènes mitochondriaux codant pour des protéines impliquées dans la biogenèse, la fusion et la fission des mitochondries, ainsi que pour des composants de la chaîne respiratoire. SIRT3 pour sa part active les composants

mitochondriaux du cycle de Krebs et de l'oxydation phosphorylante [506]. Par conséquent, il est tout à fait possible que leur délétion ait des effets différents. SIRT1 est une protéine senseur du stress oxydant [507] et il n'est donc pas surprenant que les effets de sa délétion n'apparaissent qu'après l'exposition au stress hypoxique. En effet, plusieurs études ont montré des différences significatives entre les deux génotypes seulement après exposition des animaux déficients en SIRT1 à un stress, tels que l'endotoxine [508] ou une réaction allergique [509]. De plus, la délétion de la même sirtuine peut avoir deux effets contradictoires. En effet, alors que Waypa et ses collaborateurs [510] montrent que des souris invalidées pour SIRT3 ne développent pas une HTAP plus sévère que les souris sauvages de la même lignée après exposition à l'hypoxie chronique, Paulin et ses collaborateurs [291] démontrent en revanche que la déficience en SIRT3 détermine à elle seule le développement spontané de l'HTAP chez la souris. Cela pourrait être dû à fond génétique qui diffère entre les animaux. Comme le discutent par Paulin et ses collaborateurs, la délétion de SIRT3, gène impliqué dans le métabolisme, aurait un impact plus important chez les souris utilisées dans leur étude, les 129/Sv, car elles présentent à l'origine un métabolisme plus lent et une fonction mitochondriale plus faible que les souris C57BL/6 de l'autre étude [291]. Une autre explication pourrait être l'âge des animaux utilisés dans les deux travaux. SIRT3 a en effet été associée au vieillissement et il a été suggéré que cette désacétylase pourrait jouer un rôle important aux âges plus avancées [511, 512]. Cependant, étant donné que dans les deux articles l'âge des animaux n'est pas spécifié, il n'est pas possible de faire d'hypothèses à ce sujet.

A ce propos, il est important de noter que dans notre étude les souris ont été utilisées à l'âge de 4 mois et demi. Il se pourrait que la délétion de SIRT1 ait des effets à des stades plus tardifs chez des animaux non soumis à des situations de stress. Pour cela, il serait très intéressant d'induire la délétion de SIRT1 chez nos souris et de les laisser vieillir, puis de mesurer le remodelage vasculaire et cardiaque.

E. La surexpression de SIRT1 n'influence pas la prolifération des CML-AP.

Nous avons montré que la surexpression de SIRT1, contrairement à sa sous-expression, n'a aucun effet sur la prolifération des CML-AP estimée par le clivage du sel WST-1. Il est important de souligner que ce test, très simple et pratique à réaliser, présente des points faibles. En effet, il ne permet pas de distinguer si une augmentation du signal est due à une

augmentation de la prolifération ou bien à une diminution de la mort cellulaire. En outre, étant donné que le clivage du sel WST-1 se base sur l'activité de déshydrogénases mitochondriales, il se pourrait qu'à nombre égal de cellules les signaux diffèrent si une condition affecte l'activité de ces enzymes. SIRT1 étant un modulateur positif du métabolisme mitochondrial, il serait judicieux de confirmer le résultat obtenu par des moyens plus précis d'évaluation de la prolifération cellulaire, tel que la mesure de l'incorporation du BrdU.

Dans le cas où ce résultat était confirmé, l'absence d'effet de la surexpression de SIRT1 sur la prolifération pourrait paraître surprenante. Cependant, des études ont démontré qu'une augmentation de l'expression de SIRT1 ne corrèle pas forcément avec une augmentation de son activité [513]. En général, il est reconnu que la surexpression d'un enzyme peut être associée à une diminution de son activité. Par exemple, les niveaux de guanylate cyclase augmentent considérablement chez les patients atteints d'HTAP, alors que son activité est fortement réduite [627]. Cela pourrait être un mécanisme de compensation cellulaire pour répondre aux niveaux élevés d'enzyme inactive.

En ce qui concerne SIRT1, il est important de garder à l'esprit que cette enzyme est un senseur métabolique de la cellule, répondant aux niveaux de NAD^+ , qui est son cofacteur. Par conséquent, une augmentation de protéines SIRT1 ne peut pas se traduire par une augmentation de protéines SIRT1 actives si l'état métabolique cellulaire ne change pas.

F. Stac-3 active SIRT1 dans les CML-AP.

Pour activer SIRT1, nous avons utilisé le composé Stac-3 (*sirtuin activating compound 3*). Bien que diverses études aient démontré que des Stacs présents dans la nature (par exemple, le resvératrol), ainsi que des Stacs synthétiques chimiquement différents, activent SIRT1 *in vitro* en abaissant sa constante de Michaelis (K_M) [356, 360, 376, 377], la légitimité de ces molécules en tant qu'activateurs directs de SIRT1 a été objet d'un long débat. En effet, des études ont montré que les Stacs augmentent l'activité de SIRT1 vers des substrats marqués avec le fluorophore utilisé pour la détection, mais pas vers ces mêmes peptides lorsqu'ils ne sont pas marqués [448, 515, 516], soulevant le doute d'un possible artefact. Étant donné que les fluorophores utilisés dans ces études étaient hydrophobes [376, 377], Hubbard et ses collaborateurs [450] ont testé si des groupes hydrophobes pouvaient faciliter l'activation de SIRT1 par les Stacs. En effet, des motifs hydrophobes spécifiques trouvés dans des substrats de SIRT1 tels que PGC-1 α et FOXO3a favorisent l'activation par les Stacs. De plus, dans la même étude il a été démontré qu'un résidu de glutamate en position N-terminal par rapport au

domaine catalytique de SIRT1 est nécessaire pour l'activation par les Stacs [450]. Ainsi, SIRT1 serait directement activée par des Stacs chimiquement différents via un mécanisme allostérique. Cependant, il est important de souligner que l'activité de SIRT1 dans ces études a toujours été mesurée à l'aide de kits qui, comme précisé précédemment, ne permettent pas d'évaluer l'activité de SIRT1 dans son contexte physiologique. Nous avons donc exploré pour la première fois les effets de Stac-3 sur l'activation de SIRT1 dans des CML-AP de rat via la détection des formes acétylées et totales de trois cibles de SIRT1 : PGC-1 α , l'histone 1 et FOXO1. L'activation de SIRT1 est suggérée par la diminution de la forme acétylée des trois cibles. De plus, nous avons montré une forte augmentation de l'expression en ARNm de NAMPT, une enzyme clé de la voie de sauvetage pour la production de NAD⁺, cofacteur essentiel de SIRT1. Comme il a été décrit dans l'introduction, la transcription de NAMPT est stimulée par l'AMPK [322, 324], qui a son tour est activée par SIRT1 via la désacétylation activatrice de la kinase LKB1, modulateur positif de l'AMPK [390]. De façon intéressante, il a été montré que SIRT1, en complexe avec les facteurs de transcriptions CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) et BMAL1 (*Brain and Muscle ARNT-like 1*), est recrutée suivant un rythme circadien au promoteur de NAMPT, pouvant ainsi agir aussi de manière directe sur sa transcription [517].

G. La régulation positive de l'activité de SIRT1 inhibe fortement la prolifération des CML-AP et est associée à l'activation de la biogenèse mitochondriale.

L'activation pharmacologique de SIRT1 par l'activateur spécifique Stac-3 inhibe profondément la prolifération des CML-AP humaines et de rat. Le fait que Stac-3 inhibe la prolifération des cellules contrôles, en plus de la prolifération des cellules dérivant de patients HTAP, n'est pas relevant puisque les CML-AP prolifèrent très peu physiologiquement.

De façon cohérente avec ce qui a été observé dans d'autres types musculaires, tels que le cœur et le muscle squelettique [323], l'activation de SIRT1 dans les CML-AP est associée à une augmentation de la biogenèse mitochondriale, avec une élévation de l'expression des gènes faisant partie de la cascade transcriptionnelle dirigée par le co-activateur PGC-1 α , tels que ERR α et PPAR α , qui se traduit par une augmentation significative des marqueurs de la masse mitochondriale VDAC et citrate synthase. Il serait très intéressant d'étudier quelle est la contribution précise de l'activation du métabolisme mitochondrial dans les effets antiprolifératifs de l'activation de SIRT1. Pour cela, Stac-3 pourrait être utilisé pour traiter des

cellules où le niveau protéique d'un des plus importants médiateurs des effets métaboliques de SIRT1, PGC-1 α , a été modulé négativement.

De façon intéressante, le traitement avec Stac-3 stimule aussi l'expression d'un autre gène régulé positivement par PGC-1 α , l'enzyme antioxydante SOD2. Archer et ses collaborateurs [92] ont montré que son expression est réduite dans les CML-AP issues de patients atteints d'HTAP et de modèles animaux, à cause d'une hyperméthylation au niveau du promoteur et de la région stimulatrice de ce gène. La sous-expression de SOD2 dans les CML-AP de rat reproduit le phénotype hyperprolifératif et résistant à l'apoptose des CML-AP-HTAP [92]. Cela est au moins en partie dû à l'activation d'HIF-1 α , normalement déstabilisé par l'H₂O₂ issu de la réaction catalysée par SOD2, et à l'inhibition des canaux potassiques voltage-dépendants sensibles aux espèces réactives de l'oxygène [92]. A l'inverse, le rétablissement du niveau de SOD2 inhibe la prolifération des CML-AP et permet la régression de l'HTAP *in vivo*. Par conséquent, il se pourrait que l'activation de l'expression de SOD2 par Stac-3 contribue à l'effet antiprolifératif de cet activateur de SIRT1.

Diverses études ont montré des effets bénéfiques de l'activation du métabolisme mitochondrial sur l'HTAP expérimentale chez l'animal, mettant ainsi en évidence la possibilité d'un traitement métabolique de l'HTAP. Par exemple, il a été montré que l'administration de dichloroacétate améliore l'HTAP induite par l'hypoxie chronique, la monocrotaline et la prédisposition génétique (*fawn hooded*) chez le rat [164, 308, 518]. Le dichloroacétate inhibe la pyruvate déshydrogénase kinase, conduisant à l'activation de la pyruvate déshydrogénase. Cette enzyme, localisée dans la mitochondrie, est responsable de la conversion du pyruvate, issu de la glycolyse, en acétyl-CoA, ce dernier étant un substrat du cycle de Krebs, nécessaire pour l'oxydation phosphorylante. Le trimetazidine et la ranolazine, des inhibiteurs d'une enzyme de l'oxydation mitochondriale des acides gras, présentent aussi des effets bénéfiques dans l'HTAP expérimentale. Etant donné que l'oxydation des acides gras contribue à l'inhibition de l'oxydation de glucose via le "cycle de Randle", détaillé en figure 40, son inhibition prévient ce remodelage métabolique, limitant ainsi le phénotype cellulaire pro-prolifératif et antiapoptotique observé dans l'HTAP [519, 520].

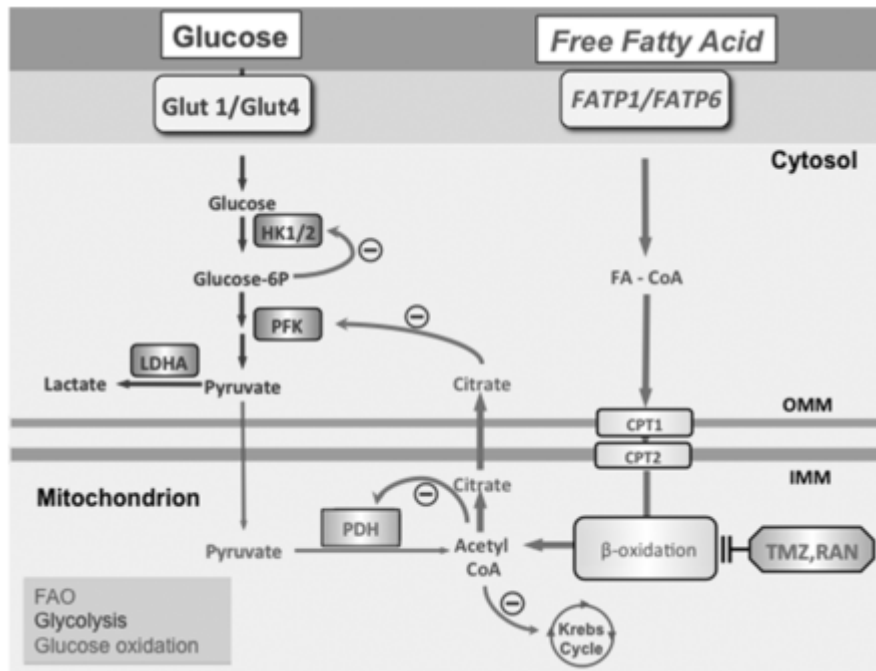


Figure 41 : Représentation schématique du cycle de Randle.

Le cycle de Randle est la relation réciproque entre l'oxydation de glucose et l'oxydation des acides gras (FAO). L'acétyl-CoA et le citrate produits par l'oxydation des acides gras inhibent la pyruvate déshydrogénase (PDH) et la phosphofructokinase (PFK), respectivement, diminuant l'oxydation du glucose quand les acides gras sont abondants. Le trimetazidine (TMZ) et la ranolazine (RAN), les inhibiteurs pharmacologiques de l'oxydation des acides gras, peuvent donc restaurer l'oxydation du glucose. CPT1/2 indique la carnitine palmitoyltransférase 1/2; FA-CoA, *fatty acyl-CoA*; FATP1/6, *fatty acid transport protein 1/6*; Glut1/4, *glucose transporter 1/4*; HK, hexokinase; IMM, *inner mitochondrial membrane*; LDHA, lactate déshydrogénase A; OMM, *outer mitochondrial membrane*. De [520]

Au regard des effets bénéfiques sur le métabolisme mitochondrial et la prolifération cellulaire *in vitro*, il serait très intéressant de tester Stac-3, ou un autre activateur spécifique de SIRT1 tel que SRT1720 (très utilisé pour les études *in vivo*), dans un modèle animal d'HTAP, pour explorer s'il serait d'une part capable de prévenir ou, mieux encore, de faire régresser cette maladie, et d'autre part si ce traitement serait associé à une amélioration du métabolisme mitochondrial dans les cellules vasculaires et aussi dans d'autres organes. En effet, de façon intéressante, le remodelage métabolique a été observé non seulement dans les CML, les cellules endothéliales et les fibroblastes, mais aussi dans les cardiomyocytes du ventricule droit, les cellules immunitaires et le muscle squelettique, suggérant un trouble métabolique globale dans l'HTAP [468]. Cela indique donc la possibilité d'un traitement systémique, qui pourrait se montrer plus efficace que les thérapies actuelles qui ciblent des voies dont l'altération est restreinte aux poumons.

De plus, pour explorer la contribution de l'amélioration du métabolisme mitochondrial dans l'effet bénéfique attendu, il est tentant d'activer spécifiquement SIRT1 et d'induire l'HTAP chez des souris déficientes en PGC-1 α . En effet, dans les études citées auparavant, les auteurs

n'ont pas démontré la contribution de la normalisation du métabolisme pour la régression de l'HTAP. En outre, le dichloroacétate, en plus d'inhiber la pyruvate déshydrogénase kinase, présente également d'autres effets : par exemple, il corrige en partie les dysfonctions liées à l'activation anormale de l'axe HIF-1-K_v1.5 et la production d'espèces réactives de l'oxygène [168].

H. La régulation positive de l'activité de SIRT1 modifie la morphologie mitochondriale.

Nous avons montré que le traitement avec Stac-3 modifie la morphologie mitochondriale, prévenant notamment l'augmentation du pourcentage de petites mitochondries et la diminution de la proportion de grosses mitochondries induites par la prolifération PDGF-dépendante.

Cela pourrait aussi participer à l'effet antiprolifératif de Stac-3 étant donné que, comme il a été discuté précédemment, des études ont démontré que la morphologie de mitochondries influence la prolifération des CML-AP. En effet, les CML-AP issues de patients atteints d'HTAP présentent un réseau mitochondrial fragmenté, et ceci est associé à une augmentation de la forme phosphorylée active de DRP1 [284]. L'inhibition pharmacologique ou moléculaire de DRP1 bloque le cycle cellulaire et améliore l'HTAP induite par la monocrotaline chez le rat, réduisant la prolifération des CML-AP [284]. A l'inverse, l'activation de la fission via l'administration de cobalt induit le développement d'une HTAP [284]. La fragmentation du réseau mitochondrial observée dans les CML-AP de patients est due à une augmentation de la fission d'un côté, mais aussi à une diminution de la fusion. En effet, la protéine MFN2, impliquée dans la fusion de la membrane externe mitochondriale, est sous-exprimée dans les CML-AP de patients atteints d'HTAP [285]. La réduction de son expression dans des CML-AP contrôles cause une diminution de l'expression de son co-activateur transcriptionnel PGC-1 α et engendre une augmentation de leur prolifération. A l'inverse, sa surexpression dans des CML-AP issues de patients atteints d'HTAP aboutit à l'élévation de la fusion mitochondriale, associée au ralentissement de la prolifération cellulaire et l'augmentation de l'apoptose [285]. Nous pouvons donc suggérer que l'inhibition de la fragmentation mitochondrial par Stac-3 implique l'activation de PGC-1 α qui à son tour est capable d'augmenter l'expression de la protéine MFN2 [285].

La forme des mitochondries pourrait affecter la prolifération cellulaire en modulant la physiologie mitochondriale. En effet, il a été montré que des mitochondries formant un réseau tubulaire sont énergétiquement plus efficaces que des mitochondries fragmentées. Des

mitochondries allongées, obtenues suite à la diminution du processus de fission, sont protégées de la mitophagie et ont une densité de crêtes plus importante, ce qui facilite l'oligomérisation de l'ATPase pour maintenir la production d'ATP et permettre la survie de cellules en privation [521]. De plus, il a été observé que des altérations dans l'expression d'OPA1, qui diminuent le processus de fusion mitochondrial, affectent le métabolisme mitochondrial réduisant la synthèse d'ATP guidée par les substrats du complexe I [522].

Des changements de la morphologie mitochondriale influencent non seulement la production énergétique, mais aussi d'autres fonctions mitochondriales essentielles, telles que la génération d'espèces réactives de l'oxygène, l'homéostasie de Ca^{2+} et l'apoptose. Par exemple, suite à l'exposition à de fortes doses de glucose, les mitochondries se fragmentent rapidement, produisant plus d'espèces réactives de l'oxygène. De façon importante, il a été montré que cette fragmentation mitochondriale est nécessaire pour la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène induite par de hautes concentrations de glucose [523].

La MFN2 régule positivement les interactions réticulum endoplasmique-mitochondries. Son absence affecte directement l'absorption de Ca^{2+} par la mitochondrie durant la libération de Ca^{2+} régulée par l'inositol triphosphate [524], alors que sa surexpression induit l'apoptose, probablement en raison d'un lien excessif réticulum endoplasmique-mitochondries qui, par conséquent, pourrait conduire à un transfert démesuré de Ca^{2+} entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries [525]. Il est important de noter, toutefois, qu'une étude très récente a remis en question ce modèle largement accepté, montrant que la délétion de MFN2 cause une augmentation du couplage structural et fonctionnel entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie [526]. De plus, la division DRP1-dépendante du réseau mitochondrial prévient les vagues calciques dans l'organite, protégeant ainsi contre l'apoptose provoquée par le Ca^{2+} [527]. La sous-expression d'OPA1 augmente la vitesse et l'ampleur de l'augmentation de Ca^{2+} mitochondrial, probablement via l'augmentation du diamètre de jonctions des crêtes contrôlé par cette protéine de fusion [528]. Cela pourrait en effet faciliter l'accès du Ca^{2+} aux transporteurs de la membrane des crêtes.

Enfin, il a été montré que l'inhibition de la fission mitochondriale ou la stimulation de la fusion retardent significativement l'apoptose. Parone et ses collaborateurs [529] ont démontré que l'inhibition de la fission n'empêche pas la libération de Smac/DIABLO, mais elle peut retarder celle du cytochrome *c*. Cela peut être obtenu via l'inhibition du remodelage des crêtes mitochondriales, un processus nécessaire à la mobilisation efficace du cytochrome *c* [530].

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude montre que l'activation de SIRT1 induit un profond remaniement des mitochondries qui concerne à la fois le métabolisme et la

structure de ces organites. L'augmentation de la capacité oxydative et l'inhibition de la fragmentation, qui peuvent d'ailleurs être liées entre elles, sont potentiellement capables d'induire l'effet antiprolifératif de l'activateur de SIRT1 Stac-3. L'étude qui permettra d'identifier la contribution de chaque modification dans cet effet est donc envisageable.

Bibliographie

1. Lilly B: **We Have Contact: Endothelial Cell-Smooth Muscle Cell Interactions.** *Physiology* 2014, **29**:234–241.
2. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H: **Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review.** *Eur Respir J* 2009, **34**:888–894.
3. Weir EK, López-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL: **Acute oxygen-sensing mechanisms.** *N Engl J Med* 2005, **353**:2042–2055.
4. Sahoo N, Hoshi T, Heinemann SH: **Oxidative Modulation of Voltage-Gated Potassium Channels.** *Antioxid Redox Signal* 2013, **21**:933–952.
5. Michelakis ED, Hampl V, Nsair A, Wu X, Harry G, Haromy A, Gurtu R, Archer SL: **Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing.** *Circ Res* 2002, **90**:1307–1315.
6. Blaustein MP: **Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness.** *Am J Physiol* 1993, **264**(6 Pt 1):C1367–1387.
7. Berridge MJ: **Inositol trisphosphate and calcium signalling.** *Nature* 1993, **361**:315–325.
8. Parekh AB, Penner R: **Store depletion and calcium influx.** *Physiol Rev* 1997, **77**:901–930.
9. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB: **Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone.** *Am J Physiol* 1990, **259**(1 Pt 1):C3–18.
10. Ganitkevich VYa null, Isenberg G: **Membrane potential modulates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ transients in guinea-pig coronary myocytes.** *J Physiol* 1993, **470**:35–44.
11. Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, Yuan JX: **Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, **280**:H746–755.
12. Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Cowling RT, Yuan JX-J: **Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells.** *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2003, **285**:L1233–L1245.
13. Webb RC: **Smooth Muscle Contraction and Relaxation.** *Adv Physiol Educ* 2003, **27**:201–206.
14. Nishikawa M, de Lanerolle P, Lincoln TM, Adelstein RS: **Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase.** *J Biol Chem* 1984, **259**:8429–8436.

15. Miller JR, Silver PJ, Stull JT: **The role of myosin light chain kinase phosphorylation in beta-adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle.** *Mol Pharmacol* 1983, **24**:235–242.
16. Lee MR, Li L, Kitazawa T: **Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase.** *J Biol Chem* 1997, **272**:5063–5068.
17. Etter EF, Eto M, Wardle RL, Brautigan DL, Murphy RA: **Activation of myosin light chain phosphatase in intact arterial smooth muscle during nitric oxide-induced relaxation.** *J Biol Chem* 2001, **276**:34681–34685.
18. Hoepfer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB: **Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **62**(25, Supplement):D42–D50. [Updates in Pulmonary Hypertension]
19. Montani D, Chaumais M-C, Guignabert C, Günther S, Girerd B, Jaïs X, Algalarrondo V, Price LC, Savale L, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M: **Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension.** *Pharmacol Ther* 2014, **141**:172–191.
20. Sutendra G, Michelakis ED: **Pulmonary Arterial Hypertension: Challenges in Translational Research and a Vision for Change.** *Sci Transl Med* 2013, **5**:208sr5–208sr5.
21. Mocumbi AO, Thienemann F, Sliwa K: **A Global Perspective on the Epidemiology of Pulmonary Hypertension.** *Can J Cardiol* 2015, **31**:375–381.
22. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA: **Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure.** *Circulation* 2008, **117**:1717–1731.
23. Sutendra G, Michelakis ED: **The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension.** *Cell Metab* 2014, **19**:558–573.
24. Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD: **An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry.** *Chest* 2012, **142**:448–456.
25. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J, Harrington RA, Anderson JL, Bates ER, Bridges CR, Eisenberg MJ, Ferrari VA, Grines CL, Hlatky MA, Jacobs AK, Kaul S, Lichtenberg RC, Lindner JR, Moliterno DJ, Mukherjee D, Pohost GM, Rosenson RS, Schofield RS, et al.: **ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association.** *Circulation* 2009, **119**:2250–2294.
26. Sitbon O, Lascoux-Combe C, Delfraissy J-F, Yeni PG, Raffi F, De Zuttere D, Gressin V, Clerson P, Sereni D, Simonneau G: **Prevalence of HIV-related pulmonary arterial hypertension in the current antiretroviral therapy era.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **177**:108–113.

27. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, Kahan A, Cabane J, Francès C, Launay D, Mouthon L, Allanore Y, Tiev KP, Clerson P, de Groote P, Humbert M: **Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:3792–3800.
28. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier J-F, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G: **Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **173**:1023–1030.
29. Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE, Barst RJ, Benza RL, Liou TG, Turner M, Giles S, Feldkircher K, Miller DP, McGoon MD: **Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry.** *Chest* 2010, **137**:376–387.
30. McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Pulido T, Rich S, Rosenkranz S, Suissa S, Humbert M: **Pulmonary Arterial Hypertension: Epidemiology and Registries.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **62**(25, Supplement):D51–D59. [*Updates in Pulmonary Hypertension*]
31. Chen Y-F, Jowett S, Barton P, Malottki K, Hyde C, Gibbs JSR, Pepke-Zaba J, Fry-Smith A, Roberts J, Moore D: **Clinical and cost-effectiveness of epoprostenol, iloprost, bosentan, sitaxentan and sildenafil for pulmonary arterial hypertension within their licensed indications: a systematic review and economic evaluation.** *Health Technol Assess Winch Engl* 2009, **13**:1–320.
32. Copher R, Cerulli A, Watkins A, Laura Monsalvo M: **Treatment patterns and healthcare system burden of managed care patients with suspected pulmonary arterial hypertension in the United States.** *J Med Econ* 2012, **15**:947–955.
33. Hatano S, World Health Organization (Eds): *Primary Pulmonary Hypertension. Report on a WHO Meeting, Geneva, 15-17 October 1973.* Geneva: WHO; 1975.
34. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R: **Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2013, **62**(25, Supplement):D34–D41. [*Updates in Pulmonary Hypertension*]
35. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M: **Management of Pulmonary Arterial Hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2015, **65**:1976–1997.
36. Meyrick B: **Structure Function Correlates in the Pulmonary Vasculature During Acute Lung Injury and Chronic Pulmonary Hypertension*1,2.** *Toxicol Pathol* 1991, **19**:447–457.
37. Yamaki S, Wagenvoort CA: **Comparison of primary plexogenic arteriopathy in adults and children. A morphometric study in 40 patients.** *Br Heart J* 1985, **54**:428–434.
38. Tajsic T, Morrell NW: **Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension.** *Compr Physiol* 2011, **1**:295–317.

39. Merklinger SL, Wagner RA, Spiekerkoetter E, Hinek A, Knutsen RH, Kabir MG, Desai K, Hacker S, Wang L, Cann GM, Ambartsumian NS, Lukanidin E, Bernstein D, Husain M, Mecham RP, Starcher B, Yanagisawa H, Rabinovitch M: **Increased Fibulin-5 and Elastin in S100A4/Mts1 Mice With Pulmonary Hypertension.** *Circ Res* 2005, **97**:596–604.
40. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG: **Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms.** *Circ Res* 2006, **99**:675–691.
41. Spees JL, Whitney MJ, Sullivan DE, Lasky JA, Laboy M, Ylostalo J, Prockop DJ: **Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension.** *FASEB J* 2008, **22**:1226–1236.
42. Qiao L, Nishimura T, Shi L, Sessions D, Thrasher A, Trudell JR, Berry GJ, Pearl RG, Kao PN: **Endothelial Fate Mapping in Mice With Pulmonary Hypertension.** *Circulation* 2014, **129**:692–703.
43. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX-J, Weir EK: **Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**(1 Suppl):S20–31.
44. Hayashida K, Fujita J, Miyake Y, Kawada H, Ando K, Ogawa S, Fukuda K: **Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension.** *Chest* 2005, **127**:1793–1798.
45. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Pécoux C, Bogaard HJ, Dorfmueller P, Remy S, Lecerf F, Planté S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F: **Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension.** *Circulation* 2015:CIRCULATIONAHA.114.008750.
46. Sheikh AQ, Lighthouse JK, Greif DM: **Recapitulation of Developing Artery Muscularization in Pulmonary Hypertension.** *Cell Rep* 2014, **6**:809–817.
47. Archer S, Rich S: **Primary Pulmonary Hypertension A Vascular Biology and Translational Research “Work in Progress.”** *Circulation* 2000, **102**:2781–2791.
48. Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tuder RM: **Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension.** *J Clin Invest* 1998, **101**:927–934.
49. Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF, Tuder RM: **Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth.** *Am J Pathol* 1999, **155**:411–419.
50. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G: **Hypertension artérielle pulmonaire primitive.** *Réanimation* 2002, **11**:95–104.
51. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR: **Mature Vascular Endothelium Can Give Rise to Smooth Muscle Cells via Endothelial-Mesenchymal Transdifferentiation In Vitro Analysis.** *Circ Res* 2002, **90**:1189–1196.

52. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM: **Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension.** *J Am Coll Cardiol* 2004, **43**(12, Supplement):S25–S32.
53. Eisenberg PR, Lucore C, Kaufman L, Sobel BE, Jaffe AS, Rich S: **Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension.** *Circulation* 1990, **82**:841–847.
54. Diehl P, Aleker M, Helbing T, Sossong V, Germann M, Sorichter S, Bode C, Moser M: **Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension.** *J Thromb Thrombolysis* 2011, **31**:173–179.
55. Collados MT, Velázquez B, Borbolla JR, Sandoval J, Massó F, Montaña LF, Guarner V: **Endothelin-1 and functional tissue factor: a possible relationship with severity in primary pulmonary hypertension.** *Heart Vessels* 2003, **18**:12–17.
56. Tu L, Guignabert C: **Emerging molecular targets for anti-proliferative strategies in pulmonary arterial hypertension.** *Handb Exp Pharmacol* 2013, **218**:409–436.
57. Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS: **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension.** *Eur Respir J* 2012, **40**:766–782.
58. Rubin LJ: **Primary Pulmonary Hypertension.** *N Engl J Med* 1997, **336**:111–117.
59. Gaine SP, Rubin LJ: **Primary pulmonary hypertension.** *Lancet Lond Engl* 1998, **352**:719–725.
60. Mandegar M, Fung Y-CB, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX-J: **Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension.** *Microvasc Res* 2004, **68**:75–103.
61. Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, Seiden JE, Rubin LJ, Yuan JX-J: **Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation.** *Am J Physiol - Cell Physiol* 2000, **279**:C1540–C1549.
62. Golovina VA, Platoshyn O, Bailey CL, Wang J, Limsuwan A, Sweeney M, Rubin LJ, Yuan JX-J: **Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation.** *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 2001, **280**:H746–H755.
63. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H: **Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression.** *Nature* 1997, **385**:260–265.
64. Allbritton NL, Oancea E, Kuhn MA, Meyer T: **Source of nuclear calcium signals.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:12458–12462.
65. Carroll DJ, Albay DT, Hoang KM, O'Neill FJ, Kumano M, Foltz KR: **The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization.** *Dev Biol* 2000, **217**:179–191.

66. Mogami H, Kojima I: **Stimulation of Calcium Entry Is Prerequisite for DNA Synthesis Induced by Platelet-Derived Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **196**:650–658.
67. Michiels C, Minet E, Michel G, Mottet D, Piret J-P, Raes M: **HIF-1 and AP-1 Cooperate to Increase Gene Expression in Hypoxia: Role of MAP Kinases.** *IUBMB Life* 2001, **52**:49–53.
68. Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H: **Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals.** *Cell Calcium* 1998, **23**:131–134. [*Nuclear Calcium: Regulation and Functions*]
69. Semenza GL: **Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease.** *Respir Res* 2000, **1**:159–162.
70. Faller DV: **Endothelial Cell Responses to Hypoxic Stress.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999, **26**:74–84.
71. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ, Yuan JX-J: **Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2003, **285**:L740–L754.
72. Rabinovitch M: **ELastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension.** *Chest* 1998, **114**:213S–224S.
73. Burg ED, Remillard CV, Yuan JX-J: **Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications.** *Br J Pharmacol* 2008, **153**(Suppl 1):S99–S111.
74. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y: **Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:9487–9492.
75. Bortner CD, Hughes FM, Cidlowski JA: **A Primary Role for K⁺ and Na⁺ Efflux in the Activation of Apoptosis.** *J Biol Chem* 1997, **272**:32436–32442.
76. Remillard CV, Yuan JX-J: **Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death.** *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2004, **286**:L49–L67.
77. Thornberry NA, Lazebnik Y: **Caspases: Enemies Within.** *Science* 1998, **281**:1312–1316.
78. Bortner CD, Cidlowski JA: **Caspase Independent/Dependent Regulation of K⁺, Cell Shrinkage, and Mitochondrial Membrane Potential during Lymphocyte Apoptosis.** *J Biol Chem* 1999, **274**:21953–21962.
79. Ekhterae D, Platoshyn O, Krick S, Yu Y, McDaniel SS, Yuan JX-J: **Bcl-2 decreases voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol - Cell Physiol* 2001, **281**:C157–C165.

80. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD: **The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis.** *Science* 1997, **275**:1132–1136.
81. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y: **Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:1455–1459.
82. Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, Kim H, Yuan JX-J: **Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol - Cell Physiol* 2001, **280**:C970–C979.
83. Geraci MW, Moore M, Gesell T, Yeager ME, Alger L, Golpon H, Gao B, Loyd JE, Tuder RM, Voelkel NF: **Gene Expression Patterns in the Lungs of Patients With Primary Pulmonary Hypertension A Gene Microarray Analysis.** *Circ Res* 2001, **88**:555–562.
84. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA: **Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor–II Gene.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**:737–744.
85. Gurtu V, Michelakis ED: **Emerging therapies and future directions in pulmonary arterial hypertension.** *Can J Cardiol* 2015, **31**:489–501.
86. Long L, Ormiston ML, Yang X, Southwood M, Gräf S, Machado RD, Mueller M, Kinzel B, Yung LM, Wilkinson JM, Moore SD, Drake KM, Aldred MA, Yu PB, Upton PD, Morrell NW: **Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension.** *Nat Med* 2015, **21**:777–785.
87. Morrell NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, Trembath RC: **Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins.** *Circulation* 2001, **104**:790–795.
88. Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJB, Kuliszewski MA, Karoubi G, Courtman DW, Zucco L, Granton J, Stewart DJ: **Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension.** *Circ Res* 2006, **98**:209–217.
89. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Böttinger EP, Lisanti MP: **Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor.** *J Biol Chem* 2001, **276**:6727–6738.
90. Tang B, Li Y, Nagaraj C, Morty RE, Gabor S, Stacher E, Voswinckel R, Weissmann N, Leithner K, Olschewski H, Olschewski A: **Endothelin-1 inhibits background two-pore domain channel TASK-1 in primary human pulmonary artery smooth muscle cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, **41**:476–483.
91. Rabinovitch M: **Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.** *J Clin Invest* 2012, **122**:4306–4313.

92. Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JRB, Gomberg-Maitland M, Thébaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J: **Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target.** *Circulation* 2010, **121**:2661–2671.
93. Zhao L, Chen C-N, Hajji N, Oliver E, Cotroneo E, Wharton J, Wang D, Li M, McKinsey TA, Stenmark KR, Wilkins MR: **Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid.** *Circulation* 2012, **126**:455–467.
94. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D: **Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?** *Ann Intern Med* 1991, **114**:464–469.
95. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ: **Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension.** *N Engl J Med* 1993, **328**:1732–1739.
96. Chester AH, Yacoub MH: **The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension.** *Glob Cardiol Sci Pract* 2014, **2014**:62–78.
97. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SAA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FBJM, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC: **Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension.** *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2004, **18**:1746–1748.
98. Förstermann U, Münzel T: **Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace.** *Circulation* 2006, **113**:1708–1714.
99. Giaid A, Saleh D: **Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension.** *N Engl J Med* 1995, **333**:214–221.
100. Dasgupta A, Bowman L, D’Arsigny C, Archer S: **Soluble Guanylate Cyclase: A New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.** *Clin Pharmacol Ther* 2015, **97**:88–102.
101. Weissmann N, Hackemack S, Dahal BK, Pullamsetti SS, Savai R, Mittal M, Fuchs B, Medebach T, Dumitrascu R, Eickels M van, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT: **The soluble guanylate cyclase activator HMR1766 reverses hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009, **297**:L658–665.
102. Schermuly RT, Stasch J-P, Pullamsetti SS, Middendorff R, Müller D, Schlüter K-D, Dingendorf A, Hackemack S, Kolosonek E, Kaulen C, Dumitrascu R, Weissmann N, Mittendorf J, Klepetko W, Seeger W, Ghofrani HA, Grimminger F: **Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2008, **32**:881–891.
103. Moncada S, Higgs A: **The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway.** *N Engl J Med* 1993, **329**:2002–2012.

104. Inserte J, Hernando V, Ruiz-Meana M, Poncelas-Nozal M, Fernández C, Agulló L, Sartorio C, Vilarcosa Ú, Garcia-Dorado D: **Delayed phospholamban phosphorylation in post-conditioned heart favours Ca²⁺ normalization and contributes to protection.** *Cardiovasc Res* 2014, **103**:542–553.
105. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA: **Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function.** *Circ Res* 2003, **93**:280–291.
106. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K: **Phosphodiesterases in the vascular system.** *J Smooth Muscle Res Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* 2003, **39**:67–86.
107. Wharton J, Strange JW, Møller GMO, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR: **Antiproliferative Effects of Phosphodiesterase Type 5 Inhibition in Human Pulmonary Artery Cells.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **172**:105–113.
108. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE: **An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension.** *N Engl J Med* 1992, **327**:70–75.
109. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, ABMAN SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF: **Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**:1925–1932.
110. Hashimoto H, Negishi M, Ichikawa A: **Identification of a prostacyclin receptor coupled to the adenylate cyclase system via a stimulatory GTP-binding protein in mouse mastocytoma P-815 cells.** *Prostaglandins* 1990, **40**:491–505.
111. Ali FY, Davidson SJ, Moraes LA, Traves SL, Paul-Clark M, Bishop-Bailey D, Warner TD, Mitchell JA: **Role of nuclear receptor signaling in platelets: antithrombotic effects of PPARbeta.** *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2006, **20**:326–328.
112. Ali FY, Egan K, FitzGerald GA, Desvergne B, Wahli W, Bishop-Bailey D, Warner TD, Mitchell JA: **Role of prostacyclin versus peroxisome proliferator-activated receptor beta receptors in prostacyclin sensing by lung fibroblasts.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, **34**:242–246.
113. Ali FY, Armstrong PCJ, Dhanji A-RA, Tucker AT, Paul-Clark MJ, Mitchell JA, Warner TD: **Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**:706–711.
114. Guignabert C, Izikki M, Tu LI, Li Z, Zadigue P, Barlier-Mur A-M, Hanoun N, Rodman D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S: **Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension.** *Circ Res* 2006, **98**:1323–1330.
115. Hervé P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L: **Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension.** *Am J Med* 1995, **99**:249–254.
116. Lee SL, Wang WW, Finlay GA, Fanburg BL: **Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion.** *Am J Physiol* 1999, **277**(2 Pt 1):L282–291.

117. Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL: **Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin.** *Circ Res* 2004, **95**:579–586.
118. Suzuki YJ, Day RM, Tan CC, Sandven TH, Liang Q, Molkentin JD, Fanburg BL: **Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 2003, **278**:17525–17531.
119. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL: **Hypoxic pulmonary vasoconstriction.** *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* 2005, **98**:390–403.
120. Maclean MR, Dempsie Y: **The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited.** *Adv Exp Med Biol* 2010, **661**:309–322.
121. Duong-Quy S, Bei Y, Liu Z, Dinh-Xuan AT: **Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension.** *Pharmacol Ther* 2013, **137**:352–364.
122. Somlyo AP, Somlyo AV: **Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase.** *Physiol Rev* 2003, **83**:1325–1358.
123. Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, Guignabert C, Izikki M, Tu L, Savale L, Humbert M, Fadel E, Adnot S, Loirand G, Pacaud P: **RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **179**:1151–1158.
124. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A: **Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats.** *Circ Res* 2004, **94**:385–393.
125. Nagaoka T, Gebb SA, Karoor V, Homma N, Morris KG, McMurtry IF, Oka M: **Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in pulmonary hypertension of the fawn-hooded rat.** *J Appl Physiol* 2006, **100**:996–1002.
126. Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG, McMurtry IF: **Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**:L656–664.
127. Guilluy C, Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Guérin P, Sagan C, Pacaud P, Loirand G: **Inhibition of RhoA/Rho kinase pathway is involved in the beneficial effect of sildenafil on pulmonary hypertension.** *Br J Pharmacol* 2005, **146**:1010–1018.
128. Abe K, Tawara S, Oi K, Hizume T, Uwatoku T, Fukumoto Y, Kaibuchi K, Shimokawa H: **Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2006, **48**:280–285.
129. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, Funk G-C, Hamilton G, Novotny C, Burian B, Block L-H: **Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension.** *J Clin Invest* 2003, **111**:1339–1346.

130. Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, Jiang Y-P, Chen JJ, Waschek JA, Kort S: **Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene.** *Circulation* 2007, **115**:1260–1268.
131. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M: **Inflammation in pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2003, **22**:358–363.
132. Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX-J, Humbert M: **Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**(1, Supplement):S10–S19. [Proceedings of the 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension]
133. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol A-C, Simonneau G, Emilie D, Humbert M: **CX3C Chemokine Fractalkine in Pulmonary Arterial Hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:1419–1425.
134. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D: **Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **151**:1628–1631.
135. Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, Eddahibi S: **Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice.** *Respir Res* 2009, **10**:6.
136. Bhargava A, Kumar A, Yuan N, Gewitz MH, Mathew R: **Monocrotaline induces interleukin-6 mRNA expression in rat lungs.** *Heart Dis Hagerstown Md* 1999, **1**:126–132.
137. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselini I, Godot V, Capel F, Adnot S, Eddahibi S, Mazmanian M, Fadel E, Hervé P, Simonneau G, Emilie D, Humbert M: **Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension.** *Eur Respir J* 2007, **29**:937–943.
138. Heldin CH, Westermark B: **Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor.** *Physiol Rev* 1999, **79**:1283–1316.
139. Katayose D, Ohe M, Yamauchi K, Ogata M, Shirato K, Fujita H, Shibahara S, Takishima T: **Increased expression of PDGF A- and B-chain genes in rat lungs with hypoxic pulmonary hypertension.** *Am J Physiol* 1993, **264**(2 Pt 1):L100–106.
140. Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M: **Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **178**:81–88.
141. Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M: **Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension.** *Circulation* 2005, **112**:423–431.

142. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF: **Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension.** *Am J Pathol* 1994, **144**:275–285.
143. Mouthon L, Guillevin L, Humbert M: **Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease?** *Eur Respir J* 2005, **26**:986–988.
144. Arends SJ, Damoiseaux J, Duijvestijn A, Debrus-Palmans L, Boomars K, Broers B, Tervaert JWC, van Paassen P: **Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in idiopathic pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2010, **35**:923–925.
145. Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Peña-Lefebvre P, Brunet S, Servettaz A, Weill B, Simonneau G, Guillevin L, Boissier MC, Mouthon L: **Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension.** *Thorax* 2005, **60**:765–772.
146. Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Dupin N, Christner JJ, Simonneau G, Fermanian J, Weill B, Guillevin L, Mouthon L: **Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension.** *Eur Respir J* 2006, **28**:799–807.
147. Negi VS, Tripathy NK, Misra R, Nityanand S: **Antiendothelial cell antibodies in scleroderma correlate with severe digital ischemia and pulmonary arterial hypertension.** *J Rheumatol* 1998, **25**:462–466.
148. Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD: **IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines.** *J Clin Invest* 1996, **97**:111–119.
149. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, Shoenfeld Y, Youinou PY: **The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis.** *J Clin Invest* 1998, **101**:2029–2035.
150. Gurtner HP: **Aminorex and pulmonary hypertension. A review.** *Cor Vasa* 1985, **27**:160–171.
151. Souza R, Humbert M, Sztrymf B, Jaïs X, Yaïci A, Pavéc JL, Parent F, Hervé P, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G: **Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases.** *Eur Respir J* 2008, **31**:343–348.
152. Savale L, Chaumais M-C, Cottin V, Bergot E, Frachon I, Prevot G, Pison C, Dromer C, Poubeau P, Lamblin N, Habib G, Reynaud-Gaubert M, Bourdin A, Sanchez O, Tubert-Bitter P, Jaïs X, Montani D, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M: **Pulmonary hypertension associated with benfluorex exposure.** *Eur Respir J* 2012, **40**:1164–1172.
153. Montani D, Bergot E, Günther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, Bouvaist H, Canuet M, Pison C, Macro M, Poubeau P, Girerd B, Natali D, Guignabert C, Perros F, O’Callaghan DS, Jaïs X, Tubert-Bitter P, Zalcman G, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M: **Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated by Dasatinib.** *Circulation* 2012, **125**:2128–2137.

154. George PM, Oliver E, Dorfmueller P, Dubois OD, Reed DM, Kirkby NS, Mohamed NA, Perros F, Antigny F, Fadel E, Schreiber BE, Holmes AM, Southwood M, Hagan G, Wort SJ, Bartlett N, Morrell NW, Coghlan JG, Humbert M, Zhao L, Mitchell JA: **Evidence for the Involvement of Type I Interferon in Pulmonary Arterial Hypertension.** *Circ Res* 2014, **114**:677–688.
155. Chin KM, Channick RN, Rubin LJ: **IS methamphetamine use associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension?** *Chest* 2006, **130**:1657–1663.
156. White K, Johansen AK, Nilsen M, Ciuculan L, Wallace E, Paton L, Campbell A, Morecroft I, Loughlin L, McClure JD, Thomas M, Mair KM, MacLean MR: **Activity of the estrogen-metabolizing enzyme cytochrome P450 1B1 influences the development of pulmonary arterial hypertension.** *Circulation* 2012, **126**:1087–1098.
157. White K, Dempsie Y, Nilsen M, Wright AF, Loughlin L, MacLean MR: **The serotonin transporter, gender, and 17 β oestradiol in the development of pulmonary arterial hypertension.** *Cardiovasc Res* 2011, **90**:373–382.
158. Mair KM, Wright AF, Duggan N, Rowlands DJ, Hussey MJ, Roberts S, Fullerton J, Nilsen M, Loughlin L, Thomas M, MacLean MR: **Sex-Dependent Influence of Endogenous Estrogen in Pulmonary Hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2014, **190**:456–467.
159. Hamid R, Cogan JD, Hedges LK, Austin E, Phillips JA, Newman JH, Loyd JE: **Penetrance of Pulmonary Arterial Hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele.** *Hum Mutat* 2009, **30**:649–654.
160. Austin ED, Hamid R, Hemnes AR, Loyd JE, Blackwell T, Yu C, Phillips III JA, Gaddipati R, Gladson S, Gu E, West J, Lane KB: **BMPR2 expression is suppressed by signaling through the estrogen receptor.** *Biol Sex Differ* 2012, **3**:6.
161. Ryan JJ, Archer SL: **Emerging Concepts in the Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension Part I: Metabolic Plasticity and Mitochondrial Dynamics in the Pulmonary Circulation and Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension.** *Circulation* 2015, **131**:1691–1702.
162. Cottrill KA, Chan SY: **Metabolic dysfunction in pulmonary hypertension: the expanding relevance of the Warburg effect.** *Eur J Clin Invest* 2013, **43**:855–865.
163. Rehman J, Archer SL: **A proposed mitochondrial-metabolic mechanism for initiation and maintenance of pulmonary arterial hypertension in fawn-hooded rats: the Warburg model of pulmonary arterial hypertension.** *Adv Exp Med Biol* 2010, **661**:171–185.
164. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu X-C, Dyck JRB, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R, Archer SL: **Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels.** *Circulation* 2002, **105**:244–250.
165. Archer SL, Fang Y-H, Ryan JJ, Piao L: **Metabolism and bioenergetics in the right ventricle and pulmonary vasculature in pulmonary hypertension.** *Pulm Circ* 2013, **3**:144–152.

166. Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JGN, Weir EK: **Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, **294**:H570–578.
167. Semenza GL: **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:721–732.
168. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL: **An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension.** *Circulation* 2006, **113**:2630–2641.
169. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G: **Treatment of pulmonary arterial hypertension.** *N Engl J Med* 2004, **351**:1425–1436.
170. Olsson KM, Delcroix M, Ghofrani HA, Tiede H, Huscher D, Speich R, Grünig E, Staehler G, Rosenkranz S, Halank M, Held M, Lange TJ, Behr J, Klose H, Claussen M, Ewert R, Opitz CF, Vizza CD, Scelsi L, Vonk-Noordegraaf A, Kaemmerer H, Gibbs JSR, Coghlan G, Pepke-Zaba J, Schulz U, Gorenflo M, Pittrow D, Hoeper MM: **Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERA).** *Circulation* 2014, **129**:57–65.
171. Sandoval J, Gaspar J, Peña H, Santos LE, Córdova J, Valle K del, Rodríguez A, Pulido T: **Effect of atrial septostomy on the survival of patients with severe pulmonary arterial hypertension.** *Eur Respir J* 2011, **38**:1343–1348.
172. Hoeper MM, Granton J: **Intensive Care Unit Management of Patients with Severe Pulmonary Hypertension and Right Heart Failure.** *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **184**:1114–1124.
173. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF: **Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure.** *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2009, **297**:L1013–L1032.
174. Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, Stenmark KR: **Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage.** *Am J Pathol* 2006, **168**:659–669.
175. Drexler ES, Bischoff JE, Slifka AJ, McCowan CN, Quinn TP, Shandas R, Ivy DD, Stenmark KR: **Stiffening of the extrapulmonary arteries from rats in chronic hypoxic pulmonary hypertension.** *J Res Natl Inst Stand Technol* 2008, **113**:239–249.
176. Jasmin J-F, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J: **Effectiveness of a Nonselective ETA/B and a Selective ETA Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension.** *Circulation* 2001, **103**:314–318.
177. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mahon GM, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM: **Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic**

hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J* 2001, **15**:427–438.

178. Clapp LH, Finney P, Turcato S, Tran S, Rubin LJ, Tinker A: **Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **26**:194–201.

179. Yang X, Long L, Southwood M, Rudarakanchana N, Upton PD, Jeffery TK, Atkinson C, Chen H, Trembath RC, Morrell NW: **Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension.** *Circ Res* 2005, **96**:1053–1063.

180. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S: **Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia.** *Circulation* 2006, **113**:1857–1864.

181. Dewachter L, Adnot S, Fadel E, Humbert M, Maitre B, Barlier-Mur A-M, Simonneau G, Hamon M, Naeije R, Eddahibi S: **Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006, **174**:1025–1033.

182. Welsh DJ, Peacock AJ, MacLean M, Harnett M: **Chronic hypoxia induces constitutive p38 mitogen-activated protein kinase activity that correlates with enhanced cellular proliferation in fibroblasts from rat pulmonary but not systemic arteries.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**:282–289.

183. Welsh DJ, Harnett M, MacLean M, Peacock AJ: **Proliferation and signaling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor and transporter.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **170**:252–259.

184. Gray MW, Burger G, Lang BF: **Mitochondrial evolution.** *Science* 1999, **283**:1476–1481.

185. Bonawitz ND, Clayton DA, Shadel GS: **Initiation and Beyond: Multiple Functions of the Human Mitochondrial Transcription Machinery.** *Mol Cell* 2006, **24**:813–825.

186. Scarpulla RC: **Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells.** *J Cell Biochem* 2006, **97**:673–683.

187. Mitchell P: **Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.** *Nature* 1961, **191**:144–148.

188. Hamanaka RB, Chandel NS: **Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes.** *Trends Biochem Sci* 2010, **35**:505–513.

189. Lustgarten MS, Bhattacharya A, Muller FL, Jang YC, Shimizu T, Shirasawa T, Richardson A, Van Remmen H: **Complex I generated, mitochondrial matrix-directed superoxide is released from the mitochondria through voltage dependent anion channels.** *Biochem Biophys Res Commun* 2012, **422**:515–521.

190. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A: **Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells.** *Circ Res* 2006, **99**:924–932.
191. Raffaello A, De Stefani D, Rizzuto R: **The mitochondrial Ca(2+) uniporter.** *Cell Calcium* 2012, **52**:16–21.
192. Chipuk JE, Green DR: **How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?** *Trends Cell Biol* 2008, **18**:157–164.
193. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D: **A Novel Protein That Interacts with the Death Domain of Fas/APO1 Contains a Sequence Motif Related to the Death Domain.** *J Biol Chem* 1995, **270**:7795–7798.
194. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM: **FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis.** *Cell* 1995, **81**:505–512.
195. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME: **Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.** *EMBO J* 1995, **14**:5579–5588.
196. Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J: **Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis.** *Cell* 1998, **94**:491–501.
197. Salvesen GS, Duckett CS: **IAP proteins: blocking the road to death's door.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:401–410.
198. Bereiter-Hahn J: **Behavior of mitochondria in the living cell.** *Int Rev Cytol* 1990, **122**:1–63.
199. Westermann B: **Mitochondrial fusion and fission in cell life and death.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**:872–884.
200. Booth FW, Thomason DB: **Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models.** *Physiol Rev* 1991, **71**:541–585.
201. Williams RS, Garcia-Moll M, Mellor J, Salmons S, Harlan W: **Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression nuclear genes encoding mitochondrial proteins.** *J Biol Chem* 1987, **262**:2764–2767.
202. Scarpulla RC: **Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function.** *Physiol Rev* 2008, **88**:611–638.
203. Wallace DC: **A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine.** *Annu Rev Genet* 2005, **39**:359.
204. Clayton D: **Mitochondrial DNA Replication: What We Know.** *IUBMB Life* 2003, **55**:213–217.

205. Evans MJ, Scarpulla RC: **Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences.** *J Biol Chem* 1989, **264**:14361–14368.
206. Chau CM, Evans MJ, Scarpulla RC: **Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes.** *J Biol Chem* 1992, **267**:6999–7006.
207. Evans MJ, Scarpulla RC: **NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells.** *Genes Dev* 1990, **4**:1023–1034.
208. Kelly DP, Scarpulla RC: **Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function.** *Genes Dev* 2004, **18**:357–368.
209. Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC: **NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators.** *Genes Dev* 1993, **7**:2431–2445.
210. Gugneja S, Scarpulla RC: **Serine Phosphorylation within a Concise Amino-terminal Domain in Nuclear Respiratory Factor 1 Enhances DNA Binding.** *J Biol Chem* 1997, **272**:18732–18739.
211. Gugneja S, Virbasius CM, Scarpulla RC: **Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:5708–5716.
212. Virbasius JV, Scarpulla RC: **Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:1309–1313.
213. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC: **Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:1354–1366.
214. Braidotti G, Borthwick IA, May BK: **Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinic acid synthase from rat.** *J Biol Chem* 1993, **268**:1109–1117.
215. Aizencang GI, Bishop DF, Forrest D, Astrin KH, Desnick RJ: **Uroporphyrinogen III Synthase AN ALTERNATIVE PROMOTER CONTROLS ERYTHROID-SPECIFIC EXPRESSION IN THE MURINE GENE.** *J Biol Chem* 2000, **275**:2295–2304.
216. Blesa JR, Prieto-Ruiz JA, Hernández JM, Hernández-Yago J: **NRF-2 transcription factor is required for human TOMM20 gene expression.** *Gene* 2007, **391**:198–208.
217. Truscott KN, Brandner K, Pfanner N: **Mechanisms of Protein Import into Mitochondria.** *Curr Biol* 2003, **13**:R326–R337.
218. Kuzmin I, Duh FM, Latif F, Geil L, Zbar B, Lerman MI: **Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene.** *Oncogene* 1995, **10**:2185–2194.

219. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC: **HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation.** *Cancer Cell* 2007, **12**:108–113.
220. Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim J-W, Yustein JT, Lee LA, Dang CV: **Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:6225–6234.
221. Virbasius JV, Virbasius CA, Scarpulla RC: **Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters.** *Genes Dev* 1993, **7**:380–392.
222. Ongwijitwat S, Liang HL, Graboyes EM, Wong-Riley MTT: **Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs.** *Gene* 2006, **374**:39–49.
223. Ongwijitwat S, Wong-Riley MTT: **Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons?** *Gene* 2005, **360**:65–77.
224. Fisher RP, Clayton DA: **Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1.** *Mol Cell Biol* 1988, **8**:3496–3509.
225. Larsson N-G, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA: **Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice.** *Nat Genet* 1998, **18**:231–236.
226. Antoshechkin I, Bogenhagen DF, Mastrangelo IA: **The HMG-box mitochondrial transcription factor xl-mtTFA binds DNA as a tetramer to activate bidirectional transcription.** *EMBO J* 1997, **16**:3198–3206.
227. Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA: **Addition of a 29 Residue Carboxyl-terminal Tail Converts a Simple HMG Box-containing Protein into a Transcriptional Activator.** *J Mol Biol* 1995, **249**:11–28.
228. Fisher RP, Parisi MA, Clayton DA: **Flexible recognition of rapidly evolving promoter sequences by mitochondrial transcription factor 1.** *Genes Dev* 1989, **3**:2202–2217.
229. Huss JM, Kelly DP: **Nuclear Receptor Signaling and Cardiac Energetics.** *Circ Res* 2004, **95**:568–578.
230. Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader J-A, Richard D, Giguère V: **Reduced Fat Mass in Mice Lacking Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α .** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:7947–7956.
231. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V: **Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α .** *Cardiovasc Res* 2008, **79**:208–217.
232. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St. Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES, Spiegelman BM: **Err α and Gabpa/b specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:6570–6575.

233. Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvynec M, Oakeley EJ, Kralli A: **The estrogen-related receptor α (ERR α) functions in PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α)-induced mitochondrial biogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:6472–6477.
234. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: **A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis.** *Cell* 1998, **92**:829–839.
235. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM: **Activation of PPAR γ Coactivator-1 Through Transcription Factor Docking.** *Science* 1999, **286**:1368–1371.
236. Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM: **Direct Coupling of Transcription and mRNA Processing through the Thermogenic Coactivator PGC-1.** *Mol Cell* 2000, **6**:307–316.
237. Ojuka EO, Jones TE, Han D-H, Chen M, Holloszy JO: **Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle.** *FASEB J* 2003, **17**:675–681.
238. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM: **Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1.** *Cell* 1999, **98**:115–124.
239. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis.** *J Clin Invest* 2000, **106**:847–856.
240. Lin J, Wu P-H, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang C, Mootha VK, Jäger S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM: **Defects in Adaptive Energy Metabolism with CNS-Linked Hyperactivity in PGC-1 α Null Mice.** *Cell* 2004, **119**:121–135.
241. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, O. Holloszy J, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP: **PGC-1 α Deficiency Causes Multi-System Energy Metabolic Derangements: Muscle Dysfunction, Abnormal Weight Control and Hepatic Steatosis.** *PLoS Biol* 2005, **3**.
242. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu P-H, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, Spiegelman BM: **Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle.** *Cell Metab* 2005, **1**:259–271.
243. Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM: **Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals.** *J Biol Chem* 2007, **282**:30014–30021.

244. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM: **Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1 β (PGC-1 β), A Novel PGC-1-related Transcription Coactivator Associated with Host Cell Factor.** *J Biol Chem* 2002, **277**:1645–1648.
245. Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A: **The PGC-1-related Protein PERC Is a Selective Coactivator of Estrogen Receptor α .** *J Biol Chem* 2002, **277**:13918–13925.
246. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O’Rahilly S, Montague C, Vidal-Puig AJ: **Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo.** *Biochem J* 2003, **373**(Pt 1):155–165.
247. Sonoda J, Mehl IR, Chong L-W, Nofsinger RR, Evans RM: **PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:5223–5228.
248. Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, Bjursell M, Parker N, Curtis K, Campbell M, Hu P, Zhang D, Litwin SE, Zaha VG, Fountain KT, Boudina S, Jimenez-Linan M, Blount M, Lopez M, Meirhaeghe A, Bohlooly-Y M, Storlien L, Strömstedt M, Snaith M, Oresic M, Abel ED, Cannon B, Vidal-Puig A: **Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance.** *PLoS Biol* 2006, **4**:e369.
249. Vianna CR, Huntgeburth M, Coppari R, Choi CS, Lin J, Krauss S, Barbatelli G, Tzameli I, Kim Y-B, Cinti S, Shulman GI, Spiegelman BM, Lowell BB: **Hypomorphic mutation of PGC-1beta causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance.** *Cell Metab* 2006, **4**:453–464.
250. Lai L, Leone TC, Zechner C, Schaeffer PJ, Kelly SM, Flanagan DP, Medeiros DM, Kovacs A, Kelly DP: **Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart.** *Genes Dev* 2008, **22**:1948–1961.
251. Vercauteren K, Pasko RA, Gleyzer N, Marino VM, Scarpulla RC: **PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:7409–7419.
252. Andersson U, Scarpulla RC: **Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**:3738–3749.
253. Scarpulla RC: **Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator.** *Ann N Y Acad Sci* 2008, **1147**:321–334.
254. Chan DC: **Mitochondrial fusion and fission in mammals.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:79–99.

255. Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT: **The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery.** *Cell Signal* 2011, **23**:1534–1545.
256. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K: **Mitotic Phosphorylation of Dynamin-related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission.** *J Biol Chem* 2007, **282**:11521–11529.
257. Chang C-R, Blackstone C: **Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology.** *J Biol Chem* 2007, **282**:21583–21587.
258. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L: **Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:15803–15808.
259. Cho D-H, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA: **S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury.** *Science* 2009, **324**:102–105.
260. Mishra P, Chan DC: **Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**:634–646.
261. Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K: **Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion.** *J Biochem (Tokyo)* 2003, **134**:333–344.
262. Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P: **The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space.** *FEBS Lett* 2002, **523**:171–176.
263. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC: **Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development.** *J Cell Biol* 2003, **160**:189–200.
264. Chen H, Chomyn A, Chan DC: **Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction.** *J Biol Chem* 2005, **280**:26185–26192.
265. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC: **Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes.** *Science* 2004, **305**:858–862.
266. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT: **Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells.** *J Cell Sci* 2003, **116**:2763–2774.
267. Zorzano A, Liesa M, Sebastián D, Segalés J, Palacín M: **Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism.** *Semin Cell Dev Biol* 2010, **21**:566–574.

268. Delettre C, Griffoin J-M, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP: **Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene.** *Hum Genet* 2001, **109**:584–591.
269. Olichon A, ElAhoury G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G: **OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis.** *Cell Death Differ* 2006, **14**:682–692.
270. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K: **Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1.** *EMBO J* 2006, **25**:2966–2977.
271. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC: **OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L.** *J Cell Biol* 2007, **178**:749–755.
272. Yamaguchi R, Lartigue L, Perkins G, Scott RT, Dixit A, Kushnareva Y, Kuwana T, Ellisman M, Newmeyer DD: **Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak- and BH3-dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization.** *Mol Cell* 2008, **31**:557–569.
273. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L: **OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion.** *Cell* 2006, **126**:177–189.
274. Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson N-G, Neupert W, Reichert AS: **Proteolytic Processing of OPA1 Links Mitochondrial Dysfunction to Alterations in Mitochondrial Morphology.** *J Biol Chem* 2006, **281**:37972–37979.
275. Youle RJ, Blik AM van der: **Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress.** *Science* 2012, **337**:1062–1065.
276. **Environmentally induced changes in mitochondria and endoplasmic reticulum of Saccharomyces carlsbergensis yeast.** *J Cell Biol* 1976, **71**:123–135.
277. Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D: **Mitophagy Plays an Essential Role in Reducing Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species and Mutation of Mitochondrial DNA by Maintaining Mitochondrial Quantity and Quality in Yeast.** *J Biol Chem* 2012, **287**:3265–3272.
278. Lemasters JJ: **Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging.** *Rejuvenation Res* 2005, **8**:3–5.
279. Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ: **Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy.** *J Cell Biol* 2008, **183**:795–803.
280. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS: **Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy.** *EMBO J* 2008, **27**:433–446.

281. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino SR, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ: **Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy.** *Science* 2011, **331**:456–461.
282. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T: **Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice.** *J Cell Biol* 2005, **169**:425–434.
283. Dromparis P, Michelakis ED: **Mitochondria in vascular health and disease.** *Annu Rev Physiol* 2013, **75**:95–126.
284. Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ, Hong Z, Wu X, Fang Y-H, Thenappan T, Piao L, Zhang HJ, Pogoriler J, Chen Y, Morrow E, Weir EK, Rehman J, Archer SL: **Dynamin-Related Protein 1-Mediated Mitochondrial Mitotic Fission Permits Hyperproliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Offers a Novel Therapeutic Target in Pulmonary Hypertension.** *Circ Res* 2012, **110**:1484–1497.
285. Ryan JJ, Marsboom G, Fang Y-H, Toth PT, Morrow E, Luo N, Piao L, Hong Z, Ericson K, Zhang HJ, Han M, Haney CR, Chen C-T, Sharp WW, Archer SL: **PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**:865–878.
286. Haslip M, Dostanic I, Huang Y, Zhang Y, Russell KS, Jurczak MJ, Mannam P, Giordano F, Erzurum SC, Lee PJ: **Endothelial uncoupling protein 2 regulates mitophagy and pulmonary hypertension during intermittent hypoxia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015, **35**:1166–1178.
287. Crosswhite P, Sun Z: **Nitric Oxide, Oxidative Stress and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension.** *J Hypertens* 2010, **28**:201–212.
288. Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED: **The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:11418–11423.
289. Park WS, Firth AL, Han J, Ko EA: **Patho-, physiological roles of voltage-dependent K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells.** *J Smooth Muscle Res* 2010, **46**:89–105.
290. Huang B, Gudi R, Wu P, Harris RA, Hamilton J, Popov KM: **Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation.** *J Biol Chem* 1998, **273**:17680–17688.
291. Paulin R, Dromparis P, Sutendra G, Gurtu V, Zervopoulos S, Bowers L, Haromy A, Webster L, Provencher S, Bonnet S, Michelakis ED: **Sirtuin 3 Deficiency Is Associated with Inhibited Mitochondrial Function and Pulmonary Arterial Hypertension in Rodents and Humans.** *Cell Metab* .
292. Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, Janocha AJ, Masri FA, Arroliga AC, Jennings C, Dweik RA, Tudor RM, Stuehr DJ, Erzurum SC: **Alterations of**

cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:1342–1347.

293. Rhodes CJ, Howard LS, Busbridge M, Ashby D, Kondili E, Gibbs JSR, Wharton J, Wilkins MR: **Iron deficiency and raised hepcidin in idiopathic pulmonary arterial hypertension: clinical prevalence, outcomes, and mechanistic insights.** *J Am Coll Cardiol* 2011, **58**:300–309.

294. Hung N, Shen C-C, Hu Y-W, Hu L-Y, Yeh C-M, Teng C-J, Kuan A-S, Chen S-C, Chen T-J, Liu C-J: **Risk of cancer in patients with iron deficiency anemia: a nationwide population-based study.** *PloS One* 2015, **10**:e0119647.

295. Levi S, Rovida E: **The role of iron in mitochondrial function.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1790**:629–636.

296. Oexle H, Gnaiger E, Weiss G: **Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1413**:99–107.

297. Cotroneo E, Ashek A, Wang L, Wharton J, Dubois O, Bozorgi S, Busbridge M, Alavian KN, Wilkins MR, Zhao L: **Iron Homeostasis and Pulmonary Hypertension Iron Deficiency Leads to Pulmonary Vascular Remodeling in the Rat.** *Circ Res* 2015, **116**:1680–1690.

298. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM: **Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism.** *Physiol Rev* 1990, **70**:391–425.

299. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R: **Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:13807–13812.

300. Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS: **Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **278**:C423–435.

301. Sutendra G, Dromparis P, Wright P, Bonnet S, Haromy A, Hao Z, McMurtry MS, Michalak M, Vance JE, Sessa WC, Michelakis ED: **The Role of Nogo and the Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Unit in Pulmonary Hypertension.** *Sci Transl Med* 2011, **3**:88ra55–88ra55.

302. Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Sutendra G, Michelakis ED: **Attenuating Endoplasmic Reticulum Stress as a Novel Therapeutic Strategy in Pulmonary Hypertension.** *Circulation* 2013, **127**:115–125.

303. Dromparis P, Paulin R, Sutendra G, Qi AC, Bonnet S, Michelakis ED: **Uncoupling protein 2 deficiency mimics the effects of hypoxia and endoplasmic reticulum stress on mitochondria and triggers pseudohypoxic pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension.** *Circ Res* 2013, **113**:126–136.

304. Hu H, Zhang Z-X, Chen C-S, Cai C, Zhao J-P, Wang X: **Effects of Mitochondrial Potassium Channel and Membrane Potential on Hypoxic Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010, **42**:661–666.

305. Westermann B: **Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1817**:1833–1838.
306. Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P: **Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine.** *Mitochondrion* 2012, **12**:77–85.
307. Dimroth P, Kaim G, Matthey U: **Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F (1) F (o) ATP synthases.** *J Exp Biol* 2000, **203**:51–59.
308. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JRB, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED: **Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis.** *Circ Res* 2004, **95**:830–840.
309. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM: **Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.** *Nature* 2001, **413**:131–138.
310. Chang JS, Huypens P, Zhang Y, Black C, Kralli A, Gettys TW: **Regulation of NT-PGC-1 α Subcellular Localization and Function by Protein Kinase A-dependent Modulation of Nuclear Export by CRM1.** *J Biol Chem* 2010, **285**:18039–18050.
311. Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, Weindruch R: **Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response.** *Aging Cell* 2008, **7**:101–111.
312. Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, Ciriolo MR: **Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Co-activator 1 α (PGC-1 α) and Sirtuin 1 (SIRT1) Reside in Mitochondria.** *J Biol Chem* 2010, **285**:21590–21599.
313. Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA: **Exercise Increases Mitochondrial PGC-1 α Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis.** *J Biol Chem* 2011, **286**:10605–10617.
314. Jäger S, Handschin C, St.-Pierre J, Spiegelman BM: **AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α .** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:12017–12022.
315. Southgate RJ, Bruce CR, Carey AL, Steinberg GR, Walder K, Monks R, Watt MJ, Hawley JA, Birnbaum MJ, Febbraio MA: **PGC-1 α gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FoxO1 in insulin-stimulated skeletal muscle.** *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2005, **19**:2072–2074.
316. Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ: **Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 α transcription coactivator.** *Nature* 2007, **447**:1012–1016.
317. Rodgers JT, Haas W, Gygi SP, Puigserver P: **Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis.** *Cell Metab* 2010, **11**:23–34.

318. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM: **Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1.** *Mol Cell* 2001, **8**:971–982.
319. Fan M, Rhee J, St-Pierre J, Handschin C, Puigserver P, Lin J, Jäeger S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Spiegelman BM: **Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK.** *Genes Dev* 2004, **18**:278–289.
320. Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR: **Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation.** *Genes Dev* 2005, **19**:1466–1473.
321. Houtkooper RH, Cantó C, Wanders RJ, Auwerx J: **The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways.** *Endocr Rev* 2010, **31**:194–223.
322. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J: **AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity.** *Nature* 2009, **458**:1056–1060.
323. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim S-H, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P: **Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α .** *EMBO J* 2007, **26**:1913–1923.
324. Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V: **Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt.** *Dev Cell* 2008, **14**:661–673.
325. Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim S, Pandey A, Puigserver P: **GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α .** *Cell Metab* 2006, **3**:429–438.
326. Coste A, Louet J-F, Lagouge M, Lerin C, Antal MC, Meziane H, Schoonjans K, Puigserver P, O'Malley BW, Auwerx J: **The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1 α .** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:17187–17192.
327. Kelly TJ, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Puigserver P: **GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1 β through lysine acetylation.** *J Biol Chem* 2009, **284**:19945–19952.
328. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB: **ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation.** *Science* 2009, **324**:1076–1080.
329. Trausch-Azar J, Leone TC, Kelly DP, Schwartz AL: **Ubiquitin Proteasome-dependent Degradation of the Transcriptional Coactivator PGC-1 α via the N-terminal Pathway.** *J Biol Chem* 2010, **285**:40192–40200.
330. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang C-Y, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM: **Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1.** *Mol Cell* 2001, **8**:971–982.

331. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J: **Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis.** *Am J Clin Nutr* 2011, **93**:884S–890S.
332. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L: **The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms.** *Genes Dev* 1999, **13**:2570–2580.
333. Stein S, Matter CM: **Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis.** *Cell Cycle Georget Tex* 2011, **10**:640–647.
334. Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L: **Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase.** *Nature* 2000, **403**:795–800.
335. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD: **The Biochemistry of Sirtuins.** *Annu Rev Biochem* 2006, **75**:435–465.
336. Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA: **Inhibition of Silencing and Accelerated Aging by Nicotinamide, a Putative Negative Regulator of Yeast Sir2 and Human SIRT1.** *J Biol Chem* 2002, **277**:45099–45107.
337. Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA: **Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature* 2003, **423**:181–185.
338. Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA: **SIRT1 and endocrine signaling.** *Trends Endocrinol Metab* 2006, **17**:186–191.
339. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L: **SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells.** *Cell* 2006, **126**:941–954.
340. Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L: **SIRT5 Deacetylates Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 and Regulates the Urea Cycle.** *Cell* 2009, **137**:560–570.
341. Peng C, Lu Z, Xie Z, Cheng Z, Chen Y, Tan M, Luo H, Zhang Y, He W, Yang K, Zwaans BMM, Tishkoff D, Ho L, Lombard D, He T-C, Dai J, Verdin E, Ye Y, Zhao Y: **The First Identification of Lysine Malonylation Substrates and Its Regulatory Enzyme.** *Mol Cell Proteomics MCP* 2011, **10**.
342. Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L: **Mouse Sir2 Homolog SIRT6 Is a Nuclear ADP-ribosyltransferase.** *J Biol Chem* 2005, **280**:21313–21320.
343. Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TLA, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF: **SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin.** *Nature* 2008, **452**:492–496.
344. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, Guimaraes A, Marinelli B, Wikstrom JD, Nir T, Clish CB, Vaitheesvaran B, Iliopoulos O, Kurland I, Dor Y,

- Weissleder R, Shirihai OS, Ellisen LW, Espinosa JM, Mostoslavsky R: **The Histone Deacetylase Sirt6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 α** . *Cell* 2010, **140**:280–293.
345. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I: **Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins**. *Mol Biol Cell* 2005, **16**:4623–4635.
346. Jing E, Gesta S, Ronald Kahn C: **Sirt2 Regulates Adipocyte Differentiation Involving FoxO1 Acetylation/Deacetylation**. *Cell Metab* 2007, **6**:105–114.
347. Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng H-L, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D: **Sirt2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis**. *Genes Dev* 2006, **20**:1256–1261.
348. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y: **Nucleocytoplasmic Shuttling of the NAD⁺-dependent Histone Deacetylase SIRT1**. *J Biol Chem* 2007, **282**:6823–6832.
349. Hallows WC, Lee S, Denu JM: **Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:10230–10235.
350. Scher MB, Vaquero A, Reinberg D: **Sirt3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress**. *Genes Dev* 2007, **21**:920–928.
351. Hallows WC, Albaugh BC, Denu JM: **Where in the cell is SIRT3?** *Biochem J* 2008, **411**:e11–e13.
352. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W: **Negative Control of p53 by Sir2 α Promotes Cell Survival under Stress**. *Cell* 2001, **107**:137–148.
353. Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai S-I, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA: **hSIR2/SIRT1 Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase**. *Cell* 2001, **107**:149–159.
354. Herranz D, Serrano M: **Sirt1: recent lessons from mouse models**. *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:819–823.
355. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P: **Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1**. *Nature* 2005, **434**:113–118.
356. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA: **Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet**. *Nature* 2006, **444**:337–342.
357. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J: **Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α** . *Cell* 2006, **127**:1109–1122.

358. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Mataka C, Elliott PJ, Auwerx J: **Specific SIRT1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects against Diet-Induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation.** *Cell Metab* 2008, **8**:347–358.
359. Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Mataka C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J: **Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle.** *Cell Metab* 2010, **11**:213–219.
360. Minor RK, Baur JA, Gomes AP, Ward TM, Csiszar A, Mercken EM, Abdelmohsen K, Shin Y-K, Canto C, Scheibye-Knudsen M, Krawczyk M, Irusta PM, Martín-Montalvo A, Hubbard BP, Zhang Y, Lehmann E, White AA, Price NL, Swindell WR, Pearson KJ, Becker KG, Bohr VA, Gorospe M, Egan JM, Talan MI, Auwerx J, Westphal CH, Ellis JL, Ungvari Z, Vlasuk GP, et al.: **SRT1720 improves survival and healthspan of obese mice.** *Sci Rep* 2011, **1**.
361. Horst A van der, Tertoolen LGJ, Vries-Smits LMM de, Frye RA, Medema RH, Burgering BMT: **FOXO4 Is Acetylated upon Peroxide Stress and Deacetylated by the Longevity Protein hSir2/SIRT1.** *J Biol Chem* 2004, **279**:28873–28879.
362. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L: **Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors.** *Cell* 2004, **116**:551–563.
363. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng H-L, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME: **Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase.** *Science* 2004, **303**:2011–2015.
364. Guarente L: **Calorie restriction and sirtuins revisited.** *Genes Dev* 2013, **27**:2072–2085.
365. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, Cabo R de, Sinclair DA: **Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase.** *Science* 2004, **305**:390–392.
366. Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E: **Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans.** *PLoS Med* 2007, **4**.
367. Chalkiadaki A, Guarente L: **High-Fat Diet Triggers Inflammation-Induced Cleavage of SIRT1 in Adipose Tissue To Promote Metabolic Dysfunction.** *Cell Metab* 2012, **16**:180–188.
368. Costa C dos S, Hammes TO, Rohden F, Margis R, Bortolotto JW, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM: **SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis.** *Obes Surg* 2010, **20**:633–639.
369. Pedersen SB, Ølholm J, Paulsen SK, Bennetzen MF, Richelsen B: **Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women.** *Int J Obes* 2008, **32**:1250–1255.

370. Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L: **Increase in Activity During Calorie Restriction Requires Sirt1**. *Science* 2005, **310**:1641–1641.
371. Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, Estey C, Moffat C, Crawford S, Saliba S, Jardine K, Xuan J, Evans M, Harper M-E, McBurney MW: **SirT1 Regulates Energy Metabolism and Response to Caloric Restriction in Mice**. *PLoS ONE* 2008, **3**:e1759.
372. Mercken EM, Hu J, Krzysik-Walker S, Wei M, Li Y, McBurney MW, de Cabo R, Longo VD: **SIRT1 but not its increased expression is essential for lifespan extension in caloric-restricted mice**. *Aging Cell* 2014, **13**:193–196.
373. Herranz D, Cañamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M: **Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer syndrome**. *Nat Commun* 2010, **1**:3.
374. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH: **Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage**. *Proc Natl Acad Sci* 2008, **105**:9793–9798.
375. Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, Van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L: **SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction**. *Aging Cell* 2007, **6**:759–767.
376. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang L-L, Scherer B, Sinclair DA: **Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan**. *Nature* 2003, **425**:191–196.
377. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH: **Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes**. *Nature* 2007, **450**:712–716.
378. Lam YY, Peterson CM, Ravussin E: **Resveratrol vs. calorie restriction: Data from rodents to humans**. *Exp Gerontol* 2013, **48**:1018–1024. [*Calorie Restriction and Fasting: Challenges and Future Directions for Research*]
379. Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, Wang Y, Raederstorff D, Morrow JD, Leeuwenburgh C, Allison DB, Saupe KW, Cartee GD, Weindruch R, Prolla TA: **A Low Dose of Dietary Resveratrol Partially Mimics Caloric Restriction and Retards Aging Parameters in Mice**. *PLoS ONE* 2008, **3**:e2264.
380. Bignon-Lauer A, Böni-Schnetzler M, Hubbard BP, Bouzakri K, Brunner A, Cavelti-Weder C, Keller C, Meyer-Böni M, Meier DT, Brorsson C, Timper K, Leibowitz G, Patrignani A, Bruggmann R, Boily G, Zulewski H, Geier A, Cermak JM, Elliott P, Ellis JL, Westphal C, Knobel U, Eloranta JJ, Kerr-Conte J, Pattou F, Konrad D, Matter CM, Fontana A, Rogler G, Schlapbach R, et al.: **Identification of a SIRT1 mutation in a family with type 1 diabetes**. *Cell Metab* 2013, **17**:448–455.
381. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Cantó C, Mottis A, Jo Y-S, Viswanathan M, Schoonjans K, Guarente L, Auwerx J: **The NAD⁺/Sirtuin Pathway**

Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* 2013, **154**:430–441.

382. Ludewig AH, Izrayelit Y, Park D, Malik RU, Zimmermann A, Mahanti P, Fox BW, Bethke A, Doering F, Riddle DL, Schroeder FC: **Pheromone sensing regulates *Caenorhabditis elegans* lifespan and stress resistance via the deacetylase SIR-2.1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:5522–5527.

383. Banerjee KK, Ayyub C, Ali SZ, Mandot V, Prasad NG, Kolthur-Seetharam U: **dSir2 in the adult fat body, but not in muscles, regulates life span in a diet-dependent manner.** *Cell Rep* 2012, **2**:1485–1491.

384. Satoh A, Brace CS, Rensing N, Cliften P, Wozniak DF, Herzog ED, Yamada KA, Imai S-I: **Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH.** *Cell Metab* 2013, **18**:416–430.

385. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, Bar-Joseph Z, Cohen HY: **The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice.** *Nature* 2012, **483**:218–221.

386. Ponugoti B, Kim D-H, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, Wu S-Y, Chiang C-M, Veenstra TD, Kemper JK: **SIRT1 Deacetylates and Inhibits SREBP-1C Activity in Regulation of Hepatic Lipid Metabolism.** *J Biol Chem* 2010, **285**:33959–33970.

387. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X: **Hepatocyte-specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation.** *Cell Metab* 2009, **9**:327–338.

388. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, Milne J, Meyers DJ, Cole P, Yates J, Olefsky J, Guarente L, Montminy M: **A Fasting Inducible Switch Modulates Gluconeogenesis Via Activator-Coactivator Exchange.** *Nature* 2008, **456**:269–273.

389. Frescas D, Valenti L, Accili D: **Nuclear Trapping of the Forkhead Transcription Factor FoxO1 via Sirt-dependent Deacetylation Promotes Expression of Glucogenetic Genes.** *J Biol Chem* 2005, **280**:20589–20595.

390. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y: **SIRT1 Modulation of the Acetylation Status, Cytosolic Localization, and Activity of LKB1 POSSIBLE ROLE IN AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE ACTIVATION.** *J Biol Chem* 2008, **283**:27628–27635.

391. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, de Oliveira RM, Leid M, McBurney MW, Guarente L: **Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ .** *Nature* 2004, **429**:771.

392. Wang L, Teng R, Di L, Rogers H, Wu H, Kopp JB, Noguchi CT: **PPAR α and Sirt1 Mediate Erythropoietin Action in Increasing Metabolic Activity and Browning of White Adipocytes to Protect Against Obesity and Metabolic Disorders.** *Diabetes* 2013, **62**:4122–4131.

393. Nadtochiy SM, Yao H, McBurney MW, Gu W, Guarente L, Rahman I, Brookes PS: **SIRT1-mediated acute cardioprotection.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011, **301**:H1506–1512.

394. Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F: **Sirt1 acts in association with PPAR α to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation.** *Cardiovasc Res* 2011, **90**:276–284.
395. Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Méneur C, Permutt MA, Imai S: **Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic β cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice.** *Cell Metab* 2005, **2**:105–117.
396. Chang H-C, Guarente L: **SIRT1 and other sirtuins in metabolism.** *Trends Endocrinol Metab* 2014, **25**:138–145.
397. Chen Z, Peng I-C, Cui X, Li Y-S, Chien S, Shyy JY-J: **Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:10268–10273.
398. Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, Sunagawa K: **SIRT1, a Longevity Gene, Downregulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, **28**:1263–1269.
399. Zhang Q, Wang Z, Chen H, Zhou S, Zheng W, Liu G, Wei Y, Cai H, Liu D, Liang C: **Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.** *Cardiovasc Res* 2008, **80**:191–199.
400. Csiszar A, Labinsky N, Podlutzky A, Kaminski PM, Wolin MS, Zhang C, Mukhopadhyay P, Pacher P, Hu F, de Cabo R, Ballabh P, Ungvari Z: **Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, **294**:H2721–H2735.
401. Gracia-Sancho J, Villarreal G, Zhang Y, García-Cardeña G: **Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype.** *Cardiovasc Res* 2010, **85**:514–519.
402. Stein S, Schäfer N, Breitenstein A, Besler C, Winnik S, Lohmann C, Heinrich K, Brokopp CE, Handschin C, Landmesser U, Tanner FC, Lüscher TF, Matter CM: **SIRT1 reduces endothelial activation without affecting vascular function in ApoE $^{-/-}$ mice.** *Aging* 2010, **2**:353–360.
403. Cardellini M, Menghini R, Martelli E, Casagrande V, Marino A, Rizza S, Porzio O, Mauriello A, Solini A, Ippoliti A, Lauro R, Folli F, Federici M: **TIMP3 Is Reduced in Atherosclerotic Plaques From Subjects With Type 2 Diabetes and Increased by SirT1.** *Diabetes* 2009, **58**:2396–2401.
404. Ho C, van der Veer E, Akawi O, Pickering JG: **SIRT1 markedly extends replicative lifespan if the NAD $^{+}$ salvage pathway is enhanced.** *FEBS Lett* 2009, **583**:3081–3085.
405. Stein S, Lohmann C, Schäfer N, Hofmann J, Rohrer L, Besler C, Rothgiesser KM, Becher B, Hottiger MO, Borén J, McBurney MW, Landmesser U, Lüscher TF, Matter CM: **SIRT1 decreases Lox-1-mediated foam cell formation in atherogenesis.** *Eur Heart J* 2010, **31**:2301–2309.
406. Breitenstein A, Stein S, Holy EW, Camici GG, Lohmann C, Akhmedov A, Spescha R, Elliott PJ, Westphal CH, Matter CM, Lüscher TF, Tanner FC: **Sirt1 inhibition promotes in**

vivo arterial thrombosis and tissue factor expression in stimulated cells. *Cardiovasc Res* 2011, **89**:464–472.

407. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, Hu F, Ballabh P, Podlutzky A, Losonczy G, de Cabo R, Mathew R, Wolin MS, Ungvari Z: **Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.** *Hypertension* 2009, **54**:668–675.

408. Yang D-L, Zhang H-G, Xu Y-L, Gao Y-H, Yang X-J, Hao X-Q, Li X-H: **Resveratrol inhibits right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in rats.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010, **37**:150–155.

409. Paffett ML, Lucas SN, Campen MJ: **Resveratrol reverses monocrotaline-induced pulmonary vascular and cardiac dysfunction: A potential role for atrogen-1 in smooth muscle.** *Vascul Pharmacol* 2012, **56**:64–73.

410. Chen B, Xue J, Meng X, Slutzky JL, Calvert AE, Chicoine LG: **Resveratrol prevents hypoxia-induced arginase II expression and proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via Akt-dependent signaling.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014, **307**:L317–325.

411. Ding M, Lei J, Qu Y, Zhang H, Xin W, Ma F, Liu S, Li Z, Jin F, Fu E: **Calorie Restriction Attenuates Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2015, **65**:562–570.

412. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T: **Nutrient Availability Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway.** *Science* 2004, **306**:2105–2108.

413. Hayashida S, Arimoto A, Kuramoto Y, Kozako T, Honda S, Shimeno H, Soeda S: **Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice.** *Mol Cell Biochem* 2010, **339**:285–292.

414. Okazaki M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K, Terada Y: **PPAR β/δ regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1.** *Endocr J* 2010, **57**:403–413.

415. Noriega LG, Feige JN, Canto C, Yamamoto H, Yu J, Herman MA, Matakci C, Kahn BB, Auwerx J: **CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability.** *EMBO Rep* 2011, **12**:1069–1076.

416. Han L, Zhou R, Niu J, McNutt MA, Wang P, Tong T: **SIRT1 is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:7458–7471.

417. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB: **Tumor Suppressor HIC1 Directly Regulates SIRT1 to Modulate p53-Dependent DNA-Damage Responses.** *Cell* 2005, **123**:437–448.

418. Bai P, Canto C, Brunyánszki A, Huber A, Szántó M, Cen Y, Yamamoto H, Houten SM, Kiss B, Oudart H, Gergely P, Menissier-de Murcia J, Schreiber V, Sauve AA, Auwerx J: **PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole body energy expenditure.** *Cell Metab* 2011, **13**:450–460.

419. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ: **miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:13421–13426.
420. Lee J, Padhye A, Sharma A, Song G, Miao J, Mo Y-Y, Wang L, Kemper JK: **A Pathway Involving Farnesoid X Receptor and Small Heterodimer Partner Positively Regulates Hepatic Sirtuin 1 Levels via MicroRNA-34a Inhibition.** *J Biol Chem* 2010, **285**:12604–12611.
421. Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M: **Downregulation of MiR-199a Derepresses Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Sirtuin 1 and Recapitulates Hypoxia Preconditioning in Cardiac Myocytes.** *Circ Res* 2009, **104**:879–886.
422. Sasaki T, Maier B, Koclega KD, Chruszcz M, Gluba W, Stukenberg PT, Minor W, Scrable H: **Phosphorylation Regulates SIRT1 Function.** *PLoS ONE* 2008, **3**.
423. Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de Cabo R, Bordone L: **JNK1 Phosphorylates SIRT1 and Promotes Its Enzymatic Activity.** *PLoS ONE* 2009, **4**.
424. Gao Z, Zhang J, Kheterpal I, Kennedy N, Davis RJ, Ye J: **Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity.** *J Biol Chem* 2011, **286**:22227–22234.
425. Guo X, Williams JG, Schug TT, Li X: **DYRK1A and DYRK3 Promote Cell Survival through Phosphorylation and Activation of SIRT1.** *J Biol Chem* 2010, **285**:13223–13232.
426. Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV, Bhalla K, Bai W: **SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**:1253–1262.
427. Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, Nakazawa H, Ichinose F, Yamada Y, Ishigami A, Ito H, Ouchi Y, Starr ME, Saito H, Shimokado K, Stamler JS, Kaneki M: **Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65.** *Sci Signal* 2014, **7**:ra106.
428. Liu X, Wang D, Zhao Y, Tu B, Zheng Z, Wang L, Wang H, Gu W, Roeder RG, Zhu W-G: **Methyltransferase Set7/9 regulates p53 activity by interacting with Sirtuin 1 (SIRT1).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:1925–1930.
429. Kim E-J, Kho J-H, Kang M-R, Um S-J: **Active Regulator of SIRT1 Cooperates with SIRT1 and Facilitates Suppression of p53 Activity.** *Mol Cell* 2007, **28**:277–290.
430. Kim J-E, Chen J, Lou Z: **DBC1 is a negative regulator of SIRT1.** *Nature* 2008, **451**:583–586.
431. Zhao W, Kruse J-P, Tang Y, Jung SY, Qin J, Gu W: **Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1.** *Nature* 2008, **451**:587–590.
432. Escande C, Chini CCS, Nin V, Dykhouse KM, Novak CM, Levine J, van Deursen J, Gores GJ, Chen J, Lou Z, Chini EN: **Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity**

and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J Clin Invest* 2010, **120:545–558.**

433. Kim H-J, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang J-T, Park JH, Yang HJ, Kim M-S, Kwon DY, Yoon SH: **Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice.** *J Proteome Res* 2011, **10**:722–731.

434. Collins PB, Chaykin S: **The Management of Nicotinamide and Nicotinic Acid in the Mouse.** *J Biol Chem* 1972, **247**:778–783.

435. Bieganowski P, Brenner C: **Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved NRK Genes Establish a Preiss-Handler Independent Route to NAD⁺ in Fungi and Humans.** *Cell* 2004, **117**:495–502.

436. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S: **Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice.** *Cell Metab* 2011, **14**:528–536.

437. Krishnakumar R, Kraus WL: **The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets.** *Mol Cell* 2010, **39**:8–24.

438. Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, de Murcia G: **Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:517–528.

439. Bai P, Canto C, Oudart H, Brunyánszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto H, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, Schoonjans K, Schreiber V, Sauve AA, Murcia JM, Auwerx J: **PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation.** *Cell Metab* 2011, **13**:461–468.

440. Barbosa MTP, Soares SM, Novak CM, Sinclair D, Levine JA, Aksoy P, Chini EN: **The enzyme CD38 (a NAD glycohydrolase, EC 3.2.2.5) is necessary for the development of diet-induced obesity.** *FASEB J* 2007, **21**:3629–3639.

441. Parrington J, Tunn R: **Ca(2+) signals, NAADP and two-pore channels: role in cellular differentiation.** *Acta Physiol Oxf Engl* 2014, **211**:285–296.

442. Dong M, Si Y-Q, Sun S-Y, Pu X-P, Yang Z-J, Zhang L-R, Zhang L-H, Leung FP, Lam CMC, Kwong AKY, Yue J, Zhou Y, Kriksunov IA, Hao Q, Lee HC: **Design, synthesis and biological characterization of novel inhibitors of CD38.** *Org Biomol Chem* 2011, **9**:3246–3257.

443. Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD: **Sirtuins — novel therapeutic targets to treat age-associated diseases.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**:841–853.

444. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R: **Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending lifespan.** *Cell Metab* 2008, **8**:157–168.

445. Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MKC, Kunz I, Schrauwen-Hinderling VB, Blaak E, Auwerx J, Schrauwen P: **Calorie restriction-like effects of 30 days of Resveratrol (resVida™) supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans.** *Cell Metab* 2011, **14**.
446. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, Towler MC, Brown LJ, Ogunbayo OA, Evans AM, Hardie DG: **Use of Cells Expressing γ Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation.** *Cell Metab* 2010, **11**:554–565.
447. Beher D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu S-C, Atangan L, Wang M: **Resveratrol is Not a Direct Activator of SIRT1 Enzyme Activity.** *Chem Biol Drug Des* 2009, **74**:619–624.
448. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K: **SRT1720, SRT2183, SRT1460, and Resveratrol Are Not Direct Activators of SIRT1 \diamond .** *J Biol Chem* 2010, **285**:8340–8351.
449. Um J-H, Park S-J, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, Chung JH: **AMP-Activated Protein Kinase-Deficient Mice Are Resistant to the Metabolic Effects of Resveratrol.** *Diabetes* 2010, **59**:554–563.
450. Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, Riera TV, Lee JE, E SY, Lamming DW, Pentelute BL, Schuman ER, Stevens LA, Ling AJY, Armour SM, Michan S, Zhao H, Jiang Y, Sweitzer SM, Blum CA, Disch JS, Ng PY, Howitz KT, Rolo AP, Hamuro Y, Moss J, Perni RB, Ellis JL, Vlasuk GP, Sinclair DA: **Evidence for a Common Mechanism of SIRT1 Regulation by Allosteric Activators.** *Science* 2013, **339**:1216–1219.
451. Zhao G, Cui J, Zhang J-G, Qin Q, Chen Q, Yin T, Deng S-C, Liu Y, Liu L, Wang B, Tian K, Wang G-B, Wang C-Y: **SIRT1 RNAi knockdown induces apoptosis and senescence, inhibits invasion and enhances chemosensitivity in pancreatic cancer cells.** *Gene Ther* 2011, **18**:920–928.
452. Wang B, Hasan MK, Alvarado E, Yuan H, Wu H, Chen WY: **NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response.** *Oncogene* 2011, **30**:907–921.
453. Wu M, Wei W, Xiao X, Guo J, Xie X, Li L, Kong Y, Lv N, Jia W, Zhang Y, Xie X: **Expression of SIRT1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in both operable triple-negative and non-triple-negative breast cancer.** *Med Oncol Northwood Lond Engl* 2012, **29**:3240–3249.
454. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet J-C, McLean PJ, Young AB, Abagyan R, Feany MB, Hyman BT, Kazantsev AG: **Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease.** *Science* 2007, **317**:516–519.
455. Pagans S, Pedal A, North BJ, Kaehlcke K, Marshall BL, Dorr A, Hetzer-Egger C, Henklein P, Frye R, McBurney MW, Hruby H, Jung M, Verdin E, Ott M: **SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation.** *PLoS Biol* 2005, **3**:e41.

456. Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL: **Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening.** *J Biol Chem* 2001, **276**:38837–38843.
457. Mai A, Massa S, Lavu S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R, Mariotti FR, Chiani F, Camilloni G, Sinclair DA: **Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors.** *J Med Chem* 2005, **48**:7789–7795.
458. Trapp J, Meier R, Hongwiset D, Kassack MU, Sippl W, Jung M: **Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins).** *ChemMedChem* 2007, **2**:1419–1431.
459. Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, Kollipara R, Depinho RA, Gu Y, Simon JA, Bedalov A: **Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes.** *Cancer Res* 2006, **66**:4368–4377.
460. Schuetz A, Min J, Antoshenko T, Wang C-L, Allali-Hassani A, Dong A, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Sternglanz R, Plotnikov AN: **Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin.** *Struct Lond Engl* 1993 2007, **15**:377–389.
461. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J: **Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**:225–238.
462. Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E: **Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity.** *Curr Pharm Des* 2014, **20**:2950–2977.
463. Bitterman JL, Chung JH: **Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies.** *Cell Mol Life Sci CMLS* 2015, **72**:1473–1488.
464. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Dartevielle P, Hamon M, Adnot S: **Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension.** *J Clin Invest* 2001, **108**:1141–1150.
465. Price NL, Gomes AP, Ling AJY, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA: **SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function.** *Cell Metab* 2012, **15**:675–690.
466. Warburg O: **On the origin of cancer cells.** *Science* 1956, **123**:309–314.
467. Freund-Michel V, Khoyarattee N, Savineau J-P, Muller B, Guibert C: **Mitochondria: roles in pulmonary hypertension.** *Int J Biochem Cell Biol* 2014, **55**:93–97.
468. Paulin R, Michelakis ED: **The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension.** *Circ Res* 2014, **115**:148–164.

469. Rafikov R, Sun X, Rafikova O, Louise Meadows M, Desai AA, Khalpey Z, Yuan JX-J, Fineman JR, Black SM: **Complex I dysfunction underlies the glycolytic switch in pulmonary hypertensive smooth muscle cells.** *Redox Biol* 2015, **6**:278–286.
470. Mata M, Sarrion I, Milian L, Juan G, Ramon M, Naufal D, Gil J, Ridocci F, Fabregat-Andrés O, Cortijo J: **PGC-1 α induction in pulmonary arterial hypertension.** *Oxid Med Cell Longev* 2012, **2012**:236572.
471. Zhao L, Ashek A, Wang L, Fang W, Dabral S, Dubois O, Cupitt J, Pullamsetti SS, Cotroneo E, Jones H, Tomasi G, Nguyen Q-D, Aboagye EO, El-Bahrawy MA, Barnes G, Howard LS, Gibbs JSR, Gsell W, He J-G, Wilkins MR: **Heterogeneity in lung (18)FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic (18)FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodeling targeted treatments.** *Circulation* 2013, **128**:1214–1224.
472. Furuta E, Okuda H, Kobayashi A, Watabe K: **Metabolic genes in cancer: their roles in tumor progression and clinical implications.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1805**:141–152.
473. HU E-C, HE J-G, LIU Z-H, NI X-H, ZHENG Y-G, GU Q, ZHAO Z-H, XIONG C-M: **High levels of serum lactate dehydrogenase correlate with the severity and mortality of idiopathic pulmonary arterial hypertension.** *Exp Ther Med* 2015, **9**:2109–2113.
474. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB: **Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.** *Science* 2009, **324**:1029–1033.
475. Rehman J, Zhang HJ, Toth PT, Zhang Y, Marsboom G, Hong Z, Salgia R, Husain AN, Wietholt C, Archer SL: **Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer.** *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2012, **26**:2175–2186.
476. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED: **A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth.** *Cancer Cell* 2007, **11**:37–51.
477. García O, Almeida A, Massieu L, Bolaños JP: **Increased mitochondrial respiration maintains the mitochondrial membrane potential and promotes survival of cerebellar neurons in an endogenous model of glutamate receptor activation.** *J Neurochem* 2005, **92**:183–190.
478. Kalbáčová M, Vrbacký M, Drahotka Z, Melková Z: **Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry.** *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol* 2003, **52**:110–116.
479. Rimessi A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Pinton P: **Mitochondrial Ca²⁺ Remodeling is a Prime Factor in Oncogenic Behavior.** *Front Oncol* 2015, **5**.
480. Stuart JA, Cadenas S, Jekabsons MB, Roussel D, Brand MD: **Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1504**:144–158.

481. Trenker M, Malli R, Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF: **Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**:445–452.
482. Yeager ME, Halley GR, Golpon HA, Voelkel NF, Tudor RM: **Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension.** *Circ Res* 2001, **88**:E2–E11.
483. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Galanaud P, Duroux P, Simonneau G, Emilie D: **Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients.** *Eur Respir J* 1998, **11**:554–559.
484. Selimovic N, Bergh C-H, Andersson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B: **Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension.** *Eur Respir J* 2009, **34**:662–668.
485. Yoshiyoshi M, Nishioka K, Nakao K, Saito Y, Matsumura M, Ueda T, Temma S, Shirakami G, Imura H, Mikawa H: **Plasma endothelin concentrations in patients with pulmonary hypertension associated with congenital heart defects. Evidence for increased production of endothelin in pulmonary circulation.** *Circulation* 1991, **84**:2280–2285.
486. de Man FS, Tu L, Handoko ML, Rain S, Ruiter G, François C, Schlij I, Dorfmueller P, Simonneau G, Fadel E, Perros F, Boonstra A, Postmus PE, van der Velden J, Vonk-Noordegraaf A, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C: **Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2012, **186**:780–789.
487. Aldred MA, Comhair SA, Varella-Garcia M, Asosingh K, Xu W, Noon GP, Thistlethwaite PA, Tudor RM, Erzurum SC, Geraci MW, Coldren CD: **Somatic chromosome abnormalities in the lungs of patients with pulmonary arterial hypertension.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010, **182**:1153–1160.
488. Guignabert C, Tu L, Le Hiress M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, Huertas A, Humbert M, Montani D: **Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer.** *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc* 2013, **22**:543–551.
489. Lombard DB, Alt FW, Cheng H-L, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV, Weissman S, Verdin E, Schwer B: **Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**:8807–8814.
490. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA: **Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-related Hearing Loss under Caloric Restriction.** *Cell* 2010, **143**:802–812.
491. Finley LWS, Haigis MC: **Metabolic regulation by SIRT3: implications for tumorigenesis.** *Trends Mol Med* 2012, **18**:516–523.
492. Kim H-S, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer R, Nguyen P, Savage J, Owens KM, Vassilopoulos A, Ozden O, Park S-H, Singh

- KK, Abdulkadir SA, Spitz DR, Deng C-X, Gius D: **SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress.** *Cancer Cell* 2010, **17**:41–52.
493. Dominy J, Puigserver P, Cantó C: **In Vivo Measurement of the Acetylation State of Sirtuin Substrates as a Proxy for Sirtuin Activity.** In *Sirtuins. Volume 1077*. Edited by Hirschev MD. Totowa, NJ: Humana Press; 2013:217–237.
494. Chiarugi A, Dölle C, Felici R, Ziegler M: **The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology.** *Nat Rev Cancer* 2012, **12**:741–752.
495. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB: **The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation.** *Cell Metab* 2008, **7**:11–20.
496. Christensen CE, Karlsson M, Winther JR, Jensen PR, Lerche MH: **Non-invasive in-cell determination of free cytosolic [NAD⁺]/[NADH] ratios using hyperpolarized glucose show large variations in metabolic phenotypes.** *J Biol Chem* 2014, **289**:2344–2352.
497. Zu Y, Liu L, Lee MYK, Xu C, Liang Y, Man RY, Vanhoutte PM, Wang Y: **SIRT1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary porcine aortic endothelial cells.** *Circ Res* 2010, **106**:1384–1393.
498. Ohanna M, Bonet C, Bille K, Allegra M, Davidson I, Bahadoran P, Lacour J-P, Ballotti R, Bertolotto C: **SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells.** *Oncotarget* 2014, **5**:2085–2095.
499. Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J: **Sirt1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer.** *J Biol Chem* 2009, **284**:18210–18217.
500. Yang Q, Wang B, Zang W, Wang X, Liu Z, Li W, Jia J: **Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner.** *PloS One* 2013, **8**:e70627.
501. Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F: **SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD.** *J Biol Chem* 2009, **284**:21872–21880.
502. Arany Z, Foo S-Y, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM: **HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha.** *Nature* 2008, **451**:1008–1012.
503. Gutsaeva DR, Carraway MS, Suliman HB, Demchenko IT, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA: **Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism.** *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2008, **28**:2015–2024.
504. Gomes AP, Price NL, Ling AJY, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, White JP, Teodoro JS, Wrann CD, Hubbard BP, Mercken EM, Palmeira CM, de Cabo R, Rolo AP,

- Turner N, Bell EL, Sinclair DA: **Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging.** *Cell* 2013, **155**:1624–1638.
505. Lim J-H, Lee Y-M, Chun Y-S, Chen J, Kim J-E, Park J-W: **Sirtuin 1 Modulates Cellular Responses to Hypoxia by Deacetylating Hypoxia-Inducible Factor 1 α .** *Mol Cell* 2010, **38**:864–878.
506. Brenmoehl J, Hoeflich A: **Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3.** *Mitochondrion* 2013, **13**:755–761.
507. Li X: **SIRT1 and energy metabolism.** *Acta Biochim Biophys Sin* 2013, **45**:51–60.
508. Gao R, Chen J, Hu Y, Li Z, Wang S, Shetty S, Fu J: **Sirt1 deletion leads to enhanced inflammation and aggravates endotoxin-induced acute kidney injury.** *PloS One* 2014, **9**:e98909.
509. Ming M, Zhao B, Shea CR, Shah P, Qiang L, White SR, Sims DM, He Y-Y: **Loss of sirtuin 1 (SIRT1) disrupts skin barrier integrity and sensitizes mice to epicutaneous allergen challenge.** *J Allergy Clin Immunol* 2015, **135**:936–945.e4.
510. Waypa GB, Osborne SW, Marks JD, Berkelhamer SK, Kondapalli J, Schumacker PT: **Sirtuin 3 Deficiency Does Not Augment Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, **49**:885–891.
511. Rose G, Dato S, Altomare K, Bellizzi D, Garasto S, Greco V, Passarino G, Feraco E, Mari V, Barbi C, BonaFe M, Franceschi C, Tan Q, Boiko S, Yashin AI, De Benedictis G: **Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly.** *Exp Gerontol* 2003, **38**:1065–1070.
512. Bellizzi D, Dato S, Cavalcante P, Covello G, Di Cianni F, Passarino G, Rose G, De Benedictis G: **Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13.** *Genomics* 2007, **89**:143–150.
513. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R: **Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats.** *PloS One* 2011, **6**:e19194.
514. Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, Stasch J-P, Gnoth MJ, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT: **Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling.** *Circulation* 2006, **113**:286–295.
515. Borra MT, Smith BC, Denu JM: **Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol.** *J Biol Chem* 2005, **280**:17187–17195.
516. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK: **Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol.** *J Biol Chem* 2005, **280**:17038–17045.
517. Sahar S, Sassone-Corsi P: **Metabolism and cancer: the circadian clock connection.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**:886–896.

518. Guignabert C, Tu L, Izikki M, Dewachter L, Zadigue P, Humbert M, Adnot S, Fadel E, Eddahibi S: **Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter.** *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2009, **23**:4135–4147.
519. Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, Dyck JRB, Michelakis ED: **Fatty Acid Oxidation and Malonyl-CoA Decarboxylase in the Vascular Remodeling of Pulmonary Hypertension.** *Sci Transl Med* 2010, **2**:44ra58–44ra58.
520. Fang Y-H, Piao L, Hong Z, Toth PT, Marsboom G, Bache-Wiig P, Rehman J, Archer SL: **Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle.** *J Mol Med Berl Ger* 2012, **90**:31–43.
521. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L: **During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability.** *Nat Cell Biol* 2011, **13**:589–598.
522. Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, Valentino ML, Rugolo M, Carelli V: **OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion.** *Brain J Neurol* 2008, **131**(Pt 2):352–367.
523. **Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology.** - PubMed - NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/16477035>]
524. de Brito OM, Scorrano L: **Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria.** *Nature* 2008, **456**:605–610.
525. Huang P, Yu T, Yoon Y: **Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn2 causes mitochondrial dysfunction and cell death.** *Eur J Cell Biol* 2007, **86**:289–302.
526. Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P: **Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:E2174–2181.
527. Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, Rizzuto R: **Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis.** *Mol Cell* 2004, **16**:59–68.
528. Fülöp L, Szanda G, Enyedi B, Várnai P, Spät A: **The effect of OPA1 on mitochondrial Ca²⁺ signaling.** *PloS One* 2011, **6**:e25199.
529. Parone PA, James DI, Da Cruz S, Mattenberger Y, Donzé O, Barja F, Martinou J-C: **Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:7397–7408.
530. Scorrano L: **Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis.** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**:1875–1883.

Annexes

Annexe 1

Sirtuin1 Regulates Human and Rodent Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation: Role in Pulmonary Arterial Hypertension.

Zurlo et al. Sirtuin1 and pulmonary arterial hypertension

Giada Zurlo, PhD¹; Jérôme Piquereau, PhD¹; Maryline Moulin, PhD¹; Mélanie Gressette, MSc¹; Benoît Ranchoux, PhD²; Anne Garnier, PhD¹; Renée Ventura-Clapier, PhD¹; Christophe Lemaire, PhD^{1,3}; Frédéric Perros, PhD²; Vladimir Veksler, MD, PhD¹

¹INSERM UMR-S1180, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

²INSERM U999, 92350 Le Plessis Robinson, 92350, France

³Univ Versailles Saint Quentin en Yvelines, Université Paris-Saclay, Versailles, France

Corresponding author: Vladimir VEKSLER, vladimir.veksler@u-psud.fr

UMR-S1180, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, 5 rue J.-B. Clément, 92296, France

Fax: (+33) 1 46 83 54 75

Telephone: (+33) 1 46 83 57 57

Abstract

Background– Energy metabolism shift from oxidative phosphorylation towards glycolysis in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) is suggested to be involved in their hyperproliferation in pulmonary arterial hypertension (PAH). The deacetylase sirtuin1 (SIRT1) is an important modulator of energy metabolism via different pathways including activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α), the master regulator of mitochondrial biogenesis.

Methods and results– Content of PGC-1 α and its downstream targets as well as markers of mitochondrial mass (voltage-dependent anion channel and citrate synthase) were diminished in human PAH PASMCs. These cells and rat PASMCs stimulated by platelet derived growth factor demonstrated a shift in cellular acetylated/deacetylated state, as evidenced by the increase of the acetylated forms of SIRT1 targets histone H1 and FOXO1. Rat and human PASMC proliferation was potentiated by SIRT1 pharmacological inhibition or specific downregulation via short interfering RNA. Moreover, after chronic hypoxia exposure, SIRT1 KO mice displayed a more intense vascular remodeling compared to their control littermates, which was associated with an accentuated increase in right ventricle pressure and hypertrophy. Sirtuin1 activator Stac-3 decreased acetylation level of histone H1 and FOXO1 and strongly inhibited rat and human PASMC proliferation without affecting cell mortality. This effect was associated with the activation of mitochondrial biogenesis evidenced by higher expression of mitochondrial markers and downstream targets of PGC-1 α .

Conclusions– Altered acetylation/deacetylation balance controlled by SIRT1 inactivation seems to be involved in the pathogenesis of PAH and this enzyme could be a promising therapeutic target for PAH treatment.

Key words: sirtuin, pulmonary arterial hypertension, proliferation, mitochondrial biogenesis, smooth muscle

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare but deadly cardiopulmonary disorder, characterized by an extensive remodeling of small- and medium-sized pulmonary arteries, mainly due to the hyperproliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs).

PAH PASMCs share some common features with cancer, such as growth dysregulation, resistance to apoptosis, and a metabolic remodelling¹. Indeed, like cancer cells, PASMCs display a shift from oxidative phosphorylation towards glycolysis even in the presence of oxygen, condition known as the Warburg effect. This metabolic alteration is sustained by the pathological activation of transcription factors such as c-Myc and the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)², as well as the inhibition of the transcription factor FOXO1³, contributing to PAH PASMC mitochondrial dysfunction. Indeed, PAH PASMC mitochondria present numerous abnormalities (for review, see⁴) including lowered oxidative capacity and altered mitochondrial dynamics leading to mitochondrial fragmentation. The recovery of mitochondrial function via the increase in oxidative capacity⁵⁻⁷ and/or the restoration of fusion/fission balance^{8,9} proved beneficial for the treatment of PAH in animal models, thus appearing as a promising therapeutic approach.

Cellular acetylation/deacetylation balance is an important regulator of energy metabolism including mitochondrial function. Particularly, sirtuin 1 (SIRT1), which is a NAD⁺-dependent deacetylase, has been found to augment mitochondrial function via several mechanisms. In various tissues including liver and skeletal muscle, SIRT1 enhances mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation by deacetylating and thus activating the master regulator of mitochondrial biogenesis, PGC-1 α (reviewed in¹⁰). Sirtuin1 is able to promote mitochondrial gene expression also via a PGC-1 α independent pathway. By destabilizing HIF-1 α , it prevents HIF-1 α -mediated inhibition of c-Myc, activator of the transcription of mitochondrial transcription factor A (TFAM), thus increasing the expression of mitochondrial-encoded respiratory genes¹¹. Finally, SIRT1 can improve mitochondrial activity by activating stress signaling pathways via the mitochondrial unfolded protein response and the nuclear translocation and activation of one of FOXO transcription factors as shown in worms¹².

Thus, one could hypothesize that SIRT1 may be affected in PAH and that its activation could have beneficial effects in this disease. However, neither the state of SIRT1 nor the acetylation/deacetylation balance in PAH pulmonary vessels of patients or in experimental

models has been investigated. Of note, another enzyme belonging to this family, sirtuin3, having mitochondrial location and activating metabolic pathways, such as mitochondrial fatty acid oxidation¹³ and oxidative phosphorylation^{14,15}, is downregulated in human PAH¹⁶. Importantly, some studies pointed out a potential protective role of SIRT1 in PAH. Indeed, resveratrol, a non-specific SIRT1 activator, has been found to prevent, and even reverse,¹⁷ monocrotaline-¹⁸ and chronic hypoxia-¹⁹ induced PAH, as well as PAH-associated right ventricle hypertrophy²⁰. Furthermore, Ding et al.²¹ have recently shown that calorie restriction activating SIRT1 and SIRT1 overexpression can also ameliorate monocrotaline-induced PAH. However, all these studies used non-specific SIRT1 activators, resveratrol and calorie restriction having in fact a large range of other targets^{23,24}. Moreover, SIRT1-triggered metabolic signaling pathways (which could be involved in resveratrol or calorie restriction beneficial effects on PAH) were not explored.

Here, we investigate for the first time the state of SIRT1 signaling pathway in human PAH PASMC as well as in rat PASMC stimulated with platelet-derived growth factor (PDGF). We demonstrate that the acetylation/deacetylation balance is shifted towards acetylation in PAH and PDGF-treated PASMCs. We show that SIRT1 is a negative regulator of PASMC growth: its pharmacological inhibition, as well as its specific downregulation enhances human and rat PASMC proliferation. Moreover, we provide evidence for SIRT1 role in PAH development, since its genetic deletion aggravates chronic hypoxia-induced PAH in mice. We then prove that SIRT1 can have beneficial effect in PAH treatment by using the SIRT1 specific activator Stac-3, which completely prevents PDGF-induced proliferation and, importantly, abolishes almost totally the proliferation of PASMCs from PAH patients without effect on the cell mortality. Finally, we show that SIRT1 activation is associated with the increase in the expression of genes implicated in mitochondrial function and the augmentation of mitochondrial biogenesis, thus providing a mechanistic explanation for the role of acetylation/deacetylation balance.

Material and methods

An expanded Methods section is available in the online-only Data Supplement.

Rat and human PSMCs

Primary culture of rat PSMCs were derived from 250-300 g male Wistar rats. After anaesthesia via intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg), the trachea, heart and lungs were rapidly removed, and the pulmonary artery isolated and deprived of residual adventitial tissue using dissection forceps and tweezers. Pulmonary artery was then cut in small pieces and incubated in 1% antibiotic/antimycotic (a/a) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 150 U/ml type I collagenase and 0.125 mg/ml elastase at 37°C for 90 minutes under shaking. Tissue lysate was then filtered through a 70 µm cell strainer. Cells were collected and cultivated in 15% fetal bovine serum (FBS) and 1% a/a DMEM at 37°C in a 95% air-5% CO₂ atmosphere till subconfluence. Medium was changed every other day. Culture material was previously coated with 50 µg/ml collagene I. Experiments were performed between passages 2 and 6. All animal care and experimental procedures conformed to the European Community guiding principles in the care and use of animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament) and authorizations to perform animal experiments according to this decree were obtained from the French Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (No. D-92-283, 13 December 2012).

Human PSMCs were kindly provided by Inserm unit UMR-S999 of Centre Chirurgical Marie Lannelongue. Cells were obtained from pulmonary artery explants (5-10 mm of diameter) realized during surgery of patients affected by idiopathic PAH (PAH PSMCs) or lung tumors (CTL PSMCs) (Table S1). Human PSMCs were cultivated in DMEM containing glucose (4.5 g/L), FBS (15%), L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), epidermal growth factor (EGF) (10 U/ml), insulin-transferrin-selenium (ITS) 1X, normocin (0.1 mg/ml), 1% a/a, and used until passage 6.

Treatments of rat and human PSMCs

After 24-hour incubation in 0.5% FBS and 1% a/a supplemented medium, PSMCs were pre-incubated for 2 hours with one of the following compounds diluted in the same medium: 10µM stac-3 (Santa Cruz), 5µM sirtinol (Santa Cruz) and 1µM SRT1720 (APExBIO). Control cells were treated with vehicle (DMSO). Rat PSMC proliferation was then induced with 10ng/ml PDGF for 24 hours. Since PAH PSMCs maintain their hyperproliferative phenotype in culture, no compound was used to stimulate their growth.

Evaluation of PSMC proliferation and death

PASMC proliferation was measured via four different approaches. BrdU incorporation was evaluated using Millipore kit, following the manufacturer instructions. WST-1 (Roche) cleavage was measured by a spectrophotometer. Cell counting was performed using a Malassez haemocytometer. The protein amount of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected via WB.

For measuring PASMC death, cells were labeled with 0.1 µg/ml fluorescein diacetate (FDA), and FDA negative cells were detected by flow cytometry (FC500, Beckman Coulter). To analyze late apoptosis/necrosis, cells were also labeled with 10 µg/ml propidium iodide (PI).

***In vivo* study**

Inducible SIRT1 KO mice were obtained from Sinclair Laboratory²⁴. 3-month old female mice (C57BL/6J carrying both the UBC-Cre-ER^{T2} and the SIRT1^{floxΔE4/floxΔE4} alleles) were subjected to 4 consecutive injections of tamoxifene (final concentration 120mg/kg) to induce SIRT1 deletion. WT mice were injected with the same concentration of vehicle (peanut oil). After three weeks, mice were exposed to chronic hypoxia (10% O₂) in a ventilated chamber (Biospherix, New York, NY). A mixture of room air and nitrogen was flushed in the chamber to maintain the hypoxic environment. Normoxic mice were kept in the same room, with the same light/dark cycle. After three weeks, mice were anesthetized with 4%, 3 L/min isoflurane. After skin incision of the sternum, direct transthoracic insertion of a catheter into the right ventricle was performed, and right ventricle pressure was measured via PowerLab 4/35 software. The thorax was opened, mice were then euthanatized via exsanguination from the aorta, and the lungs and heart rapidly removed. The right ventricle (RV) was dissected from the left ventricle plus septum (LV+S), and then the samples were weighted for determining the Fulton's index (RV/(LV+S)). Right lungs were injected with a solution 1:1 of OCT (*optimal cutting temperature*) and physiological serum, and then frozen for subsequent immunohistochemical analysis, and left lungs were frozen for WB.

Statistical analysis

The data are presented as mean±SEM.

For stac-3 and SRT1720 treatment of rat PASMC, differences were determined using one-way analysis of variance followed by non parametric Newman-Keuls post-hoc test. For short interference experiments, sirtinol treatment and *in vivo* study, differences were evaluated using a two-way analysis of variance followed by non parametric Newman-Keuls post-hoc test. Human CTL and PAH PASMCs were compared using non parametric Mann-Whitney U test.

Differences were considered as significant when p-value <0.05.

Results

Metabolic Profile in Human PAH PSMCs

In PSMCs from idiopathic PAH patients (PAH PSMCs), mitochondrial mass was decreased compared with control PSMCs (CTL PSMCs), as evidenced by reduced mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) and citrate synthase protein content (Fig.1A). Consistently, the protein level of mitochondrial biogenesis master regulator PGC-1 α was reduced in PAH PSMCs, and this was associated with a downregulation of its targets, such as the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and the estrogen-related receptor α (ERR α), as well as the antioxidant enzyme superoxide dismutase 2 (SOD2) (Fig.1B). In parallel, the glucose transporter 1 (GLUT1) and lactate dehydrogenase (LDH) protein levels were increased (Fig.1C). Thus, these results suggest an energy metabolism shift from mitochondrial oxidative phosphorylation towards glycolytic pathway in human PAH.

Acetylation/deacetylation balance in PAH PSMCs and PDGF-treated rat PSMCs

Deacetylation of PGC-1 α is one of its main regulator, therefore we hypothesized that a downregulation of mitochondrial biogenesis cascade in PAH PSMCs controlled by PGC-1 α could be linked to altered acetylation/deacetylation balance. We first measured the gene expression of the histone acetyltransferase general control of amino-acid synthesis 5-like 2 (GCN5), which is known to acetylate various cell targets including PGC-1 α , thus inhibiting its activity²⁵. GCN5 gene expression was markedly increased in PAH PSMCs, whereas SIRT1 (deacetylase counteracting GCN5 action) gene expression was unaltered (Fig.2A). Protein content of SIRT1 was also unaffected in PAH PSMCs, as well as the protein content of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) (Fig.2B), an enzyme which is essential for SIRT1 activity, producing the SIRT1 cofactor NAD⁺²⁶. The balance between the acetylated and total forms of the SIRT1 targets histone H1 (Fig.2C) and PGC-1 α (Fig.S1A) was shifted towards higher acetylation in PAH PSMCs. Taken together, these findings suggest that acetylation/deacetylation balance is shifted towards acetylation and, thus, the SIRT1 signaling pathway is impaired in PAH PSMCs. Qualitatively similar results were obtained in rat PSMCs, where PDGF-induced proliferation (Fig.2D) was associated with increased content of the acetylated forms of histone H1 and FOXO1, another SIRT1 target²⁷ (Fig.2E), as well as of PGC-1 α (Fig.S1B).

Effect of SIRT1 downregulation or inhibition on human and rat PASMC proliferation

Next, we investigated whether altered acetylation/deacetylation balance could play a causative role in PASMC hyperproliferation. We downregulated SIRT1 expression by 85% via siRNA in control human PASMCs (Fig.3A). The decline in SIRT1 protein level boosted CTL PASMC proliferation, as shown by the 50% increase in the incorporation of the thymidine analog BrdU by replicating cells (Fig.3A). In order to confirm this finding, we silenced SIRT1 also in rat PASMCs. Again, the reduced level of SIRT1 (by almost 70%) enhanced PDGF-induced proliferation, as evidenced by the increase in cell number, cleavage of WST-1 by viable cells and BrdU incorporation. Sirtuin1 reduction favored cell proliferation even under basal conditions in the absence of stimulating factors (Fig.3B). We further corroborated these observations by showing a facilitation of PDGF-induced proliferation also via SIRT1 pharmacological inhibition with sirtinol (Fig.3C). Thus, these results indicate that SIRT1 downregulation could be a causative factor for PASMC hyperproliferation.

Impact of SIRT1 genetic deletion on pulmonary vascular remodeling

We then investigated the potential role of SIRT1 downregulation in vascular remodeling induced by chronic hypoxia exposure known to trigger SMC proliferation. Thus, SIRT1 inducible knock out (SIRT1 KO) mice and their wild type (WT) littermates were exposed to either chronic hypoxia or normoxia during three weeks. As represented in Fig.4A, the deletion of SIRT1 exon 4, belonging to the catalytic domain, led to the production of a truncated protein. SIRT1 wild-type protein was significantly reduced in SIRT1 KO mice both in normoxia and hypoxia, respectively by 67% and 80%. In control lungs, chronic hypoxia exposure induced a slight increase in PGC-1 α protein level, which was completely absent in SIRT1 KO lungs. Interestingly, hypoxia-induced increase of the transcription factor HIF-1 α was less pronounced in SIRT1 KO compared to wild-type (WT) mice, whereas GLUT1 induction after chronic hypoxia was much more important in SIRT1 deficient mice.

A deeper vascular remodeling, with an increase in the percentage of completely muscular pulmonary arteries, paralleled by a decrease in the percentage of non-muscular arteries, was observed in mutant lungs. The percentage of partially muscular vessels was also slightly increased in KO compared to WT mice lungs (Fig.4B). This was associated with an exacerbated increase in the right ventricle pressure and hypertrophy (Fig.4C). Thus, the inactivation of SIRT1 aggravates vascular and cardiac remodeling *in vivo*.

Inhibition of PASMCM hyperproliferation via SIRT1 pharmacological activation

To test whether correction of the acetylation/deacetylation balance could have beneficial effect on PASMCM hyperproliferation, we investigated the effects of the pharmacological activator of SIRT1 Stac-3. As expected, Stac-3 significantly decreased the content of acetylated SIRT1 targets histone H1 and FOXO1 in rat PASMCMs (Fig.5A), as well as PGC-1 α (Fig.S2). Since SIRT1 seemed to be also involved in the expression of NAMPT^{28,29}, the rate-limiting enzyme in the NAD⁺ biosynthetic pathway, we studied NAMPT mRNA level and found that Stac-3 considerably increased it (Fig.5A), thus favoring the synthesis of the SIRT1 cofactor.

Next, we studied the effect of Stac-3 on PDGF-induced proliferation in rat PASMCMs. This treatment completely abolished PDGF proliferative effect, as was shown by the decrease in cell number, the reduction in WST-1 cleavage and the inhibition of BrdU incorporation (Fig.5B). Moreover, the protein level of the proliferation marker PCNA was normalized when Stac-3 was added to PDGF-treated PASMCMs (Fig.5B). To further verify this observation, we used another SIRT1 activator, SRT1720. This compound also blunted PASMCM proliferation though to a lesser extent (Fig.5C). Importantly, the dramatic antiproliferative effect of Stac-3 was not associated with an increase in cell death. Indeed, Stac-3 increased neither the percentage of cells unable to cleave the viability marker FDA nor the percentage of necrotic cells, permeable to propidium iodide (Fig.5D).

Given the great inhibitory effect of SIRT1 activation on rat PASMCM proliferation, we tested Stac-3 in PAH PASMCMs. The proliferation of these cells was almost completely abolished, with a decrease by more than 50% of WST-1 cleavage, a reduction of BrdU incorporation by 80% and the diminution of the protein content of the proliferation marker PCNA by almost 50% (Fig.5E).

The state of PGC-1 α downstream cascade and mitochondrial biogenesis upon SIRT1 activation

To provide mechanistic insights into the pathways potentially implicated in Stac-3 effect on PASMCM proliferation, mRNA and protein levels of several actors of mitochondrial bioenergetics were analyzed. Stac-3-mediated SIRT1 activation increased PAH PASMCM mitochondrial mass, as evidenced by the elevation of VDAC and CS protein level (Fig.6A). This augmentation can be explained by activation of mitochondrial biogenesis as Stac-3

increased the expression of PGC-1 α molecular partners PPAR α and ERR α as well as the expression of the antioxidant enzyme SOD2, known to be regulated by PGC-1 α ³⁰ (Fig.6B). Similar results were obtained in rat PSMCs, where Stac-3 also promoted mitochondrial biogenesis, as indicated by the increase of VDAC and CS protein level, as well as of the mitochondrial transcription factor A (TFAM) (Fig.6C). As in PAH PSMCs, in rat cells, Stac-3 activated the expression of PGC-1 α partners (PPAR α , ERR α and NRF2), and of elements of PGC-1 α -triggered cascade (TFAM, the antioxidant enzyme glutathione peroxidase 1 (GPx1), and mitochondrial deacetylase sirtuin3 (SIRT3)) (Fig.6D). Therefore, SIRT1 activation is clearly associated with the concerted upregulation of mitochondrial biogenesis pathway.

Effects of SIRT1 activation on mitochondrial morphology

Since mitochondrial fragmentation can favor hyperproliferation, we also studied SIRT1 effect on mitochondrial morphology. Stimulation with PDGF induced mitochondrial fragmentation, which was abolished by Stac-3 treatment (Fig.7A and B). SIRT1 activation thus normalizes mitochondrial morphology by inhibiting hyperproliferation-associated excessive fragmentation.

Discussion

The present study has highlighted a potential role of the deacetylase SIRT1, an important modulator of cell metabolism, in PAH pathogenesis. Indeed, we have shown that SIRT1 is a powerful negative regulator of rat and human PASMC proliferation. A deficiency in SIRT1 can be a factor favoring PAH development as was shown in a model of chronic hypoxia. Conversely, SIRT1 activation could be considered as a tool to inhibit PASMC proliferation.

PAH PASMCs exhibited reduced expression of VDAC and CS, mitochondrial mass markers, confirming the rarefaction of the mitochondrial network observed in patients' cells in an earlier study². This was associated with a negative regulation of mitochondrial biogenesis, as indicated by the decreased protein level of the master regulator of mitochondrial biogenesis PGC-1 α , also shown by Ryan et al.⁹, as well as the reduced expression of its targets, the transcription factors PPAR α and ERR α and the antioxidant enzyme SOD2. The partial loss of mitochondrial mass by PAH PASMCs was counterbalanced by a considerable increase in GLUT1 expression, which is in line with the increase in the uptake glucose of glucose analogue FDF by PAH patients' lungs³¹, evidencing enhanced glycolytic flux. The LDH expression was also increased, thus favoring the uncoupling of glycolysis from glucose oxidation. Such a remodeling could contribute to the increased plasma lactate levels found in Chuvash PAH³², as well as in idiopathic PAH patients³³.

The observed loss of mitochondrial mass in PAH PASMCs suggests a negative regulation of mitochondrial biogenesis probably due in part to the downregulation of PGC-1 α . Indeed, protein content of this master regulator of mitochondrial biogenesis is lowered. However, its activity is known to be modulated by post-translational modifications, such as the acetylation/desacetylation balance controlled by the acetyltransferase GCN5 and the deacetylase SIRT1³⁴. As a matter of fact, the expression of acetyltransferase GCN5, which is able to inhibit PGC-1 α ²⁵, is decreased without counterbalanced increase in deacetylase SIRT1. Whatever the actual activity of cell acetylases and deacetylases, the domination of acetylated forms of various cell targets (histone H1, FOXO1, PGC-1 α) in PAH and PDGF-stimulated rat PASMCs shows a clear shift of the balance towards acetylation.

The causal link between weakened deacetylation activity and PASMC proliferation has been provided by experiments using SIRT1 silencing or pharmacological inhibition by sirtinol. Indeed, both interventions increased rat and human PASMC proliferation, providing the first

evidence of pathogenic role of acetylation in PASMC hyperproliferation, which could be overcome by SIRT1 activity.

The positive antiproliferative role of SIRT1 was further confirmed in the experiments where SIRT1 deletion in mice significantly aggravated vascular remodeling induced by chronic hypoxia exposure. This effect was accompanied by an increase in right ventricle pressure and hypertrophy. Interestingly, SIRT1 deficiency abolishes hypoxia-induced increase in PGC-1 α protein level seen in WT lungs and this could attenuate PGC-1 α -controlled pathways including mitochondrial biogenesis. We and others³⁶ have shown that hypoxia increases SIRT1 expression whereas SIRT1 is able to regulate PGC-1 α transcription.³⁷ In SIRT1 KO lungs, hypoxia-mediated increase in SIRT1 expression is blocked and this could abolish the augmentation of PGC-1 α expression. A marked rise in GLUT1 expression in SIRT1 KO lungs argues that under hypoxic conditions, SIRT1 deficiency induces an imbalance in favor of glycolysis at the expense of oxidative phosphorylation.

Recently it has been demonstrated that SIRT1 can maintain mitochondrial biogenesis also via a PGC-1 α -independent pathway¹¹. SIRT1 stabilizes the ubiquitin ligase Von Hippel-Lindau (VHL), which recognizes HIF-1 α hydroxylated lysines, thus leading to the degradation of this transcription factor. Since HIF-1 α inhibits c-myc, transcription factor activator of TFAM expression, SIRT1-mediated HIF-1 downregulation positively modulates TFAM and, consequently, mitochondrial gene expression¹¹. However, in our experiments, HIF-1 α protein level was unaltered by SIRT1 deficiency under normoxia. In chronic hypoxia, SIRT1 KO lungs show a reduced HIF-1 α response. Therefore, PAH aggravation in SIRT1 KO mice seems to be independent of this transcription factor.

It has been proposed that the stimulation of mitochondrial metabolism could be a promising therapeutic approach to proliferative disorders such as cancer⁴¹. Reversing the metabolic shift from glucose oxidation to glycolysis has proved to be efficient to treat PAH in animal models, and is currently the subject of clinical trials⁴. Here, we show that the pharmacological activation of SIRT1 by Stac-3 leads to a strong inhibition of PAH PASMCs proliferation without effect on cell viability. An increase in the expression of transcription factors involved in mitochondrial biogenesis was observed, with a subsequent increase in mitochondrial mass. These effects of Stac-3 seem to be a consequence of direct SIRT1 activation because Stac-3 has no effect on mitochondrial mass in cells reconstituted with activation-defective SIRT1⁴². More detailed investigation carried out on rat PASMCs has shown that Stac-3 increases the expression of different factors maintaining mitochondrial biogenesis (PPAR α , ERR α , NRF2, TFAM). Moreover, SIRT1 activation prevents PDGF-induced mitochondrial fragmentation.

Interestingly, a recent study has demonstrated that mitochondrial fission is essential for PAH PASMC proliferation, with its inhibition causing cell cycle arrest and ameliorating PAH experimental models⁸. In parallel, mitofusin 2, a protein involved in mitochondrial fusion, is downregulated in PAH PASMCs, and the restoration of its expression inhibits PAH PASMC hyperproliferation⁹. Thus, Stac-3 prevention of proliferation-induced mitochondrial fission could also contribute to inhibition of PASMC proliferation. Finally, Stac-3 treatment leads to the increase of SOD2 expression, whose downregulation has been shown to contribute to PAH PASMC hyperproliferation. Indeed, SOD2 promoter and enhancer were found to be hypermethylated leading to a decrease in its expression⁴³. This in turn led to a decrease in H₂O₂ production, thus allowing HIF-1 stabilization and K_v potassium channel inhibition, both pro-proliferative events.⁴³ The decrease in SOD2 expression could thus be due to a combination of epigenetic inhibition and downregulation of the co-activator controlling its transcription. Therefore, its induction upon SIRT1 activation could be partly responsible for Stac-3 antiproliferative effects.

Such a concerted upregulation of various factors controlled by PGC-1 α supports the hypothesis that the metabolic remodeling associated with the hyperproliferation inhibition induced by Stac-3 involves PGC-1 α activation via deacetylation. SIRT1-mediated deacetylation of other targets may also play a role. Indeed, SIRT1 catalyses the deacetylation of FOXO1 thus potentiating its transcriptional activity⁴⁴. Yet, PASMC FOXO1 is a critical integrator of multiple signaling pathways driving PAH, and reconstitution of FOXO1 activity is able to restore the physiologically quiescent PASMC phenotype.³ Anyway, whatever the relative contribution of PGC-1 α or FOXO1 deacetylation to the inhibition of PASMC hyperproliferation, activation of SIRT1 leads to the same endpoint.

In conclusion, our results for the first time demonstrate an imbalance of the acetylated/deacetylated state in PAH PASMC associated with weakening of the oxidative phosphorylation machinery. Sirtuin1 downregulation is an important factor inducing PASMC hyperproliferation and favoring PAH development. Conversely, SIRT1 activation restores mitochondrial biogenesis and normalizes the hyperproliferative phenotype. Thus, targeting SIRT1 activity may have therapeutic benefit and represent a new strategy for the PAH treatment especially given that SIRT1 upregulation also seems to be beneficial for the systemic arteries and the heart (see^{41,42} and references therein).

Acknowledgments

We thank Dr. V. Nicolas (Imaging facility of IFR141), Dr. V. Domergue (Animal facility of IFR141) and Dr. C. Deloménie (Transcriptomic platform of IFR141) for technical help. The authors would also like to thank Dr.R. Fischmeister, Dr. A.-M. Gomez, Dr. S. Cohen-Kaminsky and Pr. M. Humbert for continuous support.

Funding sources

This work was supported by grants from Laboratory of Excellence LERMIT, FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) to AG (#DPM20121125546) and Région Ile de France CODDIM to RVC (#cod110153).

Disclosures

None.

References

1. Guignabert C, Tu L, Le Hiress M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, Huertas A, Humbert M, Montani D. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 2013;22:543–551.
2. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2006;113:2630–2641.
3. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capecchi MR, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med.* 2014;20:1289–1300.
4. Ryan JJ, Archer SL. Emerging Concepts in the Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension Part I: Metabolic Plasticity and Mitochondrial Dynamics in the Pulmonary Circulation and Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation.* 2015;131:1691–1702.
5. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JRB, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res.* 2004;95:830–840.
6. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu X-C, Dyck JRB, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R, Archer SL. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation.* 2002;105:244–250.
7. Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, Dyck JRB, Michelakis ED. Fatty Acid Oxidation and Malonyl-CoA Decarboxylase in the Vascular Remodeling of Pulmonary Hypertension. *Sci Transl Med.* 2010;2:44ra58–44ra58.

8. Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ, Hong Z, Wu X, Fang Y-H, Thenappan T, Piao L, Zhang HJ, Pogoriler J, Chen Y, Morrow E, Weir EK, Rehman J, Archer SL. Dynamamin-Related Protein 1–Mediated Mitochondrial Mitotic Fission Permits Hyperproliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Offers a Novel Therapeutic Target in Pulmonary Hypertension. *Circ Res*. 2012;110:1484–1497.
9. Ryan JJ, Marsboom G, Fang Y-H, Toth PT, Morrow E, Luo N, Piao L, Hong Z, Ericson K, Zhang HJ, Han M, Haney CR, Chen C-T, Sharp WW, Archer SL. PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:865–878.
10. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:225–238.
11. Gomes AP, Price NL, Ling AJY, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, White JP, Teodoro JS, Wrann CD, Hubbard BP, Mercken EM, Palmeira CM, de Cabo R, Rolo AP, Turner N, Bell EL, Sinclair DA. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*. 2013;155:1624–1638.
12. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Cantó C, Mottis A, Jo Y-S, Viswanathan M, Schoonjans K, Guarente L, Auwerx J. The NAD⁺/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell*. 2013;154:430–441.
13. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Alt FW, Kahn CR, Verdin E. SIRT3 regulates fatty acid oxidation via reversible enzyme deacetylation. *Nature*. 2010;464:121–125.
14. Ahn B-H, Kim H-S, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng C-X, Finkel T. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:14447–14452.
15. Cimen H, Han M-J, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of Succinate Dehydrogenase Activity by SIRT3 in Mammalian Mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*. 2010;49:304–311.

16. Paulin R, Dromparis P, Sutendra G, Gurtu V, Zervopoulos S, Bowers L, Haromy A, Webster L, Provencher S, Bonnet S, Michelakis ED. Sirtuin 3 Deficiency Is Associated with Inhibited Mitochondrial Function and Pulmonary Arterial Hypertension in Rodents and Humans. *Cell Metab* [Internet]. [cited 2014 Oct 10]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413114003775>
17. Paffett ML, Lucas SN, Campen MJ. Resveratrol reverses monocrotaline-induced pulmonary vascular and cardiac dysfunction: A potential role for atrogin-1 in smooth muscle. *Vascul Pharmacol*. 2012;56:64–73.
18. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, Hu F, Ballabh P, Podlutzky A, Losonczy G, de Cabo R, Mathew R, Wolin MS, Ungvari Z. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension*. 2009;54:668–675.
19. Chen B, Xue J, Meng X, Slutzky JL, Calvert AE, Chicoine LG. Resveratrol prevents hypoxia-induced arginase II expression and proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via Akt-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307:L317–325.
20. Yang D-L, Zhang H-G, Xu Y-L, Gao Y-H, Yang X-J, Hao X-Q, Li X-H. Resveratrol inhibits right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37:150–155.
21. Ding M, Lei J, Qu Y, Zhang H, Xin W, Ma F, Liu S, Li Z, Jin F, Fu E. Calorie Restriction Attenuates Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;65:562–570.
22. Bitterman JL, Chung JH. Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2015;72:1473–1488.
23. Testa G, Biasi F, Poli G, Chiarpotto E. Calorie restriction and dietary restriction mimetics: a strategy for improving healthy aging and longevity. *Curr Pharm Des*. 2014;20:2950–2977.
24. Price NL, Gomes AP, Ling AJY, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A,

Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* 2012;15:675–690.

25. Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim S, Pandey A, Puigserver P. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α . *Cell Metab.* 2006;3:429–438.

26. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004;279:50754–50763.

27. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. Mammalian SIRT1 Represses Forkhead Transcription Factors. *Cell.* 2004;116:551–563.

28. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science.* 2009;324:654–657.

29. Bellet MM, Nakahata Y, Boudjelal M, Watts E, Mossakowska DE, Edwards KA, Cervantes M, Astarita G, Loh C, Ellis JL, Vlasuk GP, Sassone-Corsi P. Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:3333–3338.

30. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2005;66:562–573.

31. Zhao L, Ashek A, Wang L, Fang W, Dabral S, Dubois O, Cupitt J, Pullamsetti SS, Cotroneo E, Jones H, Tomasi G, Nguyen Q-D, Aboagye EO, El-Bahrawy MA, Barnes G, Howard LS, Gibbs JSR, Gsell W, He J-G, Wilkins MR. Heterogeneity in lung (18)FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic (18)FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodeling targeted treatments. *Circulation.* 2013;128:1214–1224.

32. Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y, Cheeseman J, Dorrington KL, Edwards LM, Humphreys SM, Lappin TRJ, McMullin MF, McNamara CJ, Mills W, Murphy

JA, O'Connor DF, Percy MJ, Ratcliffe PJ, Smith TG, Treacy M, Frayn KN, Greenhaff PL, Karpe F, Clarke K, Robbins PA. Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:12722–12727.

33. HU E-C, HE J-G, LIU Z-H, NI X-H, ZHENG Y-G, GU Q, ZHAO Z-H, XIONG C-M. High levels of serum lactate dehydrogenase correlate with the severity and mortality of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Exp Ther Med*. 2015;9:2109–2113.

34. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011;93:884S–890S.

35. Chen R, Dioum EM, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA. Hypoxia Increases Sirtuin 1 Expression in a Hypoxia-inducible Factor-dependent Manner. *J Biol Chem*. 2011;286:13869–13878.

36. Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem*. 2009;284:21872–21880.

37. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:829–846.

38. Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, Riera TV, Lee JE, E SY, Lamming DW, Pentelute BL, Schuman ER, Stevens LA, Ling AJY, Armour SM, Michan S, Zhao H, Jiang Y, Sweitzer SM, Blum CA, Disch JS, Ng PY, Howitz KT, Rolo AP, Hamuro Y, Moss J, Perni RB, Ellis JL, Vlasuk GP, Sinclair DA. Evidence for a Common Mechanism of SIRT1 Regulation by Allosteric Activators. *Science*. 2013;339:1216–1219.

39. Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JRB, Gomberg-Maitland M, Thébaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation*. 2010;121:2661–2671.

40. Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10042–10047.

41. Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2012;107:273.
42. Liao Y-C, Wang Y-S, Guo Y-C, Lin W-L, Chang M-H, Juo S-HH. Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and SIRT-1 signaling. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1685–1694.

Figure 1: PAH PASMCMetabolic profile is shifted from oxidative phosphorylation towards glycolysis.

(A) PAH PASMCMs display a decreased protein level of VDAC and CS, two markers of mitochondrial mass (n=4). (B) The expression of the transcriptional co-activator PGC-1 α is reduced in PAH PASMCMs, which present also a decrease in the mRNA content of PPAR α , ERR α and SOD2 (n=4). (C) The expression of glucose transporter GLUT1 and LDH is increased in PAH PASMCMs compared to CTL PASMCMs (n=4). * p<0.05 versus control.

Figure 2: Hyperproliferation of PASMCMs is associated with altered acetylation/deacetylation balance.

(A) In PAH PASMCMs, acetyltransferase GCN5 mRNA content is increased, whereas that of SIRT1 is unaltered (n=4). (B) Protein levels of NAMPT and SIRT1 in PAH PASMCMs do not differ from CTL PASMCMs (n=4). (C) The acetylated form of SIRT1 target histone H1 (n=4) is increased in PAH PASMCMs. (D) 24-hour PDGF (10 ng/ml) treatment induces rat PASMCM proliferation, as evidenced by the increase in cell number, WST-1 cleavage, BrdU incorporation and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein level. (E) In rat PASMCMs, 24-hour PDGF (10 ng/ml) treatment induces an increase in the acetylated fractions of SIRT1 targets histone H1 and FOXO1, without affecting total protein expression (n=4-6). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 versus control.

Figure 3: Sirtuin1 downregulation favors PASMCM hyperproliferation.

(A) Sirtuin1 silencing by siRNA reduces SIRT1 protein level and increases BrdU incorporation in control human PASMCM (n=3). (B) Sirtuin1 silencing decreases SIRT1 amount and increases PDGF-induced proliferation in rat PASMCMs, as evidenced by the increase in cell number, WST-1 cleavage and BrdU incorporation (for BrdU incorporation, p=0.06). Sirtuin1 protein level reduction shows a trend to increase non-stimulated rat PASMCMs proliferation (n=5-6). (B) Sirtuin1 pharmacological inhibitor sirtinol (5 μ M) also facilitates PDGF (10 ng/ml)-induced rat PASMCM proliferation (n=7). * p<0.5, ** p<0.01 versus respective controls.

Figure 4: Sirtuin1 downregulation aggravates chronic hypoxia-induced vascular remodeling.

(A) The deletion of SIRT1 exon 4, which belongs to SIRT1 catalytic domain, causes the production of a truncated protein. Wild-type SIRT1 protein is significantly reduced in SIRT1 KO mice lungs, in normoxic and hypoxic conditions (n=5-6). Sirtuin1 downregulation abolishes hypoxia-induced increase in PGC-1 α protein content and blunted elevation in HIF-1 α protein while augmenting GLUT1 protein content. (n=5-6). (B) Representative images of non muscular, partially muscular and totally muscular vessels. 7- μ m lung cryosections are labeled with antibodies against Von Willebrand endothelial factor (VWF) (red) and α smooth muscle actin (α SMA) (green). Nuclei are labeled with Hoechst fluorescent probe (blue). Color merged panels are showed on the right. Chronic hypoxia-induced vascular remodeling is deeper in SIRT1 KO mice lungs, as evidenced by the decrease in the percentage of non muscular vessels, paralleled by an increase in the presence of totally muscular vessels (n=5-6). (C) Right ventricle (RV) pressure elevation is aggravated in SIRT1 KO after hypoxia exposure (n=4-5). Fulton's index, calculated as the ratio of RV weight to the weight of left ventricle (LV) + septum (S), is higher in SIRT1 KO mice compared to WT mice subjected to chronic hypoxia (n=5-6). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 versus normoxia; \$ p<0.05, \$\$ <0.01 versus wild-type.

Figure 5: Sirtuin1 activator Stac-3 decreases cell acetylation state and abolishes rat and human PSMCs hyperproliferation.

(A) In rat PSMCs, Stac-3 (10 μ M) treatment causes a significant reduction of the acetylated levels of SIRT1 targets H1 and FOXO1 (n=4-6). Stac-3 also increases NAMPT mRNA content (n=4). (B) Stac-3 strongly inhibits PDGF (10 ng/ml)-induced rat PSMC proliferation, as indicated by the decrease in cell number, WST-1 cleavage by viable cells, BrdU incorporation by replicating cells and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) amount, (n=4); (C) SIRT1 specific activator SRT1720 (1 μ M) also inhibits rat PSMC proliferation, as evidenced by the significant decrease in WST-1 cleavage (n=6). (D) Stac-3 does not affect rat PSMC mortality: fluorescein diacetate (FDA) negative cells percentage does not increase upon Stac-3 treatment (n=7). The percentage of necrotic cells, permeable to the DNA intercalating probe propidium iodide (PI), is also unchanged (n=4). (E) Stac-3 antiproliferative effect is observed also in human PAH PSMCs by the decrease in WST-1 cleavage, BrdU incorporation, as well as PCNA protein level (n=4). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 versus control non-treated PSMCs; \$ p< 0.05, \$\$ p<0.01 versus PDGF-stimulated rat PSMCs or human PAH PSMCs

Figure 6: Sirtuin1 activation is associated with a mitochondrial biogenesis enhancement in human and rat PASCs.

(A) In PAH PASCs, Stac-3 (10 μM) induces an increase in the protein level of mitochondrial mass markers VDAC and CS in PAH PASCs (n=3). (B) Stac-3 also increases expression of PGC-1 α molecular partners PPAR α and ERR α as well as expression of an antioxidant enzyme, SOD2, known to be regulated by PGC-1 α (n=4). (C) In rat PASCs, Stac-3 also increases mitochondrial mass as evidenced by elevation in VDAC and CS protein level; this is accompanied by an increase in mitochondrial transcription factor A (TFAM) content (n=4-7). (D) Stac-3 activates expression of PGC-1 α partners (PPAR α , ERR α and NRF2) and of elements of PGC-1 α -triggered cascade (TFAM, the antioxidant enzyme glutathion peroxidase 1 (GPx1) and sirtuin3 (SIRT3)) (n=4).

Figure 7: Sirtuin1 activation inhibits PDGF-induced mitochondrial fragmentation.

(A) Representative confocal images of rat PASC mitochondrial network, labeled with MTO (*MitoTracker Orange*). Stac-3 (10 μM) attenuates PDGF (10 ng/ml)-induced mitochondrial fragmentation. (B) Stac-3 prevents PDGF-induced augmentation of the percentage of small mitochondria ($\leq 1 \mu\text{m}^3$) and the decrease of highly connected mitochondria ($> 5 \mu\text{m}^3$). Stac-3 also inhibits the tendency (p=0.059) of the decrease in the presence of medium-sized mitochondria (between 1 and 5 μm^3). Data are represented as means \pm standard errors of four independent experiences. For each experience, at least ten cells per condition are analyzed. * p<0.05 versus control non-treated PASCs; \$ p< 0.05 versus PDGF-stimulated rat PASCs.

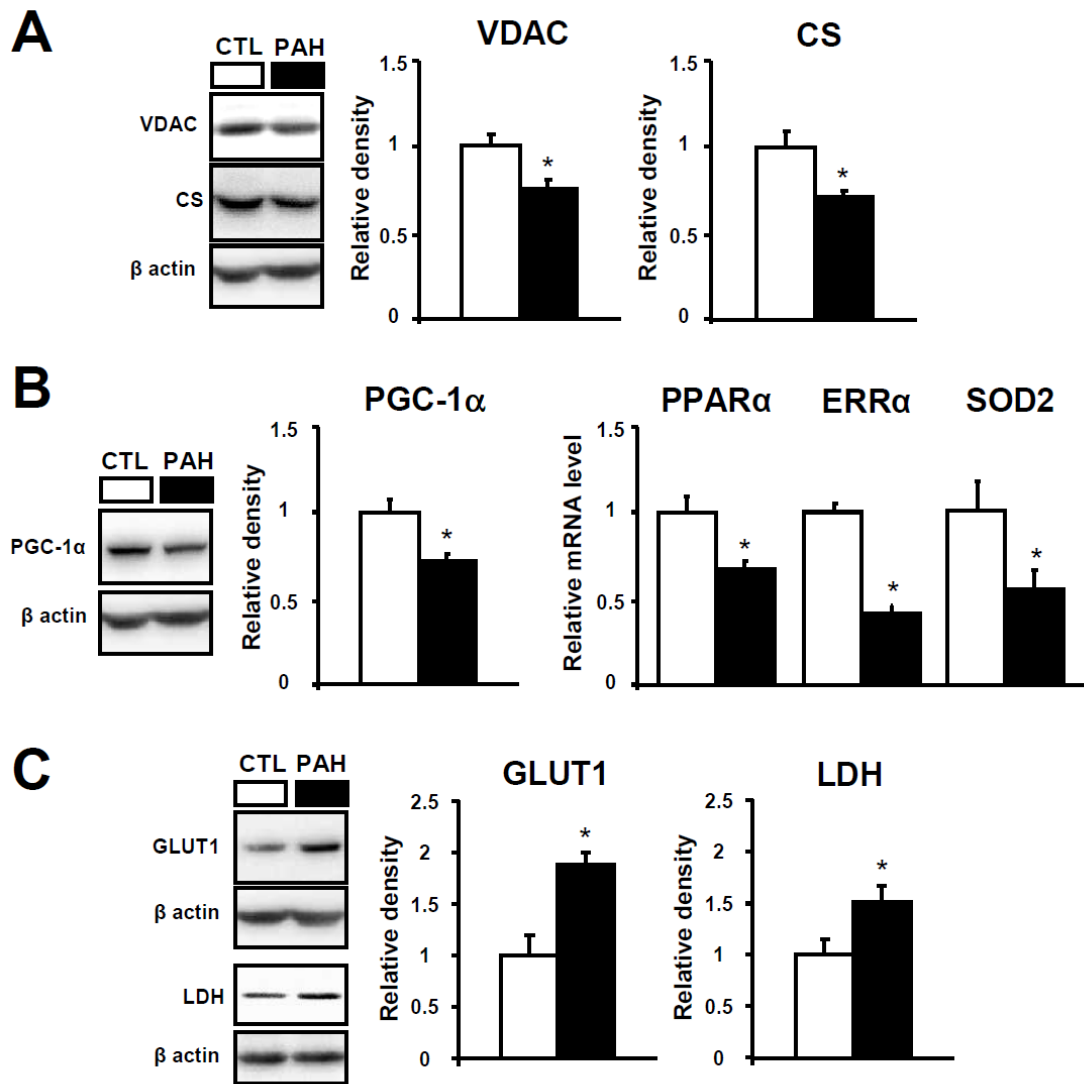


Fig. 1

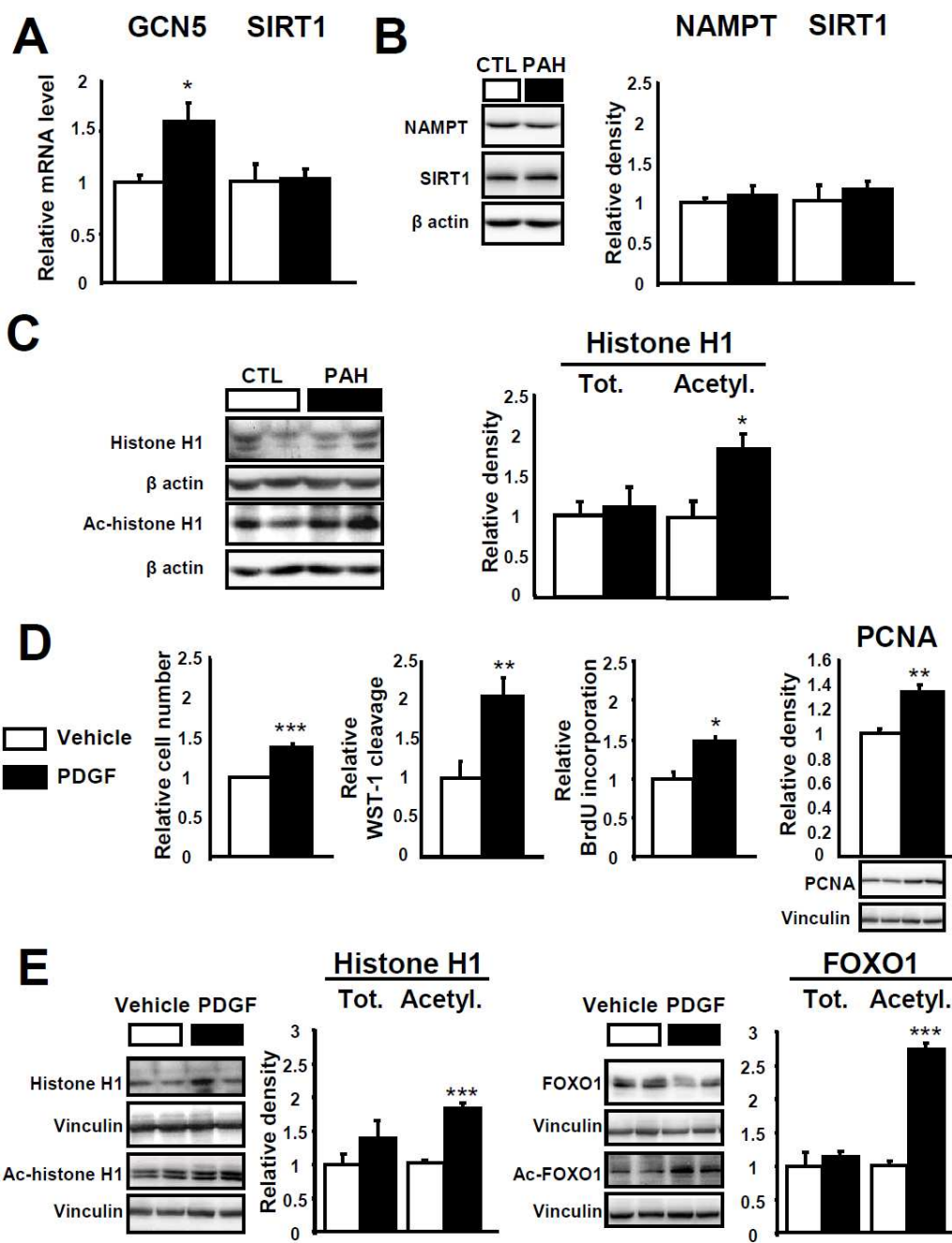


Fig.2

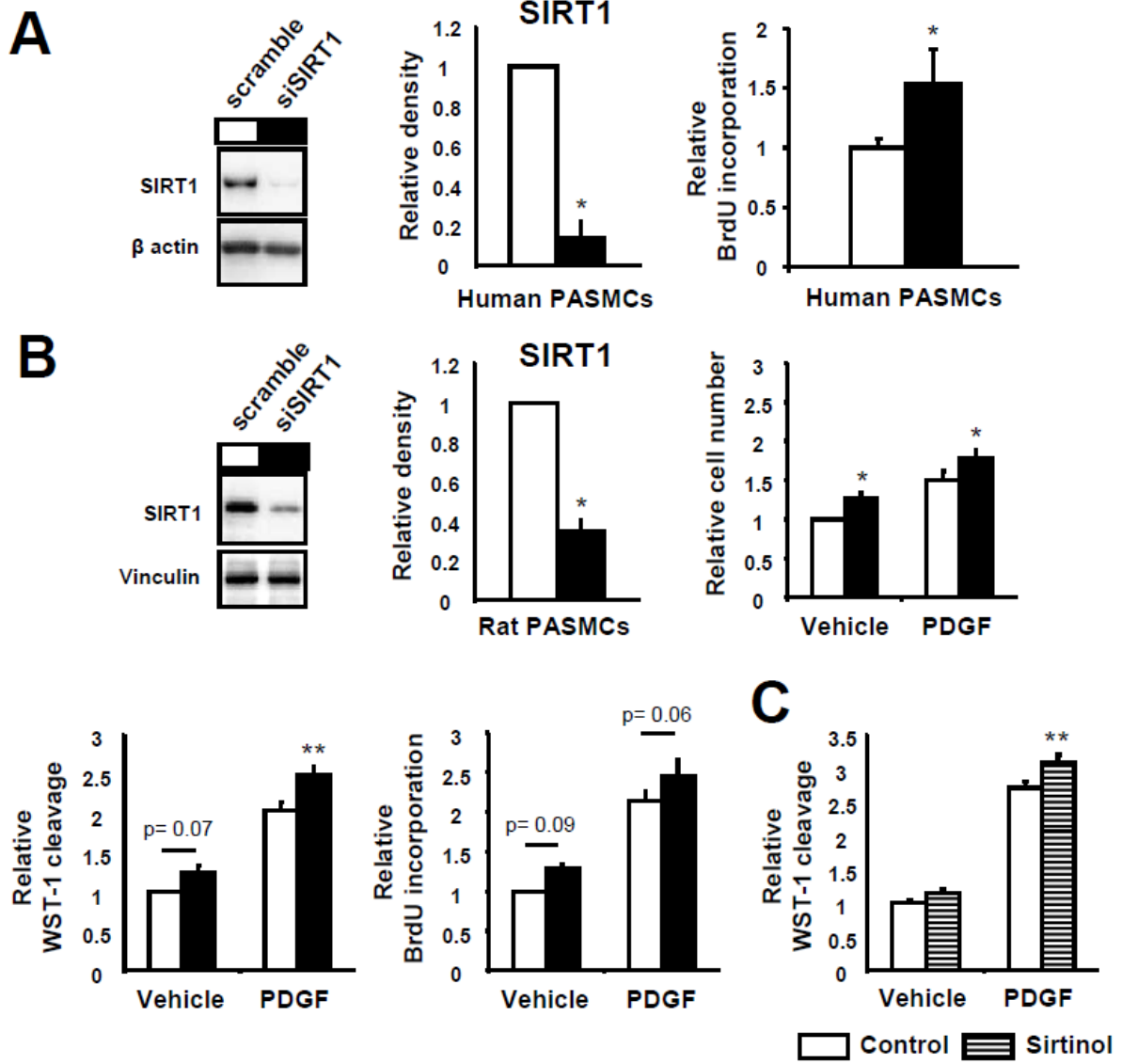
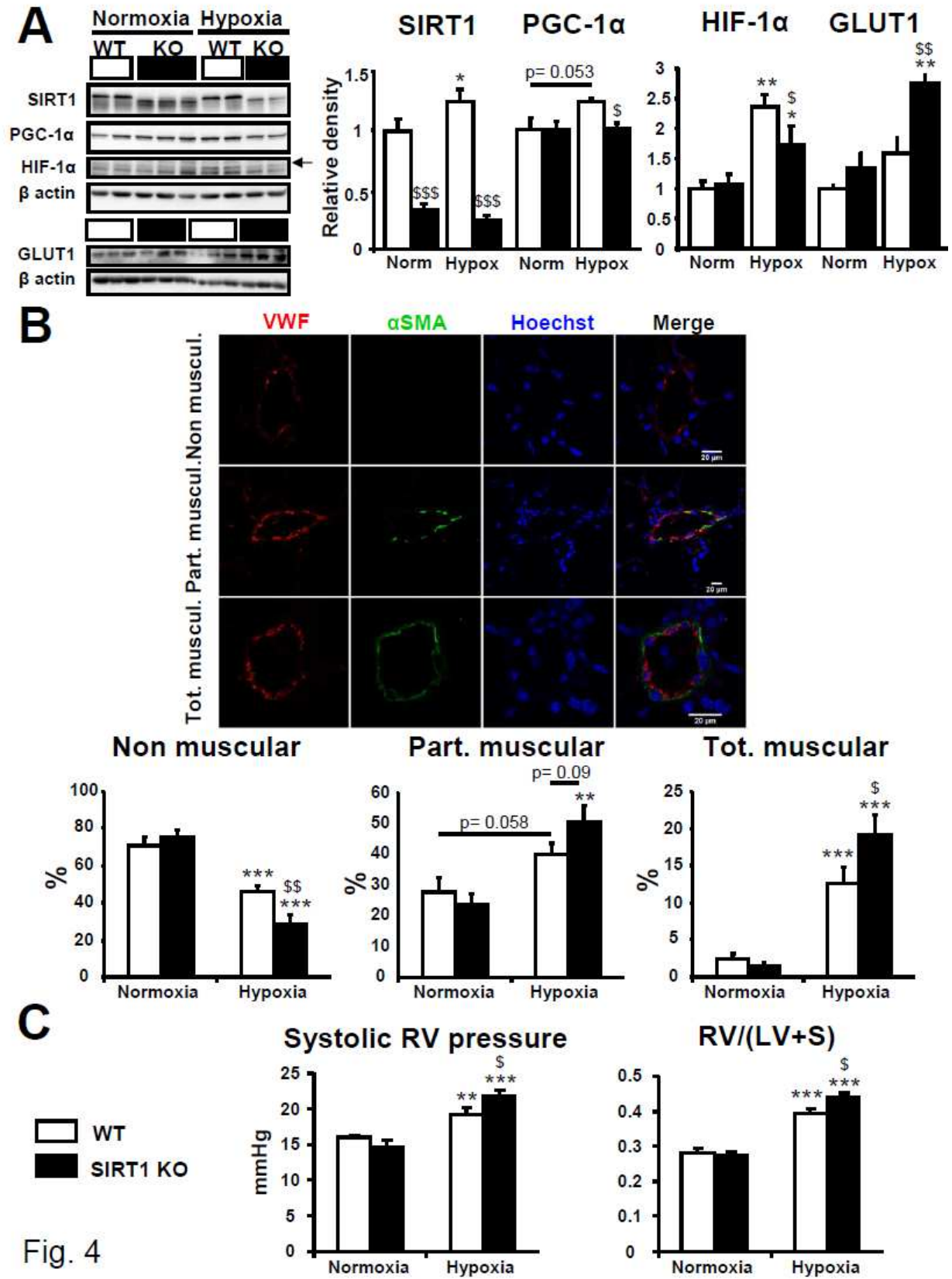


Fig. 3



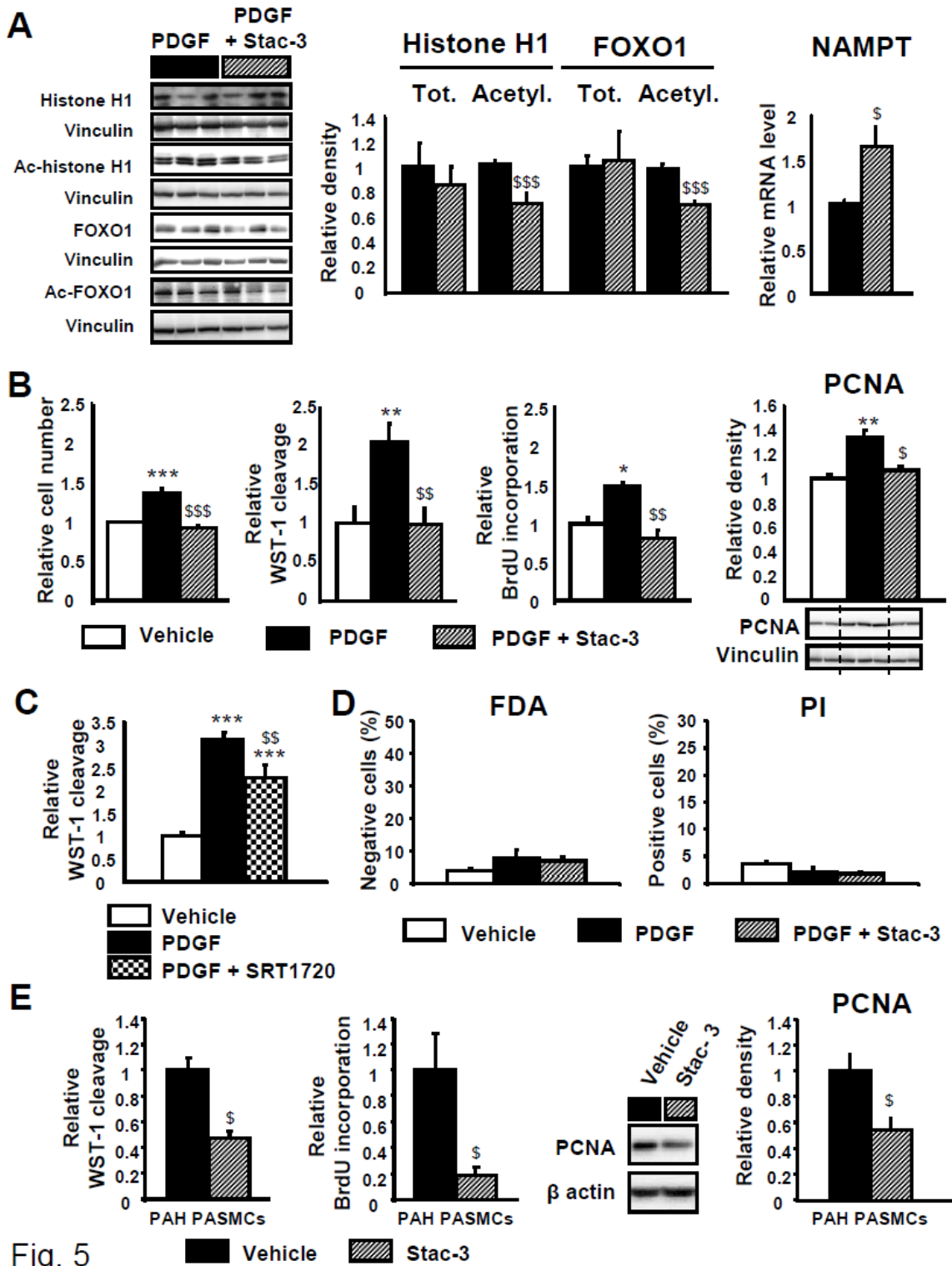


Fig. 5

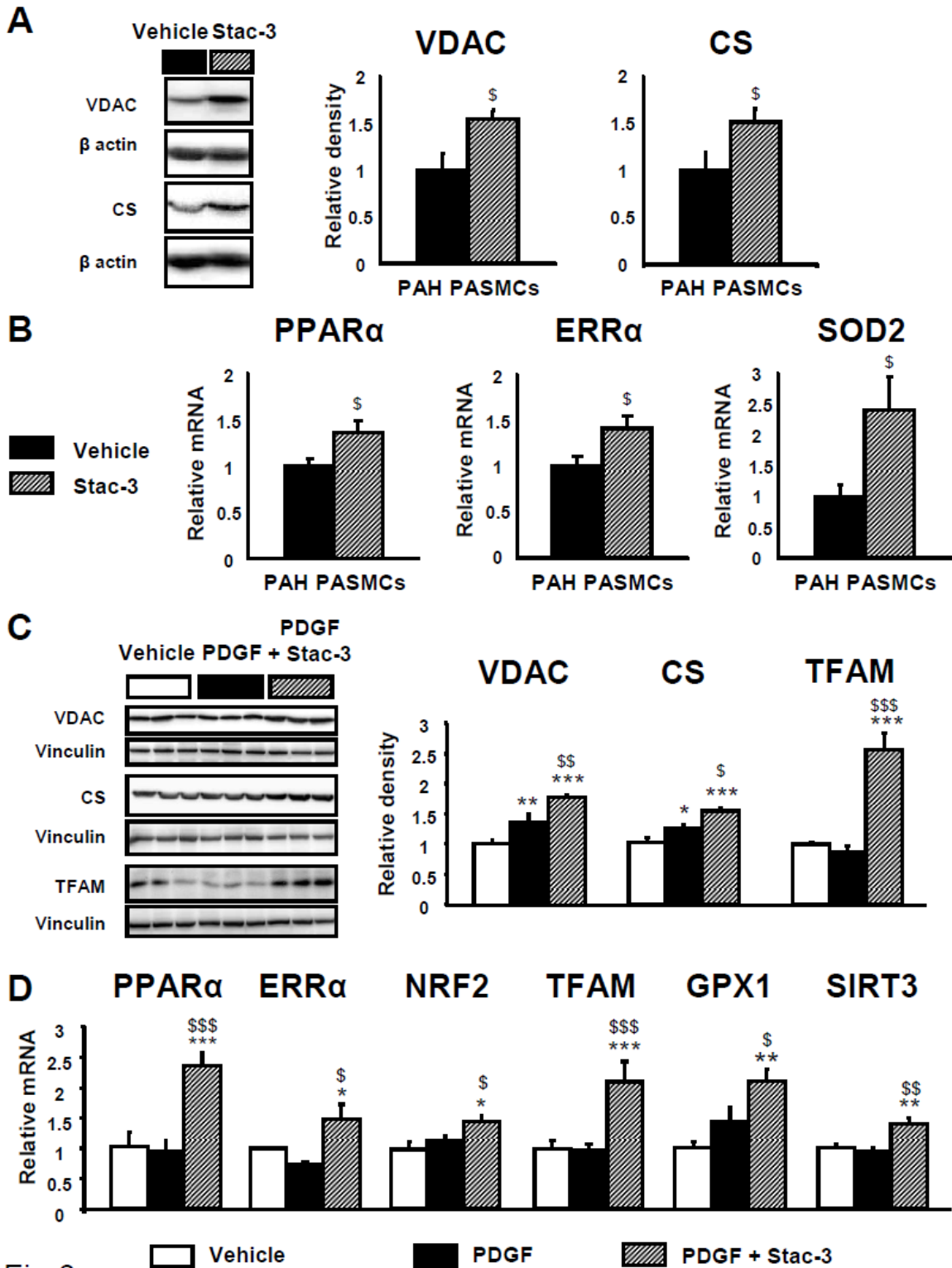


Fig.6

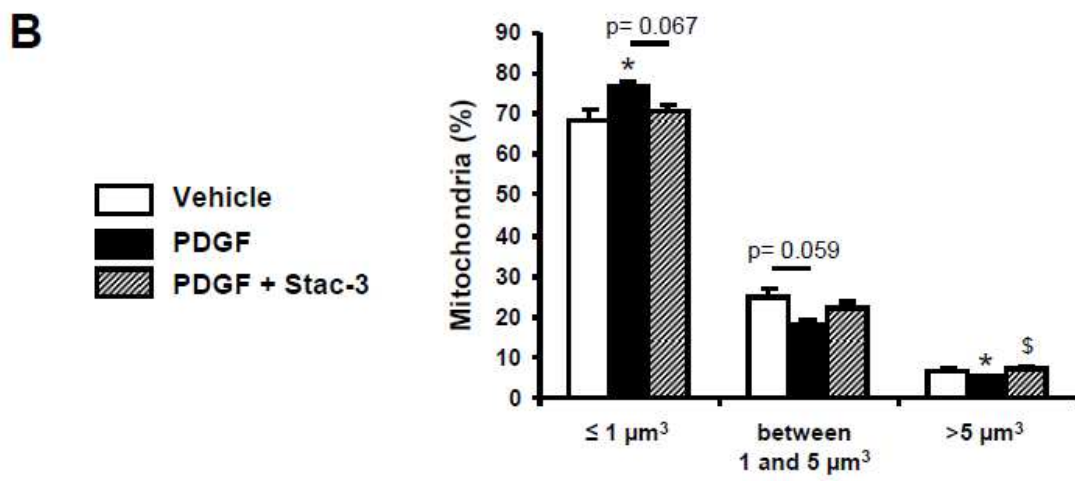
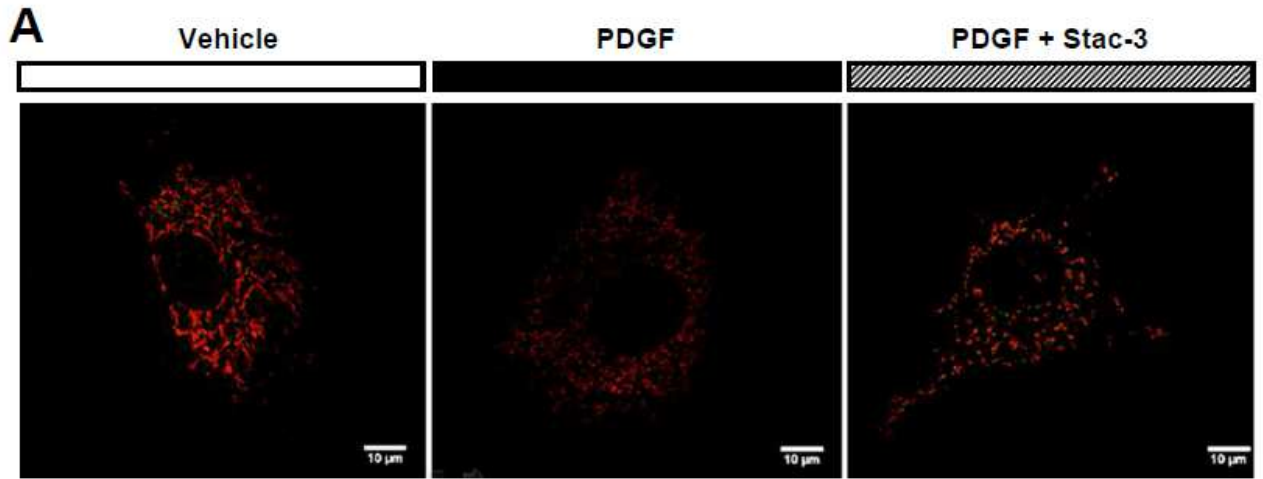


Fig. 7

Supplemental material

Supplemental methods

Immunohistochemistry

7- μ m thicked slices were cut and stained with α smooth muscle actin (α SMA) (Sigma, F3777, 1:200), Von Willebrand endothelial factor (VWF) (DAKO, A0082, 1:600) and 4 μ M Hoechst for nuclear staining. For each mouse, 100 small vessels (with a diameter $<50\mu$ m) were examined by a blinded observer. Each vessel was categorized as non muscular (vessels without smooth muscle), partially muscular (vessels with smooth muscle layer in only part of their wall) or totally muscular (smooth muscle is identifiable in the entire vessel circumference).

Immunoprecipitation

The lysates of PSMCs, including 500 μ g protein, were precleaned with protein A magnetic beads (Millipore) at 4°C for 1 hour, and then supernatants were collected. The lysates were incubated with anti-acetylated lysine antibody (Cell Signalling, 9681, 1:20) or with anti-mouse IgG antibodies (Santa Cruz, sc-2025, 1:20) at 4°C overnight. Immune complexes were collected then resuspended in denaturing lysis buffer and heated at 70°C for 10 minutes. The immunoprecipitated proteins were subjected to Western blot analysis for PGC-1 α detection.

Immunoblot

30 to 50 μ g of protein extract were loaded onto 8-15% polyacrylamide gel, and then transferred onto a PVDF membrane (Immobilon, Millipore).

Primary antibody (see table S3) incubation was performed either overnight at 4°C or for 2 hours at room temperature. The incubation of peroxydase-coupled secondary antibody was realised for 1 hour at room temperature. Proteins were visualized using Luminata Crescendo or Forte (Millipore) peroxydase substrates using a CCD camera (ChemiDoc XRS+Bio-rad). Band density was quantified using Quantity One software (BioRad) and normalised to a housekeeping protein (β actin for human PSMCs or vinculin for rat PSMCs).

Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from cells using TRIzol (Molecular Research Center). Briefly, chloroform was added to TRIzol, samples were centrifuged at 10000 g for 15 minutes at 4°C, and three phases were thus obtained: a protein containing phenol-chloroform fraction, a DNA containing interphase and a RNA containing aqueous phase.

The addition of isopropanol to the aqueous phase allowed RNA precipitation.

Reverse transcription was performed from 1 µg RNA using BioRad complementary DNA (cDNA) synthesis kit, following manufacturer instructions. Negative controls without reverse transcriptase were performed to verify the absence of genomic DNA in the samples.

Gene expression was evaluated using a quantitative PCR system (BioRad) with SYBR-Green dye. PCR reaction was realised on 5 ng cDNA. Reaction mix contained 0.5 µM sense and anti-sens primers (see table S2). To confirm the absence of exogenous contaminations, a negative control without sample was realised. For each gene, a calibration curve was obtained analysing cDNA series dilutions, and was used to calculate sample concentration and determine amplification efficiency. TBP (TATA-Binding Protein), RPL32 (Ribosomal Protein Large 32), RPLP2 (Ribosomal Protein Large P2) and 14-3-3 zeta/delta protein (YWHAZ) were used as reference genes for rat PSMCs to obtain a normalisation factor calculated by GeNorm software. For human PSMCs, RPL32, TBP, RPLP0 (Ribosomal Protein Large P0) and RPL4 (Ribosomal Protein Large 4) were used as reference genes.

Mitochondrial network analysis

Cells were incubated for 15 minutes at 37°C with 500 nM MitoTracker Orange MTO for mitochondrial staining. Cells were then fixed with 4% PFA for 10 min at 37°C, auto-fluorescence was quenched via 5-minute incubation with 50 mM NH₄Cl and were mounted using mowiol mounting medium..

3D confocal images were acquired collecting a Z-series stack with 63x objective by an inverted Laser Scanning Microscope (Zeiss LSM 510). MTO was excited by 543 nm helium neon laser. 3D images were deconvoluted using AutoDeblur AutoVisualize software (MediaCybernetics) to increase confocal system resolution, and then analyzed using Imaris software (Bitplane Company) to provide information on mitochondrial volume.

PASMC transient transfection

Reverse short interference RNA transfection was performed to downregulate SIRT1 in rat and human PSMCs. Cells were seeded in a transfection medium (Santa Cruz) containing transfection reagent (Santa Cruz) and a mix of three short interfering RNA specifically directed against SIRT1 (siSIRT1, Santa Cruz) or having no known target (control siRNA-A, Santa Cruz). 24 hours after the transfection, cells were cultivated for additional 24 hours with 0.5% FBS containing medium, then treated. Transfection rate, evaluated by flow cytometry using a FITC-coupled siRNA (Santa Cruz), was about 60%. Transfection efficiency was confirmed by SIRT1 protein level.

Evaluation of PASMC proliferation and death

PASMC proliferation was measured via four different approaches. BrdU incorporation by replicating cells was evaluated using Millipore kit, following the manufacturer instructions. WST-1 (Roche) cleavage by viable cells was measured by a spectrophotometer. Cell counting was performed using a Malassez haemocytometer, and 3 counts per condition were realised. The protein amount of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected via WB. For measuring PASMC death, cells were labelled with 0.1 µg/ml fluorescein diacetate (FDA). FDA is cleaved by cellular esterases only in viable cells thus releasing fluorescein, which is fluorescent. FDA negative cells were detected by flow cytometry (FC500, Beckman Coulter). To analyse late apoptosis/necrosis, cells were also labelled with 10 µg/ml propidium iodide (PI). Only late apoptotic/necrotic cells, which have lost their membrane integrity, can be labelled by this nucleic acid intercalating fluorescent agent. For each sample, at least 7 500 cells were analysed. Cell aggregates and debris were excluded from analysis.

Supplemental tables

Supplemental figures

Figure legends

Table S1: Features of PAH and control patients.

Table S2: Primer sequences.

Table S3: List of antibodies.

Figure S1: Hyperproliferation of PSMCs is associated with altered acetylation/deacetylation balance of PGC-1 α .

(A) The representative image of PGC-1 α amount in total protein extracts (input) and in immunoprecipitated proteins containing acetylated lysines (IP) shows that PAH PSMCs display an increase in the acetylated fraction of PGC-1 α (n=3). (B) PDGF-induced proliferation determines an enrichment of acetylated PGC-1 α in rat PSMCs (n=3).

Figure S1: Stac-3 enhances PGC-1 α deacetylation.

In rat PSMCs, Stac-3 (10 µM) treatment causes a significant reduction of the acetylated levels of SIRT1 target PGC-1 α (n=3).

Table S1

Patient	Age	Gender
H213	26	F
H215	35	F
H211	44	F
H219	41	F
H221	39	M
C106214	43	F
C1374	56	F
C1379	56	M
C1397	64	M
C1398	65	M
C1406	78	M
C1412	61	F

Table S2

Gene	Forward primers (5'→3') Reverse primers (5'→3')	Hybridization temperature (°C)
ERRα (human)	CTA TGG TGT GGC ATC CTG TG GTG ATC TCG CAC TCG TTG G	60
ERRα (rat)	TCA AGG AGG GTG TGC GTC TG CTT GGC CCA GCT GAT GGT GA	65
NRF2 (rat)	CAC TCA ACA TTT CGG GAA GAG CTC ATT CAT CTG TTG CTC TTG G	60
GCN5 (human)	CTA TGG GGC AAA CTC TCC AA TCC AGA CTC AGG GAG CTG TT	60
GPX1 (rat)	GTT TCC CGT GCA ATC AGT TC TCA CTT CGC ACT TCT CAA ACA	60
NAMPT (rat)	TGA ATT GCT CCT TCA AGT GC TTT GTT GGG ATC AGC AAC TG	60
PPARα (human)	CCT CTC AGG AAA GGC CAG TA CAG TGA AAG ATG CGG ACC TC	60
PPARα (rat)	ATG AGT CCC CTG GCA ATG GGC ATT CTT CCA AAA CGG	58
RPLP0 (human)	GCG ACC TGG AAG TCC AAC TA TTG TCT GCT CCC ACA ATG AA	60
RPLP2 (rat)	GCT GTG GCT GTT TCT GCT TC ATG TCG TCA TCC GAC TCC TC	62
RPL4 (human)	GCA AGC TGA ACA TTT TGA TTG GAT CTC TGG GCT TTT C	61
RPL32 (human, rat)	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG	60
SIRT1 (human)	ATT TAT GCT CGC CTT GCT GT CCA GCG TGT CTA TGT TCT GG	60
SIRT3 (rat)	TAC ATG CAC GGT CTG TCG AA ACA ACG CCA GTA CAG ACA GG	60
SOD2 (human)	CGT CAC CGA GGA GAA GTA CC AGT CAC GTT TGA TGG CTT CC	60
TBP (human, rat)	AAA GAC CAT TGC ACT TCG TG GCT CCT GTG CAC ACC ATT TT	60
Tfam (rat)	GAA AGC ACA AAT CAA GAG GAG CTG CTT TTC ATC ATG AGA CAG	60
YWHAZ (rat)	AGA CGG AAG GTG CTG AGA AA GAA GCA TTG GGG ATC AAG AA	60

Table S3

Antibody	Dilution	Manufacturer	Reference
Ac-FOXO1	1:500	Santa Cruz	sc-49437
Ac-histone H1	1:1000	Sigma	H7789
CS	1:500	Abcam	ab96600
GLUT1	1:500	Abcam	ab32551
FOXO1	1:1000	Cell signaling	2880S
HIF-1α	1:500	Santa Cruz	sc-10790
Histone H1	1:500	Santa Cruz	sc-10806
NAMPT	1:250	Abcam	ab45890
PCNA	1:1000	Santa Cruz	sc-56
PGC-1α	1:500	Santa Cruz	sc-13067
SIRT1	1:4000	Abcam	sc-13067
TFAM	1:500	Santa Cruz	sc-23588
VDAC	1:1000	Home made	
Vinculin	1:2000	Sigma	V9131
β actin	1:10000	Santa Cruz	sc-47778

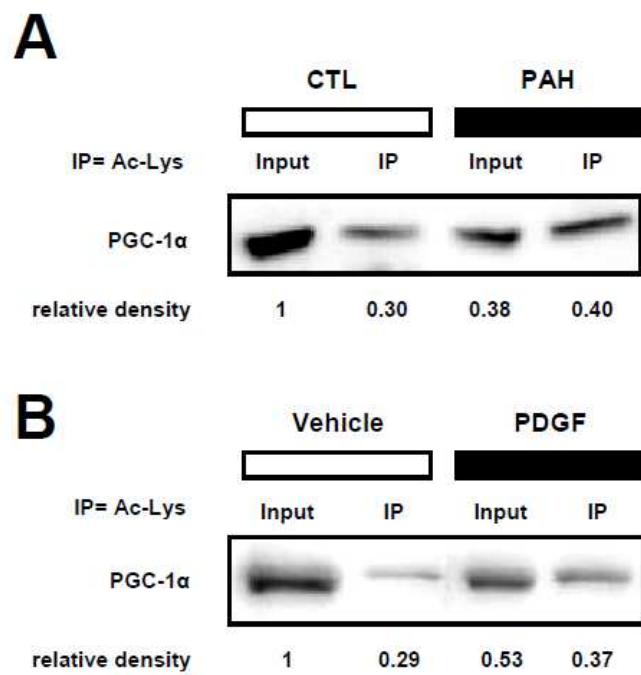


Fig. S1

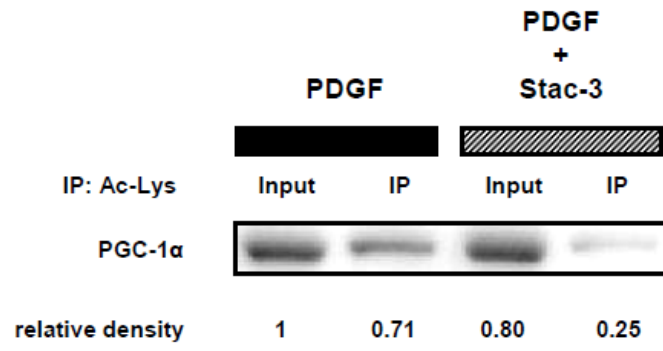


Fig. S2

Annexe 2

Metabolic therapy: Cobalamin protects mitochondrial oxidative capacity and contractile function in myocardial dysfunction

Jérôme Piquereau^{1, 2}, Maryline Moulin^{1, 2}, Giada Zurlo^{1, 2}, Philippe Mateo^{1, 2}, Mélanie Gressette^{1, 2}, Florence Lefebvre^{1, 2}, Jean-Louis Paul^{2, 3}, Renée Ventura-Clapier^{1, 2}, Vladimir Veksler^{1, 2} and Anne Garnier^{1, 2}

¹ **UMR-S 1180, Inserm, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France**

²Univ Paris-Sud, IFR141, F-92296 Châtenay-Malabry, France;

³Service de Biochimie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Address for correspondence: Dr Jérôme Piquereau

U-769 INSERM

Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud

5 rue J-B Clément, 92296 Châtenay-Malabry

France

Tel.: (33-1) 46.83.54.53

Fax: (33-1) 46.83.54.75

E-mail: jerome.piquereau@u-psud.fr

Number of words: 6481

Introduction

Heart failure (HF), which is defined as the inability of the heart to provide adequate blood flow to meet the needs of the organism, is a major cause of death in industrialized countries. Although the mechanisms leading to this pathology are still shrouded of mystery, it appears that alterations in energy metabolism of the cardiac muscle cell may play an important role in the onset and the development of this syndrome. Indeed, it has been widely demonstrated that this disease is associated with significant disruption of energy metabolism, including mitochondrial function (for review see ¹) so that the failing heart represents an "engine out of fuel".²

During the last decade, our team demonstrated that the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator -1 α (PGC-1 α) is clearly reduced in HF.³ This co-activator regulates the function of many transcription factors involved in energy metabolism pathways and is consequently considered as a key regulator of cellular energetics and especially of mitochondrial biogenesis.^{4, 5} Thus, alteration of the PGC-1 α signalling pathways could at least partially explain the metabolic disorders observed in HF patients. Consequently, this co-activator presents itself as a relevant therapeutic target, since the stimulation of its expression and/or its function could reasonably be proposed to overcome the chronic energy deficit observed in the failing heart.

Recently, a cardiac-specific robotized cellular assay was developed in our laboratory to identify inducers of *Pgc-1 α* gene expression on H9c2 cardiomyoblasts, revealing the positive effect of several compounds on *Pgc-1 α* transcription.⁶ The validation of the effect of those molecules in isolated adult cardiomyocytes has shown that cobalamin (Cb) (vitamin B12) exhibited remarkable results on PGC-1 α signalling pathways, characterising this molecule as a potential activator of mitochondrial biogenesis which could be used in a metabolic therapy of HF.

A potential role of Cb in cellular metabolism can be suggested regarding previous studies which showed that deficiency in methyl donors (Cb and folate (vitamin B9)) in rat induces an imbalanced methylation/acetylation of PGC-1 α by the protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) and the deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) in the heart and in the liver.⁷⁻⁹ In eukaryotic cells, Cb is metabolized into adenosylcobalamin and methylcobalamin, the latter being the cofactor of methionine synthase in the cytosol which catalyses the remethylation of homocysteine to methionine.¹⁰⁻¹² Knowing that methionine is converted to S-adenosylmethionine (SAM), the universal donor in transmethylation of numerous proteins, Cb is clearly required for the methylation of proteins involved in the regulation of many cellular

pathways. The activity of PGC-1 α and of proteins controlling its activity like SIRT1 are known to be directly or indirectly regulated by such post-translational modifications;^{7, 13, 14} therefore, Cb could affect cellular metabolism.

For these reasons, in the present study we tested the hypothesis that Cb could exhibit positive effects on myocardial energy metabolism and cardiac function in an animal model of pressure overload-induced myocardial dysfunction. To this end, cardiac function and energy metabolism phenotype of mice that have undergone transverse aortic constriction (TAC) were assessed under normal diet and diet supplemented with Cb and folate.

Materials and Methods

Animals

Five week-old C57B6J mice were fed with normal diet (ND) or with Cb (1 mg/kg) and folate (15 mg/kg) supplemented diet (SD) before undergoing surgery to induce pressure overload by transverse aortic constriction (TAC) at the age of 8 weeks. Anaesthesia was induced by intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg) and silk suture were placed around the aorta to generate aortic stenosis. Four weeks after surgery, mice were euthanized by cervical dislocation and hearts were rapidly excised, rinsed in cold calcium-free Krebs solution and weighed. A part of the left ventricle was immediately used for mitochondrial function assessment and another part was flash frozen in liquid nitrogen for further biochemical determinations. All animal experimental procedures were approved by animal ethics committee of Paris-Sud University.

Echocardiography

Surgery and sacrifice were preceded by echocardiography using a 12 Mhz transducer (Vivid 7, General Electric Healthcare) under 2.5% isoflurane gas anaesthesia to assess cardiac function. M-mode echocardiography was used to determine left ventricular mass, fractional shortening and left ventricular ejection fraction.

Mitochondrial functional assays in permeabilized muscle fibres

Mitochondrial respiration was studied *in situ* in saponin-permeabilized cardiac muscle fibres using a Clarke electrode as previously described. A protocol was designed to study sensitivity of mitochondrial respiration to external ADP and creatine by successively adding pyruvate-malate (1-2.5 mM), ADP (0.1 mM), creatine (12 mM) and ADP (2 mM) to respiration solution (in mM: 2.77 CaK₂EGTA, 7.23 K₂EGTA [100 nM free Ca²⁺], 6.56 MgCl₂ [1 mM free Mg²⁺], 20 taurine, 0.5 DTT, 50 K-methane sulfonate [160 mM ionic strength], 20 imidazole, pH 7.1) at 23 °C. The acceptor control ratio (ACR) was calculated from basal mitochondrial respiration rate (in the presence of pyruvate/malate 1/4 mM, without ADP) and oxygen consumption after addition of a saturating [ADP]. A second protocol consisting in measuring oxygen consumption after successive addition of ADP (2 mM), malate (4 mM), pyruvate (1 mM), glutamate (10 mM), succinate (15 mM), and amytal (an inhibitor of complex I, 1 mM) was also performed. Rates of respiration are given in $\mu\text{moles O}_2/\text{min/g}$ dry weight.

Enzyme activity

Frozen tissue samples were weighed, homogenized (Bertin Precellys 24) in ice-cold buffer (50 mg/ml) containing HEPES 5 mM (pH 8.7), EGTA 1 mM, DTT 1mM and 0.1% Triton X-100. Activity of Citrate synthase (CS), cytochrome oxidase (COX) and total creatine kinase (CK) were determined using standard spectrophotometric assays.¹⁵⁻¹⁷ LDH isoenzymes were separated using agarose gel electrophoresis performed at 200 V for 90 minutes. Individual isoenzymes were resolved by incubation of the gels with a coupled enzyme system as previously described.¹⁸

Immunoblotting

Frozen tissue samples were homogenized (Bertin Precellys 24) in ice cold buffer containing HEPES 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, beta-glycero-phosphate 5 mM, Triton X100 0.1%, orthovanadate 1 mM, DTT 1 mM, NaF 50 mM, NaPPi 5 mM, PMSF 0.2 mM and antiprotease cocktail set. Protein extracts were separated on SDS-polyacrilamide gel (10 to 12%) and then transferred to PVDF membranes for western blot or were directly applied on nitrocellulose membranes using 96-well Bio-Dot[®] (Biorad) for dot blot. After 1 hour of blocking in PBS containing TWEEN20 (0.1%) and nonfat milk (5%), the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody (citrate synthase (Abcam ab96600), carnitine palmitoyl-transferase I (Santa Cruz sc-139482), superoxide dismutase 2 (Abcam ab16956), nuclear factor erythroid 2-related factor (NFE2L2) (Santa Cruz sc-722), Acetylated-Lysine (Ac-Lys) (Cell signaling 9681) and Dimethyl-Arginine asymmetric antibody (Me-Arg) (Active motif 39231)). Oxyblot[™] protein oxidation detection kit (millipore S7150) was used for protein carbonylation assessment. After washing, the membranes were incubated with a secondary antibody coupled with horseradish peroxidase for 1 hour at room temperature and visualized using chemiluminescent substrate (Luminata[™] Western Chemiluminescent HRP Substrates, Millipore). Light emission was detected by autoradiography and quantified using an image-analysis system (Bio-Rad).

Quantitative real-time PCR

Total ventricular RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen). Oligo-dT first strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using iScript cDNA synthesis kit (Bio-rad). Real-time PCR was performed using the SYBR[®] green method on CFX96 Touch[™] Real Time PCR Detection system (Bio-Rad) from 2.5 ng cDNA. mRNA levels for all target genes

were normalized to RPL32 and TBP levels using GeNorm software.¹⁹ Primer sequences are available in supplemental material.

Preparation of samples for homocysteinemia dosage

At sacrifice, blood samples were collected immediately placed on ice and plasma was isolated by centrifugation at 2500g for 15 min at 4°C. Plasma total homocysteine defined as the total concentration of homocysteine after quantitative reductive cleavage of all disulfide bonds, was assayed by using the fluorimetric high-performance liquid chromatography method described by Fortin.²⁰

Cardiomyocyte cultures

Twelve-week old Wistar rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg/kg). Hearts were rapidly excised and perfused (retrograde perfusion) with collagenase to isolate individual adult rat ventricular myocytes as described previously.²¹ Isolated cells were immediately plated on laminin-coated culture dishes in minimal essential medium (M4780, Sigma) supplemented with 2.5% foetal bovine serum, penicillin (100units/mL), streptomycin (100µg/mL), and 2% HEPES (pH 7.4) for 1 hour, and switched to serum-free medium during 16 hours before 24 hours incubation in serum-free medium containing Cb (30µM) or folate (750µM).

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. For in vivo study, statistical differences were analyzed using two-way ANOVA; Newman-Keuls post-hoc were used to identify significant differences between means. For cellular study, t-test was used.

Results

Cardiac alterations induced by pressure overload are reduced in mice treated with Cb and folate.

After 4 weeks of TAC, mice fed without or with SD displayed an increase in heart weight and lung weight (Table 1) compared to their respective sham group, as judged by absolute weight and/or organ weight-to-tibia length ratio. However, the heart weight after TAC was significantly lower when mice were fed with a diet supplemented with Cb and folate. No impact of pressure overload was observed on body and kidney weight in any group. Assessment of left ventricle mass by echocardiography showed that a TAC-induced hypertrophy was significantly less pronounced in SD-TAC group (Figure 1A). Importantly, a decrease in left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (FS) after 4 weeks of TAC was significantly attenuated by SD (Figures 1B, 1C). Moreover, left ventricular levels of atrial natriuretic peptide (ANP) and myocyte-enriched calcineurine-interacting protein (MCIP1) mRNA were significantly less upregulated in SD-TAC group than in ND-TAC group (Figure 1D), evidencing a better functional status of the myocardium in TAC in the presence of Cb and folate supplementation.

Cobalamin and folate supplemented diet protects cardiac energy metabolism in TAC model of failing heart.

Given that SD exhibited a protective effect on cardiac function and that Cb was suspected to impact energy metabolism according to our previous study,⁶ we sought to determine whether this vitamin could protect cellular energetics and especially mitochondrial function in this *in vivo* model. Thus, mitochondrial respiration was analyzed on cardiac permeabilized fibres and revealed the presence of mitochondrial abnormalities after 4 weeks of TAC in mice fed with ND (Figure 2). More specifically, respiration rates measured after cumulative addition of pyruvate, glutamate, succinate and amytal were lower in fibres from ND-TAC heart compared with ND-sham (Figure 2A). Whereas feeding with Cb and folate supplemented diet did not show any effect on mitochondrial function in basal conditions (ND-sham vs SD-sham) (Figure 2A), this diet almost completely prevented the downregulation of mitochondrial respiration observed under stress (Figure 2A). Interestingly, the drop in respiration rates remarked in ND-TAC mice were combined with a strong trend ($p = 0.125$) towards a lower acceptor control ratio in this group which was not observed in mice treated with SD (Figure 2B). In addition, the activity of citrate synthase (CS), which is currently used as a marker of mitochondrial mass, was significantly reduced in ND group after 4 weeks of TAC whereas the

difference was not significant between sham and TAC mice treated with Cb and folate (Figure 2C). Thus, the all set of these data suggests that cardiac protection of Cb and folate supplemented diet in pressure overload model is associated with an improved mitochondrial function.

The protective effect of SD on mitochondrial function under cardiac pressure overload seemed to be combined with a better preservation of metabolism upstream of the mitochondrial oxidative phosphorylation. Indeed, medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) expression was significantly higher in SD-TAC mice compared to ND-TAC ones, which suggests that SD improves fatty acid utilization under conditions of TAC (Figure 2D). Moreover, the large and significant increase in hexokinase 2 (*Hk2*) and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*Pdk4*) expression as well as prevalence of M-isoform of LDH in ND-TAC group in comparison with the others groups (Figure 2D,E) suggests that the metabolism of TAC mice is remodelled towards glycolysis at the expense of oxidative metabolism. SD almost completely normalized these metabolic shifts. This suggests that Cb has generalized effect on the energy metabolism involving different pathways coordinated by PGC-1.

Mitochondrial biogenesis was sustained after TAC under Cb and folate treatment.

Further, we investigated whether the treatment with supplemented diet improved PGC-1-dependent mitochondrial biogenesis pathway. Expression of *Pgc-1 α* and *Pgc-1 β* genes exhibited a similar decrease in both TAC groups (Figure 3A). However, SD ensured normalization of mitochondrial transcription factor A (*Tfam*) and nuclear respiratory factor 2 (*Nrf2*) gene expressions inhibited by TAC. This evidences a higher activation of PGC-1 α downstream transcription cascade in TAC group fed with SD (Figure 3B) and suggests a protection of mitochondrial biogenesis pathway in the heart when cardiac pressure overload by TAC is associated with diet supplemented with Cb and folate.

To investigate the underlying mechanisms allowing an activation of PGC-1 α -mediated cascade in mice fed with SD that underwent 4 weeks of TAC, we first assessed the combined effect of TAC and diet on post-translational activation/inhibition of PGC-1 α . Given the involvement of Cb in methylation and in acetylation of proteins via methylcobalamin, post-translational regulators of PGC-1 α were studied. Thus, as shown in Figure 4A, *Prmt1* gene expression level showed interesting changes since a large increase was observed after TAC only in mice treated with Cb and folate, evoking a higher methylation level in this group. Accordingly, the total methylation level, assessed by immunoblotting, was significantly

higher in SD-TAC group than in ND-TAC group (Figure 4B). Interestingly, ND-TAC mice displayed a trend ($p = 0.142$) to a lesser methylation of proteins in comparison with ND-Sham mice (Figure 4B). Whereas *Sirt1* gene expression was not impacted by TAC and diet, the general control non-repressed protein 5 (*Gen5*) gene expression was decreased in SD-TAC compared to ND-TAC group (Figure 4A). These results suggest a higher acetylation level of proteins, and potentially PGC-1 α , in ND-TAC than in the other groups and especially in SD-TAC mice. Indeed, a normalization of elevated total acetylation level in TAC group by SD was observed (Figure 4B).

The protective effect of SD was not related to Cb and folate action on oxidative stress and homocysteinemia.

Knowing that mitochondria are a major producer and a target of ROS in heart, assessment of oxidative stress was also performed. Protein carbonylation level was similar in all groups (Figure 5A) and gene expression (Glutathione peroxidase 1, GPX1) or protein level (Superoxide dismutase 2, SOD2) of antioxidant enzymes as well as protein level of Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2) did not show any significant difference between TAC groups (Figure 5B and 5C), even if NFE2L2 level tended to be lower in ND-TAC group in comparison to the other groups (Figure 5C).

It is also well known that Cb is intimately linked to the concentration of homocysteine in the blood through a stimulation of methionine production from homocysteine and folate. A dysregulation of homocysteinemia having been reported to be associated with cardiac dysfunction, plasma homocysteine concentration was measured and did not show any difference between the all groups (Figure 5D).

Cobalamin activated mitochondrial biogenesis in isolated rat cardiomyocytes.

Dealing with the fact that SD used in this study was enriched with Cb and folate, the specific effects of each compound on mitochondrial biogenesis were studied in isolated cardiomyocytes obtained from adult rat. Whereas the transcription levels of *Pgc-1 α* and *Pgc-1 β* were respectively unchanged and decreased after Cb treatment, this latter induced a significant increase in *Tfam* transcription (an increase of $59 \pm 10\%$ compared to control ($p < 0.01$)) (Figure 6A). Moreover, transcription of *Cox1*, a gene encoded by mitochondrial genome, tended to increase (an increase of $114 \pm 56\%$ compared to control ($p < 0.068$), Figure 6A). Importantly, these data correlated with significant increase in protein amount of CS and CPT1, implying an elevation of mitochondria mass after Cb treatment (Figure 6B). In

contrast, cardiomyocytes treated with folate only did not exhibit any difference in expression of these same genes in comparison to control (Figure 6C), indicating that Cb supplementation is required to induce an activation of mitochondrial biogenesis.

Discussion

Alterations of energy metabolism and especially mitochondrial dysfunctions have been largely reported in heart failure syndrome for many years,^{22, 23} lending credibility to the idea of a metabolic therapy of this disease. In the present study, we tested this concept by exploring the potential protective effect of Cb in cardiac pressure overload suggested by the action of this compound on mitochondrial biogenesis revealed by the cardiac-specific robotized cellular assay previously published.⁶ Thus, we show here that feeding with a diet supplemented with Cb and folate, from 3 weeks before TAC to sacrifice, exhibits beneficial effects in the murine model of myocardial dysfunction used in this study. Indeed, the treatment with Cb and folate clearly minimized the alterations of cardiac contractility classically induced by TAC^{24, 25} and the protective effect of these B vitamins was associated with sustained mitochondrial biogenesis process. Whereas these mechanisms are at least partly involved in the preservation of mitochondrial function and in the lesser sensitivity to TAC of mice fed with SD, the similar oxidative status with ND and SD seems to suggest that an antioxidant effect of these vitamins would not be a major mechanism of the protective effect observed in this model.

Cb and folate support PGC-1 α activity in murine model of cardiac pressure overload

Although several factors contribute to the pathogenesis of cardiac dysfunction in heart failure, mitochondrial dysfunction is commonly recognized as an important contributor. Here, we confirm again the metabolic disorders induced by cardiac pressure overload previously reported.^{3, 26, 27} Importantly, we show for the first time that a treatment with a diet supplemented with Cb and folate is beneficial in this pathological model and that the protective effects of these vitamins on cardiac function are combined with a prevention of mitochondrial damages and more generally with a preservation of energy metabolism.

It has been reported that after a prolonged aortic banding, cardiac dysfunction is associated with metabolic alterations that could be partly explained by a decrease in PGC-1 α expression and a downregulation of its downstream transcription cascade.^{3, 28, 29} In the present study, a clear decrease in *Pgc-1 α* transcription was shown in the heart of animals with aortic stenosis. This was associated with a lower transcription level of *Tfam* and *Nrf2* in ND-TAC group suggesting an inhibition of PGC-1 α cascade. The normalization of *Tfam* and *Nrf2* expression in SD-TAC mice evidenced an improvement of PGC-1 α activity when TAC mice were fed with SD. Actually, PGC-1 α activity is largely dependant on methylation and acetylation states of the protein.^{13, 30, 31} Those states could be suspected to be modified by SD, as shown

previously. Indeed, this study has shown that methyl donor deficiency in rat induces detrimental effect on energy metabolism through an imbalanced methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1/GCN5 in the heart and in the liver⁷⁻⁹; methyl donor deficiency during pregnancy and lactation also induces heart and liver affliction in offspring because of the same underlying mechanisms⁹. Moreover, one of these studies pointed out the hypomethylation of PGC-1 α to explain the cardiac hypertrophy observed in rats fed without Cb and folate that besides suggests a major role of energetic status in cardiac remodelling⁷ and thus supports the idea of metabolic therapy of heart failure. However, a complementation of food with Cb and folate had never been tested in a model of myocardial dysfunction. In our study, the expression of *Sirt1*, *Gcn5* and *Prmt1* and particularly the assessment of total methylation/acetylation level by immunoblotting suggested a lesser acetylation level and a higher methylation level of PGC-1 α in SD-TAC mice that are in favour of the activation of this transcriptional co-activator.^{32, 33} In a convincing manner, these observations which allow to propose post-translational modifications of PGC-1 α were associated with the preservation of mitochondrial function and thus seem to be at least in part responsible for the protection of cardiac energy metabolism observed in SD-TAC group.

The impact of Cb and folate on PGC-1 α activity can be explained by the role of these compounds in methionine production, the precursor of the universal methyl donor SAM,^{12, 34} which allows methylation of this co-activator by PRMT1; but it can also be advanced that SAM is required to modulate the activity of numerous proteins which could regulate PGC-1 α in a second time, as it has previously been suggested for SIRT1.¹⁴ Thus, even if no modification of *Sirt1* expression were noted in our study, a post-translational activation of this enzyme could eventually be proposed, reinforcing the idea of a lesser acetylation of PGC-1 α suggested by the decrease in *Gcn5* expression and in total acetylation level in SD-TAC group.³³

Interestingly, there is no obvious direct effect of Cb on *Pgc-1 α* transcription *in vivo* contrary to what had been shown in cells.⁶ However, the transposition of what is seen in an acute cellular model to a chronic animal model has to be measured, especially as the stimulation of *Pgc-1 α* transcription in adult rat cardiomyocytes reported in our previous study was transitory and thus might suggest a complex mechanism. Even so, the fact that we showed here that Cb, but not folate, exhibits a stimulating effect on mitochondrial biogenesis in adult rat cardiomyocytes tends to demonstrate that Cb plays a central role in the activation of the downstream PGC-1 α transcription cascade observed in SD-TAC group and that this activation

could not be attributed to a direct effect of folate which was added in the composition of the supplemented diet to ensure a sufficient source of methyl.

Finally, whereas it is difficult to directly link the adenosylcobalamin pathway to mitochondrial biogenesis according to what is known about this derivative of Cb, a beneficial action of this molecule in mitochondrial function could be proposed via its action in the use of odd chain fatty acid.³⁵ Indeed, adenosylcobalamin is the cofactor of methylmalonyl coenzyme A mutase in mitochondria involved in odd-chain fatty acids catabolism¹⁰⁻¹² and ensures the entry of the last degradation product of these fatty acids, methylmalonyl-CoA, into the Krebs cycle by its conversion to succinyl-CoA. Moreover, a supply of adenosylcobalamin allows avoiding a possible accumulation of methylmalonylic acid which inhibits the Krebs cycle.³⁶ Consequently, it can not be excluded that adenosylcobalamin could partly be responsible for the protection observed in this study.

Protective effect of Cb and Folate in cardiac pressure overload is independent of its role on oxidative stress and on homocysteinemia.

Beyond the effect of Cb and folate on cardiac energy metabolism through PGC-1 α activation in our model, the protective action of these two B vitamins could also be explained by antioxidant mechanisms. Indeed, Cb and folate are efficient radical traps^{37, 38} and they can prevent oxidative damages *in vivo*.^{39, 40} Moreover, whether it be through methylcobalamin or adenosylcobalamin pathways, a deficiency in Cb leads to oxidative stress.^{41, 42} Nevertheless, no oxidative damages were observed after four weeks of TAC in our model and no difference in antioxidant elements such as GPX1, SOD2 or NFE2L2, were noted between TAC groups, indicating that a potential antioxidant effect of these B vitamins would not be involved in the protective mechanisms. Besides, Cb oxidative protection is often associated with its role in the control of homocysteinemia. Indeed, Cb is important to maintain a relatively low homocysteinemia and hyperhomocysteinemia (HHCY) is reported to increase ROS production⁴³ and to decrease antioxidant mechanisms.^{44, 45} In our study, plasma level of homocysteine was similar in all groups; consequently, it can be considered that Cb did not act through this mechanism in the present work.

Of note, the fact that oxidative stress and HHCY previously described in pressure overload model⁴⁶ were not observed in our study shows that, after four weeks of aortic banding, our mice were at the beginning of the disease. Interestingly, even if the syndrome was not fully developed, the metabolic alterations were noted, demonstrating that these latter occur at an early stage of the disease and that metabolic therapy could consequently be relevant.

The absence of HHCY in our model is also a critical point to understand the action mode of Cb in this study. Indeed, even if the underlying mechanisms are not fully elucidated, it has been described that HHCY can directly or indirectly alter cardiac function. Actually, the vascular alterations induced by HHCY are well known,^{47, 48} but HHCY can also directly affect contractile properties of the heart through different mechanisms involving mitochondria or not.^{49, 50} Knowing that homocysteinemia was normal after four weeks of TAC, this potential protective mechanism of Cb can not be considered to explain our results.

In summary, we demonstrated here for the first time that the use of a treatment with Cb supplemented diet in a murine model of cardiac pressure overload exhibits beneficial effects on cardiac function. This protective action of Cb is associated with a sustained acetylation/methylation balance which leads to the preservation of mitochondrial biogenesis and mitochondrial function, potentially involving a post-translational activation of PGC-1 α . Overall, these results support the notion that, in cardiac myopathy, mitochondrial biogenesis, and especially PGC-1 α , is a relevant target to preserved cardiac energy metabolism and function of the heart, conferring credit to metabolic therapy.

Fundings

Our laboratory is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT and is supported by a grant from “Fondation pour la Recherche Médicale”, université Paris-Sud (ERM) and CORDDIM. RVC is senior scientist at CNRS.

Acknowledgments

We thank Valérie Domergue and Pauline Robert (Animal facility of IFR141-IPSIT) for their help with the animals, Claudine Deloménie (Transcriptomic platform of IFR141-IPSIT) for her expertise in molecular biology, We thank Christophe Lemaire for helpful discussion and Rodolphe Fischmeister for continuous support.

References

1. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V, Joubert F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochimica et biophysica acta* 2011;**1813**:1360-1372.
2. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007;**356**:1140-1151.
3. Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *The Journal of physiology* 2003;**551**:491-501.
4. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism* 2005;**1**:361-370.
5. Patten IS, Arany Z. PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2012;**23**:90-97.
6. Ruiz M, Courilleau D, Jullian JC, Fortin D, Ventura-Clapier R, Blondeau JP, Garnier A. A cardiac-specific robotized cellular assay identified families of human ligands as inducers of PGC-1alpha expression and mitochondrial biogenesis. *PloS one* 2012;**7**:e46753.
7. Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juilliere Y, Malthiery Y, Gueant JL. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol* 2011;**225**:324-335.
8. Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP, Gueant JL. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. *J Hepatol* 2012;**57**:344-351.
9. Gueant JL, Elakoum R, Ziegler O, Coelho D, Feigerlova E, Daval JL, Gueant-Rodriguez RM. Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2013.
10. Banerjee R, Ragsdale SW. The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 2003;**72**:209-247.

11. Quadros EV. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol* 2010;**148**:195-204.
12. Gueant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I, Adjalla C, Maury F, Merle C, Nicolas JP, Namour F, Daval JL. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* 2013;**95**:1033-1040.
13. Holness MJ, Caton PW, Sugden MC. Acute and long-term nutrient-led modifications of gene expression: potential role of SIRT1 as a central co-ordinator of short and longer-term programming of tissue function. *Nutrition* 2010;**26**:491-501.
14. Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu SF. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis* 2013;**4**:e553.
15. Wharton DC, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods in Enzymology* 1967;**10**:245-250.
16. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, Ventura-Clapier R. Muscle creatine kinase-deficient mice. II. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry* 1995;**270**:19921-19929.
17. Ventura-Clapier R, Kuznetsov AV, d'Albis A, van Deursen J, Wieringa B, Veksler VI. Muscle creatine kinase-deficient mice. I. Alterations in myofibrillar function. *The Journal of biological chemistry* 1995;**270**:19914-19920.
18. De Sousa E, Veksler V, Minajeva A, Kaasik A, Mateo P, Mayoux E, Hoerter J, Bigard X, Serrurier B, Ventura-Clapier R. Subcellular creatine kinase alterations. Implications in heart failure. *Circulation research* 1999;**85**:68-76.
19. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;**3**:research0034.0031-0034.II.
20. Fortin LJ, Genest J, Jr. Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. *Clin Biochem* 1995;**28**:155-162.
21. Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *British Journal of Pharmacology* 1999;**127**:65-74.

22. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *The Journal of physiology* 2004;**555**:1-13.
23. Mettauer B, Zoll J, Garnier A, Ventura-Clapier R. Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2006;**452**:653-666.
24. Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 2010;**13**:1011-1022.
25. Liu Q, Chen X, Macdonnell SM, Kranias EG, Lorenz JN, Leitges M, Houser SR, Molkentin JD. Protein kinase C{alpha}, but not PKC{beta} or PKC{gamma}, regulates contractility and heart failure susceptibility: implications for ruboxistaurin as a novel therapeutic approach. *Circulation research* 2009;**105**:194-200.
26. Kolwicz SC, Jr., Olson DP, Marney LC, Garcia-Menendez L, Synovec RE, Tian R. Cardiac-specific deletion of acetyl CoA carboxylase 2 prevents metabolic remodeling during pressure-overload hypertrophy. *Circulation research* 2012;**111**:728-738.
27. Riehle C, Wende AR, Zaha VG, Pires KM, Wayment B, Olsen C, Bugger H, Buchanan J, Wang X, Moreira AB, Doenst T, Medina-Gomez G, Litwin SE, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Abel ED. PGC-1beta deficiency accelerates the transition to heart failure in pressure overload hypertrophy. *Circulation research* 2011;**109**:783-793.
28. Witt H, Schubert C, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A, Tiemann K, Stypmann J, Roepcke S, Brokat S, Mahmoodzadeh S, Brozova E, Davidson MM, Ruiz Noppinger P, Grohe C, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med (Berl)* 2008;**86**:1013-1024.
29. Zhang J, Wei C, Wang H, Tang S, Jia Z, Wang L, Xu D, Wu Y. Protective effect of qiliqiangxin capsule on energy metabolism and myocardial mitochondria in pressure overload heart failure rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;**2013**:378298.
30. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005;**434**:113-118.
31. Wenz T. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha under cellular stress. *Mitochondrion* 2013;**13**:134-142.
32. Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev* 2005;**19**:1466-1473.

33. Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim SH, Pandey A, Puigserver P. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell metabolism* 2006;**3**:429-438.
34. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1996;**10**:471-480.
35. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chem Biol Interact* 2006;**163**:113-132.
36. Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Pezacka EH, Jacobsen DW, Miyatake K, Nakano Y. Accumulation of methylmalonic acid caused by vitamin B12-deficiency disrupts normal cellular metabolism in rat liver. *Br J Nutr* 1996;**75**:929-938.
37. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2001;**30**:1390-1399.
38. Krautler B. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochem Soc Trans* 2005;**33**:806-810.
39. Shaw S, Jayatilleke E, Herbert V, Colman N. Cleavage of folates during ethanol metabolism. Role of acetaldehyde/xanthine oxidase-generated superoxide. *Biochem J* 1989;**257**:277-280.
40. Arriaga-Alba M, Ruiz-Perez NJ, Sanchez-Navarrete J, de Angel BL, Flores-Lozada J, Blasco JL. Antimutagenic evaluation of vitamins B1, B6 and B12 in vitro and in vivo, with the Ames test. *Food Chem Toxicol* 2013;**53**:228-234.
41. Richard E, Alvarez-Barrientos A, Perez B, Desviat LR, Ugarte M. Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J Pathol* 2007;**213**:453-461.
42. Richard E, Desviat LR, Ugarte M, Perez B. Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *Journal of cellular biochemistry* 2013;**114**:183-191.
43. Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, Moshal KS, Tyagi SC. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *Journal of cellular biochemistry* 2006;**98**:1150-1162.

44. Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 2003;**18**:147-154.
45. Matte C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andrezza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Goncalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. *Neurochem Int* 2009;**54**:7-13.
46. Hughes WM, Jr., Rodriguez WE, Rosenberger D, Chen J, Sen U, Tyagi N, Moshal KS, Vacek T, Kang YJ, Tyagi SC. Role of copper and homocysteine in pressure overload heart failure. *Cardiovasc Toxicol* 2008;**8**:137-144.
47. Vizzard E, Bonadei I, Zanini G, Frattini S, Fiorina C, Raddino R, Dei Cas L. Homocysteine and heart failure: an overview. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* 2009;**4**:15-21.
48. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J* 2015;**14**:6.
49. Joseph J, Washington A, Joseph L, Koehler L, Fink LM, Hauer-Jensen M, Kennedy RH. Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2002;**283**:H2567-2574.
50. Moshal KS, Tipparaju SM, Vacek TP, Kumar M, Singh M, Frank IE, Patibandla PK, Tyagi N, Rai J, Metreveli N, Rodriguez WE, Tseng MT, Tyagi SC. Mitochondrial matrix metalloproteinase activation decreases myocyte contractility in hyperhomocysteinemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2008;**295**:H890-897.

Figure legends

Table 1: Anatomical characteristics of mice 4 weeks after surgery

Figure 1: Effect of TAC on cardiac function under normal or cobalamin/folate-supplemented diet.

A-C. Left ventricle mass, Ejection fraction and fractional shortening were assessed by echocardiography before surgery (panels on left) and at sacrifice (panels on right). **D.** Markers of cardiac damage 4 weeks after surgery: *Anp* (atrial natriuretic peptide) and *Mcip1* (myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1). (n = 6 to 8 per experimental group), * p<0.05 sham vs TAC, # p<0.05 ND vs SD.

Figure 2: Effect of TAC on cardiac energy metabolism under normal or cobalamin/folate-supplemented diet.

A. Rate of respiration measured under phosphorylating conditions (2mM ADP) in the presence of substrates for complex I and II. **B.** Acceptor ratio was calculated as the ratio between maximal respiration rate (ADP 2mM) and basal respiration rate (without ADP) with malate-pyruvate (4:1mM). **C.** Citrate synthase (CS) enzymatic activity. **D.** mRNA expression level of enzymes of carbohydrate and fatty acid catabolisms. **E.** Proportion of H and M isoforms of LDH assessed from activity of isoenzyme. (n = 6 to 8 per experimental group), * p<0.05 sham vs TAC, # p<0.05 ND vs SD.

Figure 3: Markers of mitochondrial biogenesis in heart of mice fed with normal and cobalamin/folate-supplemented diet 4 weeks after surgery.

A. mRNA expression level of transcriptional coactivators of mitochondrial biogenesis. **B.** mRNA expression level of key transcriptional factors of mitochondrial biogenesis. (n = 6 to 8 per experimental group), * p<0.05 sham vs TAC, # p<0.05 ND vs SD.

Figure 4: Effect of TAC on post-translational modifications in heart of mice under normal and supplemented diet.

A. mRNA expression level of *Prmt1*, *Sirt1* and *Gcn5* involved in protein acetylation/methylation balance. **B.** total methylation (Me-Arg) and acetylation (Ac-Lys) of proteins assessed by dot blots. (n = 6 to 8 per experimental group), * p<0.05 sham vs TAC, # p<0.05 ND vs SD.

Figure 5: Cardiac oxidative status and homocysteinemia of mice fed with normal and cobalamin/folate-supplemented diet 4 weeks after surgery.

A. Global carbonylation of ventricle proteins. **B.** mRNA expression level of *Gpx1*. **C.** Protein level of SOD2 and NFE2L2. **D.** total plasma concentration of homocysteine after 4 weeks of surgery (n = 6 to 8 per experimental group), * p<0.05 sham vs TAC, # p<0.05 ND vs SD.

Figure 6: Markers of mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes treated with cobalamin or folate.

A. mRNA expression level of transcriptional coactivators and key transcriptional factors of mitochondrial biogenesis after 24h treatment with 30μM Cb. **B.** Protein level of CPT1 and CS after 24h treatment with 30μM Cb. **C.** mRNA expression level of transcriptional coactivators and key transcriptional factors of mitochondrial biogenesis after 24h treatment with 750μM Folate. (n = 7 to 9 per experimental group), * p<0.05 sham vs TAC, # p<0.05 ND vs SD.

Table 1

	Normal diet		Supplemented diet		Statistical analysis		
	Sham (n=7)	TAC (n=7)	Sham (n=8)	TAC (n=7)	Diet effect	TAC effect	Interaction
Body weight (g)	26.6 ± 1	26.4 ± 1	25.6 ± 0.5	25 ± 1	0.17	0.59	0.83
Heart weight (mg)	173.9 ± 5.4	292.3 ± 14.5 **	157 ± 6	242.4 ± 14 ** ##	0.004	<0.001	0.13
Tibia lenght (mm)	17.3 ± 0.1	17.3 ± 0.2	17.1 ± 0.1	17.3 ± 0.3	0.59	0.65	0.44
Heart/Tibia (mg/mm)	10.1 ± 0.4	17 ± 0.9 **	9.18 ± 0.3	14 ± 0.7 ** ##	<0.001	<0.001	0.08
Lung/Tibia (mg/mm)	10.8 ± 0.5	17.4 ± 2.2	10.4 ± 0.3	15.8 ± 2.8	0.78	0.009	0.9
Liver/Tibia (mg/mm)	93.2 ± 3.2	72.2 ± 4.5 *	75.5 ± 3 #	73.8 ± 3.9	<0.001	0.038	<0.001
Kidney/Tibia (mg/mm)	10.5 ± 0.4	10.2 ± 0.4	9.8 ± 0.4	8.7 ± 0.5	0.094	0.038	0.3

* TAC vs Sham

ND vs SD

Supplemental material

Primer sequences

	Gene	Primers	Hybridation temperature	Product size
Mouse	<i>Anp</i>	5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3'	60°C	88 bp
		5'-CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA-3'		
	<i>Gcn5</i>	5'-AATGAGCAGGTCAAGGGCTA-3'	60°C	73 bp
		5'-GGATGCTGTGTTTGATGTGG-3'		
	<i>Gpx1</i>	5'-GTTTCCCGTGCAATCAGTTC-3'	60°C	129 bp
		5'-TCACTTCGCACTTCTCAAACA-3'		
	<i>Hk2</i>	5'-TTTCACCTTCTCGTTCCCCT-3'	60°C	175 bp
		5'-GTCATTCACCACAGCCACAA-3'		
	<i>Mcad</i>	5'-CCGTTCCCTCTCATCAAAG-3'	60°C	129 bp
		5'-ACACCCATACGCCAACTCTT-3'		
	<i>Mcip1</i>	5'-CAGCGAAAGTGAGACCAGGG-3'	60°C	309 bp
		5'-ACGGGGGTGGCATCTTCTAC-3'		
	<i>Nrf2</i>	5'-CACTCAACATTTCCGGAAGAG-3'	60°C	143 bp
		5'-CTCATTTCATCTGTTGCTCTTGG-3'		
	<i>Pdk4</i>	5'-CCTTCACACCTTCACCACAT-3'	60°C	189 bp
		5'-AAAGAGGCGGTTCAGTAATCC-3'		
<i>Pgc-1α</i>	5'-CACCAAACCCACAGAGAACAG-3'	58°C	210 bp	
	5'-GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA-3'			
<i>Pgc-1β</i>	5'-TGGAAAGCCCCTGTGAGAGT-3'	60°C	202 bp	
	5'-TTGTATGGAGGTGTGGTGGG-3'			
<i>Prmt1</i>	5'-ATCGAGTTCACCCGATGC-3'	58°C	112 bp	
	5'-TCTTCACTGTTAGGTAGTCCTCCA-3'			
<i>Sirt1</i>	5'-AAAAGATAATAGTTCTGACTGGAGCTG 3'	60°C	171 bp	
	5'-TGAAGAATGGTCTTGGGTCTTT-3'			
<i>Tfam</i>	5'-GCTAAACACCCAGATGCAAA-3'	60°C	143 bp	
	5'-TACTTGCTCACAGCTTCTTTGT-3'			
Rat	<i>Cox1</i>	5'-AGCAGGAATAGTAGGGACAGC-3'	60°C	520 bp
		5'-TGAGAGAAGTAGTAGGACGGC-3'		
	<i>Pgc-1α</i>	5'-CACCAAACCCACAGAGAACAG-3'	58°C	210 bp
		5'-GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA-3'		
	<i>Pgc-1β</i>	5'-TGGAAAGCCCCTGTGAGAGT-3'	60°C	202 bp
		5'-TTGTATGGAGGTGTGGTGGG-3'		
	<i>Tfam</i>	5'-GAAAGCACAAATCAAGAGGAG-3'	60°C	175 bp
		5'-CTGCTTTTCATCATGAGACAG-3'		

Figure 1

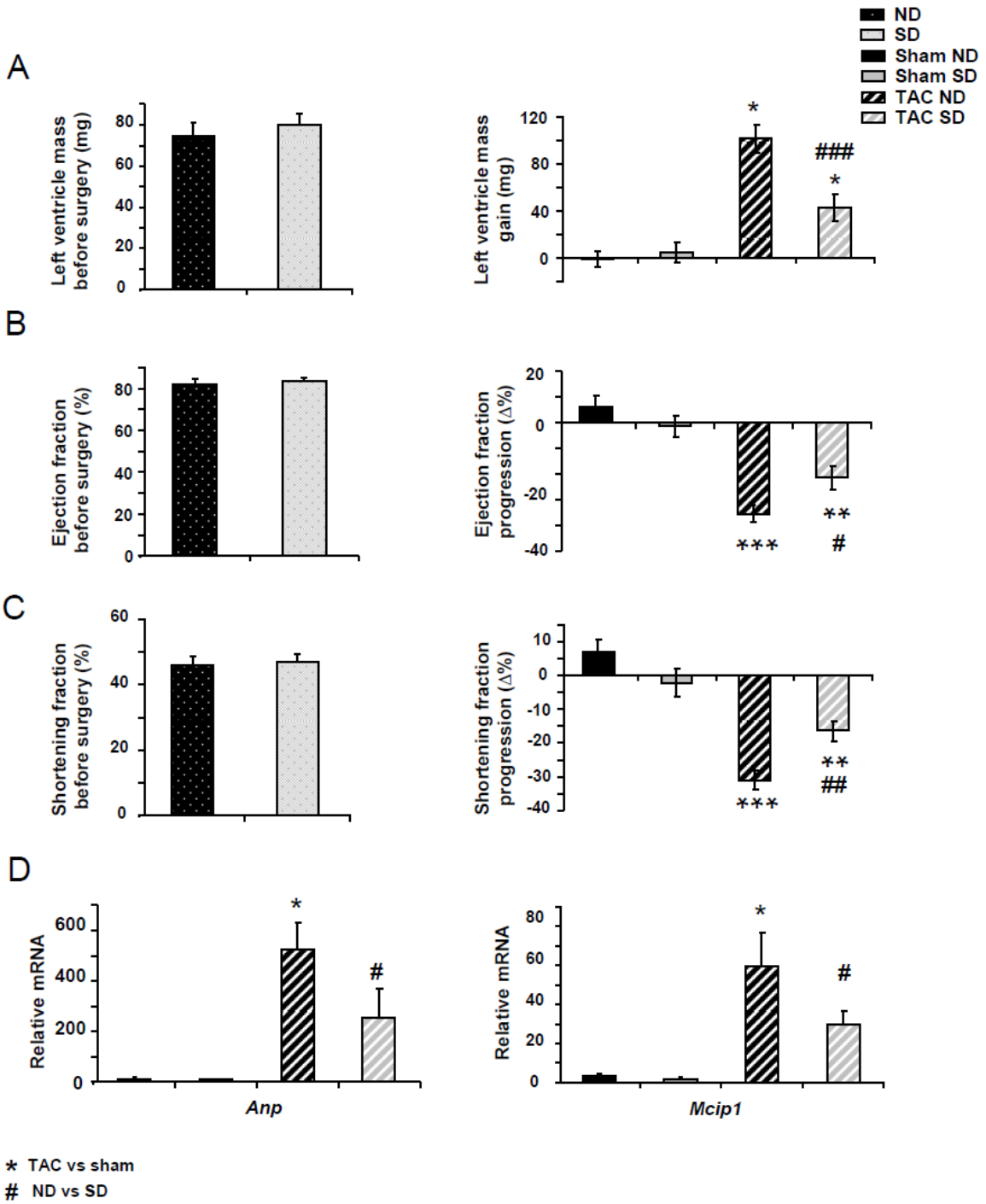


Figure 2

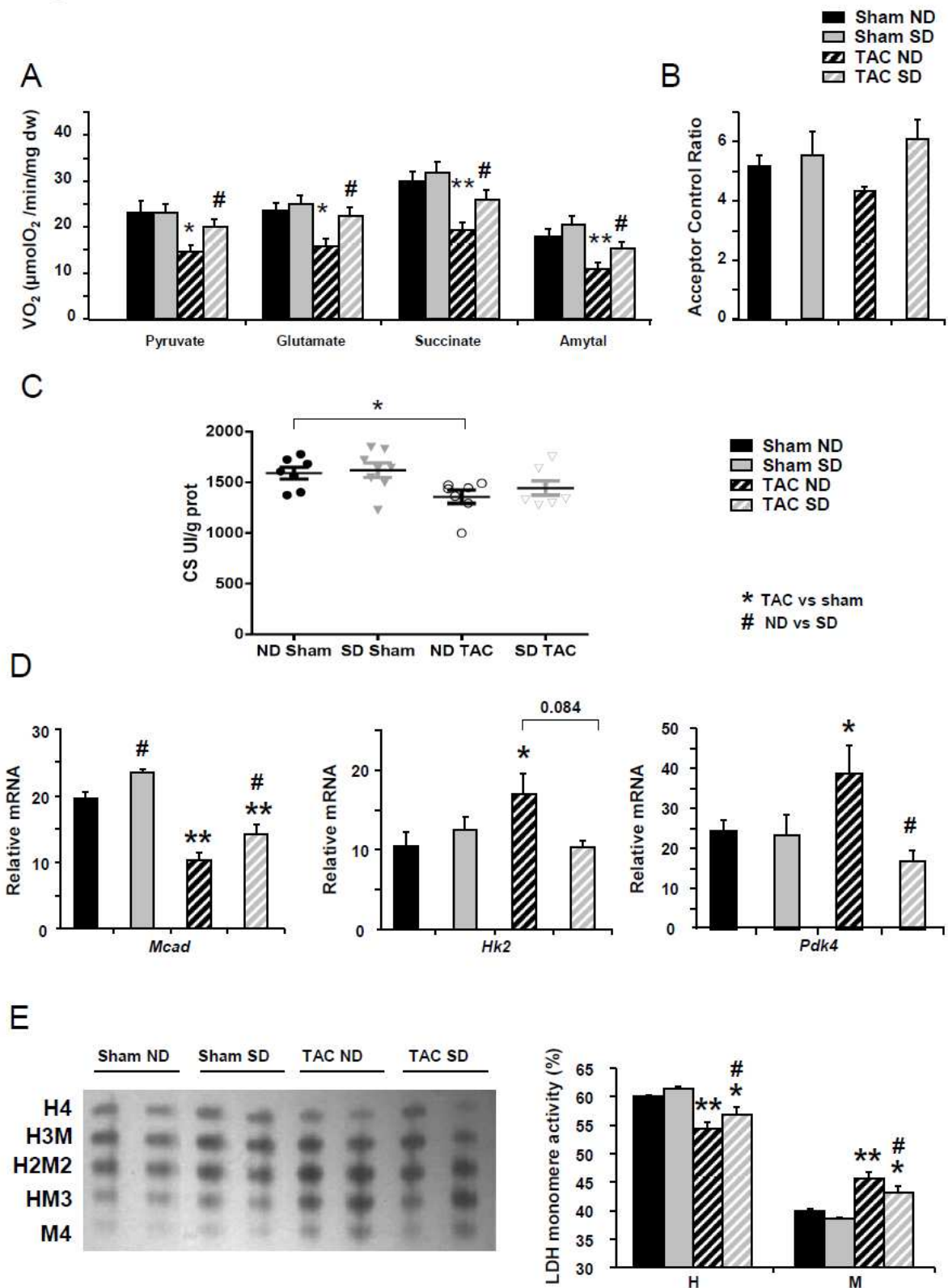


Figure 3

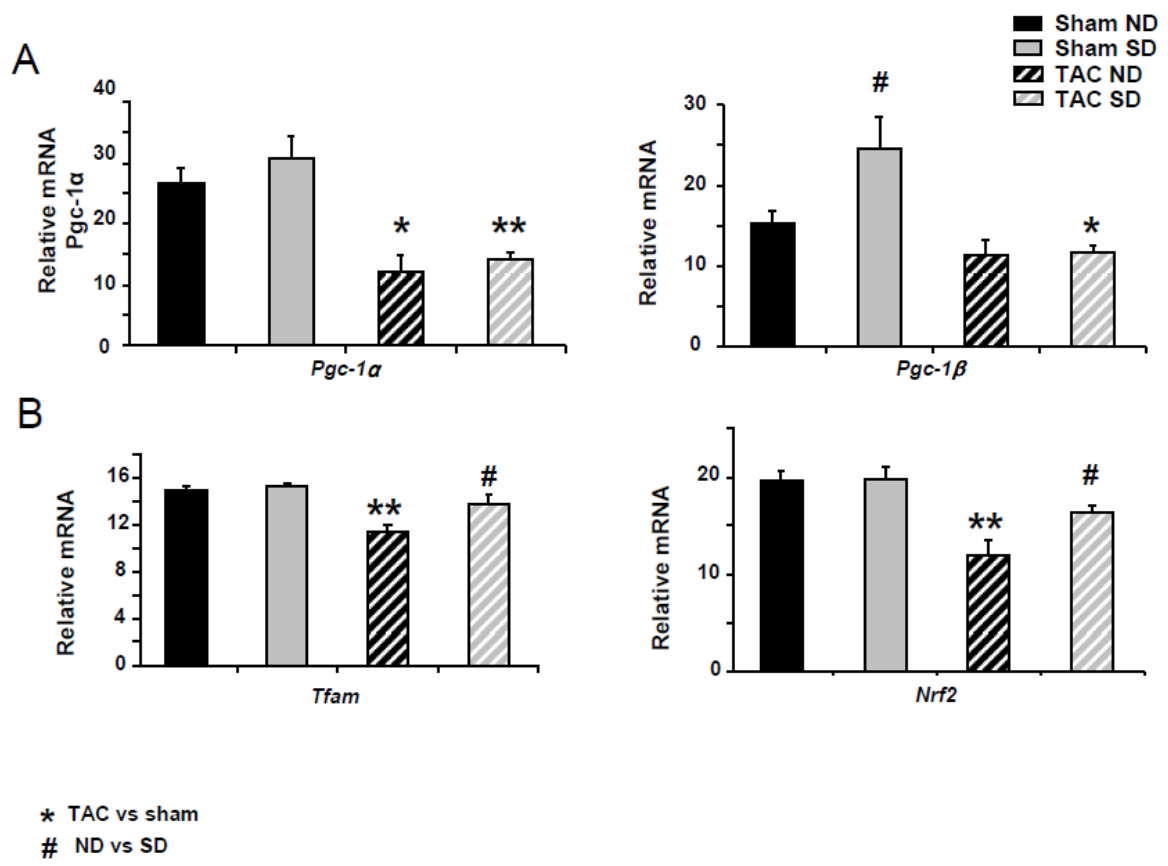


Figure 4

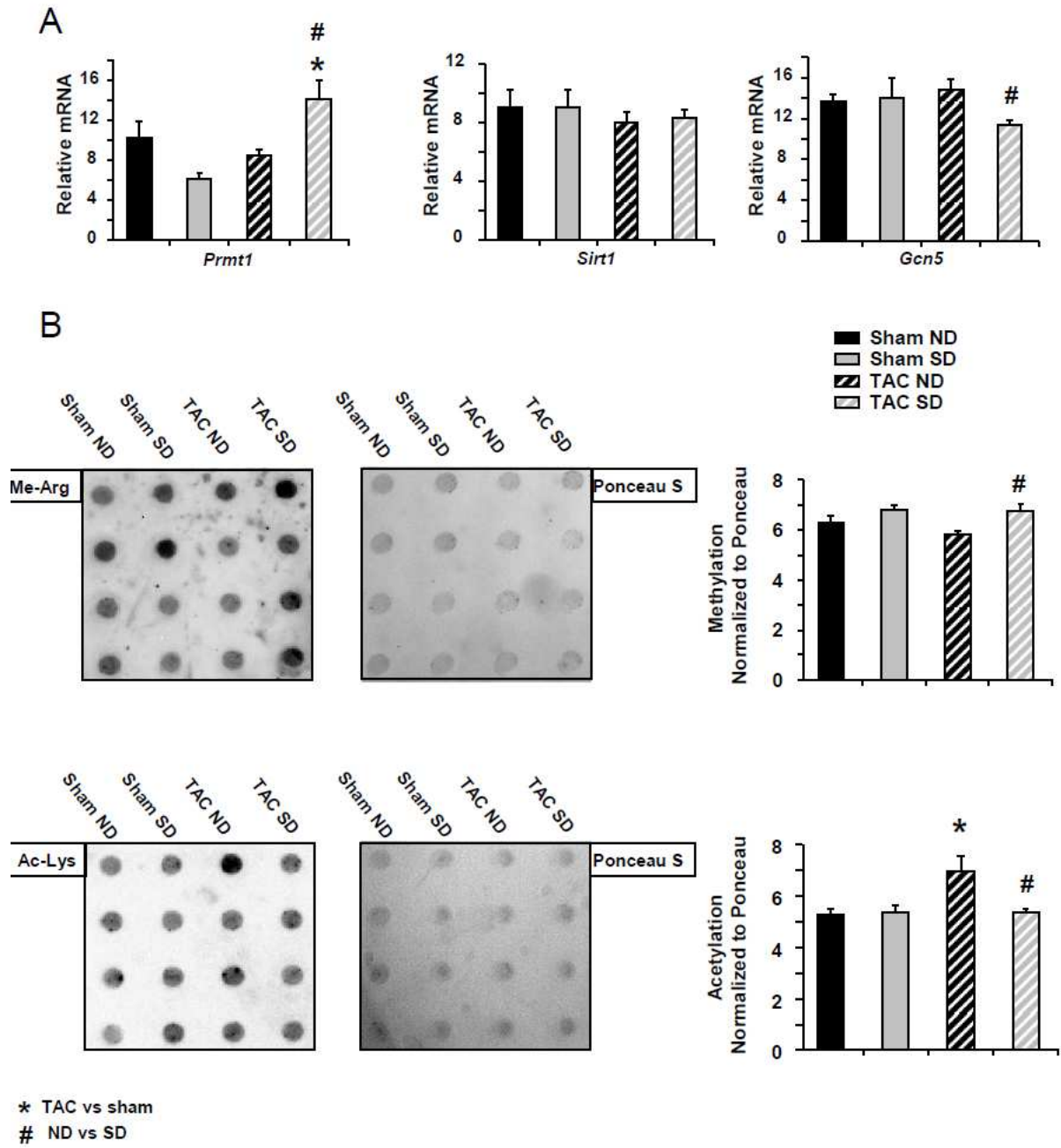


Figure 5

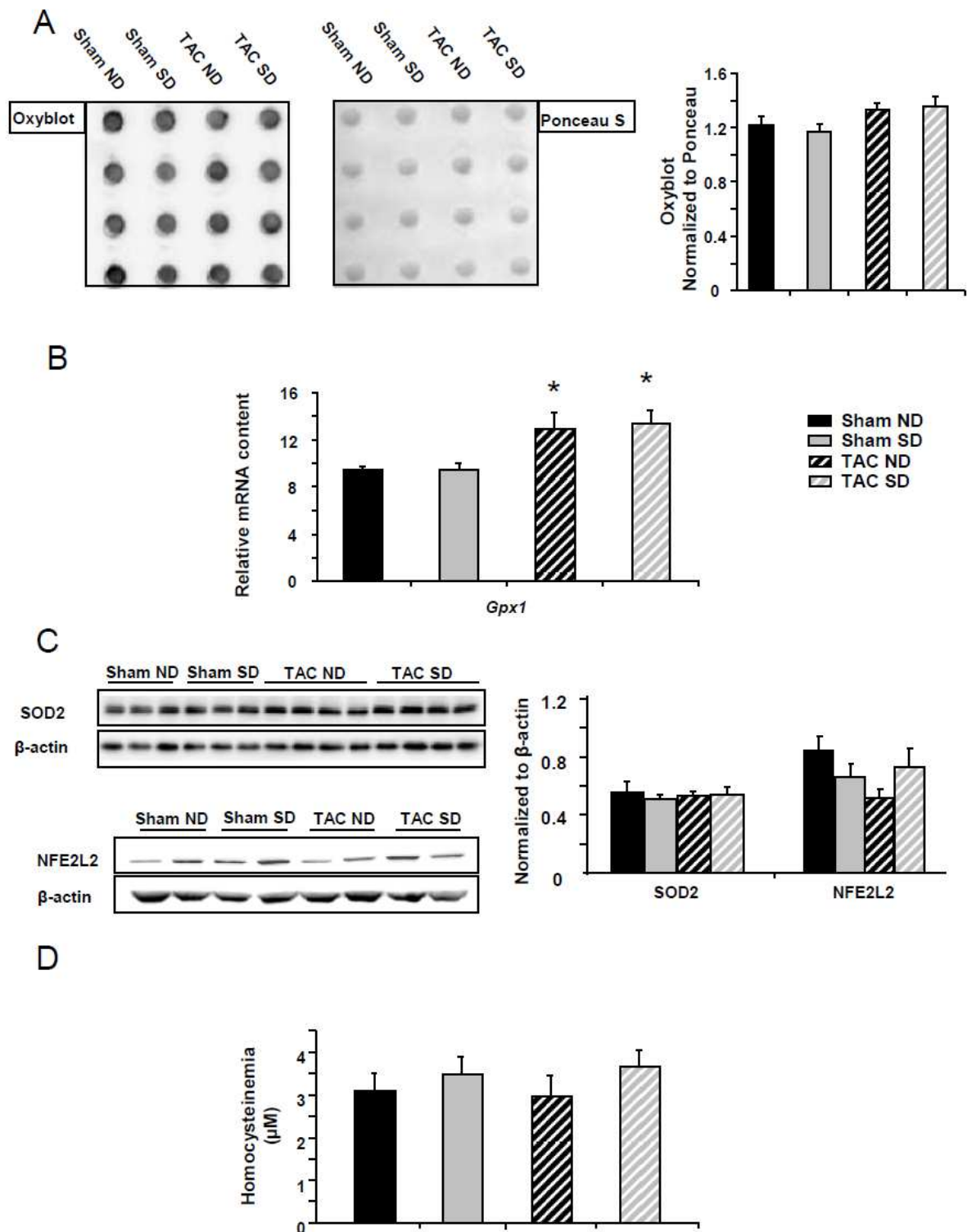
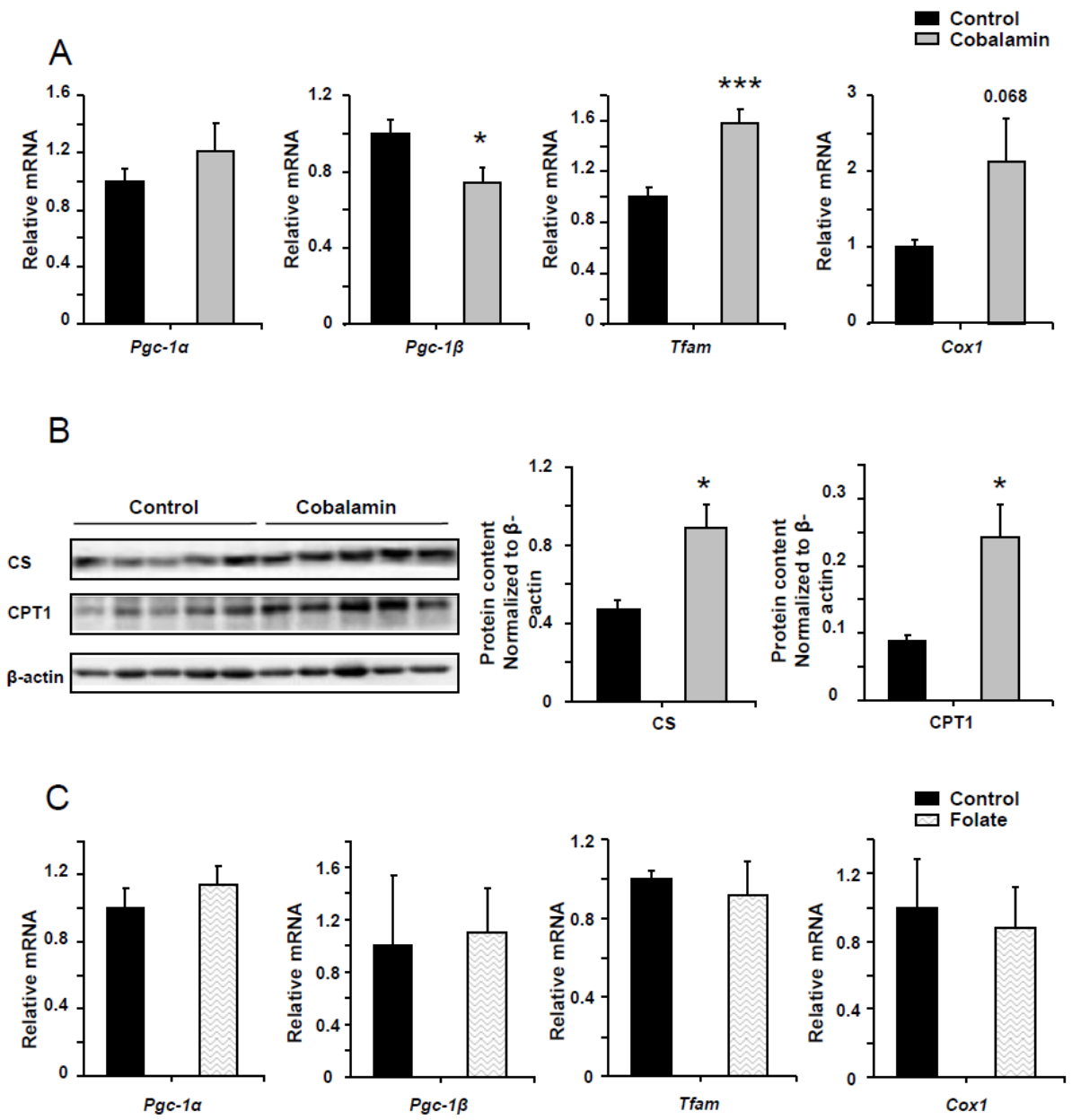


Figure 6



* TAC vs sham

ND vs SD

Titre : Rôle de SIRT1 et de la biogenèse mitochondriale et de la biogenèse mitochondriale dans la prolifération des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire

Mots clés : sirtuine, hypertension artérielle pulmonaire, prolifération, biogenèse mitochondriale, muscle lisse

Résumé : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie mortelle caractérisée par un important remodelage vasculaire, principalement dû à l'hyperprolifération et à la résistance à l'apoptose des cellules du muscle lisse de l'artère pulmonaire (CML-AP). Récemment il a été montré que les CML-AP présentent un remodelage du métabolisme énergétique, avec une régulation négative de l'oxydation phosphorylante associée à une activation de la voie glycolytique, qui semble contribuer à leur phénotype particulier. La désacétylase sirtuine1 (SIRT1) est un important modulateur du métabolisme énergétique, notamment via son activation de *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α* (PGC-1 α), régulateur clé de la biogenèse mitochondriale.

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que la la prolifération des CML-AP de rat et humaines est caractérisée par une réduction de l'activité de SIRT1, et est augmentée suite à l'inhibition pharmacologique ou la sous-expression spécifique de SIRT1. De plus, suite à l'hypoxie chronique, des souris déficientes en SIRT1 présentent un remodelage vasculaire plus important que celui observé chez les souris contrôles. Au contraire, l'activation pharmacologique de SIRT1 inhibe fortement la prolifération des CML-AP, et est associée à l'activation de la biogenèse mitochondriale. L'ensemble de ces résultats suggère que l'inactivation de SIRT1 joue un rôle causal dans l'hyperprolifération des CML-AP et cette enzyme pourrait être une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'HTAP.

Title : Role of SIRT1 and mitochondrial biogenesis in the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells

Keywords : sirtuin, pulmonary arterial hypertension, proliferation, mitochondrial biogenesis, smooth muscle

Abstract: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a lethal disease characterized by an intensive vascular remodelling, mainly due to hyper-proliferation and resistance to apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). Recently it has been found that PASMCs demonstrate a shift in energy metabolism from oxidative phosphorylation towards glycolysis thus contributing to their particular phenotype. The deacetylase sirtuin1 (SIRT1) is a modulator of energy metabolism, particularly via its activation of *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α* (PGC-1 α), the master regulator of mitochondrial biogenesis. Here we show for

the first time that rat and human PASMC proliferation is characterised by a diminution of SIRT1 activity, and is potentiated by SIRT1 pharmacological inhibition or specific downregulation. Moreover, after chronic hypoxia, SIRT1 KO mice display a more intense vascular remodeling compared to their control littermates. Conversely, pharmacological SIRT1 activation strongly inhibits PASMC proliferation, and is associated with the activation of mitochondrial biogenesis. In general, the data obtained show that SIRT1 inactivation plays a causative role in PASMC proliferation and this enzyme could be a promising therapeutic target for PAH treatment.