

Université de Montréal

**Modulation de l'expression de Sirt-1 induite par
l'endothéline-1 dans les cellules musculaires lisses
vasculaires**

par

Ahmed Mir

Programme des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales
option Générale

Août 2013

© Ahmed Mir, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

**Modulation de l'expression de Sirt-1 induite par
l'endothéline-1 dans les cellules musculaires lisses
vasculaires**

Présenté par :

Ahmed Mir

Évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Lise Coderre, président-rapporteur

Dr Ashok K. Srivastava, directeur de recherche

Dr Muhammad Zafarullah, membre du jury

Résumé

Au cours des maladies cardiovasculaires (MCV), il peut se produire divers problèmes de santé, telle que l'insuffisance cardiaque ou encore l'HTA. Ces phénomènes se caractérisent, entre autres, par une augmentation de synthèse d'endothéline-1 (ET-1), un neuropeptide synthétisé par les cellules endothéliales ayant un effet vasoconstricteur sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Ainsi, la surexpression de ce vaso-peptide, mène à terme, au maintien de l'HTA aggravée des sujets, précédée ou concomitante à l'athérosclérose ou à la resténose, cliniquement illustrées par une prolifération et une migration anormale des CMLV de la media vers l'intima des vaisseaux sanguins. Parallèlement, il a été observé que la protéine sirtuine-1 (Sirt-1), membre de la famille des protéines histones déacétylases (HDAC), présente des propriétés anti-athérosclérotiques par sa capacité d'atténuer la prolifération et la migration des CMLV. Des travaux récents ont aussi montré qu'au cours de l'HTA la protéine Sirt-1 est faiblement exprimée dans les CMLV. Son implication dans le développement des pathologies vasculaires semble apparente, mais des études demeurent nécessaires pour décrire son rôle exact dans la pathogenèse des MCV. Dans cette optique, l'objectif de cette étude a été d'observer la variation d'expression de Sirt-1 dans les CMLV, isolées de l'aorte ascendante de rat, en réponse à l'ET-1. On a remarqué qu'une heure de stimulation des CMLV avec l'ET-1 induit une diminution de l'expression de Sirt-1 via l'activation des récepteurs ET_A. Ces résultats suggèrent que la capacité d'ET-1 à atténuer l'expression de Sirt-1 serait un éventuel mécanisme d'action avec des effets favorisant les MCV.

Mots-clés : Maladies cardiovasculaires, Endothéline-1, Cellules vasculaires des muscles lisses, Hypertension artérielle, Histone déacétylase, Sirtuine-1.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are associated with several vascular dysfunctions such as heart failure and hypertension. These phenomena cause increased synthesis of endothelin-1 (ET-1), a neuropeptide, synthesized by endothelial cells which has vasoconstrictor action on vascular smooth muscle cells (VSMC). Overexpression of this vasoactive peptide leads eventually to hypertension (HTA). This usually happens after atherosclerosis or restenosis, leading to proliferation and migration of VSMC from media to intima. It was shown that during atherosclerosis, the protein sirtuin-1 (Sirt-1), a member of protein histone deacetylases (HDAC), has an anti-atherosclerotic effect due to its ability to diminish proliferation and migration of VSMC. It has also been observed that during hypertension, Sirt-1 was poorly expressed in VSMC. Its role in vascular pathophysiology remains sparsely studied, therefore it's essential to explore it. In the present study we investigated the expression of Sirt-1 in VSMC isolated from the ascending aorta of rats, in response to ET-1 stimulation. We observed that Sirt-1 expression decreases after 1 hour of stimulation by ET-1 via ET_A receptors. In summary, these results suggest that the ability of ET-1 to attenuate Sirt-1 expression in VSMC, may be a potential mechanism for promoting CVD.

Keywords: Cardiovascular diseases, Endothelin-1, Vascular smooth muscle cell, Hypertension, histone deacetylase, Sirtuin-1.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des abréviations, sigles et acronymes	viii
Remerciements	xi
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1.1 Maladies cardiovasculaires et implications des vasopeptides	2
1.2 L'endothéline-1	5
1.2.1 Nature et propriétés de l'endothéline-1	5
1.2.2 Conformation de l'endothéline.....	6
1.2.3 Régulation de l'endothéline.....	7
1.2.4 Site de génération de l'endothéline	8
1.2.5 Synthèse de l'endothéline-1	10
1.2.6 Concentration plasmatique et dégagement d'ET-1	Erreur ! Signet non défini.
1.2.7 Récepteurs à l'endothéline-1	13
1.3 Activité biologique de l'endothéline-1	14
1.3.1 L'endothéline-1 dans la vasculature.....	14
1.3.2 ET-1 dans le cœur.....	16
1.3.3 Action de l'endothéline dans le rein	17
1.3.4 Action de l'endothéline dans le système endocrinien	18
1.4 Rôle d'ET-1 dans les maladies cardio-vasculaires	19
1.4.1 ET-1 dans les maladies cardiovasculaires	19
1.4.2 ET-1 dans l'hypertension secondaire.....	21
1.4.3 ET-1 dans l'hypertension essentielle.....	23
1.4.4 ET-1 dans l'athérosclérose.....	24
1.4.5 ET-1 dans l'insuffisance cardiaque.....	27

1.5 ET-1 induit les voies de signalisations dans les CMLV	28
1.6 Effets épigénétiques et implication dans les maladies cardiovasculaires.....	32
1.6.1 La méthylation de l'ADN :	33
1.6.2 Les protéines HDAC/HAT et l'ADN :	34
1.6.3 Les protéines histones déacétyles transférases :	36
1.6.4 Les protéines Sirtuines :	37
1.6.4.1 Structure et régulation de la protéine Sirt-1:	39
1.6.4.2 La protéine Sirt-1 et son activité:	43
1.6.4.3 Régulation et implication de la protéine Sirt-1 dans divers voies de signalisation:.....	46
1.6.5 Implication de Sirt-1 dans les MCV	47
1.7 Objectifs de la présente étude.....	53
CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DES RESULTATS	55
Matériels et Méthodes	56
Résultats	60
Légende des figures.....	66
CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE	67
Discussion	68
Conclusions et perspectives.....	75
CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE.....	78

Liste des figures

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

Figure 1.1 Structure moléculaire des trois isoformes d'endothéline.....	9
Figure 1.2 Régulation de la synthèse d'ET-1 : les voies de production, les récepteurs ainsi que l'effet sur les cellules des muscles.	11
Figure 1.3 Inhibiteurs et activateurs de la synthèse d'ET-1.....	12
Figure 1.4 Schéma de l'activation des voies de signalisations ERK1/2 et PI3-K/PKB par ET-1 dans les CMLV.	30
Figure 1.5 Contrôle de l'activité catalytique de Sirt1.	42
Figure 1.6 Rôle des histones déacétylases dans la répression de la transcription et des histones acétyl transférase dans l'activation de la transcription.....	45
Figure 1.7 Inflammation et stress oxydatif lors d'une plaque d'athérome.....	50

CHAPITRE 2 - RESULTATS

Figure 1. Expression de Sirt-1 en fonction du temps dans les CMLV.....	59
Figure 2. Effet des antagonistes du récepteur ET-1, BQ123/788, sur l'expression de Sirt-1 induite par ET-1 dans les CMLV(A10).....	62

CHAPITRE 3 - CONCLUSION

Figure 3.1 Schéma modèle hypothétique résumant l'action d'ET-1 sur Sirt-1 via les voies de signalisation dans les cellules musculaires lisses vasculaires..... 73

Liste des abréviations, sigles et acronymes

Acétyl-CoA	Acétyl coenzyme A
ADH	Hormone antidiurétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
Ang II	Angiotensine II
ANP	Atrial natriuretic peptide
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1R	Angiotensin II type 1 receptor
Ca ²⁺	Calcium
C2C12	Lignée cellulaire de myoblastes dans la souris
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique
CK2	Caséine kinase 2
CMLV	Cellule musculaire lisse vasculaire
DAG	Diacyle glycérol
DBC1	Deleted in bladder cancer 1
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DNMT	Enzyme méthyle transférase d'ADN
DOCA	Deoxycorticostérone acetate
EAS	Essentiel pour l'activité de sirt-1
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EGF	Epidermal growth factor

EGF-R	Epidermal growth factor receptor
eNOS	Endothelial oxyde nitrique synthase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ET	Endothéline
ET _A	Endothéline récepteur type A
ET _B	Endothéline récepteur type B
FOXO	Forkhead box
GCs	Guanylate cyclase soluble
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GTP	Guanosine triphosphate
H ⁺	Proton
HAT	Histone acétyle transférase
HDA1	Histone déacétylase 1
HDAC	Histone déacétylase
HTA	Hypertension artérielle
IGF-1	Insulin like growth factor-1
IGF-R	Insulin growth factor receptor
IP3	Inositol triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K ⁺	Potassium
KO	Knock out
LKB1	Liver kinase B1
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCV	Maladies cardiovasculaires
MLCK	Myosin light chain kinase
Na ⁺	Sodium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NES	Séquences d'export nucléaire
NLS	Séquence de localisation nucléaire

NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NO	Oxyde nitrique
Nox1	NADPH oxydase 1
P38	P38 Mitogen-activated protein kinase
P53	Tumor protein 53
PLC	Phospholipase C
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α
PGI ₂	Prostacycline
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PKB	Protéine kinase B
PIP2	Phosphatidylinositol-4'-5'-biphosphate
PKG	Protéine kinase G
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
RPD3	Reduced potassium dependency 3
RE	Réticulum endoplasmique
R-PTK	Receptor protein tyrosine kinase
SD	Sprague Dawley
SENP1	Sentrin-specific protease 1
Ser	Sérine
SHR	Spontaneously hypertensive rat
Sir2	Silent information regulator 2
Sirt	Sirtuine
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TGF- β	Transforming growth factor beta
Thr	Thréonine
TSA	Trichostatine A
WKY	Wistar Kyoto

Remerciements

Avant tout, je souhaite sincèrement remercier le Dr Ashok K. Srivastava pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour ces trois années de maîtrise qui ont été pour moi très enrichissantes d'un point de vue scientifique et également humain, le remercier aussi pour les encouragements, ses conseils, son aide morale pour les moments les plus difficiles ainsi que la contribution et le temps qu'il m'a accordé afin de faire de moi quelqu'un de meilleur et d'accomplir à terme mon travail de mémoire.

Je souhaite aussi remercier mes camarades de laboratoire, Georgia Kapakos, Estelle Rolande Simo, Victoria Youreva et George Vardatsikos pour m'avoir donné de leur temps, pour leur aide et support dans mon travail de recherche. Je souhaiterais enfin remercier l'ensemble de mes camarades du CRCHUM-MDRC puisqu'ils ont été d'une très grande contribution scientifique à mon égard, et m'ont permis de m'épanouir davantage dans ma manière de voir les choses.

Et pour finir je souhaiterais remercier ma famille et mes amis qui m'ont donné des conseils qui ne concernent certes pas uniquement mon travail mais qui m'ont encouragé et permis d'associer davantage mon style de vie avec celui de la recherche.

CHAPITRE 1:

INTRODUCTION

1.1 Maladies cardiovasculaires et implications des vasopectides

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité mondiale, et elles sont à l'origine de dix-sept millions de décès par année, soit à peu près 30% de la totalité des décès à travers le monde [1]. Ce chiffre devrait être plus important dans les années à venir, en particulier à cause des habitudes de la population qui tend à être de plus en plus sédentaire, avec une alimentation beaucoup trop riche (en sucres, gras et sel), inappropriée à leurs besoins, et qui sont des risques de développement de l'obésité, du diabète de type II et des MCV. Ces MCV, notamment l'hypertension artérielle (HTA), l'athérosclérose ou l'insuffisance cardiaque, sont de nos jours, parmi les pathologies les plus présentes dans les pays développés.

L'un des principaux facteurs de risque physiologique des MCV est en effet l'HTA qui est définie par la persistance d'une pression artérielle anormalement élevée [2]. En effet, la pression artérielle est la mesure de la force exercée par le sang sur les parois des artères. Il existe toutefois deux types d'HTA: essentielle et secondaire. L'HTA essentielle, également dite primaire, est de cause inconnue. Elle est associée à une diminution de la compliance vasculaire ainsi qu'à un élargissement des parois artérielles. Elle est généralement liée à une athérosclérose ou resténose. L'HTA secondaire est causée généralement par une dérégulation de sécrétion de la glande surrénale et des reins, phénomènes associés à des troubles connus tel que le syndrome

de Cushing (hyperplasie bilatérale qui entraîne une synthèse plus grande de cortisol) [2]. L'HTA secondaire, qui survient après certaines maladies détectables, peut être réversible si les problèmes sont traités, contrairement à l'HTA primaire qui n'a pas de cause réellement définie. L'HTA est l'un des plus importants facteurs de risque de MCV, elle entraîne des anomalies structurales de la paroi des artères qui irriguent le cerveau, le cœur, divers organes et tout le système cardiovasculaire, en augmentant le risque d'accident vasculaire cérébral, d'insuffisance rénale chronique et d'infarctus.

D'un point de vue moléculaire, les MCV se caractérisent par une concentration élevée de facteurs tels que les peptides vasoactifs à effets vasoconstricteurs et mitogènes, impliqués dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire avec également un rôle important au niveau cellulaire. Ils ont en effet la capacité d'activer diverses voies de signalisation intracellulaires (fig.1.4) qui peuvent mener à une perturbation globale du système cardiovasculaire. Parmi ces facteurs, trois sont fortement impliqués dans les mécanismes de contrôle physiologique cardiovasculaire : les peptides vasoconstricteurs que sont l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (Ang II), et l'Insuline like growth factor (IGF-1); ils exercent un rôle dans la régulation du tonus vasculaire ainsi que de la pression sanguine par une action directe sur la paroi vasculaire.

D'un point de vue structural, la paroi vasculaire est essentiellement composée de trois couches qui contribuent à l'équilibre et au maintien de la pression sanguine [3]:

- L'intima, couche interne de la paroi artérielle, contenant les cellules endothéliales reposant sur du tissu conjonctif séparé de la media par une limitante élastique;
- La media est quant à elle la couche moyenne de la paroi artérielle comportant de l'élastine et du collagène, mais aussi les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) qui permettent la vasoconstriction;
- L'adventice, ou couche externe de la paroi artérielle, est essentiellement composée de tissus conjonctifs et de fibres élastiques mais aussi des vaisseaux capillaires qui permettent la vascularisation des parois artérielles.

Au cours de l'obésité, entre autres désordres métaboliques, la paroi vasculaire est le siège de plusieurs évènements athérosclérotiques qui conduisent aux dommages vasculaires. Parmi ces évènements, on observe une accumulation de plaques adipeuses, une sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires et pro-adhésifs, une prolifération et une migration plus grande des cellules inflammatoires et vasculaires [4]. Ceci conduit à la formation d'athéromes à l'origine du rétrécissement de la lumière du vaisseau favorable à l'HTA. Les plaques adipeuses imposent également avec le temps un effort considérable au système cardiovasculaire, qui s'adapte aux changements de pression, pour éventuellement s'affaiblir et ne plus être en mesure de maintenir une pression artérielle normale [5;6].

De plus lors d'un athérome ou d'une resténose, il se produit une synthèse anormalement élevée de peptides vasoconstricteurs qui aggravent les complications vasculaires. Ces peptides, et surtout l'ET-1, dont l'expression est reliée à une activation de la croissance, de la prolifération ainsi que de la migration des CMLV de la media vers l'intima des vaisseaux, ce qui conduit à une modification de la structure interne de la paroi des artères au sein de laquelle l'intima est progressivement remplacée par la néointima plus rigide et moins apte à s'adapter aux forces exercées par les flux sanguins [7;8].

1.2 L'endothéline-1

1.2.1 Nature et propriétés de l'endothéline-1

L'ET-1, découverte par Yanagisawa et son équipe en 1988, est l'un des plus puissants vasoconstricteurs découverts [9]. Elle possède aussi des propriétés chimioattractantes et mitogènes [10]. L'ET-1 module l'homéostasie cardiovasculaire en agissant sur la réabsorption du sel et de l'eau au niveau du rein, et aussi en induisant une stimulation du système rénine-angiotensine ainsi que du système nerveux sympathique. Dans la physiologie cardiovasculaire, l'ET-1 induit des effets inotropes et chronotropes ainsi qu'une stimulation de la sécrétion d'ANP (Atrial Natriuretic Peptide) au niveau du cœur [11;12]. L'ET joue également un rôle important dans l'hypertrophie, la migration et la prolifération des CMLV ce qui contribue à remodeler la paroi des vaisseaux. Ainsi, diverses études associent l'ET à

différentes pathologies, et en particulier aux phénomènes d'HTA. L'une de ses conséquences physiologiques est l'augmentation de la pression artérielle notamment grâce à une stimulation de la contraction des vaisseaux [13] via l'activation de plusieurs voies de transduction du signal sur différents types cellulaires, tel que les cellules du système vasculaire, du rein (mésangiales) ainsi que les cardiomyocytes [14-16].

1.2.2 Conformation de l'endothéline

Les effets biologiques d'ET-1 passent principalement via les différents récepteurs d'endothéline de type A (ET_A) et récepteurs d'endothéline de type B (ET_B) [17;18], ce qui activerait différentes voies de signalisation associées à l'activation de l'hypertrophie, de la migration et de la prolifération cellulaires dans divers types de cellules, et particulièrement dans le tissu cardiaque, les cardiomyocytes et les CMLV (fig 1.3) [14]. Ainsi, une surproduction du vasoconstricteur ET-1 est responsable de divers dysfonctionnements dans le système cardiovasculaire, associé à une augmentation du tonus musculaire, de la pression artérielle avec une variation de l'épaisseur des parois des vaisseaux sanguins [19].

Il existe trois isoformes de la protéine d'ET (fig. 1.1), ET-1, ET-2 et ET-3, qui ont une structure et une action physiologique différente [20]. Elles sont composées de 21 acides aminés codés par différents gènes localisés sur trois chromosomes distincts. Toutes les trois ont en commun, d'un point de vue structural deux ponts disulfures

(Cys¹-Cys¹⁵ et Cys³-Cys¹¹) en partie N-terminale, de trois groupes polaires latéraux chargés sur les résidus d'acides aminés 8-10 et une région hydrophobe en C-terminale (résidus 16-21) contenant la chaîne latérale aromatique indolique sur Trp²¹ (fig.1.1). La partie C-terminale est la région qui permet la liaison au récepteur alors que la partie N-terminale est celle qui détermine l'affinité du peptide pour son récepteur [21]. Parmi les trois protéines d'ET, ET-1 est celle qui est la plus synthétisée et avec une action biologique démontrée [22]. ET-2 contient deux substitutions d'acides aminés (Trp⁶-Leu⁷) ainsi que 90% d'homologie de séquence avec l'ET-1. ET-3 contient six acides aminés substitués (Thr², Phe⁴-Thr⁵-Tyr⁶-Lys⁷ et Tyr¹⁴) et partage 70% d'homologie de séquence avec ET-1. La structure particulière en boucle ainsi que le domaine hydrophobe en C-terminale d'ET est essentiellement impliqué dans l'activité biologique de la molécule. Parmi les trois isopeptides d'ETs, ET-1 est celui qui est le plus impliqué dans les vaisseaux sanguins [23].

1.2.3 Régulation de l'endothéline

La régulation de la production d'ET-1 se fait principalement au niveau transcriptionnel où différents facteurs peuvent influencer la synthèse d'ET-1 (fig.1.3), en contribuant à une augmentation ou à une diminution de synthèse d'acide ribonucléique messenger (ARNm) et de la préproendothéline (préproET) [24;25]. La production d'ET-1 est alors activée par différents stimuli, tels que les hormones, les facteurs de croissance, l'hypoxie, les forces de cisaillements, les lipoprotéines et les

radicaux libres. Alors qu'une augmentation intracellulaire du niveau de cyclic guanosine monophosphate (cGMP), de l'oxyde nitrique (NO), de l'ANP, de la prostaglandine et de l'héparine sont connus pour inhiber la production d'ET-1 [26;27].

La stabilité de l'ARNm d'ET-1 est un élément clé lors de la régulation de sa synthèse. Ainsi, dans la région 5' de la séquence d'ADN, il existe des sites de liaison pour les protéines d'activation et les facteurs nucléaires, qui interviennent positivement dans la synthèse de l'ARNm d'ET-1. La région 3' de l'ARNm contient des séquences riches en adénine et uracile qui interviennent dans la déstabilisation sélective du précurseur d'ET-1, l'ARNm de la préproET-1, ce qui explique la vie biologique relativement courte avec un temps de demi vie de 15 min [28].

1.2.4 Site de génération de l'endothéline

Les cellules endothéliales sont les principaux sites de production d'ET-1 et ces dernières produisent une grande quantité d'ARNm préproET-1. D'autres cellules sont également capables de produire l'ET-1, de manière plus modeste, telle que les reins, le cœur, le système nerveux central (SNC) et la neurohypophyse. Les cellules aortiques musculaires lisses vasculaires humaines expriment également l'ARNm de l'ET-1, bien que sa production soit environ 100 fois inférieure à celle des cellules endothéliales. Des quantités limitées d'ET-2 sont produites dans les cellules endothéliales, le cœur et les reins [29]. L'ET-3 semble être exprimée dans le système

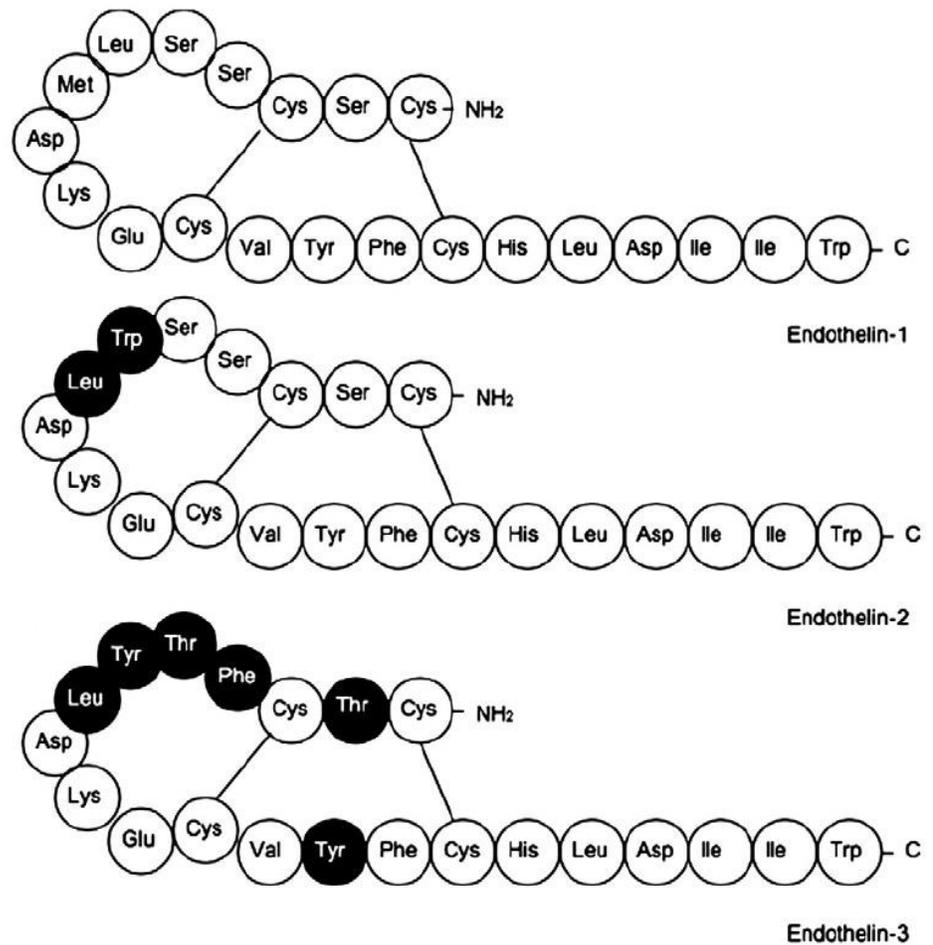


Figure 1.1 Structure moléculaire des trois isoformes d'endothéline.

L'ET est composée de 21 acides aminés formant une protéine repliée sur elle-même avec deux ponts disulfures entre les Cys1-Cys15 et Cys3-Cys11. Les acides aminés en noir représentent les différences entre l'ET-2, l'ET-3 et l'ET-1. La partie C terminal hydrophobe contenant le tryptophane, représente la région bioactive alors que la partie N terminal détermine l'affinité de l'ET à son récepteur.

(Khimji AK : Cellular Signalling 22: 1615-1625, 2010).

endocrinien, le système nerveux gastro-intestinal et central, mais pas dans les cellules endothéliales [30].

1.2.5 Synthèse de l'endothéline-1

L'ET-1 est produite dans différents tissus, mais principalement dans les cellules endothéliales, sous forme d'une préproET-1 de 212 acides aminés [20]. La transformation de celle-ci est faite par le clivage de 38 acides aminés par une endopeptidase, ce qui permet de passer de la préproET-1 à la proET-1 (BigET-1). La formation d'ET-1 immature en protéine active ET-1 requière l'action d'une des multiples enzyme de conversion d'ET (ECE) qui sont présentes aussi bien dans les cellules endothéliales que dans les CMLV [31]. L'ECE-1 active existe en quatre variantes, ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c et ECE-1d qui ont des rôles et une distribution différente selon les tissus. L'ECE-1a et l'ECE-1b sont celles qui ont un rôle à jouer dans la synthèse d'ET-1 au niveau des cellules endothéliales. L'ECE-1a est exprimée dans les cellules endothéliales via l'appareil de Golgi, et apparaît comme la principale enzyme responsable du processus de conversion de la proET-1 en ET-1. L'ECE-1b est, quant à elle, exprimée dans des cellules avoisinantes tel que les CMLV, et est ensuite transportée vers la membrane plasmique où elle est en mesure d'agir [32;33].

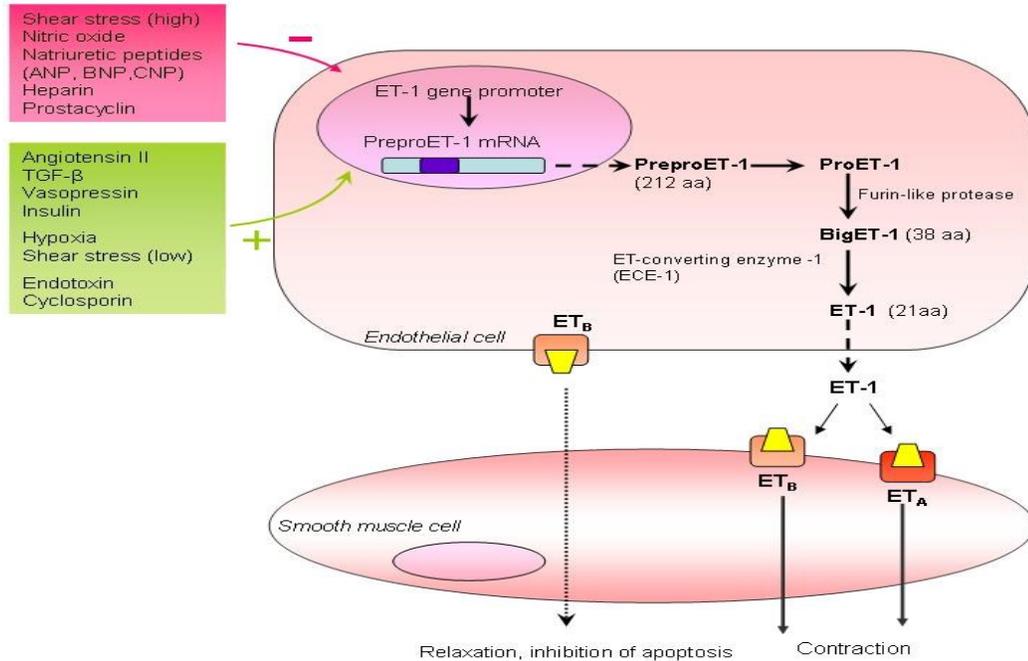


Figure 1.2 Régulation de la synthèse d'ET-1 : les voies de production, les récepteurs ainsi que l'effet sur les cellules des muscles.

La synthèse d'ET-1 est régulée par divers facteurs, les stimulateurs sont surlignés en vert et les inhibiteurs en rouge. La synthèse d'ET-1 débute avec la transcription de préproET-1 qui est clivée par une endopéptidase pour former le précurseur proET-1 (Big ET-1). Big ET-1 est ensuite transformé en peptide mature par la métalloprotéinase endothéline-converting enzyme-1 (ECE-1). Deux récepteurs d'ET ont été identifiés, ET_A que l'on retrouve sur les CMLV, son activation permet une vasoconstriction et prolifération cellulaire, alors que les récepteurs ET_B se situent sur les cellules endothéliales et les CMLV et conduisent principalement à une vasodilatation. ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; CNP, C-type natriuretic peptide; TGF- β , transforming growth factor β . (Remuzzi et al: *Nature Reviews Drug Discovery* 1: 986-1001, 2002).

TABLE 1. Factors That Influence ET-1 Secretion*

Stimulating factors	Inhibiting factors
Vasoconstrictor	Vasodilators
Angiotensin II	Bradykinin
Vasopressin	Nitric oxide
Norepinephrine	Prostaglandins E ₂ and I ₂
Isoprostane 8-epi-prostaglandin F _{2α}	Adrenomedullin
	Atrial and brain natriuretic peptides
Thrombogenic agents	Anticoagulants
Thrombin	Heparin
	Hirudin
Cytokines and growth factors	NA
Interleukin 1 and 3	
Tumor necrosis factor α	
GCSF	
Interferon-gamma	
Transforming growth factor β	
Endotoxin	
Physicochemical factors	Physicochemical factors
Mechanical strain	High levels of shear stress (>6 dyne/cm ²)
Pressure without cell distortion	NA
Hypoxia	NA
Low levels of shear stress (<2 dyne/cm ²)	NA
Hemodynamic pressure overload	NA
Aging	
Other factors	Other factors
Insulin	Nitrates
Serotonin	Progesterone
Corticosteroids	Estrogens
Erythropoietin	PPAR-α
Oxidized low-density lipoproteins	Calcium ionophores
Cyclosporine	Montelukast
Platelet aggregation	NA
Macrophage infiltration	NA
Formation of atherosclerotic lesions	NA

*ET-1 = endothelin 1; GCSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; NA = not applicable; PPAR-α = peroxisome proliferator-activated receptor-α.

Perez del Villar et al *Mayo Clin Proc.* 80: 84-96, 2005.

Figure 1.3 Inhibiteurs et activateurs de la synthèse d'ET-1.

1.2.6 Concentration plasmatique et dégagement d'ET-1

La concentration plasmatique circulante d'ET-1 chez des personnes normales, se situe entre 1 à 10 pmol/l [34], bien que les concentrations permettant les contractions vasculaires soient plus élevées, puisque la concentration d'ET-1 circulante est très inférieure à celle secrétée localement de façon paracrine et autocrine par les cellules endothéliales aux pôles basales vers l'espace intercellulaire, en contact direct avec les membranes cytoplasmiques des CMLV voisines [35]. Donc, la concentration plasmatique d'ET-1 reflète mal la quantité réellement produite ainsi que la concentration d'ET-1 qui pourrait se situer entre les cellules endothéliales et les CMLV puisqu'ET-1 a un temps de demi-vie très court et est rapidement éliminée de la circulation par les NEP (neutral endopeptidase) et les cathepsines G synthétisés par les cellules endothéliales [36;37], bien que le foie et les reins soient, en majeure partie, responsable de l'élimination d'ET-1 [38].

1.2.7 Récepteurs à l'endothéline-1

La protéine ET-1 exerce son rôle en se liant et en activant trois types de récepteurs, ET_A, ET_B et ET_C. Ces récepteurs font partie de la famille des protéines récepteurs couplées aux protéines G (GPCRs) [39]. Ces récepteurs sont caractérisés par leurs structures particulières à 7 domaines hydrophobes transmembranaires, une région N-terminale extracellulaire et une région C-terminale intracellulaire. L'ET-1 ainsi que l'ET-2 ont une affinité plus grande que l'ET-3 pour ces récepteurs, [17]. Les

récepteurs ET_A et ET_B sont présents dans de nombreux tissus (cœur, rein, cerveau, vaisseaux), en particuliers dans les CMLV et les cellules endothéliales [18;40], alors que l' ET_C est principalement situé au niveau du cerveau dans l'hypophyse avec une influence sur la synthèse de prostaglandine [41].

1.3 Activité biologique de l'endothéline-1

1.3.1 L'endothéline-1 dans la vasculature.

Jusqu'à présent, différents inhibiteurs des récepteurs d'ET-1 ont été découverts, tel que l'antagoniste d' ET_A le pentapeptide BQ-123 et l'antagoniste d' ET_B , BQ788 [42]. Lors de la stimulation d'un des deux récepteurs des vaisseaux sanguins, ET_A/ET_B , il se produit une réponse physiologique précise en fonction de la localisation de ces récepteurs sur les cellules et du type cellulaire. Par exemple, lorsque l'ET-1 se lie aux récepteurs ET_A et ET_B situés sur les CMLV par une stimulation paracrine, cela mène à une vasoconstriction des vaisseaux, mais également à une croissance, une prolifération et une migration cellulaire plus grandes [43], alors que si l'ET-1 se fixe au récepteur ET_B des cellules endothéliales par une stimulation autocrine, ceci provoque une vasodilatation transitoire des vaisseaux qui précède habituellement la vasoconstriction (fig. 1.2). Cette vasodilatation est liée entre autre à la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB) induite par ET-1, ce qui mène à l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) dans les cellules endothéliales et ce qui conduit entre autre à une inhibition de l'apoptose, de

la prolifération et de la migration cellulaire dû à une accélération de la sécrétion et du largage de l'oxyde nitrique (NO) et de la prostacycline (PGI₂), deux puissants vasodilatateurs agissant sur les CMLV produits par les cellules endothéliales [44;45]. Le NO et le PGI₂ ont également la possibilité de limiter l'action de l'ET-1 en diminuant sa synthèse et en favorisant son élimination dans un premier temps par l'inhibition de l'ECE-1 ou également avec la sécrétion par le cœur de l'ANP [46]. L'effet du NO dans la cellule se produit via l'activation, au niveau des CMLV, de la guanylate cyclase soluble (GCs), celle-ci a pour effet d'augmenter la formation de cGMP à partir de GTP (guanosine triphosphate) [47]. Le cGMP va activer la protéine kinase G (PKG) qui cause une forte diminution du calcium (Ca²⁺) intracellulaire en favorisant la recapture de celui-ci par le réticulum endoplasmique (RE) et en inhibant les échangeurs Ca²⁺/K⁺ des membranes [48]. L'un des rôles du Ca²⁺ est d'activer les Myosine Light Chain Kinase (MLCK) qui phosphorylent les molécules de myosines afin de permettre des contractions cellulaires. Ainsi, une chute de la concentration de Ca²⁺ va donc favoriser une relaxation au niveau des cellules musculaires et une vasodilatation des vaisseaux [49].

Cependant, les CMLV ne sont pas les plus sensibles à ET-1. En effet les parois vasculaires des artères coronaires et rénales sont plus réceptives aux effets vasoconstricteurs d'ET-1 que celles des CMLV [50]. De même, les parois des artères mésentériques peuvent être stimulées par les vaso-peptides tel qu'ET-1. Ils existent différentes réponses à la vasoconstriction, notamment chez les mésentères ou les

cellules cardiaques qui y sont plus sensibles ce qui peut être liées à des quantités variables des récepteurs ET_A et ET_B dans ces parois [51].

1.3.2 ET-1 dans le cœur

Diverses études ont démontré l'importance qu'ET-1 pouvait jouer dans les tissus du cœur. En effet, la protéine d'ET-1 a un effet biologique inotropique positif dans le cœur humain, entre autre en diminuant le pH via l'activation de l'échangeur de sodium-proton (Na⁺/H⁺) et en favorisant l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Ce dernier effet est dû à la libération massive d'ions Ca²⁺ stockés dans le réticulum sarcoplasmique (RS) permettant la liaison des molécules de Ca²⁺ avec les myofilaments et donc la contraction musculaire [52]. Bien que l'ET-1 influence la fonction cardiaque indirectement en induisant une vasoconstriction coronaire, l'effet sur le myocarde est plus large, puisque le contrôle des flux d'ions par l'ET-1 permet également une prolongation de la durée du potentiel d'action. Cela qui lui attribue un rôle important dans les cardiomyopathies, tel que la dyplasie ventriculaire droite arythmogène liée à des perturbations électriques cardiaques, secondaires au remplacement des cellules musculaires cardiaques par des cellules adipeuses [53]. Fait intéressant, après une insuffisance cardiaque, il se produit aussi une réponse inotropique plus grande à cause d'une forte réaction à l'ET-1 [54]. En outre, il a été démontré chez des rats que la modulation cardiaque qui survient suite à

l'entraînement, est en partie le résultat d'une augmentation significative de la concentration d'ET-1 dans le cœur [55].

1.3.3 Action de l'endothéline dans le rein

Grâce à son action vasoconstrictrice, l'ET-1 a été considéré comme un élément important dans la régulation du tonus vasculaire rénal. L'ET-1 permet la vasoconstriction des artéioles afférentes et efférentes in vitro [56] et réduit également le débit de filtration glomérulaire (DFG) [57]. Il a été observé que les deux récepteurs d'ET-1, ET_A et ET_B, sont impliqués dans ces effets [58]. Il est aussi important de noter que la production des vasoconstricteurs tel que l'ET-1 peut se faire par diverses cellules du rein [59]. L'ET-1 est principalement présente dans la zone médullaire, et sa production par les cellules de cette région du corps humain est supérieure à celle de n'importe quelle autre cellule [60]. La contribution d'ET-1, dans les fonctions rénales, permet le maintien de l'équilibre des concentrations ioniques et de l'équilibre physiologique des sujets sains puisque l'ET-1 au niveau de la médullaire favorise l'excrétion de Na⁺ et d'eau en induisant une diurèse [61-63]. Ceci a été confirmé par l'utilisation de souris transgéniques, KO pour l'ET-1 spécifiquement au tube collecteur, ce qui a provoqué de l'hypertension, confirmant qu'ET-1 favorise l'excrétion de Na⁺ et d'eau [64], même si cela a pu être auparavant, mis en doute dans d'autres études qui ont plutôt évoqué un faible rôle d'ET-1 dans l'effet natriurétique [65]. Plusieurs mécanismes potentiels ont aussi été étudiés afin de comprendre

comment l'ET-1 induit l'excrétion du Na⁺ et d'eau, et les résultats d'études ont établi qu'ET-1 induit l'inhibition des pompes transmembranaires Na⁺/K⁺ dans le tube proximal et collecteur [61], ainsi que l'inhibition des effets de l'hormone antidiurétique (ADH). En outre, il a également été démontré que l'ET-1 bloque la réabsorption de l'eau dans le tube collecteur via l'inhibition des effets de l'ADH [62]. Afin de comprendre les effets natriurétiques et diurétiques d'ET-1 sur les cellules du rein, les chercheurs ont spécifiquement bloqué par des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B, ce qui a permis de conclure que l'action se produit via ces récepteurs [66].

1.3.4 Action de l'endothéline dans le système endocrinien

Il est largement admis qu'ET-1 stimule la sécrétion de plusieurs hormones dans le corps humain incluant les hormones surrénales corticales et médullosurrénales, ce qui améliore la libération de l'aldostérone à partir de cellules isolées de la zone glomérulée corticale [67], ainsi que de l'adrénaline à partir des cellules chromaffines médullaires [68]. L'ET-1 stimule la production et la libération de peptides tel que l'ANP par les myocytes auriculaires en culture in vitro et in vivo [69]. Cependant, diverses études montrent qu'ET-1 a des effets contrastés sur le système rénine-angiotensine. Il a été rapporté qu'ET-1 a un rôle inhibiteur sur la libération de la rénine par les cellules de l'appareil juxta-glomérulaire rénal de rat [70], malgré qu'ET-1 a été vu comme un élément important dans la stimulation de

l'ECA endothéliale [71]. Il a été observé dans les cellules de Leydig de rat, que l'ET-1 et l'ET-3, sont impliqués dans la libération de la testostérone en stimulant la production de testostérone basale induite par la gonadotrophine, bien que les effets de l'ET-3 ont été moins importants [72]. Dans le tissu adipeux, l'ET-1 inhibe l'expression et la sécrétion de l'adiponectine [73]. De plus, une étude a démontré que lors d'une résistance à l'insuline, l'ET-1 est capable d'augmenter la sécrétion d'IL-6 par les adipocytes ce qui constitue une étape critique pour la résistance à l'insuline [74].

1.4 Rôle d'ET-1 dans les maladies cardiovasculaires

Dans les MCV telles que l'HTA, l'athérosclérose, la maladie coronarienne, l'insuffisance cardiaque, il est important de noter l'implication des vasoconstricteurs et en particulier d'ET-1, à moduler une grande variété des fonctions cellulaires qui à terme contribuent indéniablement à ces physiopathologies et développe de l'HTA aussi bien essentielle que secondaire [75;76].

1.4.1 ET-1 dans les maladies cardiovasculaires

L'effet principal de l'ET-1 sur les CMLV permet de réguler le tonus vasculaire. Ceci se produit en deux parties, dans un premier temps, cet effet est vasodilatateur puis cette phase est suivie d'un effet vasoconstricteur beaucoup plus long qui n'est cependant pas dépendant de la concentration d'ET-1 dans le plasma,

mais plutôt de la forte affinité d'ET-1 à son récepteur. Ces deux phases s'expliquent du fait que lors de la fixation d'ET-1 sur les récepteurs ET_B des cellules endothéliales, il se produit une synthèse rapide des molécules PGI₂ et du NO qui vont contribuer à la dilatation des vaisseaux alors que la fixation d'ET-1 sur les récepteurs ET_A et ET_B des CMLV va plus tardivement mener à une constriction [77].

D'autres facteurs peuvent interagir et contribuer au remodelage vasculaire tel que l'Epidermal growth factor (EGF) ou le Platelet-derived growth factor (PDGF), des facteurs qui sont d'avantages produits lors de la formation de plaques d'athéromes sur les parois des vaisseaux sanguins [78]. Le remodelage de la paroi se produit aussi en réponse au stress oxydatif suite à l'activation du système nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) qui conduit à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui participe aussi à l'activation des différentes voies de signalisation en agissant comme médiateurs des signaux de divers facteurs de croissance et des peptides vasoconstricteurs (ET-1, AngII), tout en favorisant le vieillissement des cellules. ET-1 est donc vu comme un élément agissant en faveur de la production des ERO qui sont des médiateurs importants impliqués dans la signalisation de différents facteurs de croissance et de peptides vasoactifs [15]. À terme, l'effet de maintien du tonus vasculaire par l'ET-1 résulte en une modulation structurale des vaisseaux, plus spécifiquement, il se produit un remodelage vasculaire dû entre autre à la prolifération [79] et la migration [80] anormalement élevées des CMLV de la media vers l'intima en réponse à l'action

d'ET-1, qui finalement contribuent grandement à l'HTA secondaire et essentielle ainsi qu'aux dérèglements rencontrés dans divers organes cibles.

1.4.2 ET-1 dans l'hypertension secondaire

L'HTA secondaire est en grande partie présente et liée à divers dérèglements physiologiques connus et qui sont en partie réversibles. Des augmentations significatives des taux plasmatiques d'ET-1 sont régulièrement vus dans certains modèles d'hypertension tels que les rats spontanément hypertendus (SHR) qui sont parmi les modèles qui présentent la plus grande augmentation de concentration systémiques d'ET-1 [81]. En raison de la production accrue d'ET-1 dans ce modèle, il a été vu, la contribution de ce vasoconstricteur au remodelage des artères durant l'hypertension [82]. Fait intéressant, le modèle d'hypertension qui évoque une augmentation de concentration d'ET-1 au niveau systémique, présente également un remodelage des artères et une augmentation de section transversale, ce qui confirme davantage les faits observés [46].

Afin de mieux comprendre les mécanismes régissant les effets intracellulaires d'ET-1, plusieurs travaux ont été établis. Ainsi, des études ont suggéré un rôle essentiel de transactivation du récepteur de l'EGF dans la réponse vasculaire qui est associée à un remodelage stimulé par l'ET-1 [83]. Il a été également rapporté qu'ET-1 stimule, via son récepteur ET_A , la transactivation du l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R), ce qui permet la synthèse de l'ADN des cellules musculaires lisses

vasculaires, qui est un indice de prolifération et donc de remodelage [84]. Des études utilisant des rats mâles Wistar Kyoto normotendus (WKY), rats contrôle aux SHR, ont permis de révéler les mécanismes par lesquels ET-1 induit le remodelage de la vasculature. Ces études ont suggéré que le remodelage structurel des parois vasculaires induit par l'ET-1 semble être la réponse à la contraction soutenue, qui implique la réorganisation du collagène [85]. Durant l'hypertension, la concentration de vasopeptides est plus élevée, et il a été rapporté qu'ET-1 active davantage la NADPH oxydase dans les cellules musculaires lisses vasculaires et dans les vaisseaux sanguins [83], ce qui contribue à la prolifération, médiée en partie par l'augmentation de la production de ERO [86]. La participation d'ET-1 dans les dommages d'organes et particulièrement les vaisseaux, les reins et le cœur, durant l'HTA, ont été constatés. Ainsi, diverses études ont confirmé l'implication d'ET-1 dans les pathologies rénales et cardiovasculaires via la stimulation des facteurs de croissance en induisant l'inflammation chez des rats hypertendus [87]. Récemment, il a été révélé que le blocage sélectif des récepteurs ET_A réduit les blessures et les traumatismes rencontrés non seulement dans les podocytes (cellules de l'épithélium viscérale des reins) mais aussi d'organes cibles, afin améliorer la croissance et la survie indépendamment de l'hypertension [88]. Dans le cœur, les inhibiteurs de l' ET_A , combinés ET_A / ET_B ou de la ECE, ont empêché l'atteinte et la détérioration d'organes cibles dans des modèles d'animaux d'hypertendus [89-91]. Le blocage du système de synthèse d'ET empêche la hausse de la concentration d'ET-1 dans le cœur chez des rats transgéniques avec

une hypertension aggravée. Ils ont suggéré que le blocage des récepteurs d'ET-1 peut fournir des outils pour protéger les rats de lésions cardiaques hypertensives [92].

1.4.3 ET-1 dans l'hypertension essentielle.

L'HTA essentielle se produit au cours du vieillissement, ainsi que lors de l'augmentation de concentration de vasoconstricteurs, qui reste en majorité inconnu. La concentration systémique d'ET-1 ne reflète cependant pas réellement la production d'ET totale, puisqu'elle est générée en parti localement, afin d'agir de manière paracrine ou autocrine comme pour les CMLV et les cellules endothéliales. En effet, les diverses études portant sur le rôle d'ET-1 dans l'hypertension essentielle n'ont révélé aucun changement significatif de concentration dans le plasma entre les patients hypertendus et les sujets sains [93]. Par contre, il a été démontré que l'augmentation de la concentration plasmatique d'ET-1 était liée à un dysfonctionnement rénal et au vieillissement plutôt qu'à l'HTA essentielle, suggérant qu'ET-1 participe à l'hypertension sans en être réellement la conséquence [94]. Chez certains patients, les chercheurs ont tenté de voir les effets d'ET-1 sur les vaisseaux en injectant au bras des antagonistes de récepteurs ET_A ce qui a provoqué une vasodilatation des vaisseaux chez des patients hypertendus ainsi que les normotendus [95], et a amélioré chez les patients hypertendus, les problèmes liés à la vasodilatation. D'autre part, l'injection de l'antagoniste du récepteur ET_B induit une vasoconstriction des artères de l'avant-bras chez les sujets normotendus et a eu une

action vasodilatatrice chez les sujets hypertendus, ce qui indique un effet vasoconstricteur via les récepteurs ET_B chez les individus hypertendus mais pas les sujets sains [96]. Les deux antagonistes des récepteurs d'ET-1 peuvent réduire la pression artérielle systémique chez des modèles animaux et chez les patients hypertendus. Des études cliniques sur des patients atteints d'hypertension essentielle ont révélé que le bosentan, un antagoniste des deux récepteurs ET_A/ET_B , a permis de diminuer la pression artérielle chez ces patients [97]. Enfin, comme mentionner ci-dessus, le vieillissement est le facteur de risque cardio-vasculaire qui permet d'augmenter l'activation et la concentration d'ET-1 et d'hypertension [98], mais qui peut être largement amélioré si les sujets sont soumis à des exercices ce qui permet de réduire le tonus vasoconstricteur et prévenir l'hypertension [99].

1.4.4 ET-1 dans l'athérosclérose

Durant l'athérosclérose, il se trouve dans les parois des vaisseaux et notamment de l'artère aorte, des lésions au niveau des cellules endothéliales ce qui induit d'une inflammation, une infiltration des monocytes dans les parois, une augmentation de production des cytokines, des facteurs de croissance, des vasoconstricteurs qui influent sur la migration des cellules musculaires lisses vasculaires de la media vers l'intima, contribuant aussi à une accumulation de lipides dans les cellules et les couches sous-jacentes, ce qui représentent les principales caractéristiques et causes rencontrées lors de l'athérosclérose [89]. Plusieurs groupes

de chercheurs ont suggéré qu'il y avait une grande implication d'ET-1 dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Il a été démontré qu'ET-1 est un facteur chimiotactique pour les monocytes et les macrophages et qu'ET-1 agit comme un facteur stimulant pour les CMLV [100]. Une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'ET-1 corrèle avec le nombre de lésions vasculaires chez les patients atteints d'athérosclérose [101]. Le fait qu'ET-1 a une demi-vie courte dans la circulation, suppose que ces taux plasmatiques élevés sont dus à une augmentation de production d'ET-1 par les tissus lésés. Une hausse d'ET-1 et de ses récepteurs ET_A/ET_B a été démontré dans les blessures athérosclérotiques chez des modèles d'animaux et humains [102]. L'étude d'expression des ARNm d'ET-1 dans les artères coronaires humaines saines et athérosclérosées a démontré que les cellules endothéliales, les macrophages dérivés des monocytes et des CMLV au sein de la lésion athérosclérotique sont capables de synthétiser l'ET-1 [103]. Dans le même cadre, il a été rapporté à l'aide de CMLV en culture à partir d'artères athérosclérosées que la production d'ET-1 est nettement plus forte dans les plaques d'athéromes ce qui peut contribuer au développement ou la progression de maladies, notamment coronarienne [104]. Les deux récepteurs ET_A/ET_B ont été montré comme étant liés aux pathologies d'athéroscléroses. Chez des hamsters hyperlipidémiques, les deux récepteurs sont localisés dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages des plaques d'athéromes [105]. Par ailleurs, chez des souris déficientes en apolipoprotéine-E et atteintes d'athérosclérose, l'inhibition du

récepteur ET_A normalise les dysfonctions endothéliales en réduisant les risques liés à la production de NO et en diminuant la formation de plaques d'athéromes [106]. Également chez l'homme, la perfusion d'inhibiteur des récepteurs ET_A, tel que BQ123, permet d'améliorer la fonction vasculaire coronaire des patients souffrant d'athérosclérose. Ces données suggèrent que le blocage des récepteurs d'ET-1 peut-être une nouvelle stratégie thérapeutique afin d'améliorer la fonction vasculaire coronaire chez les patients atteints d'athérosclérose [107]. Les mécanismes supplémentaires par lesquels l'ET-1 induit l'athérosclérose ont été récemment déterminés. L'ET-1, par l'intermédiaire des récepteurs ET_A, induit la production de glycosaminoglycanes (GAG) par les CMLV ce qui augmente leurs liaisons aux lipoprotéines de basse densité (LDL) et modifie également ses propriétés de liaison aux lipides aux niveaux des parois vasculaires [108]. Cela favorise la formation de néo-intima. C'est en partie par ce procédé que les blessures à l'endothélium vasculaire initient l'épaississement de l'intima avec la migration des CMLV de la media vers l'intima où elles contribuent aussi au changement de la contractilité. L'épaississement de la couche d'intima, est le résultat de la formation d'une néointima prononcée, ce qui rétrécit la lumière du vaisseau [109]. L'infusion exogène d'ET-1 a été vue comme un élément permettant de potentialiser le développement de l'hyperplasie de l'intima suite à une blessure volontairement induite, tandis que les antagonistes des récepteurs mixtes ET_A/ET_B ou un inhibiteur de la ECE réduit la formation de néointima ce qui

supporte le rôle central de l'ET-1 dans ce processus de remodelage vasculaire [110-112].

1.4.5 ET-1 dans l'insuffisance cardiaque

Des recherches faites sur les humains et les animaux atteints d'insuffisance cardiaque ont montré des taux circulants d'ET plus élevés que chez des individus sains [113]. En outre, la concentration plasmatique d'ET-1 corrèle avec les modifications de l'activité cardiaque et de la modification du débit sanguin [114]. Il semble que la baisse du débit cardiaque observée durant l'insuffisance cardiaque conduit à une stimulation de la libération d'ET-1 en raison de niveaux très élevés constatés chez des modèles d'animaux atteints de cardiopathies [113]. Afin de déterminer si les effets pouvaient être atténués, des inhibiteurs des récepteurs ET_A/ET_B, tel que le bosentan, ont démontré leurs efficacités à diminuer l'action d'ET-1 et donc à limiter les complications de l'insuffisance cardiaque, permettant l'amélioration de l'hémodynamique pulmonaire et systémique chez les patients [115]. Les mêmes résultats ont été observés avec un inhibiteur sélectif du récepteur ET_A (143). En fait, un antagoniste sélectif des récepteurs ET_A améliore le débit et la fonction cardiaques chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive [116]. Récemment, chez des modèles de rats, la contractilité myocardique a été nettement améliorée après un traitement avec le PP36, un inhibiteur de l'ECE

suggérant que la production d'ET-1 et l'activation des voies de signalisation via ses récepteurs jouent un rôle crucial dans les physiopathologies cardiaques [117] .

1.5 ET-1 induit les voies de signalisations dans les CMLV

L'ET-1 exerce ses actions physiologiques grâce à l'activation de plusieurs voies de signalisation qui comprennent les Phospholipase C (PLC)/ Diacyle Glycérol (DAG)/ Inositol triphosphate (IP3), les Mitogen activated protein kinase (MAPK) et les voies du phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K)/PKB (fig.1.4). De nombreuses protéines kinases cytosoliques comme Src, Pyk2 ainsi que les protéines récepteurs et non-récepteurs tyrosine kinases jouent également un rôle important dans le lancement des événements de signalisation induite par l'ET-1. Les événements cellulaires déclenchés par l'activation de ces voies de signalisation permettent la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération, la contraction et la survie des cellules musculaires lisses vasculaires, et une aberration dans ces voies mène à des états pathologiques. L'ET-1, en se fixant sur ses récepteurs ET_A/ET_B des CMLV, va activer spécifiquement une hydrolase, la PLC [118], qui va scinder le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2), un phospholipide membranaire, et conduire à la formation de deux molécules, IP3 et le DAG. D'une part, la formation d'IP3 va contribuer au relargage de Ca^{2+} par le RE vers le cytoplasme et donc à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule, et d'autre part, une production de DAG, un lipide hydrophobe se localisant principalement au niveau de

la membrane plasmique, conduit à l'activation de la Protéine kinase C (PKC) [119;120], ce qui mène aussi à un passage plus grand du Ca^{2+} de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule ainsi qu'une phosphorylation et une activation de l'échangeur de Na^+-H^+ , car cette protéine permet de faire entrer un ion Na^{2+} contre la sortie d'un ion H^+ , d'où une alcalisation du milieu, avec un pH plus élevé favorisant la fixation du Ca^{2+} aux protéines contractiles [121;122]. L'activation de la protéine PKC peut, par un mécanisme de transactivation, activer les R-TK, c'est-à-dire que via l'activation des récepteurs GPCRs, (ET_A/ET_B), il est possible d'activer les R-TK tel que l'Insulin growth factor receptor (IGF-R) ou l'EGF-R. L'activation des R-TK et non récepteurs Tyrosine Kinase (c-Src) vont conduire à l'activation de différentes voies de signalisation tel que la voie des MAPK, PKB, c-Jun N-terminal kinase (JNK) ou encore la P38 Mitogen-activated protein kinase (P38) qui ont un effet sur la survie, la prolifération, la migration ou encore le métabolisme des cellules. Ainsi, l'implication de ces voies de signalisation et des effets qu'elles engendrent ont été notamment observé au niveau de l'aorte dans des conditions d'hypertension [16].

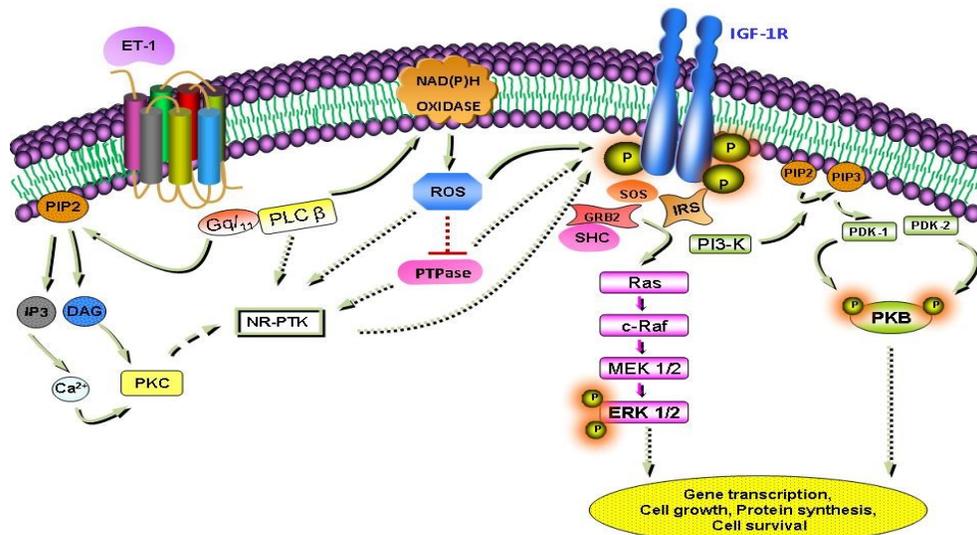


Figure 1.4 Schéma de l'activation des voies de signalisations ERK1/2 et PI3-K/PKB par ET-1 dans les CMLV.

La stimulation des récepteurs d'ET-1 conduit à l'activation à la fois des Gq α , ainsi que des $\beta\gamma$, qui à leur tour active la PLC β . PLC β convertit PIP2 en IP3 et DAG. IP3 est responsable de l'élévation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire. DAG active la PKC. Grâce à l'activation de plusieurs intermédiaires en aval, Ca²⁺, seul ou en partenariat avec la PKC ou d'autres intermédiaires, déclenche l'activation de NR-PTK, en induisant leur phosphorylation sur des résidus tyrosine cibles. L'activation de ces PTK conduit à la phosphorylation de protéines d'amarrage, comme IRS-1, qui servent aussi de sites d'amarrage pour Grb-2/SOS. Celui-ci peut conduire à l'activation de la voie Ras/Raf/MEK/ERK1/2. La phosphorylation de IRS-1 active aussi PI3-K qui continue à catalyser la phosphorylation de PIP2 à PIP3, permettant le recrutement des PKD1/2 à la membrane plasmique, où PDK1/2 vont phosphoryler PKB sur les résidus thréonine et sérine. ET-1 augmente également la production d'ERO en activant la NADPH oxydase, par un mécanisme inconnu, dans les CMLV. Produit de façon endogène les ERO sont capables d'inhiber PTPases par l'oxydation des résidus cystéine dans les domaines catalytiques. L'inhibition de ces PTPases favorise la phosphorylation de la tyrosine des NR-PTK et des R-PTK, ce qui entraîne l'activation de R-PTK indépendamment de la fixation de ligand, tels que l'IGF-1R, qui agissent en amont des voies deux voies de signalisations Ras/Raf/MEK/ERK1/2 et PI3-K / PKB. L'activation des cascades de signalisation ERK1/2 et PKB jouent un rôle majeur dans la médiation de diverses réponses cellulaires telles que la transcription des gènes, la synthèse des protéines, la croissance cellulaire et la survie cellulaire.

L'activation de ces cascades de signalisation peut avoir un effet néfaste sur la santé des sujets, puisqu'il a été observé que diverses pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose ou encore l'HTA présentaient une variation de la concentration d'ET-1. En effet, le système d'ET-1 peut être plus activé chez certaines espèces de rats, tel les rats DOCA (Deoxycorticosterone acetate-salt hypertendu), DOCA salt-treated SHR ce qui confère une concentration plasmatique d'ET-1 plus élevée chez ces modèles d'animaux hypertendus, avec des complications qui leurs sont associées, tel que l'hypertrophie et le remodelage des parois des artères. L'implication d'ET-1 dans les MCV est confirmée avec l'injection de divers inhibiteurs d'ET_A/ET_B qui permettent de réduire l'hypertension et de diminuer l'hypertrophie cellulaire [81].

ET-1 est une protéine pro-inflammatoire qui contribue au développement de l'athérosclérose en stimulant la synthèse par les plaques d'athéromes, et de certains facteurs de croissance, eux-mêmes également pro-athérogéniques tel que le PDGF et le transforming growth factor beta (TGF- β). Toutefois, l'un des effets encore mal étudié d'ET-1 est sa réelle implication dans les phénomènes d'épigénétique. En effet, les mécanismes de contrôle de l'activité cellulaire se déroulent en grande partie via les régulations épigénétiques dont l'implication dans les mécanismes physiopathologiques concernant les MCV a récemment été évoquée [123].

La mise en lumière des mécanismes d'ET-1 nous permettrait donc de mieux comprendre et de trouver par la suite un meilleur moyen de gérer les complications

qui lui sont associées. C'est dans cette optique que diverses études ont été réalisées ces dernières années sur les protéines ayant un impact sur le cycle cellulaire et la molécule d'ADN, il s'agit notamment des histones déacétylases (HDAC) qui permettent une répression de la synthèse de protéine. Parmi les HDAC, la protéine Sirtuine-1 (Sirt-1), a été vue comme ayant divers effets bénéfiques contre l'athérosclérose, ce qui soutient les recherches qui visent à décrire l'implication de Sirt-1 sur le contrôle de la prolifération et de la migration cellulaires des CMLV.

1.6 Effets épigénétiques et implication dans les maladies cardiovasculaires

Après la découverte de la molécule d'ADN par Watson et Crick en 1953, il a été possible de saisir davantage différents faits observés dans la cellule. On trouve chez un même individu une multitude de cellules avec des fonctions et rôles différents. Chaque cellule a des paramètres prédéterminés qui sont contenus dans son code génétique et qui se manifestent selon la modélisation de celle-ci, par des phénomènes biologiques tels que l'épigénétique, en réponse par exemple à un stimulus. Dans les gènes, il se trouve quatre bases azotées aussi appelées bases nucléiques (Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine), et l'alignement de ces molécules donne la spécificité génomique [124]. Les effets épigénétiques sur l'ADN peuvent être multiples mais sont essentiellement dus à la méthylation des bases par des méthylases [125] ainsi qu'à l'acétylation/déacétylation des histones par les

histones acétyles transférases (HAT) et les HDAC qui respectivement ajoutent ou retirent des groupements acétyles sur les histones [126]. Ceci est un mécanisme dynamique qui se produit en réponse à différents facteurs physiologiques [127]. L'épigénétique permet également de saisir davantage l'altération d'une expression de gène durant les maladies et dans notre étude concernant les CMLV lors d'une HTA. Ces voies de régulation de l'expression génétique se font sans modifier la séquence d'ADN, et sont liées surtout à la présence de différents facteurs externes, ce qui nous donne une nouvelle approche de la régulation de la cellule, pouvant aussi nous éclairer sur les différentes combinaisons et liens existants entre les génotypes et les phénotypes associés [128].

1.6.1 La méthylation de l'ADN :

L'un des deux principaux phénomènes épigénétiques est la méthylation, qui se produit principalement après la synthèse d'ADN, i.e. durant la mitose ou la réplication de l'ADN, et ainsi déterminer quel gène sera plus ou moins exprimé à travers la modulation de la chromatine [129]. Lors d'une méthylation d'acides désoxyriboses, l'adénine et la cytosine peuvent être méthylées. Cependant, chez les vertébrés, l'ajout d'un groupement méthyle à partir du donneur S- adenosylmethionine se fait sur la cytosine en 5-méthylcytosine dans les séquences CG de l'ADN. Cette réaction est catalysée par l'enzyme méthyle transférase d'ADN (DNMT). Ce processus de méthylation, qui se déroule principalement sur les gènes, est un

mécanisme réversible et mène à une diminution de l'expression génique, il peut toutefois se produire également sur les protéines pour changer leurs structures et donc leurs activités [130]. Cependant, la différence de structure de la chromatine ainsi que la répression de la transcription est due principalement à l'action des HDAC et HAT.

1.6.2 Les protéines HDAC/HAT et l'ADN :

Il a été démontré que la molécule d'ADN et les histones sont les principales composantes du chromosome, dans laquelle la double hélice d'ADN est enroulée autour de molécules d'histones préalablement assemblés en octamères pour former un cœur d'histone (huit molécules H2A, H2B, H3 et H4) avec une structure qui ressemblerait à un collier de perle et qui pourrait être davantage surenroulé ce qui diminuerait largement la transcription [131]. Ce complexe d'ADN et de protéines constituent chez les cellules eucaryotes le nucléosome, l'unité de base de la chromatine. Il permet un contrôle de l'accessibilité du double brin d'ADN selon le niveau de compaction. La chromatine est incessamment en contact avec diverses protéines, telles que les HDAC, qui influencent son degré de compaction, et qui à travers la régulation de la structure chromatinienne sont directement impliquées dans la régulation de plusieurs processus nucléaires comme la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN [132].

La chromatine n'a pas la même conformation sur toute sa longueur, ce qui confère une différence dans la synthèse protéique. L'effet de

l'acétylation/déacétylation des histones ou des protéines non histones joue un rôle majeur dans le développement de la cellule [133]. Les HAT sont des enzymes qui vont permettre le transfert réversible d'un groupement fonctionnel acétyl des acétyl-CoA sur les lysines pour donner des N-acétyl lysine, ceci favorise la transcription. Les HDAC ont la capacité de retirer ces groupes fonctionnels acétylés des lysines, ce qui tend à charger positivement les protéines, puisque les lysines sont des acides aminés chargés positivement, à l'opposé l'ajout d'acétyl, va tendre à neutraliser ces charges [126]. Les protéines histones déacétylées seront chargées plus positivement et auront des interactions plus fortes avec les groupements phosphate de l'ADN, chargés négativement. L'ADN est, suite à la déacétylation, étroitement associé aux histones ce qui mène à un plus grand enroulement de celui-ci autour des cœurs d'histones, ce qui en résulte une compaction de la chromatine [134;135].

Une diminution de transcription s'explique par une chromatine surenroulée et, par conséquent, à un accès à la molécule d'ADN plus difficile pour les complexes protéiques de synthèse tel que les ARN polymérase [136]. L'acétylation ou la déacétylation n'est pas uniquement responsable de la répression de la synthèse d'ARN mais peut, comme dans le cas de Sirt-1, aussi agir sur les protéines impliquées dans diverses voies de signalisation, sur les récepteurs, le cytosquelette, ainsi que les protéines ayant un rôle dans la prolifération et la migration cellulaire [137].

1.6.3 Les protéines histones déacétylases transférases :

Il existe chez l'humain 18 histones déacétylases réparties en quatre groupes, et classées selon leurs séquences et leurs homologies avec les protéines histones déacétylases initialement découvertes chez la levure [138].

- La classe I inclut les HDAC 1, 2, et 8 qui ont une localisation essentiellement nucléaire et l'HDAC 3 située aussi bien au niveau cytosolique qu'au niveau du noyau. Elles ont une homologie avec la protéine reduced potassium dependency 3 (RPD3) de la levure ainsi que la particularité de voir leur activité inhibée par la trichostatine A (TSA) qui est considérée, avec les HDAC de classe II, comme des groupes classiques de déacétylases [138].
- La classe II présente deux sous-groupes ayant une forte homologie avec l'HDA1 de levure. Elles sont présentes dans noyau ou dans le cytoplasme dépendamment des signaux d'activation. Les HDAC 4, 5, 7, et 9 de classe II_A, contiennent un large domaine régulateur N-terminale en plus du domaine catalytique C-terminale, alors que les protéines de classe II_B, HDAC 6 et 10, sont différentes car elles contiennent en plus, deux sites catalytiques distincts. Elles peuvent aussi être inhibées par la TSA ce qui les classent parmi les familles des déacétylases dites classiques [139].

- La classe III, celle des protéines Sirt, est située dans le cytoplasme, le noyau ou encore la mitochondrie, et a une forte homologie avec Sir2 (silent information regulator 2) de levure. Elles nécessitent la présence du cofacteur NAD^+ afin d'être fonctionnelles et contrairement aux autres familles de HDAC, elles ne possèdent pas de résidu zinc dans leur site catalytique [140].
- La classe IV contenant uniquement 'HDAC11 présent dans le cytoplasme et le noyau. Elle est considérée comme atypique et son rattachement à la famille de HDAC est basé uniquement sur des séquences d'ADN similaires aux autres protéines déacétylases cependant partagent certaines caractéristiques des classe I et II [141].

Parmi les quatre familles d'histones déacétylases, les récentes recherches sur les effets de déacétylation se sont davantage penchées sur les protéines Sirt de classe III, qui ont été vu comme ayant divers rôles importants et déterminants au sein de la cellule [142]. Ce sont celles que l'on va d'avantage étudier tout au long de notre étude.

1.6.4 Les protéines Sirtuines :

La famille des protéines Sirt est impliquée dans une multitude de processus cellulaires, notamment le vieillissement, la régulation de la transcription, l'apoptose, la résistance au stress et la régulation de la dépense énergétique en situation de jeûne

[143-145]. Elles ont initialement été identifiées comme étant des orthologues de la protéine SIR2 de levure et sont classées en quatre sous-classe (I-IV) dans lesquels se trouvent sept différentes protéines (Sirt1-7), réparties selon leur niveau d'homologie et l'analyse de leurs séquences d'acides aminés [144;146;147]:

- Sous-classe I :

Elle est constituée de Sirt-1 qui est présente aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme avec une activité de déacétylation et permet un effet sur le métabolisme et l'inflammation. De Sirt-2, présente dans le cytoplasme et qui a une activité déacétylase et un rôle sur le cycle cellulaire. Et enfin de, Sirt-3 présente dans le noyau ou la mitochondrie et qui a une activité déacétylase et un effet sur le métabolisme [148-150].

- Sous-classe II : elle ne contient que la protéine Sirt-4 présente dans la mitochondrie avec une activité adénosine diphosphate (ADP) - ribosyl transférase et a un effet sur la sécrétion d'insuline [151].

- Sous-classe III : contient aussi comme unique élément la protéine Sirt-5 présente dans la mitochondrie avec une activité déacétylase et un effet sur la détoxification de l'ammoniaque [152].

- Sous-classe IV : elle renferme les protéines Sirt-6 et Sirt-7 présentes dans le noyau, avec une activité déacétylase mais également ADP-ribosyl transférase. Sirt-6 permet spécifiquement la réparation de l'ADN alors que Sirt-7 a un rôle dans la synthèse d'ADN ribosomal [153;154].

Les Sirt ont la particularité d'être NAD⁺ dépendante, plus précisément, leurs activités requiert la présence de NAD⁺ comme cofacteur et même si l'activité enzymatique de toute les Sirt n'a pas encore été prouvée, elles conservent toutes un domaine similaire de 275 acides aminés [155]. Les recherches faites sur les protéines Sirt ont démontré que Sirt-1 était principalement celle qui exerce une activité enzymatique dans la cellule avec pour principale action de réguler la répression génétique (acétylation des cœurs d'histones) et d'inactiver des facteurs de transcriptions tel que la tumor protein 53 (P53), un facteur de transcription régulant certaines fonctions cellulaires importantes comme la mitose ou la mort programmée des cellules [156].

1.6.4.1 Structure et régulation de la protéine Sirt-1:

Dans les cellules humaines, Sirt-1 est de loin la plus grande protéine parmi les Sirt. Elle est composée de 747 acides aminés notamment dû à ses extensions en N-terminale et C-terminale. La partie N-terminale contient deux séquences de localisation nucléaire (NLS) et deux séquences d'export nucléaire (NES) qui sont

impliquées dans le mouvement de Sirt-1 entre le noyau et le cytoplasme [157]. Durant la prolifération des cellules de myoblastes C2C12, Sirt-1 est localisée dans le noyau et majoritairement dans le cytoplasme lors de la différenciation cellulaire [157;158]. La prolifération et la différenciation cellulaires sont régies par des signaux qui mènent à l'activation de voies de signalisations correspondantes. Ainsi, l'inhibition de la PI3K empêche la localisation nucléaire de Sirt-1, nécessaire pour la prolifération cellulaire, ce qui suggère que PI3K aurait un effet sur le contrôle dynamique de Sirt-1 [159]. De plus, JNK, un autre médiateur intracellulaire des cascades mitogènes, est aussi impliqué et aurait un effet dans le processus de régulation de Sirt-1 via sa phosphorylation sur les résidus Ser²⁷ et Ser⁴⁷ ainsi que Thr⁵³⁰, ce qui favorise sa localisation dans le noyau, augmente l'activité enzymatique de Sirt-1, ainsi que sa capacité à déacétyler les histones mais pas celle d'agir sur les protéines non histones tel que la P53 [160]. De nos jours, 13 sites de phosphorylation ont été identifiés sur Sirt-1 dont 7 sont sur des sites localisés dans la partie N-terminale, incluant Ser²⁷ et Ser⁴⁷, et six dans la partie C-terminale incluant la Thr⁵³⁰. Ceux-ci influent son état et son lieu d'activité, La précision de régulation de la protéine Sirt-1 est tel que, si certains résidus tel que la Thr⁵³⁰ ou la Ser⁵⁴⁰ en C-terminale ne sont pas phosphorylés, il n y a pas de cycle cellulaire normal [161].

De plus chez la souris, il a été montré que Sirt-1 peut aussi être phosphorylée par la caséine kinase 2 (CK2), ce qui stimule l'activité de Sirt-1 et son habilité à fixer certaines protéines tel que les facteurs de régulation impliqués dans la prolifération

cellulaire (P53) [162]. Une fois de plus, afin que Sirt-1 soit activée, certains de ses sites dits essentiels pour l'activité de Sirt-1 (EAS), doivent être phosphorylés ce qui leur permet de pouvoir interagir avec les domaines catalytiques, de les activer et d'augmenter l'affinité de Sirt-1 pour ses substrats (Fig1.5) [163]. Cependant, certains sites de la protéine Sirt-1 permettant la liaison entre le domaine catalytique et les EAS sont en mesure d'être aussi liés par les protéines DBC1 (Deleted in bladder cancer protein 1), ce qui empêche lors de la fixation des DBC1 sur Sirt-1, l'activation du site catalytique par les EAS (Fig.1.5) [163;164]. En plus de la phosphorylation, Sirt-1 peut être également soumis à d'autres modifications post-traductionnelles, incluant par exemple la sumoylation, dans lequel cas il peut se produire un ajout dans la région C-terminale de Sirt-1 des small ubiquitin-like modifier (SUMO) sur la Lys⁷³⁴. Cette modification contribue aussi à augmenter davantage l'activité catalytique de l'enzyme, par exemple lors d'un stress cellulaire, Sirt-1 tend à être désactivé, et notamment par l'association à des désumoylases (SENPI) qui vont alors réduire son activité alors qu'à l'inverse, la sumoylation de Sirt-1 a un effet bénéfique sur la gestion du stress cellulaire [165]. Enfin, il peut se produire également une méthylation de Sirt-1 sous l'action de la méthyltransférase, surtout sur les Lys²³³⁻²³⁵⁻²³⁶⁻²³⁸ en région N-terminale, ce qui va principalement perturber la liaison de Sirt-1 avec ses protéines cibles [166]. Toutes ces voies de régulations sur la protéine Sirt-1 ont un rôle primordial au niveau de la cellule, car ils orientent celle-ci et l'active plus ou moins selon les événements et les besoins cellulaires.

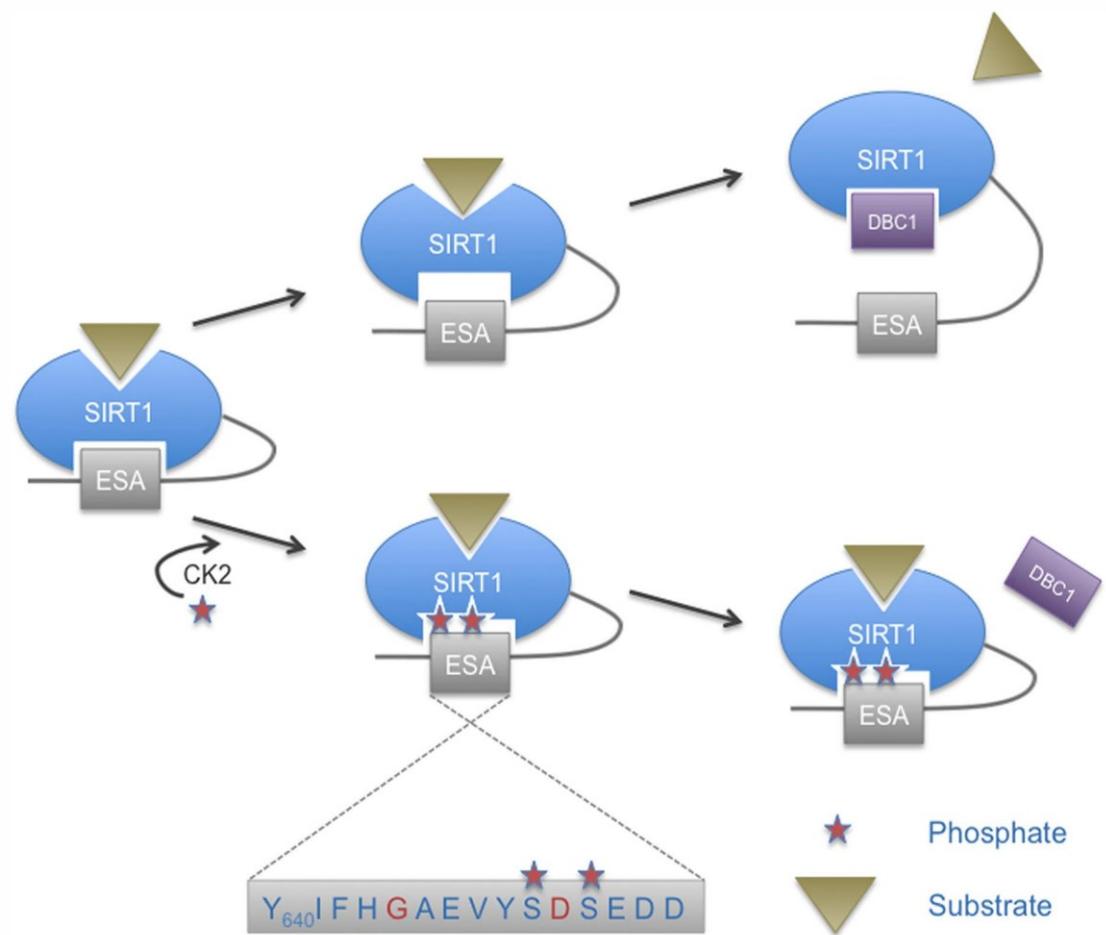


Figure 1.5 Contrôle de l'activité catalytique de Sirt-1.

Il existe deux sites de phosphorylation par les CK2 à l'intérieur du site d'activation de Sirt-1 (ESA), cette séquence se trouve dans l'extension C-terminal de Sirt-1. Ces sites phosphorylés par CK2 permettent d'accroître l'interaction d'ESA avec le site catalytique, ce qui va augmenter l'affinité de Sirt-1 pour son substrat et améliorer l'activité catalytique. Les motifs ESA concurrencent la liaison de DBC1 à Sirt-1, qui agit comme un régulateur négatif. La liaison d'ESA au domaine phosphorylé de Sirt-1 en réponse à leur phosphorylation par les CK2 va empêcher la liaison à ces sites de DBC1 et donc abroger son effet inhibiteur.

(Luscher B. Front Pharmacol. 2012;3:29)

1.6.4.2 La protéine Sirt-1 et son activité:

Sirt-1 peut être aussi bien localisé dans le noyau que dans le cytoplasme et selon les besoins cellulaires, il est transféré d'un compartiment de la cellule à un autre. Sirt-1 a un effet bénéfique sur les MCV notamment en ayant un effet protecteur contre l'hypertrophie des cellules cardiaques et des muscles lisses vasculaires [167]. En effet, sa surexpression dans le cœur de souris transgénique démontre une diminution de l'hypertrophie cardiovasculaire ainsi que celle des CMLV en limitant l'effet de l'AngII via une expression plus faible du récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1) [168]. Les effets de Sirt-1 peuvent être multiples dans le corps humain ce qui contribue d'avantage à diminuer les risques de MCV en agissant comme un régulateur clé du métabolisme, et est surexprimé à travers le corps durant un état de jeun ou de restriction calorique [169]. Dans les muscles squelettiques, à travers la biogenèse mitochondriale, Sirt-1 permet l'activation de l'oxydation des acides gras. Dans le foie et les adipocytes, Sirt-1 stimule le catabolisme des acide gras et du cholestérol et permet l'augmentation de l'effet glycogénique tout en diminuant l'effet glycolytique comme précédemment démontrer [170]. Sirt-1 contribue à l'activation des gènes glycogéniques et la sortie du glucose, via la phosphorylation oxydative par l'activation du peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α (PGC-1 α), il permet aussi lors de période de jeûne de diminuer les gènes glycolytiques via la déacétylation et l'activation de facteurs de transcription tel que PGC-1 α . Ces actions de Sirt-1 sur les différentes protéines cibles et clés du

métabolismes sont des mécanismes importants pour le bon fonctionnement des cellules durant les phénomènes de plaques d'athéromes et d'HTA [171].

Parmi ces sept protéines, la plus étudiée a été Sirt-1, puisque son implication dans la cellule semble avoir un impact conséquent. En plus d'être un facteur important du métabolisme et de jouer un rôle dans les mécanismes de restriction calorique à travers l'activation de diverses voies de signalisation, elle a permis chez les levures et les mouches le prolongement de vie cellulaire, ce qui suggère que Sirt-1 est aussi un acteur contre le vieillissement des cellules [172]. De plus, la délétion du gène SIR2 provoquait une diminution autour de 50% de la durée de vie des *Saccharomyces cerevisiae*, mais si au contraire on surexprimait la protéine du gène SIR2 ceci augmente à plus de 30% la durée de vie. Ces effets ont également été observés chez d'autres organismes vivant tel que la drosophile [173;174]. Cette déacétylase a un rôle important, car elle contribue d'une manière ou d'une autre à prévenir diverses pathologies, tel que les MCV, neurodégénératives ou encore le diabète. Sirt-1 peut avoir divers effets, puisqu'elle est liée à la répression de gènes, au contrôle métabolique, l'apoptose, à la survie cellulaire, la neuroprotection, la restauration de l'ADN, l'inflammation, le cycle circadien et le contrôle du stress qui sont des phénomènes récurrents dans les CMLV lors d'HTA notamment [175;176].

Contrairement à Sirp2, Sirt-1 est une protéine ayant les mêmes effets que celle-ci, uniquement présente dans les cellules de mammifères qui en plus de

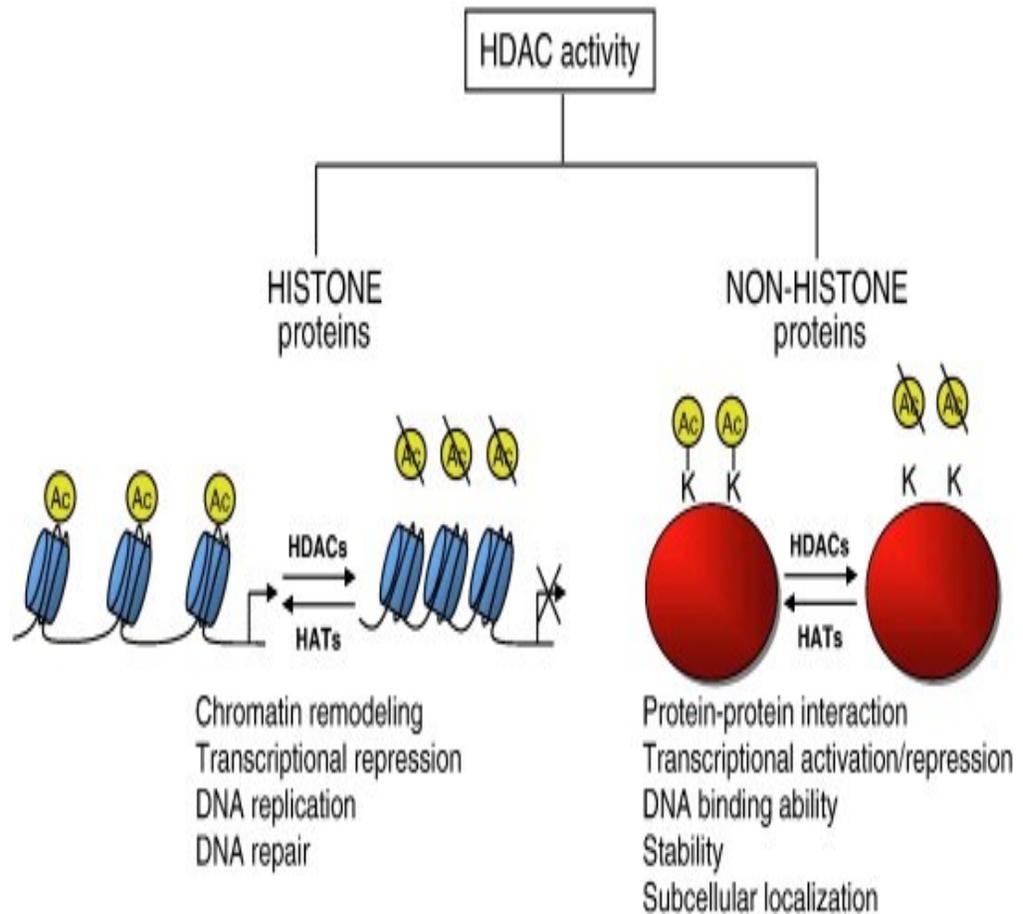


Figure 1.6 Rôle des histones déacétylases dans la répression de la transcription et des histones acétyles transférases dans l'activation de la transcription.

Les HDAC inhibent l'expression de gènes cibles sans modifier la séquence d'ADN. Ils déacétylent les histones qui mènent fortement à liaison entre l'ADN et les histones ce qui empêche la transcription et l'expression des gènes, et une diminution de la croissance cellulaire. Cependant, l'HDAC peut déacétyler d'autres protéines que les histones, notamment les P53 qui sont impliqués dans la diminution de la croissance cellulaire. La déacétylation d'histone est réversible par les histones acétyl transférase, qui ajoutent un groupement acétyl aux histones, ce qui diminue la charge positive des histones, et affaiblit les liaisons de charge avec l'ADN, qui est alors déplié et devient plus accessible aux facteurs de transcription et à la synthèse d'ARN. (Alberto Gulino, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer Volume 1815, Issue 2, 241 – 252 (2011))

déacétyler les histones, peut contribuer à un contrôle plus large des activités cellulaires, tel que le rapport déacétylation/acétylation de protéines nucléaires ou cytosoliques liées par exemple à la signalisation (caspase 3), de facteurs de transcription (Forkhead box (FOXO)), certaines enzymes spécifiques (Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)), ce qui mènerait à activer ou désactiver comme le ferait une protéine kinase lors de la phosphorylation/déphosphorylation protéique [177;178].

1.6.4.3 Régulation et implication de la protéine Sirt-1 dans diverses voies de signalisation:

La localisation principale de Sirt-1 dans le noyau lui permet d'être un acteur majeur dans la régulation de l'acétylation du cœur d'histones comme celle des histones H3 sur la Lys⁹ (H3K9ac), H3K14ac, et H4K16ac, ou alors, par l'acétylation d'autres protéines qui ne sont pas des histones tels que les facteurs de transcriptions, ou les suppresseurs de tumeur P53 aussi bien que d'autres facteurs de régulation et cofacteurs, parmi lesquels la famille des FOXO et le peroxyosome proliferator activated receptors (PPAR) [158]. Sirt-1 est un acteur dans le contrôle de divers processus cellulaires tel que le métabolisme des lipides et du glucose en réponse en particulier au jeun et au stress, avec un processus de régulation via l'axe Sirt1-AMP-activated protéine kinase (AMPK) qui est un détecteur de l'état énergétique, avec une fonction clé dans la régulation du métabolisme énergétique. Sirt-1 permet aussi la déacétylation et une baisse d'activité de P53, un facteur de transcription suppresseur

de tumeurs un élément important lors de la prolifération et la migration cellulaire des CMLV. Cependant, Sirt-1 est une enzyme favorisant la prolifération cellulaire, et dans un même temps avec des effets suppresseurs de tumeurs [179].

1.6.5 Implication de Sirt-1 dans les MCV

La protéine Sirt-1 permet le contrôle de la différenciation et du métabolisme cellulaire, y compris des cellules endothéliales [180]. Les MCV peuvent être associées à une perturbation survenue sur la paroi des vaisseaux et un dysfonctionnement des cellules endothéliales, et sont généralement suivis par une réaction inflammatoire et un stress oxydatif [15]. Les troubles endothéliaux sont caractérisés par une présence plus élevée de certains vasoconstricteurs, notamment l'ET-1. Leur synthèse par les cellules endothéliales est essentiellement activée par une force de cisaillement plus grande sur les parois des vaisseaux ou une hypoxie vasculaire ce qui tend à perturber la structure des vaisseaux [181]. C'est un risque majeur puisque cela contribue au développement de complications vasculaires mortelles tel que l'athérosclérose, l'accident vasculaire cérébral, l'infarctus du myocarde [182]. L'effet bénéfique de Sirt-1 lors des problèmes cardiovasculaires a clairement été démontré chez des souris transgénique Sirt-1 au niveau des cellules endothéliales. On y a observé une diminution des risques d'athéroscléroses et de problèmes aux niveaux des vaisseaux, ce qui a rendu possible une meilleure protection des cellules et une plus forte résistance à une augmentation de gras qui pourrait induire des troubles sur la paroi endothéliale (plaque d'athérome) (fig.1.7)

[183]. D'un point de vue général, Sirt-1 est très exprimé lors de la croissance des cellules des vaisseaux sanguins et contribue au contrôle de l'activité angiogénique. Sirt-1 est également très exprimé dans le système vasculaire avec un important effet sur le développement des vaisseaux et une activité pro-angiogénique associée à la déacétylation et à l'inactivation de protéine comme FOXO1, qui est un facteur de transcription majeur, empêchant le développement des vaisseaux sanguins [180]. Sirt-1 peut également agir et diminuer l'action d'autres protéines de la famille FOXO tel que le FOXO 3-4 (facteurs pro-apoptotiques) ou inhiber NF- κ B, ce qui tend à diminuer l'apoptose des cellules endothéliales induite par celles-ci et dans un même temps empêcher un arrêt du cycle cellulaire, ce qui confère à Sirt-1 un rôle majeur contre la dysfonction des cellules endothéliales après une blessure ou une ischémie avec aussi une survie et une inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales [184].

Lors des MCV, la régénération des cellules endothéliales endommagées est une chose primordiale afin de maintenir une structure normale et stable des vaisseaux qui pourraient être altérés après une lésion de la cloison vasculaire. Cependant, la capacité des cellules endothéliales à se régénérer lors de l'HTA reste très limitée, ce qui a pour conséquence de laisser la barrière endothéliale un peu plus perméable à divers organismes tel que les macrophages, et aboutit à une réponse inflammatoire. L'effet bénéfique de Sirt-1 est de diminuer l'expression des molécules d'adhésion, ce qui décroît l'infiltration des tissus par les cellules à travers la plaie (fig.1.7) [185;186]. L'inhibition de Sirt-1, par exemple, chez l'humain induit une sénescence

des cellules, ce qui suggère que Sirt-1 permettrait aux cellules endothéliales de retrouver une capacité de prolifération normale ainsi qu'à terme, une restauration des parois avec une inhibition de la sénescence cellulaire. Lorsque la protéine Sirt-1 n'est pas inhibée ou dégradée, elle peut aussi déacétyler et activer les protéines (Liver kinase B1 (LKB1) et AMPK), impliqués dans les signaux cellulaires qui provoquent la croissance vasculaire endothélial et un meilleur vieillissement des tissus [187].

La régénération des cellules endothéliales est essentielle pour le maintien de la fonction des vaisseaux sanguins et particulièrement après divers troubles cardiovasculaires. Cependant, la capacité pour régénérer les cellules endothéliales est très limitée puisque une diminution de Sirt-1 a été enregistrée après une ischémie ou une blessure quelconque dans ces cellules, ce qui conduit à un arrêt de croissance et à une sénescence cellulaire. Il en résulte également une diminution de production de NO pas eNOS et donc un contrôle plus faible sur les cellules vasculaire muscles lisse sous-jacente, dans l'intima, la seconde couche des vaisseaux [188].

Également, suite à la sénescence et à l'apoptose des cellules endothéliales, il se produit une réponse inflammatoire, ce qui contribue à la prolifération accrue de la Media, vers l'intima des CMLV, avec une perte de l'élasticité des parois des vaisseaux qui a également pour conséquence d'augmenter le diamètre de l'intima, de diminuer la lumière des vaisseaux et donc de contribuer davantage à un changement et une augmentation de la pression artérielle tout en contribuant davantage aux MCV [78].

Paradoxalement, des chercheurs ont pu constater qu'après une ligature carotidienne, mimant l'effet de HTA, Sirt-1 est moins exprimé dans les CMLV ce qui leur confère une capacité de prolifération et de migration plus élevée. Sirt-1 a donc certainement un rôle protecteur lors d'une HTA et les conséquences qui en découlent, avec entre autre un effet antioxydant, anti-inflammatoire et anti-apoptotique [189].

Durant les phénomènes de resténose ou encore d'hypertension, il existe différents facteurs qui peuvent causer un trouble ou une blessure au niveau de la vasculature, tel que l'aorte, ce qui à terme active la prolifération et la migration vers l'intima des CMLV, où ces cellules vont modifier l'environnement dans lesquelles elles se trouvent et former la néointima avec des propriétés structurales qui diffèrent de la couche d'intima initialement présente, principalement par un nombre de cellules plus nombreuses et désorganisées dans l'espace [190]. L'injection par exemple, de resvératrol (un activateur de Sirt-1) à des CMLV a montré qu'après une blessure artérielle, il diminuait la formation de la néointima tout en atténuant les troubles vasculaires qui peuvent survenir lors d'une hypertension, néanmoins des effets protecteurs attribués à Sirt-1 ont été enregistrés durant une HTA, ce qui a conduit à une diminution des risques et des complications associées en particulier lors de la présence l'athérosclérose [191].

D'autres facteurs peuvent contribuer à expliquer le rôle important que pourrait avoir les vasoconstricteurs et Sirt-1 dans les CMLV. Sachant que les vasoconstricteurs stimulent la production d'ERO par les enzymes comme Nox1

(NADPH oxydase 1) dans les cellules, il a été démontré que la surexpression de Sirt-1 dans des CMLV de souris inhibe les effets hypertrophique induit par AngII en diminuant l'activité des protéines Nox, ce qui octroie à Sirt-1 un effet protecteur contre le stress oxydatif, et particulièrement celui relatif à une augmentation d'ERO par les vasoconstricteurs. Sirt-1 contribue alors au maintien d'une pression artérielle normale et empêche diverses complications vasculaires via entre autre le remodelage des parois de vaisseaux [192]. Le problème encouru lors d'une HTA au niveau des CMLV est que divers facteurs encore non étudiés, réduisent la quantité de protéines Sirt-1 de même que les effets bénéfiques qui lui sont associé à l'égard des MCV [176].

La protéine Sirt-1 permet la prolifération et la migration des cellules endothéliales alors qu'au niveau des CMLV, Sirt-1 à une action différente encore peu connue et qui mérite d'être davantage étudiée. Par conséquent, la présente étude vise à examiner l'effet l'ET-1 sur l'expression Sirt- 1 dans les CMLV. En outre, nous avons cherché à savoir si ET-1 est impliqué dans la diminution d'expression de Sirt-1 dans les CMLV et par quel mécanisme et voie de signalisation cela se produit.

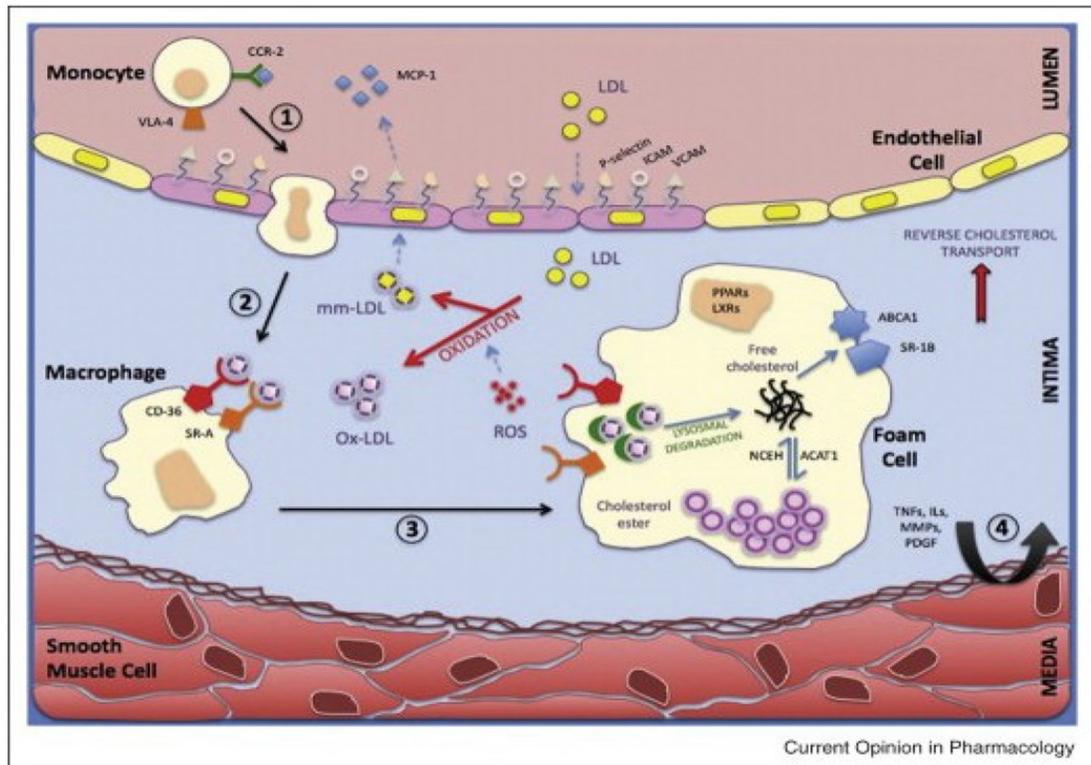


Figure 1.7 Inflammation et stress oxydatif lors d'une plaque d'athérome.

Il se produit une surproduction des molécules d'adhésions vasculaires (P-selectin, ICAM, VCAM) qui facilite la liaison et l'adhésion des monocytes à l'endothélium, en plus de la synthèse de MCP1 par les cellules endothéliales et de leur liaison aux récepteurs d'activation des monocytes CCR2 (étape 1). Le LDL absorbé par l'endothélium est transformé en Ox-LDL par l'action des ROS. Après avoir migré à travers l'endothélium, les monocytes se différencient en macrophages en présence de différents facteurs tel que MCSF (étape 2). Ces macrophages nouvellement constitués accumulent des ox-LDL à travers l'absorption des récepteurs (CD-38 et SR-A) ce qui forme des cellules spumeuses (étape 3). L'interaction entre les cellules spumeuses et les cellules de l'inflammation (cellules T) mènent à la production de facteurs de l'inflammation ce qui permet la migration des cellules musculaires lisses vers l'intima pour ainsi former la néointima (étape 4).

ICAM, InterCellular Adhesion Molecule; CCR2, C-C chemokine receptor type 2; VCAM, Vascular cell adhesion protein; MCP1, monocyte chemotactic protein-1; Ox-LDL, Oxidized LDL; MCSF, Macrophage colony-stimulating factor; CD38 (cluster of differentiation 38) SR-A Scavenger Receptor Class A.

(Smith A. Curr. Opin. Pharmacol. 2009;9:109–118)

1.7 Objectifs de la présente étude

Comme indiqué plus haut, les vasoconstricteurs, et en particulier l'ET-1, sont des molécules actives et très puissantes, par leurs capacités à réguler diverses fonctions cardiovasculaires en jouant un rôle physiologique important mais également dans certaines pathophysiologies. L'ET-1 active de multiples voies de signalisation, notamment les MAPK et PI3-K/PKB qui interviennent dans les réponses hypertrophiques et prolifératives dans les CMLV. En outre, Sirt-1 contribuant au maintien de l'équilibre contre les MCV, agit comme un agent anti-hypertrophique et anti-prolifératif dans de nombreux types cellulaires. Il apparaît être donc une cible potentielle, puisque durant l'HTA une diminution d'expression de Sirt-1 dans les CMLV est enregistrée. Le mécanisme précis par lequel Sirt-1 contribue à la cardioprotection et comment les réponses physiologiques et son association à divers facteurs, tel que ET-1, peuvent moduler ses effets dans les CMLV demeurent inexplorés. Par conséquent, les études suivantes permettent d'avoir une idée afin de mieux saisir ce processus. Ainsi, l'objectif des présentes études était:

Dans un premier temps de déterminer le lien existant entre Sirt-1 et ET-1 durant l'hypertrophie et la prolifération cellulaire. Par conséquent, le premier objectif de notre présente étude est d'examiner dans les CMLV, l'implication potentielle de la protéine Sirt-1 dans la signalisation induite par l'activation d'ET-1. Dans un deuxième temps, pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire par lequel l'ET-1 agit et module son effet prolifératif et hypertrophique, notamment en y impliquant

celle de Sirt-1, on a essayé de voir pour commencer, par quel récepteur (ET_A/ET_B) cela se produisait, en utilisant des inhibiteurs de ces récepteurs.

CHAPITRE 2: PRÉSENTATION DES RESULTATS

Matériels et Méthodes

Anticorps et réactifs:

Les réactifs de culture cellulaire ont été obtenus auprès d'Invitrogen Corp. (Grand Island, NY, États-Unis). La protéine d'ET-1 recombinant humaine a été achetée chez American Peptide Inc. (Vista, CA, États-Unis). L'anticorps spécifique anti-Sirt-1, et l'anti- β -actine, ainsi que la peroxydase de raifort conjugué à l'anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris étaient de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, États-Unis). L'anticorps de Sirt-3 est de Cell Signaling (Beverly, MA, États-Unis). Le kit de détection de chimioluminescence amplifiée (ECL) est d'Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Qc, Canada).

Culture et stimulation des CMLV:

Les CMLV A-10 sont dérivées de l'aorte de rat embryonnaire thoracique et celle isolées de rats Sprague Dawley (SD) ont été maintenues en culture avec du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 10% de sérum fœtal bovin (FBS) et 1% de pénicilline et de streptomycine (PS), à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% CO₂. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence de 80-90% dans des plaques de 60 mm et incubées dans du DMEM sans sérum 5 heures avant le traitement avec les inhibiteurs et l'ET. Elles ont été soumises deux fois par semaine à la récolte avec la trypsine/EDTA. Toutes les cellules utilisées avaient un passage entre 5 et 10.

Isolation des cellules :

Les rats adultes mâles, SD (14 semaines) étaient placés dans des cages en plastiques sous un cycle de 12 heures de lumière et d'obscurité à 23 ± 2 °C avec une nourriture régulière de laboratoire. Les animaux ont été tués à la guillotine, puis leur aorte a été prélevée. Celle-ci a été débarrassée du gras. L'aorte est ensuite coupée longitudinalement, et déposée dans des tubes avec de la collagénase I (3 mg/ml) et du DMEM sans FBS, puis laissée à 37 °C durant 30 minutes. Suite à cela, l'aorte est transférée dans un pétris contenant du DMEM, du FBS 10% et du PS 2%. L'intérieur de l'aorte est gratté avec un instrument afin de retirer les cellules endothéliales. Elle est nettoyée avec du DMEM, coupée en petit morceaux puis déposée dans un tube contenant 15 ml de milieu DMEM sans FBS avec de la collagénase III (1 mg) et de l'élastase (1 mg). Le mélange est laissé à 37° pendant 1h ensuite il est centrifugé 3 min à 250 g. Le surnageant est aspiré et le culot est trituré avec du DMEM supplémenté avec du FBS. Ce mélange est ensuite déposer dans des pétris en déposant 2 ml du mélange avec 10ml de milieu de culture contenant du DMEM, du FBS et de la PS puis laisser des pétris dans un incubateur pour débiter la culture cellulaire de CMLV.

Immunoblot:

Les cellules incubées en absence ou en présence de différents agents ont été lavées deux fois avec du PBS glacé et lysées dans 200 µl de tampon (25 nM Tris-HCl, pH 7.5. 25 mM NaCl, 1mM Na orthovanadate, 10mM Na fluoride, 10 mM Na

pyrophosphate, 2 mM benzamidine, 2 mM ethylenebis (oxyethylenitrilo)-tetraacetic acid (EGTA), 2 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) et 0.5 µg/ml leuleptin) sur la glace. Les cellules ont été grattées, recueillies et centrifugées à 12.000 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les matières insolubles. Les concentrations de protéines ont été mesurées en utilisant un dosage Bradford. Des quantités égales de protéines ont été soumises à un gel de SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) de 7,5%, puis transféré sur les membranes de difluorure de vinylidène (PVDF) (Millipore, MA, États-Unis). Les membranes ont été bloquées 1 heure avec du PBS-Tween 20 contenant 5% de lait écrémé en poudre à température ambiante, puis incubées une nuit à 4°C avec des anticorps primaires respectifs : monoclonal Sirt-1 (1 :2000), Sirt-3 (1 :2000) et β-actine (1 : 20000)). Le complexe antigène-anticorps est détecté par l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort (*HRP*), et les bandes de protéines ont été visualisées par ECL. L'intensité des bandes a été quantifiée par analyse densitométrique en utilisant les logiciels Quantity One et Graphpad Prism 5.

Statistiques:

L'analyse statistique a été effectuée par one-way, analyse de variance à mesures répétées (ANOVA) suivie d'un test post hoc de Tukey. Toutes les données sont rapportées comme moyenne + SE. Les différences entre les moyennes ont été considérées comme significatives à $P < 0,05$.

Résultats

Expression de Sirt-1 en fonction du temps dans les CMLV

La protéine d'ET-1 active les voies de signalisation via ses récepteurs GPCR, et notamment, elle permet la transactivation au R-TK. Ce dernier est notamment impliqué dans la diminution d'expression de Sirt-1. Pour cette raison, nous avons voulu savoir si la stimulation avec l'ET-1 sur des cellules isolées de l'aorte (culture primaire) de rats SD ainsi que sur des cellules embryonnaires immortalisées de rat (A10) pouvait permettre d'en arriver au même résultat. Il est connu que la stimulation des CMLV par l'ET-1 peut mener à différentes réponses intracellulaires en activant diverses cascades de signalisation et notamment PKB. Ainsi, les résultats démontrent, qu'après stimulation, le niveau d'expression de Sirt-1 diminue progressivement au cours du temps, mais de manière significative après 1 heure chez les A10 et dès 30 min dans les cultures primaires de rat SD (Fig. 1A). Les cellules immortalisées A10 ont une prolifération et migration cellulaire plus grande que celles des SD ainsi que des mécanismes intracellulaires qui peuvent être différents. Tout cela influence la durée de diminution de Sirt-1 entre ces deux types cellulaires. De plus, cette diminution d'expression est spécifique à Sirt-1, puisque le niveau d'expression de Sirt-3 ne change pas au cours du temps (Fig1.A). Il est aussi intéressant de noter que l'effet d'ET-1 est observé autant avec les cellules immortalisées (A10) que les cellules de culture primaire (SD).

A

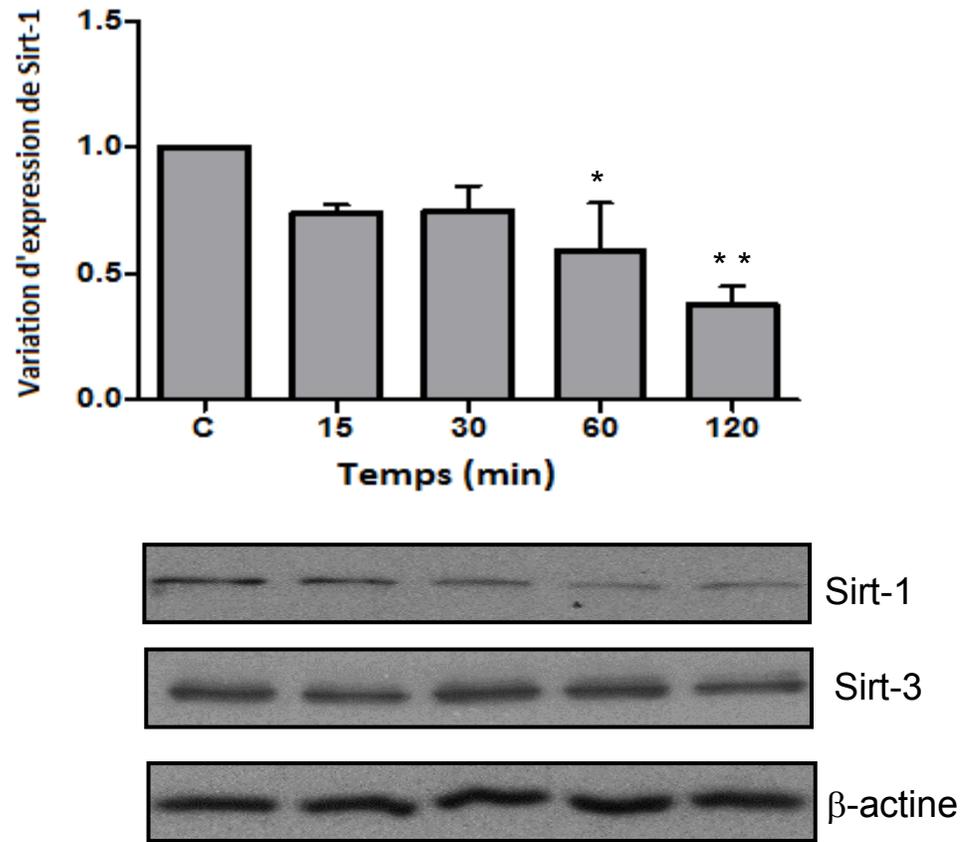


Figure 1

B

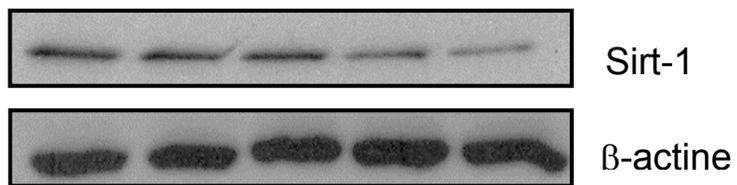
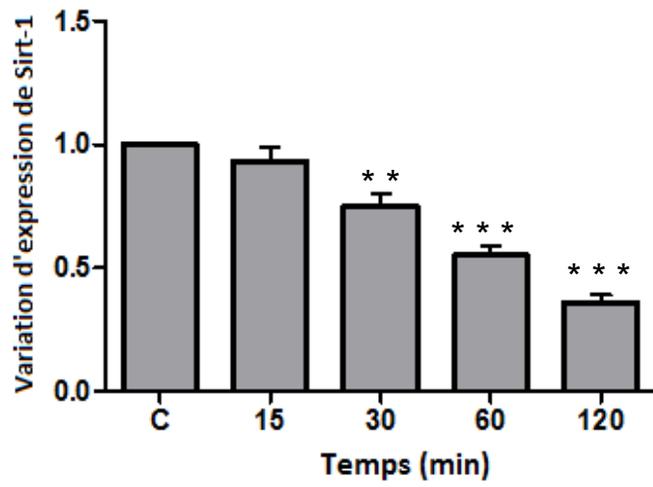


Figure 1

Effet des antagonistes du récepteur ET-1, BQ123/788, sur la suppression de l'expression de Sirt-1 induite par ET-1 dans les CMLV

Nous venons de démontrer que la stimulation des cellules par ET-1 via ses récepteurs a un effet sur la signalisation induisant la diminution d'expression de Sirt-1 chez les CMLV de SD et les A10. Cependant, pour la suite de nos expériences nous choisirons de travailler avec les A10, puisque ce sont les types cellulaires pratiqués à utiliser. De ce fait, il est essentiel de déterminer quel récepteur est impliqué afin de pouvoir déterminer dans l'avenir quelle protéine il est judicieux de cibler. Après avoir préincubé nos cellules pendant 30 minutes avec les inhibiteurs BQ 123 et 788 respectivement inhibiteurs des récepteurs GPCR ET_A et ET_B, les cellules ont été stimulées pendant deux heures avec l'ET-1. Nous avons clairement pu voir une diminution d'expression de Sirt-1 malgré la présence de l'inhibiteur BQ 788, mais une expression normale dans les cellules préincubées avec le BQ 123. En l'absence d'ET-1, BQ 788 et BQ 123 seul n'ont aucun effet sur les cellules CMLV [193]. Nos résultats nous permettent d'affirmer qu'ET-1 diminue l'expression de Sirt-1 après deux heures via les récepteurs ET_A.

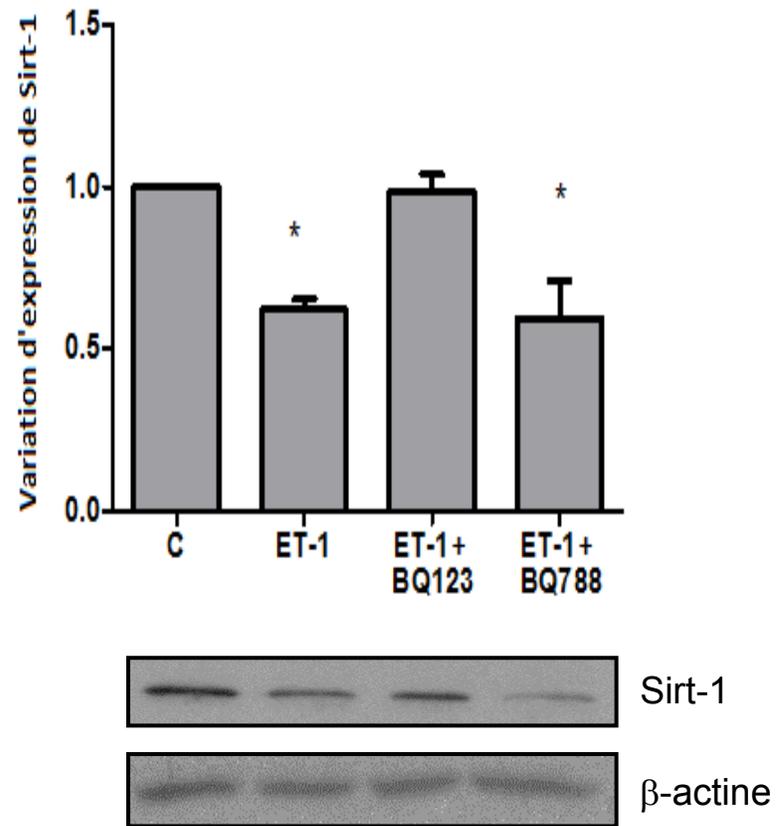


Figure 2

Légende des figures

Figure 1. Expression de Sirt-1 en fonction du temps dans les CMLV.

A. Les cellules A-10 sont mises au repos dans un milieu sans sérum durant 5 heures puis elles sont ensuite traitées avec 100 nM d'ET-1 pour des périodes déterminées **B.** Les cellules SD sont mises au repos avec un milieu sans sérum puis par la suite, elles sont traitées avec 100 nM d'ET-1 pour des périodes de temps déterminées. Les lysats cellulaires ont été préparés et incubés avec l'anticorps Sirt-1 et Sirt-3 (panneau du dessous). Les membranes PVDF contenant nos protéines sont aussi analysées avec la β -actine. Les diagrammes (panneau du dessus) représentent la moyenne des données quantifiées par balayage densitométrique des bandes de protéines indiquées dans le panneau inférieur. Les valeurs sont la moyenne \pm SE de 6 transferts de Western blot distincts, de 3 expériences indépendantes qui ont été effectuées en double exemplaire, et sont exprimées comme l'augmentation d'expression de la protéine par rapport à l'expression basale, qui est pris comme 1. Aucun résultat n'a été exclu. Chaque résultat est comparé au contrôle P <0,05 est considéré comme statistiquement significatif par rapport à ET-1 seul. * Indique que P <0,05, ** indique que P <0,005, et *** indique que P <0,0005.

Figure 2. Effet des antagonistes du récepteur ET-1, BQ123/788, sur l'expression de Sirt-1 induite par ET-1 dans les CMLV (A10).

A. Les cellules A-10 sont mises au repos dans un milieu sans sérum durant 5 heures puis elles ont ensuite été prétraitées avec ou sans 10 μ M de BQ 123 et BQ 788 durant 30 minutes, suivies par le traitement de 100 nM d'ET-1 durant 120 min. Les lysats cellulaires ont été préparés et incubé avec l'anticorps Sirt-1 (panneau du dessous). Les membranes PVDF contenant nos protéines sont aussi analysées avec la β -actine. Les diagrammes (panneau du dessus) représentent la moyenne des données quantifiées par balayage densitométrique des bandes de protéines indiquées dans le panneau inférieur. Les valeurs sont la moyenne \pm SE de 6 transferts de Western blot distincts, de 3 expériences indépendantes qui ont été effectuées en double exemplaire, et sont exprimés comme l'augmentation d'expression de la protéine par rapport à l'expression basale, qui est pris comme 1. Aucun résultat n'a été exclu. Chaque résultat est comparé au contrôle. P <0,05 est considéré comme statistiquement significatif par rapport à ET-1 seul. * Indique que P <0,05, ** indique que P <0,005, et *** indique que P <0,0005.

CHAPITRE 3 :
DISCUSSION ET CONCLUSION
GENERALE

Discussion

ET-1 est le peptide vasoconstricteur le plus puissant qui a été découvert, il y a à peine 25 ans [9]. Diverses études ont été réalisées au cours des années qui ont suivi afin de clarifier le rôle physiologique et physiopathologique d'ET-1 dans les systèmes multiples du corps, mais de nombreuses questions restent néanmoins encore en suspens. Dans le système vasculaire, l'ET-1 joue un rôle de vasoconstriction basal (rôle tonique) et une surproduction d'ET-1 a été suggérée parmi les facteurs contribuant à l'apparition de maladies vasculaires comme l'HTA, les cardiomyopathies et l'athérosclérose [76]. L'ET-1 contribue aussi à la force et au rythme de contractilité du myocarde, l'insuffisance cardiaque, les maladies rénales et endocriniennes [13;76]. Basé sur des données expérimentales, certains traitements sont susceptibles d'inhiber les altérations fonctionnelles et structurelles induites par ET-1 dans le système vasculaire [194]. Malgré les récentes progressions pour diminuer les effets néfastes d'ET-1, une meilleure connaissance sur ses voies de signalisation intracellulaire serait importante pour l'élaboration d'agents thérapeutiques spécifiques à l'encontre des éléments essentiels de signalisation impliqués dans le remodelage vasculaire. L'ET-1 provoque ses effets à travers la stimulation de ses GPCR qui conduisent à l'activation et la phosphorylation de diverses protéines comprenant aussi bien les protéines kinases de la famille Raf, que les kinases lipidiques de la famille la PI-3K [195]. Ces deux voies sont impliquées notamment dans la croissance, l'hypertrophie et la prolifération cellulaire, des phénomènes important par lesquels l'ET-1 développe les pathologies rencontrées

durant l'HTA et les MCV. En parallèle, il est également connu à travers plusieurs études réalisées dans les CMLV qu'ET-1 était capable d'induire une variation de la synthèse des protéines et de l'ARNm [84]. D'autres études ont démontré le rôle important que pouvait avoir une plus faible expression de certaines protéines dans l'hypertrophie et la migration cellulaire durant l'HTA [191], ce qui laisse penser une implication possible des protéines, tels que les HDAC, dans la variation d'expression des gènes et d'expression de protéines. Parmi les HDAC, Sirt-1 est la plus étudiée et la plus impliquée dans les pathologies en général, et particulièrement celles concernant les MCV [196].

Bien que la régulation de l'activation de Sirt-1 ne soit pas encore complètement connue, plusieurs voies cellulaires ont été identifiées dans différentes conditions. La restriction calorique, l'exercice et le stress oxydatif ont été identifiés comme des facteurs importants dans la variation d'expression de Sirt-1. Il a alors été constaté que la surexpression de Sirt-1 peut inhiber la prolifération et l'hypertrophie des CMLV, qui sont considérés comme des contributeurs essentiels à l'athérosclérose et aux MCV. Par exemple, la surexpression de Sirt-1 dans des CMLV a diminué l'hypertrophie de ceux-ci malgré la stimulation par l'Ang II [197]. L'expression et l'activation de Sirt-1 dans les cellules est alors cruciale, car elle confère une protection observée des cellules telles que les cardiomyocytes.

Dans notre étude, on observe qu'une exposition de deux heures à l'ET-1 entraîne une diminution des niveaux de Sirt-1 dans les cellules vasculaires de muscles

lisses. Une diminution aussi rapide de la concentration d'une protéine suggère l'activation de mécanisme de dégradation Sirt-1. L'ARNm de Sirt-1 est stabilisé par différents processus, entre autre par des protéines (tel que l'antigène humain R (HuR)) qui s'associent à l'ARNm pour en conserver l'expression. L'altération de ce processus diminue la stabilité de l'ARNm de Sirt-1 et mériterait d'être exploré [198]. De plus, les protéines Sirt-1 lorsqu'elles sont phosphorylées, cela active leur ubiquitination ce qui va induire leur dégradation par le protéasome, il serait alors aussi important de voir si dans notre cas, cette voie est présente dans la diminution d'expression de Sirt-1 après stimulation des CMLV par ET-1 [199].

L'expression de Sirt-1 peut aussi être modifiée par certaines protéines de liaison à l'ARNm, qui peuvent se lier à la région non traduite en 3' de l'ARNm de Sirt-1, ce qui conduit à la stabilisation et à la régulation positive de l'expression de Sirt-1 [200]. Cependant, lors d'un stress oxydatif, suite à une stimulation des cellules, les protéines de liaisons sont phosphorylées, ce qui entraîne la dissociation de l'ARNm de Sirt-1 avec ses protéines de stabilisation, puis conduit à la dégradation d'ARNm et à une diminution de son expression [201]. La cytoprotection de Sirt-1 a été suggéré comme un facteur de la réduction du risque de maladie coronarienne [202]. Dans les cellules endothéliales, Sirt-1 peut aussi servir comme un facteur anti-athérosclérose, en diminuant les risques vu par une haute teneur en gras résultant d'une dysfonction cellulaires endothéliales vasculaires qui porte atteinte à l'intégrité de l'endothélium et qui favorise une plaque d'athérome [203]. Les cellules

endothéliales dysfonctionnelles mènent également à l'activation des plaquettes et des thrombus des vaisseaux. Donc, contrairement aux effets néfastes vus sur ces évènements par la surexpression d'ET-1, celle de la protéine Sirt-1 peut en revanche protéger les cellules endothéliales du stress oxydatif et de l'apoptose constamment présent lors de l'HTA [204]. L'activation de Sirt-1 améliore également à travers la régulation de l'expression d'eNOS, la production du NO [205]. En outre, les propriétés antiplaquettaires de Sirt-1 peuvent, à l'inverse d'ET-1, contribuer à prévenir l'athérosclérose et fonctionner comme un élément important pour se protéger des MCV [206]. Ceci a été récemment démontré lors d'une ligature de l'artère carotide, mimant l'effet d'une HTA et où se produit suite à cela une augmentation de vasoconstricteurs, les chercheurs ont pu constater qu'il y avait une diminution de Sirt-1, ainsi qu'une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire. D'autres études ont montré que Sirt-1 joue un rôle essentiel dans la régulation de la diffusion des signaux de certains facteurs de croissance, de cytokines et de vasoconstricteurs tels que le TNF- α et Ang-II présents en plus grande quantité lors de MCV [168;189].

La participation de Sirt-1 dans l'activation de voies de signalisation de divers facteurs, et notamment de constricteurs est unanime, mais cela n'a jamais été démontré pour le plus puissant d'entre eux, ET-1, dans les CMLV lors de MCV. C'est dans cette optique que nous avons décidé d'étudier le rôle et le lien que pouvait avoir Sirt-1 et ET-1 qui sont des acteurs clés dans la médiation des évènements cellulaires. Dans cette étude, nous avons utilisé deux stratégies différentes: La

stimulation des CMLV par ET-1 en fonction du temps, et des inhibiteurs pharmacologiques classiques. Cette étude est la première à signaler une action d'ET-1 sur la protéine Sirt-1 dans les CMLV normales et différenciés, SD et A10 (fig.1. A et B) et cela de manière spécifique, car Sirt-3, une HDAC de même classe que Sirt-1, n'a pas subi de variation d'expression (Fig.1. A). Cependant, la contribution de la modulation d'expression de Sirt-1 induit les voies de signalisation dans les CMLV demeure obscure et doit être clarifiée. Par conséquent, dans la seconde approche de notre étude, nous avons étudié le rôle des récepteurs d'ET-1 sur l'expression de Sirt-1. L'inhibition du récepteur ET_A a permis d'abolir la diminution d'expression de Sirt-1 (Fig.2) dans les CMLV. Cette constatation appuie l'idée que Sirt-1 joue un rôle dans la signalisation induite par ET-1 dans les CMLV. La β -actine, une protéine de structure, est présente en égal quantité dans chaque puit, ce qui nous garantit une concentration de protéine stable et également dosée.

Au terme des contributions connues par ces deux protéines (ET-1, Sirt-1), il peut être suggéré qu'une plus faible expression de la protéine Sirt-1 via l'activation par ET-1 des voies de signalisation peut permettre de contribuer à la régulation de divers processus cellulaires, y compris la croissance cellulaire, la prolifération, l'hypertrophie et la survie dans les CMLV. Ainsi, l'inhibition de Sirt-1 peut être une bonne stratégie pour prévenir ou traiter les troubles physiologiques durant l'HTA. L'activation de Sirt-1 contrairement à ET-1, assure par exemple, la protection cellulaire contre le stress oxydatif et la production des ERO, un mécanisme clé dans

la progression de nombreuses pathologies, incluant les MCV. Plusieurs cibles de signalisation cellulaire de Sirt-1 récemment identifiées peuvent potentiellement réduire les risques de MCV. Pourtant, il est clair que Sirt-1 module un ensemble complexe de voies en aval qui peuvent être essentiels pour déterminer à la fois la survie des cellules et la longévité cellulaire. En outre, Sirt-1 semble fonctionner comme une voie strictement réglementée qui varie selon son niveau d'expression et qui peut être bénéfique aux cellules cardiaques au cours de l'exposition aux pathologies telle que l'HTA. Par conséquent, les travaux futurs dans ce domaine au cours des prochaines années sont nécessaires pour surmonter les défis importants où il sera essentiel de comprendre l'interaction entre Sirt-1, les vasoconstricteurs et les voies associées dans le système cardiovasculaire, afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour les systèmes cardiovasculaires et d'éliminer, ou tout au moins, limiter les conséquences nuisibles qui peuvent en découler.

Conclusions et perspectives

Cette étude nous a permis de découvrir un mécanisme d'action d'ET-1. Dans l'ensemble, les résultats que nous avons présentés dans ce mémoire suggèrent que l'ET-1 active les voies de signalisations chez les CMLV via le récepteur ET_A afin de diminuer spécifiquement au cours du temps l'expression de la protéine Sirt-1, et cela se fait de manière significative après deux heures d'exposition à l'ET-1. Même si nous avons souligné le rôle important d'ET-1 dans la phosphorylation et l'activation chez les CMLV, il reste beaucoup à connaître sur sa régulation, ses implications et son mode d'action. Nos prochaines recherches porteront sur le rôle que pourraient avoir les Receptor protein tyrosine kinase (R-PTK) et les voies de signalisations impliquées dans les réponses hypertrophiques et prolifératives induites par l'ET-1 et les facteurs de croissance, dans la diminution de la quantité au cours du temps de Sirt-1 dans les CMLV. Il sera aussi important de tester le rôle du protéasome et la stabilité de l'ARNm de Sirt-1. Clarifier ces points nous aidera à mieux comprendre, les facteurs et mécanismes potentiellement impliqués dans le mode d'action d'ET-1 sur la diminution d'expression de Sirt-1 induite dans les CMLV.

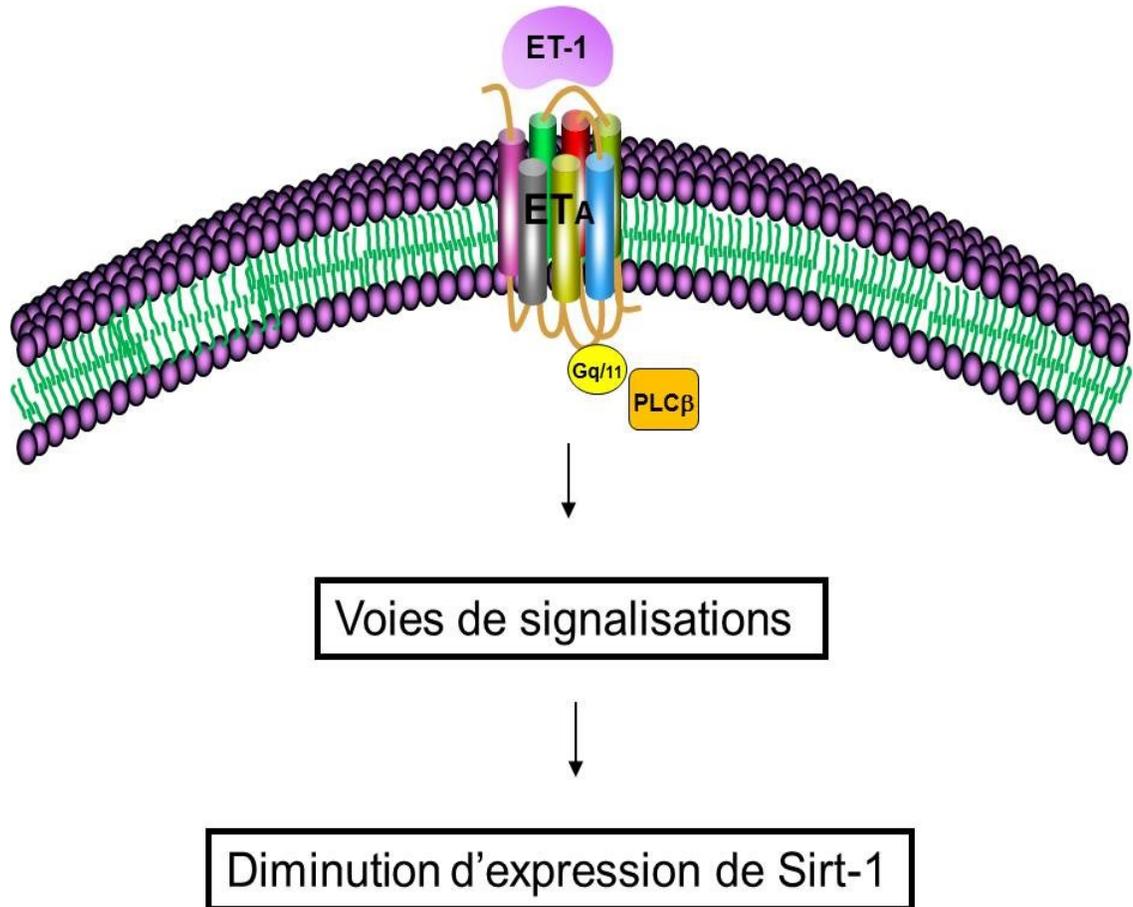


Figure 3.1 Schéma d'un modèle hypothétique résumant l'action d'ET-1 sur Sirt-1 via les voies de signalisation dans les cellules musculaires lisses vasculaires.

La capacité d'ET-1 à lier ses récepteurs membranaires GPCR, induisent en aval diverses voies de signalisation. Les récepteurs ET_A, stimulés par l'ET-1, vont activer différentes voies de transmission du signal, aboutissant à la diminution de l'expression de Sirt-1 dans les CMLV.

CHAPITRE 4 :

BIBLIOGRAPHIE

Reference List

1. **Dr Ala Alwan. Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles. 2011. Ref Type: Internet Communication**
2. **Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. Circulation 2000; 101(3):329-335.**
3. **Branicki FJ, Coleman SY, Pritchett CJ, Cheung WL, Tuen H, Fok PJ et al. Emergency surgical treatment for nonvariceal bleeding of the upper part of the gastrointestinal tract. Surg Gynecol Obstet 1991; 172(2):113-120.**
4. **Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340(2):115-126.**
5. **Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. Physiol Rev 2003; 83(1):59-115.**
6. **Hong YM. Cardiomyopathies in children. Korean J Pediatr 2013; 56(2):52-59.**
7. **Accorsi-Mendonca D, Correa FM, Paiva TB, de Souza HP, Laurindo FR, de Oliveira AM. The balloon catheter induces an increase in contralateral carotid artery reactivity to angiotensin II and phenylephrine. Br J Pharmacol 2004; 142(1):79-88.**
8. **Morrell NW, Atochina EN, Morris KG, Danilov SM, Stenmark KR. Angiotensin converting enzyme expression is increased in small pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. J Clin Invest 1995; 96(4):1823-1833.**
9. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988; 332(6163):411-415.**
10. **Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis 1989; 78(2-3):225-228.**

11. Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1990; 258(3 Pt 1):C408-C415.
12. Schiffrin EL. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension* 1995; 25(6):1135-1143.
13. Rabelink TJ, Kaasjager KA, Boer P, Stroes EG, Braam B, Koomans HA. Effects of endothelin-1 on renal function in humans: implications for physiology and pathophysiology. *Kidney Int* 1994; 46(2):376-381.
14. Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC et al. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 2000; 275(48):37895-37901.
15. Daou GB, Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate Endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(2):208-215.
16. Araki S, Haneda M, Togawa M, Kikkawa R. Endothelin-1 activates c-Jun NH2-terminal kinase in mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 51(3):631-639.
17. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):730-732.
18. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303):732-735.
19. Callera G, Tostes R, Savoia C, Muscara MN, Touyz RM. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5(3):531-552.
20. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2863-2867.

21. Nakajima K, Kumagaye S, Nishio H, Kuroda H, Watanabe TX, Kobayashi Y et al. Synthesis of endothelin-1 analogues, endothelin-3, and sarafotoxin S6b: structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S8-12.
22. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989; 264(25):14954-14959.
23. Nakajima K, Kumagaye S, Nishio H, Kuroda H, Watanabe TX, Kobayashi Y et al. Synthesis of endothelin-1 analogues, endothelin-3, and sarafotoxin S6b: structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S8-12.
24. Ferri C, Bellini C, De AC, De SL, Perrone A, Properzi G et al. Circulating endothelin-1 concentrations in patients with chronic hypoxia. *J Clin Pathol* 1995; 48(6):519-524.
25. Knothe CH, Boldt J, Zickmann B, Konstantinov S, Dick P, Dapper F et al. Influence of different flow modi during extracorporeal circulation on endothelial-derived vasoactive substances. *Perfusion* 1995; 10(4):229-236.
26. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1):51-60.
27. Wanstall JC, Jeffery TK. Recognition and management of pulmonary hypertension. *Drugs* 1998; 56(6):989-1007.
28. Lee ME, Bloch KD, Clifford JA, Quertermous T. Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J Biol Chem* 1990; 265(18):10446-10450.
29. Plumpton C, Champeney R, Ashby MJ, Kuc RE, Davenport AP. Characterization of endothelin isoforms in human heart: endothelin-2 demonstrated. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S26-S28.
30. Howard PG, Plumpton C, Davenport AP. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens* 1992; 10(11):1379-1386.

31. Maguire JJ, Johnson CM, Mockridge JW, Davenport AP. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1997; 122(8):1647-1654.
32. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 1998; 428(3):304-308.
33. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995; 270(25):15262-15268.
34. Miyauchi T, Suzuki N, Kurihara T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Matsumoto H et al. Endothelin-1 and endothelin-3 play different roles in acute and chronic alterations of blood pressure in patients with chronic hemodialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178(1):276-281.
35. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke* 1991; 22(3):378-383.
36. Goldie RG. Endothelins in health and disease: an overview. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26(2):145-148.
37. Abassi ZA, Golomb E, Bridenbaugh R, Keiser HR. Metabolism of endothelin-1 and big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase EC.3.4.24.11. *Br J Pharmacol* 1993; 109(4):1024-1028.
38. Michael JR, Markewitz BA. Endothelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(3 Pt 1):555-581.
39. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 2011; 91(1):1-77.
40. Endoh M, Fujita S, Yang HT, Talukder MA, Maruya J, Norota I. Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca²⁺ transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci* 1998; 62(17-18):1485-1489.
41. Vierhapper H, Hollenstein U, Roden M, Nowotny P. Effect of endothelin-1 in man--impact on basal and stimulated concentrations of luteinizing

hormone, follicle-stimulating hormone, thyrotropin, growth hormone, corticotropin, and prolactin. *Metabolism* 1993; 42(7):902-906.

- 42. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci* 1992; 50(4):247-255.**
- 43. Gellai M, Fletcher T, Pullen M, Nambi P. Evidence for the existence of endothelin-B receptor subtypes and their physiological roles in the rat. *Am J Physiol* 1996; 271(1 Pt 2):R254-R261.**
- 44. Fujitani Y, Oda K, Takimoto M, Inui T, Okada T, Urade Y. Autocrine receptors for endothelins in the primary culture of endothelial cells of human umbilical vein. *FEBS Lett* 1992; 298(1):79-83.**
- 45. Alonso D, Radomski MW. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev* 2003; 8(1):107-115.**
- 46. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199(3):1461-1465.**
- 47. D'Souza FM, Sparks RL, Chen H, Kadowitz PJ, Jeter JR, Jr. Mechanism of eNOS gene transfer inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(1):C191-C199.**
- 48. Twort CH, van BC. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca²⁺ by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. *Circ Res* 1988; 62(5):961-964.**
- 49. Yazawa M, Kuwayama H, Yagi K. Modulator protein as a Ca²⁺-dependent activator of rabbit skeletal myosin light-chain kinase. Purification and characterization. *J Biochem* 1978; 84(5):1253-1258.**
- 50. Clozel M, Clozel JP. Effects of endothelin on regional blood flows in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 250(3):1125-1131.**
- 51. Han SP, Trapani AJ, Fok KF, Westfall TC, Knuepfer MM. Effects of endothelin on regional hemodynamics in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 1989; 159(3):303-305.**

52. Pieske B, Beyermann B, Breu V, Loffler BM, Schlotthauer K, Maier LS et al. Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 1999; 99(14):1802-1809.
53. Watanabe T, Kusumoto K, Kitayoshi T, Shimamoto N. Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in in vivo and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S108-S111.
54. Qi XL, Sia YT, Stewart DJ, Wei G, Nguyen QT, Cernacek P et al. Myocardial contractile responsiveness to endothelin-1 in the post-infarction rat model of heart failure: effects of chronic quinapril. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(11):2023-2035.
55. Maeda S, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi T, Goto K, Sugishita Y et al. Endothelin-1 in the heart during exercise. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S392-S394.
56. Edwards RM, Trizna W, Ohlstein EH. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol* 1990; 259(2 Pt 2):F217-F221.
57. King AJ, Brenner BM, Anderson S. Endothelin: a potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J Physiol* 1989; 256(6 Pt 2):F1051-F1058.
58. Inscho EW, Imig JD, Cook AK, Pollock DM. ETA and ETB receptors differentially modulate afferent and efferent arteriolar responses to endothelin. *Br J Pharmacol* 2005; 146(7):1019-1026.
59. Kohan DE. Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells. *Am J Physiol* 1991; 261(2 Pt 2):F221-F226.
60. Kitamura K, Tanaka T, Kato J, Eto T, Tanaka K. Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(1):348-352.
61. Zeidel ML, Brady HR, Kone BC, Gullans SR, Brenner BM. Endothelin, a peptide inhibitor of Na(+)-K(+)-ATPase in intact renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol* 1989; 257(6 Pt 1):C1101-C1107.

62. Oishi R, Nonoguchi H, Tomita K, Marumo F. Endothelin-1 inhibits AVP-stimulated osmotic water permeability in rat inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1991; 261(6 Pt 2):F951-F956.
63. Pollock DM, Pollock JS. Evidence for endothelin involvement in the response to high salt. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(1):F144-F150.
64. Ahn D, Ge Y, Stricklett PK, Gill P, Taylor D, Hughes AK et al. Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention. *J Clin Invest* 2004; 114(4):504-511.
65. Kato T, Kassab S, Wilkins FC, Jr., Kirchner KA, Keiser J, Granger JP. Endothelin antagonists improve renal function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25(4 Pt 2):883-887.
66. Yukimura T, Yamashita Y, Miura K, Kim S, Iwao H, Takai M et al. Renal vasodilating and diuretic actions of a selective endothelin ETB receptor agonist, IRL1620. *Eur J Pharmacol* 1994; 264(3):399-405.
67. Cozza EN, Gomez-Sanchez CE, Foeking MF, Chiou S. Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J Clin Invest* 1989; 84(3):1032-1035.
68. Boarder MR, Marriott DB. Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5:S223-S224.
69. Fukuda Y, Hirata Y, Yoshimi H, Kojima T, Kobayashi Y, Yanagisawa M et al. Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155(1):167-172.
70. Takagi M, Tsukada H, Matsuoka H, Yagi S. Inhibitory effect of endothelin on renin release in vitro. *Am J Physiol* 1989; 257(6 Pt 1):E833-E838.
71. Kawaguchi H, Sawa H, Yasuda H. Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J Hypertens* 1991; 9(2):171-174.
72. Conte D, Questino P, Fillo S, Nordio M, Isidori A, Romanelli F. Endothelin stimulates testosterone secretion by rat Leydig cells. *J Endocrinol* 1993; 136(2):R1-R4.

73. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50(5):1126-1133.
74. Chai SP, Chang YN, Fong JC. Endothelin-1 stimulates interleukin-6 secretion from 3T3-L1 adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(3):213-218.
75. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 1997; 96(6):1976-1982.
76. Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 Suppl 2:S3-S6.
77. Luscher TF. Endothelial control of vascular tone and growth. *Clin Exp Hypertens A* 1990; 12(5):897-902.
78. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1996; 93(12):2178-2187.
79. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988; 238(2):249-252.
80. Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Yoshikawa J. Effect of the endothelin family of peptides on human coronary artery smooth-muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S84-S89.
81. Lariviere R, Sventek P, Thibault G, Schiffrin EL. Endothelin-1 expression in blood vessels of DOCA-salt hypertensive rats treated with the combined ETA/ETB endothelin receptor antagonist bosentan. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73(3):390-398.

82. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 2000; 36(3):312-318.
83. Flamant M, Tharaux PL, Placier S, Henrion D, Coffman T, Chatziantoniou C et al. Epidermal growth factor receptor trans-activation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J* 2003; 17(2):327-329.
84. Iwasaki H, Eguchi S, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis of vascular smooth-muscle cells through transactivation of epidermal growth factor receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S182-S184.
85. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res* 2004; 41(2):174-182.
86. Wedgwood S, Dettman RW, Black SM. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(5):L1058-L1067.
87. Tostes RC, Touyz RM, He G, Ammarguella F, Schiffrin EL. Endothelin A receptor blockade decreases expression of growth factors and collagen and improves matrix metalloproteinase-2 activity in kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39(6):892-900.
88. Opocensky M, Kramer HJ, Backer A, Vernerova Z, Eis V, Cervenka L et al. Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension. *Hypertension* 2006; 48(5):965-971.
89. Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation* 2001; 103(2):319-324.
90. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, Park JK, Dechend R, Genersch E et al. Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension* 2000; 36(2):282-290.

91. Muller DN, Mullally A, Dechend R, Park JK, Fiebeler A, Pilz B et al. Endothelin-converting enzyme inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension* 2002; 40(6):840-846.
92. Vanourkova Z, Kramer HJ, Erbanova M, Backer A, Cervenka L, Huskova Z et al. Endothelin receptor blockade does not affect blood pressure or angiotensin II levels in CYP1A1-Ren-2 transgenic rats with acutely induced hypertension. *Vascul Pharmacol* 2009; 50(5-6):194-199.
93. Ergul A, Tackett RL, Puett D. Distribution of endothelin receptors in saphenous veins of African Americans: implications of racial differences. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34(3):327-332.
94. Hirai Y, Adachi H, Fujiura Y, Hiratsuka A, Enomoto M, Imaizumi T. Plasma endothelin-1 level is related to renal function and smoking status but not to blood pressure: an epidemiological study. *J Hypertens* 2004; 22(4):713-718.
95. Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon RO, III, Panza JA. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33(2):753-758.
96. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998; 97(8):752-756.
97. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlton V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *Bosentan Hypertension Investigators. N Engl J Med* 1998; 338(12):784-790.
98. Stauffer BL, Westby CM, DeSouza CA. Endothelin-1, aging and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2008; 23(4):350-355.
99. Van Guilder GP, Westby CM, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. *Hypertension* 2007; 50(2):403-409.
100. Griendling KK, Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 1996; 10(2):283-292.

101. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC, Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325(14):997-1001.
102. Fan J, Unoki H, Iwasa S, Watanabe T. Role of endothelin-1 in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902:84-93.
103. Winkles JA, Alberts GF, Brogi E, Libby P. Endothelin-1 and endothelin receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191(3):1081-1088.
104. Haug C, Voisard R, Lenich A, Baur R, Hoher M, Osterhues H et al. Increased endothelin release by cultured human smooth muscle cells from atherosclerotic coronary arteries. *Cardiovasc Res* 1996; 31(5):807-813.
105. Kowala MC, Rose PM, Stein PD, Goller N, Recce R, Beyer S et al. Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamsters fed cholesterol. *Am J Pathol* 1995; 146(4):819-826.
106. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(24):14367-14372.
107. Bohm F, Jensen J, Svane B, Settergren M, Pernow J. Intracoronary endothelin receptor blockade improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86(11):745-751.
108. Ballinger ML, Ivey ME, Osman N, Thomas WG, Little PJ. Endothelin-1 activates ETA receptors on human vascular smooth muscle cells to yield proteoglycans with increased binding to LDL. *Atherosclerosis* 2009; 205(2):451-457.
109. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77(3):445-465.
110. Dashwood MR, Noertersheuser P, Kirchengast M, Munter K. Altered endothelin-1 binding following balloon angioplasty of pig coronary arteries: effect of the ETA receptor antagonist, LU 135252. *Cardiovasc Res* 1999; 43(2):445-456.

111. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, Shimada K, Maemura K, Oda H et al. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95(1):221-230.
112. Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, Storer BL, Hart T, Feuerstein GZ et al. A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 1994; 75(1):190-197.
113. Cavero PG, Miller WL, Heublein DM, Margulies KB, Burnett JC, Jr. Endothelin in experimental congestive heart failure in the anesthetized dog. *Am J Physiol* 1990; 259(2 Pt 2):F312-F317.
114. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89(4):1580-1586.
115. Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W et al. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98(21):2262-2268.
116. Luscher TF, Enseleit F, Pacher R, Mitrovic V, Schulze MR, Willenbrock R et al. Hemodynamic and neurohumoral effects of selective endothelin A (ET(A)) receptor blockade in chronic heart failure: the Heart Failure ET(A) Receptor Blockade Trial (HEAT). *Circulation* 2002; 106(21):2666-2672.
117. Rufanova VA, Pozdnev VF, Kalenikova EI, Postnikov AB, Storozhilova AN, Masenko VP et al. Endothelin-converting enzyme inhibition in the rat model of acute heart failure: heart function and neurohormonal activation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234(10):1201-1211.
118. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:281-312.
119. Fukami K. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem* 2002; 131(3):293-299.

120. Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 2001; 101(8):2353-2364.
121. Berk BC, Aronow MS, Brock TA, Cragoe E Jr, Gimbrone MA, Jr., Alexander RW. Angiotensin II-stimulated Na⁺/H⁺ exchange in cultured vascular smooth muscle cells. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 1987; 262(11):5057-5064.
122. Philipson KD, Frank JS, Nishimoto AY. Effects of phospholipase C on the Na⁺-Ca²⁺ exchange and Ca²⁺ permeability of cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 1983; 258(9):5905-5910.
123. Shirodkar AV, Marsden PA. Epigenetics in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 2011; 26(3):209-215.
124. WATSON JD, CRICK FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1953; 18:123-131.
125. Nyce J, Liu L, Jones PA. Variable effects of DNA-synthesis inhibitors upon DNA methylation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1986; 14(10):4353-4367.
126. Saha RN, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ* 2006; 13(4):539-550.
127. Horiuchi K, Fujimoto D, Fukushima M, Kanai K. Increased histone acetylation and deacetylation in rat ascites hepatoma cells. *Cancer Res* 1981; 41(4):1488-1491.
128. Riviere G, Lienhard D, Andrieu T, Vieau D, Frey BM, Frey FJ. Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation. *Epigenetics* 2011; 6(4):478-489.
129. Shanmugam MK, Sethi G. Role of epigenetics in inflammation-associated diseases. *Subcell Biochem* 2012; 61:627-657.
130. Esse R, Rocha MS, Barroso M, Florindo C, Teerlink T, Kok RM et al. Protein arginine methylation is more prone to inhibition by S-adenosylhomocysteine than DNA methylation in vascular endothelial cells. *PLoS One* 2013; 8(2):e55483.

131. Spitzkovskii DM. [Geometric complementarity of the primary structures of histone molecules H2A, H2B, H3, H4 and several possible consequences of this phenomenon]. *Biull Eksp Biol Med* 1978; 86(11):579-583.
132. Camerini-Otero RD, Sollner-Webb B, Felsenfeld G. The organization of histones and DNA in chromatin: evidence for an arginine-rich histone kernel. *Cell* 1976; 8(3):333-347.
133. Hirschler-Laszkiwicz I, Cavanaugh A, Hu Q, Catania J, Avantaggiati ML, Rothblum LI. The role of acetylation in rDNA transcription. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(20):4114-4124.
134. Wiegand RC, Brutlag DL. Histone acetylase from *Drosophila melanogaster* specific for H4. *J Biol Chem* 1981; 256(9):4578-4583.
135. Kaneta H, Fujimoto D. A histone deacetylase capable of deacetylating chromatin-bound histone. *J Biochem* 1974; 76(4):905-907.
136. Pedersen AG, Baldi P, Chauvin Y, Brunak S. DNA structure in human RNA polymerase II promoters. *J Mol Biol* 1998; 281(4):663-673.
137. Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 2000; 408(6810):377-381.
138. Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 2001; 262(2):75-83.
139. Lahm A, Paolini C, Pallaoro M, Nardi MC, Jones P, Neddermann P et al. Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(44):17335-17340.
140. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 2006; 75:435-465.
141. Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 2002; 277(28):25748-25755.
142. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Iseki H, Katano M et al. Sirt1, p53, and p38(MAPK) are crucial regulators of detrimental phenotypes of embryonic stem cells with Max expression ablation. *Stem Cells* 2012; 30(8):1634-1644.

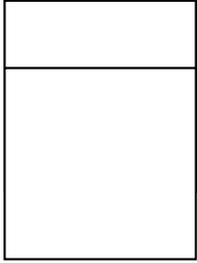
143. Lai L, Yan L, Gao S, Hu CL, Ge H, Davidow A et al. Type 5 Adenylyl Cyclase Increases Oxidative Stress by Transcriptional Regulation of MnSOD via the SIRT1/FoxO3a Pathway. *Circulation* 2013.
144. Hwang JW, Yao H, Caito S, Sundar IK, Rahman I. Redox Regulation Of Sirt1 In Inflammation And Cellular Senescence. *Free Radic Biol Med* 2013.
145. Kemper JK, Choi SE, Kim DH. Sirtuin 1 deacetylase: a key regulator of hepatic lipid metabolism. *Vitam Horm* 2013; 91:385-404.
146. Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000; 403(6771):795-800.
147. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L et al. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(11):5807-5811.
148. Vaziri H, Dessain SK, Ng EE, Imai SI, Frye RA, Pandita TK et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001; 107(2):149-159.
149. Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309(3):558-566.
150. Jin L, Wei W, Jiang Y, Peng H, Cai J, Mao C et al. Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes. *J Biol Chem* 2009; 284(36):24394-24405.
151. Nasrin N, Wu X, Fortier E, Feng Y, Bare' OC, Chen S et al. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *J Biol Chem* 2010; 285(42):31995-32002.
152. Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* 2011; 334(6057):806-809.
153. Pan PW, Feldman JL, Devries MK, Dong A, Edwards AM, Denu JM. Structure and biochemical functions of SIRT6. *J Biol Chem* 2011; 286(16):14575-14587.

154. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 2006; 20(9):1075-1080.
155. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273(2):793-798.
156. Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804(8):1666-1675.
157. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 2007; 282(9):6823-6832.
158. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 2004; 16(1):93-105.
159. Byles V, Chmielewski LK, Wang J, Zhu L, Forman LW, Faller DV et al. Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int J Biol Sci* 2010; 6(6):599-612.
160. Lang GE, Fleischer-Peters A. [Rieger syndrome as an expression of neural crest dysgenesis]. *Fortschr Ophthalmol* 1989; 86(4):366-369.
161. Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de CR et al. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One* 2009; 4(12):e8414.
162. Kang H, Jung JW, Kim MK, Chung JH. CK2 is the regulator of SIRT1 substrate-binding affinity, deacetylase activity and cellular response to DNA-damage. *PLoS One* 2009; 4(8):e6611.
163. Kang H, Suh JY, Jung YS, Jung JW, Kim MK, Chung JH. Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity. *Mol Cell* 2011; 44(2):203-213.
164. Kim JE, Chen J, Lou Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* 2008; 451(7178):583-586.

165. Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV et al. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 2007; 9(11):1253-1262.
166. Liu X, Wang D, Zhao Y, Tu B, Zheng Z, Wang L et al. Methyltransferase Set7/9 regulates p53 activity by interacting with Sirtuin 1 (SIRT1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(5):1925-1930.
167. Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Sirt1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res* 2011; 90(2):276-284.
168. Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J et al. SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(7):1263-1269.
169. Canto C, Auwerx J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20(7):325-331.
170. Chakrabarti P, English T, Karki S, Qiang L, Tao R, Kim J et al. SIRT1 controls lipolysis in adipocytes via FOXO1-mediated expression of ATGL. *J Lipid Res* 2011; 52(9):1693-1701.
171. 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(7029):113-118.
172. Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(45):15998-16003.
173. Kaerberlein 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(19):2570-2580.
174. Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvari M, Piper MD et al. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature* 2011; 477(7365):482-485.
175. Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol Med* 2013.

176. Gorenne I, Kumar S, Gray K, Figg N, Yu H, Mercer J et al. Vascular smooth muscle cell sirtuin 1 protects against DNA damage and inhibits atherosclerosis. *Circulation* 2013; 127(3):386-396.
177. Pang WJ, Xiong Y, Wang Y, Tong Q, Yang GS. Sirt1 attenuates camptothecin-induced apoptosis through caspase-3 pathway in porcine preadipocytes. *Exp Cell Res* 2013; 319(5):670-683.
178. Draznin B, Wang C, Adochio R, Leitner JW, Cornier MA. Effect of dietary macronutrient composition on AMPK and SIRT1 expression and activity in human skeletal muscle. *Horm Metab Res* 2012; 44(9):650-655.
179. Lau AW, Liu P, Inuzuka H, Gao D. SIRT1 phosphorylation by AMP-activated protein kinase regulates p53 acetylation. *Am J Cancer Res* 2014; 4(3):245-255.
180. Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F et al. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 2007; 21(20):2644-2658.
181. Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15(8):302-308.
182. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* 2011; 25(1):16-28.
183. Zhang QJ, Wang Z, Chen HZ, Zhou S, Zheng W, Liu G et al. Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2008; 80(2):191-199.
184. Giannakou ME, Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* 2004; 14(8):408-412.
185. Vita JA, Keaney JF, Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002; 106(6):640-642.
186. Stein S, Schafer N, Breitenstein A, Besler C, Winnik S, Lohmann C et al. SIRT1 reduces endothelial activation without affecting vascular function in ApoE^{-/-} mice. *Aging (Albany NY)* 2010; 2(6):353-360.

187. Xie M, Liu M, He CS. SIRT1 regulates endothelial Notch signaling in lung cancer. *PLoS One* 2012; 7(9):e45331.
188. Chen Z, Peng IC, Cui X, Li YS, Chien S, Shyy JY. Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(22):10268-10273.
189. Li L, Zhang HN, Chen HZ, Gao P, Zhu LH, Li HL et al. SIRT1 acts as a modulator of neointima formation following vascular injury in mice. *Circ Res* 2011; 108(10):1180-1189.
190. Moore S. Pathogenesis of atherosclerosis. *Metabolism* 1985; 34(12 Suppl 1):13-16.
191. Li L, Gao P, Zhang H, Chen H, Zheng W, Lv X et al. SIRT1 inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43(2):103-109.
192. Nozawa Y, Matsuura N, Miyake H, Yamada S, Kimura R. Effects of TH-142177 on angiotensin II-induced proliferation, migration and intracellular signaling in vascular smooth muscle cells and on neointimal thickening after balloon injury. *Life Sci* 1999; 64(22):2061-2070.
193. Gomez Sandoval YH, Levesque LO, Li Y, Anand-Srivastava MB. Role of epidermal growth factor receptor transactivation in endothelin-1-induced enhanced expression of Gi protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2013; 91(3):221-227.
194. Lazich I, Bakris GL. Endothelin antagonism in patients with resistant hypertension and hypertension nephropathy. *Contrib Nephrol* 2011; 172:223-234.
195. Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2004; 22(6):1141-1149.
196. Chong ZZ, Wang S, Shang YC, Maiese K. Targeting cardiovascular disease with novel SIRT1 pathways. *Future Cardiol* 2012; 8(1):89-100.
197. Li L, Gao P, Zhang H, Chen H, Zheng W, Lv X et al. SIRT1 inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43(2):103-109.



198. Ceolotto G, De Kreutzenberg SV, Cattelan A, Fabricio AS, Squarcina E, Gion M et al. Sirtuin 1 stabilization by HuR represses TNF-alpha- and glucose-induced E-selectin release and endothelial cell adhesiveness in vitro: relevance to human metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2014; 127(7):449-461.
199. 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(25):22227-22234.
200. Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 2007; 25(4):543-557.
201. Kim EJ, Kho JH, Kang MR, Um SJ. Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol Cell* 2007; 28(2):277-290.
202. Renaud S, de LM. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339(8808):1523-1526.
203. Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Molecules* 2009; 14(9):3446-3485.
204. Hou J, Chong ZZ, Shang YC, Maiese K. Early apoptotic vascular signaling is determined by Sirt1 through nuclear shuttling, forkhead trafficking, bad, and mitochondrial caspase activation. *Curr Neurovasc Res* 2010; 7(2):95-112.
205. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(37):14855-14860.
206. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 2007; 100(10):1512-1521.

