

Université de Montréal

# **Le Rôle de Sirtuine 3 dans la Rétinopathie du Prématuré**

par

Noémie-Rose Harvey

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître es Sciences (M.Sc.)  
en pharmacologie  
option moléculaire

Juin 2015

© Noémie-Rose Harvey, 2015

## Résumé

Dans les pays industrialisés, les rétinopathies ischémiques proliférantes telles que la rétinopathie diabétique et la rétinopathie du prématuré sont les principales causes de cécité chez les individus en âge de travailler et la population pédiatrique. Ces pathologies sont caractérisées par une dégénérescence microvasculaire initiale suivie d'une hyper-vascularisation compensatoire disproportionnée et pathologique. Les sirtuines constituent une importante famille de protéines impliquées dans le métabolisme et la réponse au stress. Plus particulièrement, sirtuine 3 (SIRT3) est une déacétylase mitochondriale primordiale qui agit au cœur du métabolisme énergétique et de l'activation de nombreuses voies métaboliques oxydatives. Nos résultats démontrent pour la première fois qu'une déficience en SIRT3 diminue la sévérité des lésions vasculaires dans le modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR). En plus de stimuler l'angiogénèse, l'absence de SIRT3 est aussi associée à une augmentation de la glycolyse, possiblement en activant la famille de gènes 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (*PFKFB*). Nous suggérons que le manque de SIRT3 est impliqué dans l'effet Warburg et procure ainsi un avantage prolifératif et protecteur dans l'OIR. La présente étude propose SIRT3 comme nouvelle cible thérapeutique potentielle dans la rétinopathie du prématuré, une maladie dont les complications désastreuses persistent tout au long de la vie.

**Mots-clés** : Rétinopathie du prématuré, Sirtuine 3, Métabolisme énergétique, Angiogénèse, Stress oxydatif, Glycolyse, Effet Warburg, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase

## Abstract

Proliferative ischemic retinopathies such as proliferative diabetic retinopathy and retinopathy of prematurity (ROP) are the leading causes of blindness in working age and pediatric populations in industrialized countries. These pathologies are characterized by an initial microvascular degeneration followed by a disproportionate compensatory but pathological hyper-vascularization mounted by the hypoxic and energy deficient retina in an attempt to reinstate metabolic equilibrium. Sirtuins are an important family of protein involved in metabolism and stress response. Sirtuin 3 (SIRT3) in particular is a major mitochondrial deacetylase central to energy metabolism and the regulation of many oxidative pathways. For the first time, our results show that a lack of SIRT3 decreases the severity of vascular lesions in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. Deficiency in SIRT3 not only stimulates angiogenesis, but also increases glycolysis, possibly through indirect activation of the gene family 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (*PFKFB*). We suggest that a lack of SIRT3 is involved in the Warburg effect and therefore confers a proliferative advantage that is protective in OIR. The present study puts forward SIRT3 as a new potential therapeutic target for ROP, a disease leading to life-long vision complications.

**Keywords** : Retinopathy of prematurity, Sirtuin 3, Energetic metabolism, Angiogenesis, Oxidative stress, Glycolysis, Warburg effect, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii
Remerciements.....	xii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	13
1.1 Rétinopathie du prématuré.....	14
1.1.1 Aperçu et problématique.....	14
1.1.2 Anatomie de l'oeil.....	16
1.1.2.1 Structures.....	16
1.1.2.2 Anatomie de la rétine.....	18
1.1.3 Pathogénèse de la rétinopathie du prématuré.....	21
1.1.3.1 Phases de vaso-oblitération et néovascularisation.....	21
1.1.3.2 Stress oxydatif.....	22
1.1.3.3 Régulation du flot oculaire.....	24
1.1.3.4 Angiogenèse et facteurs de croissance.....	26
1.2 Métabolisme énergétique.....	30
1.2.1 Respiration cellulaire.....	30
1.2.1.1 Métabolisme du glucose.....	30
1.2.1.2 Métabolisme des acides gras (aperçu).....	33
1.2.1.3 Métabolisme des acides aminés (aperçu).....	34
1.2.1.4 Cycle de Krebs.....	34
1.2.1.5 Chaîne de transport d'électrons et phosphorylation oxydative.....	36
1.2.2 Effet Warburg.....	40
1.2.3 Rétinopathie du prématuré et métabolisme énergétique.....	41
1.3 Sirtuine 3.....	42

1.3.1 Classification des sirtuines.....	42
1.3.2 Mécanisme d'action des sirtuines .....	43
1.3.4 Rôles établis de Sirtuine 3.....	44
1.3.4.1 Rôle de SIRT3 dans le métabolisme énergétique .....	44
1.3.4.2 Rôle de SIRT3 dans le stress oxydatif .....	45
1.3.4.3 Rôle de SIRT3 dans le cancer .....	46
1.4 Hypothèse de recherche .....	48
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE .....	49
2.1 Animaux.....	50
2.2 Rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) .....	50
2.3 Rétines montées sur lames en entier ( <i>whole-mount</i> ) et immunohistochimie.....	51
2.4 Quantification des lésions vasculaires .....	52
2.5 Quantification des filopodes sur les cellules endothéliales d'extrémité ( <i>tip cells</i> ).....	52
2.6 Explants aortiques.....	52
2.7 Consommation de glucose dans la rétine.....	53
2.8 Calorimétrie indirecte .....	53
2.9 Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) .....	54
2.10 Analyses statistiques .....	54
CHAPITRE 3 RÉSULTATS .....	55
3.1 Expression de SIRT3 dans le développement normal de la rétine.....	56
3.2 Rétinopathie induite par l'oxygène et angiogénèse .....	58
3.2.1 Rétinopathie induite par l'oxygène .....	58
3.2.2 Mesure des filopodes sur les <i>tip cells</i> .....	61
3.2.3 Croissance des explants aortiques.....	63
3.3 Glycolyse .....	65
3.3.1 Incorporation de <sup>3</sup> H-2DG dans la rétine .....	65
3.3.2 Métabolisme du glucose au niveau systémique.....	66
3.3.3 Expression des <i>Pfkfb</i> dans la rétine.....	68
CHAPITRE 4 DISCUSSION .....	70
4.1 L'expression de <i>Sirt3</i> accroît dans la rétine pendant le développement.....	71
4.2 Les souris <i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup> développent une rétinopathie moins sévère que les WT .....	71

4.3 Une carence en SIRT3 est caractérisée par des <i>tip cells</i> riches en filopodes.....	72
4.4 Les explants aortiques des souris <i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup> développent plus d'angiogénèse .....	73
4.5 Mécanismes potentiels expliquant une angiogénèse accrue .....	74
4.6 Les rétines des souris <i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup> consomment davantage de glucose que les WT .....	75
4.7 Le déficit en SIRT3 se traduit en une hausse systémique du métabolisme du glucose ..	75
4.8 L'expression de <i>Pfkfb1</i> , <i>Pfkfb3</i> et <i>Pfkfb4</i> augmente en absence de SIRT3 .....	76
4.9 Mécanismes potentiels expliquant une amplification de la glycolyse .....	77
4.10 Lien entre la glycolyse et l'angiogénèse.....	78
4.11 Dualité de l'effet de SIRT3.....	79
CHAPITRE 5 CONCLUSION .....	80
Bibliographie.....	82

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie de l'œil.....	16
<b>Figure 2</b> : Anatomie microscopique de la rétine.....	19
<b>Figure 3</b> : Cycle de Krebs .....	35
<b>Figure 4</b> : Chaîne de transport d'électrons et phosphorylation oxydative .....	37
<b>Figure 5</b> : Expression des sirtuines dans la rétine de souris WT en normoxie .....	57
<b>Figure 6</b> : Comparaison des lésions vasculaires chez les souris WT et <i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup> après OIR .....	60
<b>Figure 7</b> : Filopodes des <i>tip cells</i> à P14 chez les souris avec rétinopathie .....	62
<b>Figure 8</b> : Croissance microvasculaire d'explants aortiques chez les souris WT et <i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup> .....	64
<b>Figure 9</b> : Consommation rétinienne de glucose à P17 après OIR .....	65
<b>Figure 10</b> : Comparaison des ratios d'échanges gazeux entre les souris WT et <i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup> .....	67
<b>Figure 11</b> : Expression des <i>Pfkfb</i> en normoxie et après OIR chez les souris WT et <i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup> ....	69

## Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNase I	Désoxyribonucléase I
ADNc	ADN codant
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase
ATP	Adénosine triphosphate
BAX	Protéine X associée à BCL2 ou <i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	Protéine leucémie lymphoïde chronique/lymphome 2 ou <i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
CI	Intervalle de confiance ou <i>confidence interval</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CoA	Coenzyme A
CoQ	Coenzyme Q10 ou ubiquinone
CoQH <sub>2</sub>	Coenzyme Q10 réduite ou ubiquinol
COX	Cyclooxygénase
Cyt <i>c</i> <sup>2+</sup>	Cytochrome <i>c</i> réduit
Cyt <i>c</i> <sup>3+</sup>	Cytochrome <i>c</i> oxydé
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EPO	Érythropoïétine
F6P	Fructose-6-phosphate
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH <sub>2</sub>	Dihydroflavine adénine dinucléotide
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
FoxO3a	<i>Forkhead box O3a</i>

G6P	Glucose-6-phosphate
GAP	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDP	Guanosine diphosphate
GLUT1-4	Transporteurs du glucose 1-4
[GSH]/[GSSG]	Ratio glutathion réduit/glutathion oxydé
GTP	Guanosine triphosphate
H <sup>+</sup>	Proton
<sup>3</sup> H-2DG	2-déoxyglucose marqué au tritium
HIF-1 $\alpha$	Facteur inductible par l'hypoxie-1 alpha ou <i>hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
HMGCS	Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A synthase
H <sub>2</sub> O	Eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical hydroperoxyl
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IGF-1	Facteur de croissance de type insuline 1 ou <i>insulin-like growth factor 1</i>
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
L <sup>•</sup>	Radical lipidique
LCAD	Acyl-coenzyme A déshydrogénase des acides gras à longue chaîne ou <i>long-chain-acyl-CoA dehydrogenase</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
LOO <sup>•</sup>	Radical peroxy lipidique
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucléotide, forme oxydée
[NAD <sup>+</sup> ]	Ratio nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/nicotinamide adénine
[NADH]	dinucléotide réduit
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAM	Nicotinamide
NCBI	Centre national pour l'information biotechnologique ou <i>National Center for Biotechnology Information</i>

NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire kappa B ou <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronale
NO	Oxyde nitrique
NO <sub>2</sub>	Dioxyde d'azote
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrite
O <sub>2</sub>	Oxygène
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anion superoxyde
OH <sup>•</sup>	Radical hydroxyl
OIR	Rétinopathie induite par l'oxygène ou <i>oxygen-induced retinopathy</i>
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrite
P	Valeur-p ou <i>p-value</i>
P <sub>i</sub>	Phosphore inorganique
P7, P12, P <sub>n</sub>	Jour 7, 12 ou <i>n</i> après la naissance d'une souris ou <i>postnatal day 7, 12, n</i>
PaO <sub>2</sub>	Pression partielle artérielle en oxygène
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate ou <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase ou <i>polymerase chain reaction</i>
PFKFB	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandine F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
PHD	HIF-1 $\alpha$ prolyl hydroxylases
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
qPCR	PCR quantitative en temps réel
RER	Ratio d'échanges gazeux ou <i>respiratory exchange ratio</i>
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène ou <i>reactive oxygen species</i>
SDH	Succinate déshydrogénase
SEM	Erreur-type de la moyenne ou <i>standard error of the mean</i>
SIRT1	Sirtuine 1

SIRT2	Sirtuine 2
SIRT3	Sirtuine 3
<i>Sirt3</i> <sup>-/-</sup>	Souris transgénique dont le gène codant la protéine sirtuine 3 est invalidé ou <i>Sirt3 knock-out</i>
SIRT4	Sirtuine 4
SIRT5	Sirtuine 5
SIRT6	Sirtuine 6
SIRT7	Sirtuine 7
SOD	Superoxyde dismutase
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale alpha ou <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
vCO <sub>2</sub>	Production de dioxyde de carbone
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial ou <i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	Récepteur de type 2 du VEGF
VNTR	Nombre variable de répétitions en tandem ou <i>variable number tandem repeat</i>
vO <sub>2</sub>	Consommation d'oxygène
WT	Type sauvage (souris) ou <i>wild type</i>
$\alpha$ -KG	Alpha-cétoglutarate
$\mu$ Ci	Microcurie

*On ne va jamais aussi loin que lorsqu'on ne sait pas où l'on va*  
*- Christophe-Colomb*

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette maîtrise. La première personne envers qui je souhaite exprimer ma reconnaissance infinie est mon directeur de recherche, Dr Jean-Sébastien Joyal. Il a eu la générosité de m'accueillir dans son laboratoire à ses tous débuts et, grâce à sa vision et ses ambitions, j'ai bénéficié d'opportunités exceptionnelles. Malgré ses obligations de toutes parts, il n'a jamais hésité à prendre le temps de discuter et de m'aider dans mon cheminement académique et professionnel.

Je ne saurais passer sous silence l'aide précieuse de Marie-Josée Lacombe, l'assistante de recherche qui m'a guidée dans bon nombre de protocoles expérimentaux. Je tiens à souligner également la contribution de mon collègue Jin Sung Kim, qui a rendu possible l'achèvement de cette maîtrise. J'aimerais remercier les membres du laboratoire de Dr Chemtob, non seulement pour leur clémence et le prêt de leurs équipements, mais aussi pour nous avoir accueillis chaleureusement lors des festivités avant que le laboratoire ne soit entièrement installé.

Je remercie tout particulièrement ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel pendant mes études universitaires. Merci à mes parents qui m'ont toujours encouragée et supportée dans les moments difficiles, à ma sœur qui a enduré stoïquement mes discours plaintifs pendant la rédaction de mon mémoire, à mon frère qui a probablement préparé la moitié des cafés que j'ai ingérés pendant mes études et à mon frère aîné qui a réussi à trouver toutes sortes d'euphémismes pour décrire mon énergie et mes accès de bizarrerie. Merci énormément à mon conjoint, qui a élégamment accepté de m'accompagner dans tous mes projets, peu importe leur lieu, leur durée ou leur excentricité.

Finalement, je tiens à remercier Dr Pankaj Bhatia, directeur de mon programme de résidence, pour m'avoir donnée la flexibilité nécessaire à la complétion de ce mémoire

**CHAPITRE 1**  
**INTRODUCTION**

## **1.1 Rétinopathie du prématuré**

### **1.1.1 Aperçu et problématique**

La rétinopathie du prématuré compte parmi les trois principales causes de cécité chez la population pédiatrique dans les pays industrialisés. [1] La rétinopathie du prématuré est un problème d'envergure, affectant 21,8% des bébés prématurés de moins de 32 semaines d'âge gestationnel qui survivent après les soins intensifs néonataux. [2] Lorsqu'on considère seulement les bébés de très petit poids à la naissance (moins de 1000 g), 80% développent cette maladie. [3] Les principaux facteurs de risques associés à cette condition sont l'administration d'oxygène pendant la période néonatale, un âge gestationnel bas, un petit poids à la naissance et des facteurs liés à la sévérité générale des problèmes de santé du nouveau-né, notamment la durée du séjour aux soins intensifs néonataux. [4]

La rétinopathie du prématuré entraîne une variété de séquelles, allant d'une diminution de l'acuité visuelle à la cécité, en passant par les erreurs réfractives telles que la myopie, l'hypermétropie, l'anisométrie et l'astigmatisme. [5,6] D'autres complications de la maladie comme le strabisme, les cataractes, le glaucome, les champs visuels réduits et la perception altérée des contrastes sont aussi communes. Les anomalies rétinienne qui découlent de la rétinopathie du prématuré sont nombreuses et incluent le décollement de la rétine, les plis rétinien, les dégénérescences rétinienne et l'hétérotopie maculaire. [7,8] La rétinopathie du prématuré est une condition pathologique qui perdure tout au long de la vie et certaines complications associées à un sombre pronostic visuel surviennent plusieurs années plus tard. Par exemple, dans une série rétrospective de 47 patients adultes âgés de 45 à 56 ans, l'âge moyen d'apparition d'un décollement rétinien était de 35 ans. Dans cette série, la moitié des yeux étudiés avaient une meilleure acuité visuelle corrigée de 20/200 ou moins. Par « meilleure acuité visuelle corrigée », on entend que l'acuité visuelle était mesurée alors que le sujet portait des lentilles réfractives appropriées pour chaque œil. [9] Au Canada, une

personne dont le meilleur œil a une acuité visuelle de 20/200 ou moins avec correction est considérée légalement aveugle. [10]

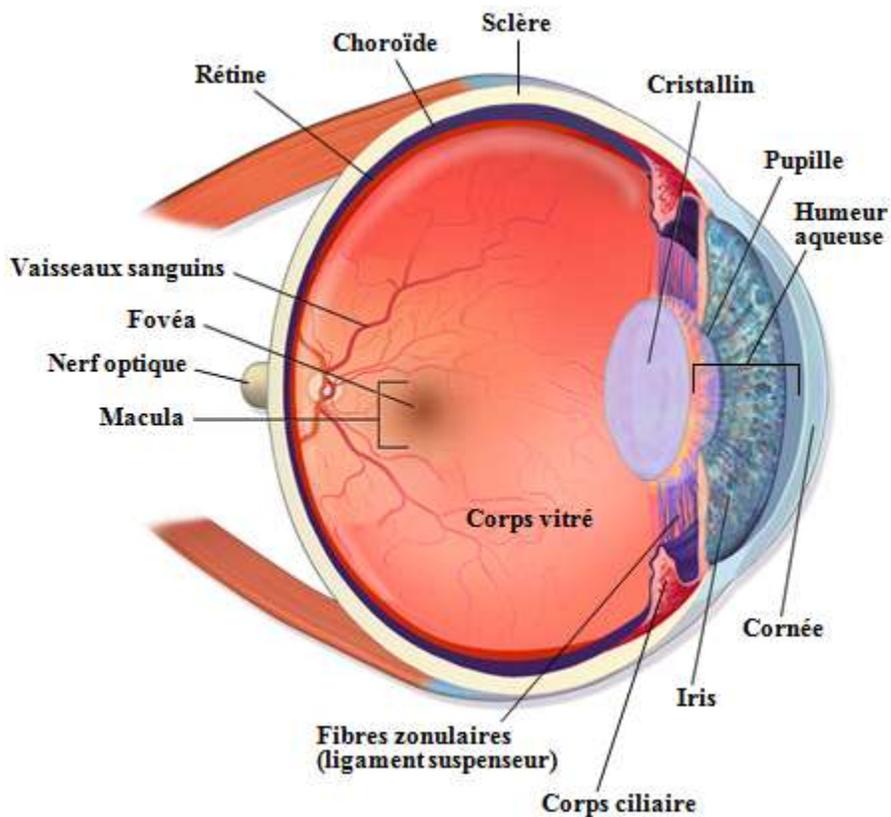
Les traitements actuels sont réservés aux cas de rétinopathie plus avancés et reposent sur l'ablation de la rétine avasculaire périphérique, soit par cryothérapie, soit par laser (diode ou argon). La cryothérapie est progressivement tombée en défaveur, car elle donne un résultat visuel légèrement inférieur à long terme, est associée à un taux de complications plus élevé et est moins facile d'utilisation. [11] Bien que le traitement adéquat de la rétinopathie du prématuré réduit de près du tiers le risque de détérioration sévère de l'acuité visuelle, environ 45% des yeux traités ont une acuité de 20/200 ou moins après 15 ans. [12] De plus, ces modalités thérapeutiques comportent un risque non négligeable de complications, notamment de saignement intraoculaire, de cataracte, de détachement du corps vitré, d'atrophie de l'iris et d'opacification cornéenne. [11] Bevacizumab et Ranibizumab, deux anticorps monoclonaux anti VEGF, sont parfois utilisés hors indication (*off-label*) pour traiter des maladies rétiniques proliférantes, incluant la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique et la rétinopathie du prématuré. Le traitement avec injection intravitréenne de Bevacizumab semble être associé à moins d'anomalies structurales que la thérapie laser conventionnelle dans la zone centrale de la rétine. [13] Cependant, depuis la publication des premières études, des effets secondaires sévères ont été décrits, incluant la progression de la maladie au décollement rétinien total [14] Comme VEGF est aussi un facteur de croissance angiogénique important dans la formation physiologique des vaisseaux rétiniques, une utilisation au mauvais moment pourrait endommager davantage l'œil en altérant la vascularisation normale. Le moment optimal pour procéder à l'injection demeure encore à préciser.

Au cours des dernières années, on a constaté une augmentation de l'incidence de la rétinopathie du prématuré, probablement secondairement à l'amélioration de la survie de prématurés de plus en plus jeunes. [15] Les traitements demeurent très limités et les conséquences de la maladie sont désastreuses et permanentes. Il est donc impératif d'approfondir nos connaissances sur la rétinopathie du prématuré afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

## 1.1.2 Anatomie de l'œil

### 1.1.2.1 Structures

L'œil est composé de la sclère (ou sclérotique), de la cornée, de l'uvée (choroïde, corps ciliaire et iris), du cristallin, de l'humeur vitrée, de l'humeur aqueuse et de la rétine (Figure 1, ci-dessous).



**Figure 1 :** Anatomie de l'œil

Vue des structures anatomiques selon une coupe sagittale de l'œil.

Image adaptée à partir de [16], licence *Creative Commons Attribution 3.0*).

La sclère est une membrane fibreuse et dense qui forme la couche externe de l'œil. Elle procure les points d'insertion des muscles extraoculaires et donne la forme au globe oculaire. L'épisclère recouvre la sclère et contient les vaisseaux épiscléraux sous forme de plexus antérieur et plexus postérieur.

La cornée est une structure transparente et avasculaire qui recouvre l'œil antérieurement. Elle est responsable de la majorité du pouvoir de réfraction de l'œil. La cornée est divisée en cinq couches: l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma (substantia propria), la membrane de Descemet et l'endothélium.

L'uvée est composée de la choroïde, du corps ciliaire et de l'iris. La choroïde est une membrane brune spongieuse riche en plexus veineux. Les quatre couches qui forment la choroïde sont l'épichoroïde, la couche vasculaire, la choriocapillaire et la membrane de Bruch. L'épichoroïde appose la choroïde à la sclère. La couche vasculaire forme la masse de la choroïde et contient aussi des mélanocytes. La choriocapillaire est une couche de capillaires tapissés d'endothélium fenestré de type II et subvient aux besoins en nutriments et oxygène de la portion externe de la rétine. La membrane de Bruch est un tissu lisse et brillant qui se situe entre la choriocapillaire et la rétine.

Le corps ciliaire correspond à la portion antérieure de la choroïde et est constitué de fibres musculaires lisses orientées selon trois axes différents. La contraction du corps ciliaire tend les fibres zonulaires qui composent le ligament suspenseur, ce qui modifie la tension sur la capsule du cristallin.

L'iris est le segment le plus antérieur de l'uvée et comporte une ouverture centrale, la pupille. Il sépare la chambre antérieure de l'œil de la chambre postérieure. Il contient à la fois un muscle dilatateur de la pupille et un muscle sphincter pupillaire. La contraction et la relaxation de ces deux muscles permettent d'ajuster la quantité de lumière qui pénètre l'œil.

Le cristallin est une structure biconvexe transparente et élastique attachée au corps ciliaire par le ligament suspenseur. Le cristallin se bombe ou s'aplatit selon la contraction du corps ciliaire, ce qui confère à l'œil son pouvoir d'accommodation, c'est-à-dire sa capacité à s'adapter pour obtenir une vision de loin ou une vision de près.

L'humeur aqueuse est un liquide qui remplit la chambre antérieure et la chambre postérieure de l'œil. Elle est produite par le corps ciliaire et fournit les nutriments nécessaires

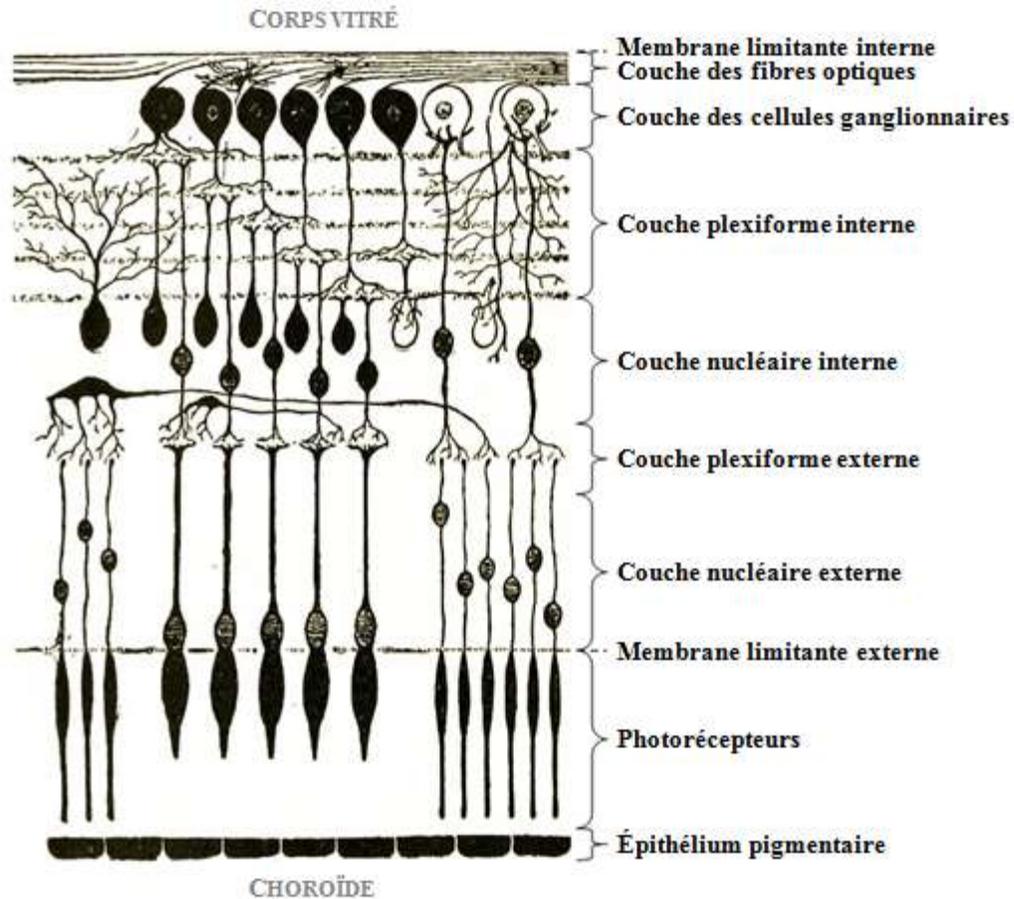
à la cornée, bien qu'elle soit faible en protéines. Elle participe également à la réfraction de la lumière avec les autres structures transparentes de l'œil (cornée, cristallin, corps vitré).

Le corps vitré est un élément transparent et gélatineux qui remplit l'espace entre le cristallin et la rétine, à laquelle il adhère. Il permet de maintenir la forme et la turgescence de l'œil. De plus, il contribue à la réfraction de la lumière avant qu'elle atteigne la rétine.

La rétine est la structure qui tapisse l'intérieur du globe oculaire. Dans le pôle postérieur de la rétine, on retrouve la macula et la fovéa, une dépression superficielle avasculaire procurant la meilleure acuité visuelle. [17,18]

### **1.1.2.2 Anatomie de la rétine**

La rétine renferme plusieurs couches qui sont : l'épithélium pigmentaire, les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), la membrane limitante externe, la couche nucléaire externe, la couche plexiforme externe, la couche nucléaire interne, la couche plexiforme interne, la couche des cellules ganglionnaires, la couche des fibres optiques et la membrane limitante interne (Figure 2, page suivante).



**Figure 2 :** Anatomie microscopique de la rétine

Description des différentes couches de la rétine en commençant par la face interne de la rétine (haut de l'image) jusqu'à la surface externe accolée contre la choroïde (bas de l'image).

Image adaptée à partir de [19], domaine public.

L'épithélium pigmentaire est la couche la plus externe de la rétine, accolée contre la choroïde. Il s'agit d'une couche unicellulaire qui absorbe la lumière et est impliquée dans la nutrition des photorécepteurs. Il doit son nom aux granules de mélanine qu'il contient. Cet épithélium joue un rôle essentiel dans la formation de la rhodopsine en entreposant et relâchant la vitamine A, un précurseur de la rhodopsine. La rhodopsine est un pigment photosensible que l'on retrouve dans les bâtonnets.

Environ deux fois plus nombreux que les cônes, les bâtonnets sont responsables de la vision lorsque la lumière environnante est faible. Ces deux types de cellules composent la

couche de photorécepteurs et sont sensibles aux influx lumineux grâce aux divers pigments qu'ils contiennent.

La membrane limitante externe supporte les photorécepteurs. La membrane limitante interne correspond à la membrane basale des cellules de Muller (cellules gliales prédominantes dans la rétine) et sépare le corps vitré de la rétine.

La couche nucléaire externe comporte les noyaux cellulaires des photorécepteurs. La couche nucléaire interne contient les corps cellulaires des neurones bipolaires, qui jouent le rôle d'interneurones entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires, et des cellules de Muller.

La couche plexiforme externe abrite les synapses entre les photorécepteurs et les neurones bipolaires. Quant à la couche plexiforme interne, elle contient les synapses entre les neurones bipolaires et les cellules ganglionnaires.

La couche de cellules ganglionnaires renferme les corps cellulaires des cellules ganglionnaires, les neurones qui transportent les influx nerveux jusqu'aux corps genouillés dans le cerveau. Des cellules gliales sont aussi présentes dans cette couche.

Les fibres optiques contiennent les axones des cellules ganglionnaires. Elles sont orientées radialement et se rassemblent pour former le nerf optique.

La rétine contient aussi deux autres types de neurones : les cellules horizontales et les cellules amacrines. Ces neurones sont distribués à travers les couches plexiforme externe, nucléaire interne et plexiforme interne. Les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales constituent les trois types de cellules gliales que l'on retrouve dans la rétine. Alors que les cellules de Müller et les cellules microgliales se retrouvent dans toutes les couches de la rétine (à l'exception de l'épithélium pigmentaire), les astrocytes sont limités à la couche de fibres optiques seulement. [17-19]

### **1.1.3 Pathogénèse de la rétinopathie du prématuré**

#### **1.1.3.1 Phases de vaso-oblitération et néovascularisation**

Chez l'humain, la vascularisation de la rétine débute in utero autour de 16 semaines d'âge gestationnel. Durant le développement initial, l'apport vasculaire est partiellement fourni par la vasculature hyaloïde qui origine du nerf optique et traverse l'œil vers la chambre antérieure. Ces vaisseaux primitifs régressent et disparaissent vers 34 semaines, alors que la vasculature intrarétinienne devient de plus en plus élaborée. Les vaisseaux rétiniens se forment du centre vers la périphérie de la rétine. Le côté nasal devient vascularisé autour de 36 semaines d'âge gestationnel, alors que les vaisseaux du côté temporal complètent leur maturation à 40 semaines, c'est-à-dire à terme. Au moment de la naissance, un bébé à terme a donc une vasculature rétinienne entièrement développée. [15,20]

Dans le cas de la rétinopathie du prématuré, le nouveau-né naît avec une rétine immature. La maladie est caractérisée par une phase initiale de vaso-oblitération (VO) qui se manifeste par un arrêt de la progression de la croissance vasculaire et une dégénération microvasculaire. Alors que l'apport en nutriments et oxygène se raréfie à cause de la destruction des vaisseaux, les besoins énergétiques de la rétine deviennent de plus en plus importants et celle-ci devient hypoxique, ce qui mène à la deuxième phase de la maladie: la néovascularisation (NV). Cette dernière est excessive et pathologique et mène à diverses complications, telles que le détachement rétinien et la cécité. [21,22]

À la naissance, le bébé prématuré est exposé à un excès relatif en oxygène, un élément crucial dans la pathogénèse de la rétinopathie du prématuré. Plusieurs facteurs contribuent à cet excès. Entre autres, l'environnement extra-utérin est relativement hyperoxique par rapport au milieu intra-utérin. La saturation en oxygène de l'hémoglobine est de seulement  $\approx 70\%$  in utero, alors que la saturation en  $O_2$  d'un bébé normal qui respire l'air ambiant est de 100%. Similairement, la  $PaO_2$  est de 30 mm Hg in utero, comparativement à 60-100 mm Hg à l'air

ambient. [23] Par ailleurs, les bébés prématurés, à cause de leur immaturité, présentent d'autres comorbidités qui nécessitent l'administration d'O<sub>2</sub> supplémentaire, notamment la bronchodysplasie pulmonaire. Une supplémentation excessive en O<sub>2</sub> contribue à élever encore davantage la PaO<sub>2</sub> et il a été démontré à maintes reprises que limiter la saturation en O<sub>2</sub> diminue les taux de rétinopathie du prématuré. [23,24]

### 1.1.3.2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif joue un rôle central dans la rétinopathie du prématuré. [25] Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont des molécules de signalisation hautement réactives conservées à travers l'évolution et présentes dans toutes les formes de vie aérobiques. Les ROS incluent des radicaux libres dérivés de l'oxygène et d'autres molécules réactives non radicalaires. Un radical libre est un atome ou molécule qui possède au moins un électron non apparié. [26] Les ROS sont continuellement produits dans les cellules saines et supportent de nombreuses fonctions cellulaires normales, telles la prolifération, la migration, la guérison de plaies et la réponse inflammatoire contre des pathogènes. Toutefois, lorsque les ROS sont générés en quantité excessive, ils causent des dommages cellulaires et éventuellement la mort cellulaire. [27] Parmi les ROS, on retrouve l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), le radical hydroperoxyl (HO<sub>2</sub><sup>•</sup>), le radical hydroxyl (OH<sup>•</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les radicaux lipidiques (L<sup>•</sup>). Les dérivés réactifs de l'azote, tels que le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), sont des molécules semblables aux ROS qui contiennent en plus de l'azote. Ils causent de la nitrosylation et des effets délétères comparables à ceux des ROS, incluant la peroxydation des lipides, les dommages à l'ADN et l'inactivation de mécanismes de dégradation des ROS. [28]

La principale source cellulaire de ROS est la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie, plus précisément le complexe III (voir section 1.2.1.5, page 35). Les ROS sont produits par diverses réactions enzymatiques et non enzymatiques. [29,30] Parallèlement, les cellules disposent de plusieurs mécanismes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui leur permettent d'éliminer ces molécules. Les principaux mécanismes enzymatiques

incluent les superoxyde dismutases (manganèse superoxyde dismutase [MnSOD] et cuivre/zinc superoxyde dismutase [Cu/ZnSOD]), la catalase et la glutathion peroxydase. Parmi les mécanismes non enzymatiques, on retrouve la vitamine C, la vitamine E, le glutathion, le  $\beta$ -carotène (précurseur de la vitamine A) et la thiorédoxine. [31,32] Dans des conditions normales, l'état redox de la cellule est maintenu grâce à un équilibre entre les oxydants et antioxydants. Le stress oxydatif/nitrosatif survient lorsqu'un déséquilibre entre la génération des ROS et la capacité des mécanismes antioxydants à éliminer les ROS entraîne une augmentation relative de ROS. Ceux-ci enclenchent des réactions en chaîne qui intensifient davantage la synthèse de ROS. [32]

Par exemple, les ROS ont des effets oxydants directs sur les lipides, les protéines (incluant les enzymes antioxydantes) et l'ADN, causant ainsi des dommages cellulaires, l'apoptose et la nécrose. Par exemple, Les ROS réagissent avec les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire pour produire des radicaux peroxy lipidiques ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Ceux-ci s'accumulent dans la membrane et altèrent directement la fonction des protéines et la transduction des signaux. [30] Les ROS ont la capacité de relâcher du fer libre à partir des enzymes contenant des groupes fer-soufre, ce qui mène à la formation d' $\text{OH}^\bullet$  à travers la réaction de Fenton et propage les dommages oxydatifs. [33] L'oxydation des pores mitochondriaux par les ROS altère le potentiel de membrane mitochondrial, contribuant à la libération de cytochrome c, l'activation de la caspase et l'apoptose. [34]

La rétine est particulièrement susceptible au stress oxydatif parce qu'elle est riche en acides gras polyinsaturés, donc vulnérable à la peroxydation lipidique, et est constamment exposée à la lumière, donc soumise à la photo-oxydation. [35] De plus, la rétine est le tissu qui consomme proportionnellement le plus d'oxygène dans le corps. [36] Chez le prématuré, les mécanismes antioxydants sont immatures, le rendant ainsi particulièrement vulnérable au stress oxydant. Effectivement, la production et l'activité enzymatique de SOD, catalase et glutathion peroxydase, ainsi que les concentrations de vitamine C et vitamine E augmentent drastiquement à la fin de la grossesse. [31] Par ailleurs, il a été démontré que les bébés prématurés qui reçoivent des transfusions sanguines ont des concentrations plasmatiques de fer libre plus élevées, alors que cette hausse n'est pas observée chez les bébés à terme. Les

bébés prématurés sont plus susceptibles de recevoir des transfusions en raison de leurs comorbidités et le fer libre ainsi généré catalyse la formation de ROS par la réaction de Fenton. [37] Le taux de production des ROS est amplifié dans plusieurs conditions pathologiques, entre autres dans les lésions d'ischémie-reperfusion. Dans la rétinopathie du prématuré, l'ischémie rencontrée après la dégénérescence microvasculaire de la phase de VO et le retour de l'apport sanguin qui se produit pendant la phase de NV constituent une forme d'ischémie-reperfusion. [38,39] L'hyperoxie rencontrée dans la phase initiale de la rétinopathie du prématuré est généralement acceptée comme mécanisme de production de ROS puisque l'oxygène est le substrat pour la synthèse de  $O_2^{\bullet-}$  et autres ROS qui en dérivent. [40] Paradoxalement, l'hypoxie rencontrée dans la deuxième phase de la maladie contribue aussi à la génération de stress oxydatif/nitrosatif. L'hypoxie mène à l'activation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inducible (iNOS) et ainsi à la production d'oxyde nitrique (NO). [41] En réagissant avec le  $O_2^{\bullet-}$ , le NO forme davantage de ONOO<sup>-</sup> et on observe une augmentation de la nitrosylation. Les produits de nitration altèrent la viabilité des cellules endothéliales et la vascularisation rétinienne. [39,42]

### **1.1.3.3 Régulation du flot oculaire**

Deux lits vasculaires distincts, provenant de l'artère ophtalmique, procurent les nutriments et l'oxygène nécessaire à l'œil. Les vaisseaux rétiniens, émergeant de l'artère rétinienne, sont responsables de nourrir la surface interne de la rétine, tandis que la choroïde, originant des artères ciliaires, approvisionne la surface externe de la rétine incluant les photorécepteurs. [43] Le flot choroïdien est particulièrement abondant et l'extraction d'oxygène dans la choroïde est faible, ce qui fait de ce réseau vasculaire un important pourvoyeur d'oxygène et de nutriments pour la rétine. [44] Alors que la vasculature rétinienne complète son développement et atteint la périphérie de la rétine à 40 semaines d'âge gestationnel, les vaisseaux choroïdiens mûrissent tôt dans la grossesse, autour de 22 semaines. [45] Chez les enfants prématurés qui ont une vascularisation rétinienne incomplète avec une zone périphérique avasculaire, la choroïde joue un rôle encore plus important dans l'irrigation de la rétine. [46] Toutefois, des involutions de la choroïde ont aussi été observées dans la

rétinopathie du prématuré, particulièrement dans les aires de perte de photorécepteurs et de déficit fonctionnel, suggérant que la choroïde joue aussi un rôle dans la pathogénèse de cette condition. [47]

L'autorégulation correspond à la capacité de maintenir un flot constant malgré une variation des pressions de perfusion et des tensions d'oxygène. L'objectif est de maintenir un flot sanguin adéquat pour répondre aux demandes métaboliques. [48] Chez le nouveau-né, contrairement à l'adulte, les vasculatures rétiniennes et choroïdiennes sont incapables de limiter la livraison excessive d'oxygène à la rétine, en partie à cause d'une insuffisance de facteurs vasoconstricteurs, mais surtout à cause d'une production exagérée de vasodilatateurs. [49,50] Chez l'adulte, le flot rétinien et le flot choroïdien sont maintenus constants sur un intervalle de pressions de perfusion tandis que, chez le nouveau-né, l'autorégulation du flot rétinien est limitée et l'autorégulation du flot choroïdien inexistante. [51,52] Similairement, en réponse à des changements de tensions d'oxygène, l'adulte module le flot rétinien et choroïdien de façon à maintenir des niveaux d'oxygène constants, tandis que le nouveau-né bénéficie seulement d'une autorégulation du flot rétinien. Autrement dit, les vaisseaux choroïdiens du nouveau-né sont incapables de se contracter en réponse à l'hyperoxie, résultant en une augmentation des niveaux d'oxygène dans la choroïde et la rétine. On constate ainsi une augmentation de ROS, notamment  $H_2O_2$ , et davantage de stress oxydatif. [53]

Les prostaglandines et les thromboxanes font partie des prostanoides, une sous-classe d'eicosanoïdes. La synthèse des prostanoides débute avec l'enzyme phospholipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ), qui hydrolyse les phospholipides de la membrane cellulaire pour produire l'acide arachidonique, qui sera ensuite converti en prostaglandine  $H_2$  ( $PGH_2$ ) par une cyclooxygénase (COX). Des synthases distinctes transforment ensuite la  $PGH_2$  en différents prostanoides ( $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$  et thromboxane  $A_2$ ). [54,55] Chez le nouveau-né, la rétine et la choroïde produisent plus de prostanoides que chez l'adulte. [49] En réponse à l'augmentation de la pression de perfusion oculaire ou à l'ischémie, la cascade COX est activée et mène à une relâche importante de  $PGE_2$ , de  $PGF_2$  et de ROS. Ceux-ci induisent encore davantage l'activation de la cascade COX. [56-58] Chez l'adulte,  $PGE_2$  et  $PGF_{2\alpha}$  sont des vasoconstricteurs alors que chez le nouveau-né,  $PGE_2$  et  $PGF_{2\alpha}$  jouent le rôle de

vasodilatateurs. Le résultat net est une vasodilatation non opposée. [59,60] Plutôt que de limiter l'arrivée d'oxygène à la rétine, la réponse du nouveau-né a pour effet d'augmenter les niveaux oculaires d'oxygène, les ROS et les dommages oxydatifs qui s'ensuivent et l'activation de la cascade COX, enclenchant ainsi un cercle vicieux.

L'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS) sont toutes deux activées dans le tissu choroïdien et neurorétinien du nouveau-né et sont davantage induites dans la rétinopathie du prématuré. [61] L'élévation d'oxyde nitrique (NO) qui s'ensuit l'emporte sur les vasoconstricteurs et contribue à altérer la régulation du flot choroïdien en hyperoxie. [3,53] L'hypercapnie, une condition souvent présente chez le prématuré secondairement à la dysplasie bronchopulmonaire, résulte en une élévation de PGE<sub>2</sub>, qui induit l'expression d'eNOS, générant ainsi du NO et augmentant conséquemment le flot rétinien, l'oxygénation et la production de nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). [42,62] Le stress nitrique et oxydatif ainsi généré induit la production de NO et de prostaglandines, tous deux affectant le tonus des muscles lisses des vaisseaux de l'œil. [49] Dans la rétine, la vasodilatation causée par PGE<sub>2</sub> et d'autres prostaglandines est partiellement attribuable à la production de NO et, inversement, NO exerce une partie de son effet vasodilatateur via un mécanisme qui implique la cascade COX. [60,63]

#### **1.1.3.4 Angiogénèse et facteurs de croissance**

Outre les dommages directs causés à l'endothélium par le stress oxydatif, l'excès en oxygène joue un rôle clé dans la pathogénèse de la rétinopathie du prématuré en supprimant l'expression de facteurs de croissance et de survie. Ces ajustements se produisent au niveau transcriptionnel grâce au facteur inductible par l'hypoxie-1 (HIF-1), qui est composé de deux sous-unités (alpha et bêta). Celles-ci doivent s'hétérodimériser afin que HIF-1 devienne actif. [64] Dans des conditions normoxiques, HIF-1 $\alpha$  a une demi-vie éphémère en raison de son ciblage rapide au protéasome par des prolyl hydroxylases (PHD). [65] L'oxygène et l'alpha-cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) sont deux coactivateurs essentiels de PHD. Par conséquent, en hypoxie ou en carence nutritionnelle, PHD est inactif, HIF-1 $\alpha$  n'est pas dégradé, la dimérisation de

HIF-1 se produit et la transcription de gènes qui ont un élément de réponse à l'hypoxie est initiée. HIF-1 entraîne la transcription d'une multitude de gènes qui jouent un rôle dans la réponse à l'hypoxie, entre autres l'érythropoïétine (EPO), le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et iNOS. [66,67] Par ailleurs, les ROS ont également la capacité de stabiliser HIF-1 $\alpha$  et donc d'augmenter l'angiogénèse en situation hypoxique. [68]

Le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) augmente en conditions hypoxiques et joue un rôle primordial dans l'angiogénèse, que ce soit dans les tumeurs ou dans la rétine. [69,70] Toutefois, VEGF est aussi essentiel dans le développement normal de la vascularisation rétinienne. Alors que le tissu neural de la rétine se développe antérieurement aux vaisseaux chez le fœtus, la demande en oxygène s'accroît et génère une vague d'hypoxie physiologique qui précède la croissance vasculaire. [71] Au cours du développement de la rétine, les astrocytes et neurones sécrètent le VEGF et d'autres facteurs de croissance et forment un gabarit qui guide l'angiogénèse. Au fur et à mesure que de nouveaux vaisseaux se forment, l'hypoxie relative s'estompe, la dégradation de HIF-1 $\alpha$  reprend et l'expression de VEGF diminue par rétroaction locale, freinant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux. [72]

Chez l'enfant prématuré, l'administration d'oxygène supplémentaire résulte en un environnement hyperoxique et supprime l'expression de VEGF, interférant ainsi avec le développement vasculaire normal de la rétine. La perte du gradient physiologique de VEGF entraîne un arrêt de la croissance des vaisseaux et même une régression de certains vaisseaux déjà formés, des éléments caractéristiques de la phase de VO. [73] Dans la phase de NV, la rétine devient hypoxique à cause d'une combinaison de dégénérescence microvasculaire survenue précédemment et d'accroissement des demandes métaboliques de la rétine en pleine croissance. Celle-ci exprime des niveaux élevés de VEGF dans le but de rétablir un apport adéquat en oxygène, mais résulte plutôt en une néovascularisation désorganisée et pathologique. [74] VEGF induit aussi la formation de ROS en activant la NADPH oxydase, perpétuant ainsi une amplification délétère du signal proangiogénique. [75]

L'EPO est une hormone produite principalement dans le rein en réponse à l'hypoxie ou l'anémie et stimule la production d'érythrocytes et l'angiogénèse. Dans la rétine, l'EPO est

impliqué à la fois dans l'angiogénèse physiologique et pathologique. Semblablement au VEGF, les niveaux d'EPO chutent substantiellement en conditions hyperoxiques dans la phase initiale de VO et deviennent élevés subséquemment dans la phase de NV. Comme pour le VEGF, l'EPO semble avoir un effet cytoprotecteur dans la première phase. L'administration précoce d'EPO dans le modèle murin de la rétinopathie du prématuré diminue l'ampleur de la VO et de l'apoptose neuronale dans la rétine en activant le facteur nucléaire kappa B (NF-κB). En contraste, l'administration d'EPO pendant la deuxième phase amplifie la néovascularisation pathologique et la sévérité des dommages rétiens. [76,77] De plus, il existe une interaction entre les récepteurs du VEGF et de l'EPO. L'activation du récepteur de type 2 du VEGF (VEGFR2) par le VEGF active le récepteur de l'EPO. Celui-ci interagit aussi avec le VEGFR2 pour l'activer, amplifiant ainsi la réponse angiogénique au VEGF. [78]

Bien que l'oxygène et les facteurs angiogéniques induits par HIF-1 $\alpha$  occupent un rôle central dans le développement vasculaire de la rétine et dans la rétinopathie du prématuré, d'autres facteurs sont importants. En effet, le contrôle serré de l'administration d'oxygène supplémentaire n'est pas parvenu à éradiquer la maladie. L'hormone de croissance et le facteur de croissance de type insuline 1 (IGF-1), par lequel passent plusieurs des effets mitogènes de l'hormone de croissance, semblent impliqués dans les deux phases de la rétinopathie du prématuré. [23] IGF-1 et IGF-2 sont importants dans la croissance fœtale tout au long de la grossesse. La concentration d'IGF-1 augmente durant le dernier trimestre et corrèle avec la taille du fœtus, alors qu'IGF-2 reste relativement inchangé. Cependant, après la naissance, les niveaux sériques d'IGF-1 diminuent à cause de l'absence du placenta et du liquide amniotique. [79,80] Par conséquent, le bébé prématuré est exposé à des concentrations moindres d'IGF-1 trop tôt dans son développement. La concentration sérique d'IGF-1 corrèle directement avec la sévérité de la rétinopathie du prématuré chez l'humain. Plus la concentration est faible, plus la rétinopathie est sévère. De plus, dans un environnement normal, les souris déficientes en IGF-1 (*knock-out*) ont une croissance vasculaire rétinienne anormalement lente malgré des niveaux de VEGF inchangés. [81] L'antagonisation du récepteur d'IGF-1 supprime la néovascularisation en partie à travers le contrôle de l'activation par VEGF de la protéine kinase activée par le mitogène p44/42. IGF-1 semblerait donc jouer un rôle de facteur permissif pour le VEGF. [82] IGF-1 est aussi étroitement associé au gain de

poids pendant la période post-natale. Un faible poids est un facteur de risque connu pour la rétinopathie du prématuré. [83] En plus de promouvoir la croissance et d'interagir avec l'insuline et l'hormone de croissance pour moduler la sensibilité à l'insuline, IGF-1 jouerait un rôle dans la régulation de la glycolyse. [84,85]

## 1.2 Métabolisme énergétique

### 1.2.1 Respiration cellulaire

#### 1.2.1.1 Métabolisme du glucose

##### *Glycolyse*

La glycolyse se divise en neuf réactions qui convertissent le glucose en pyruvate. Le glucose pénètre la cellule en utilisant des transporteurs spécifiques (principalement GLUT1-4). La glycolyse se déroule dans le cytosol, où les enzymes de la glycolyse se retrouvent. Les enzymes impliquées sont les suivantes : hexokinase, phosphoglucose isomérase, phosphofructokinase, aldolase, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), phosphoglycérate kinase, phosphoglycérate mutase, enolase et pyruvate kinase.

La première étape consiste à phosphoryler le glucose en glucose-6-phosphate (G6P). Cette réaction, catalysée par l'enzyme hexokinase, consomme une molécule d'ATP. Dans un deuxième temps, la phosphoglucose isomérase réarrange le cycle à six atomes de carbones en cycle à cinq carbones, ce qui forme le fructose-6-phosphate (F6P). Lors de la troisième étape, la phosphofructokinase utilise une deuxième molécule d'ATP pour phosphoryler le F6P en fructose-1,6-bisphosphate (FBP). Quatrièmement, l'aldolase catalyse le clivage du FBP en deux molécules à trois carbones : glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Cette dernière est convertie en GAP par l'enzyme triphosphate isomérase, de sorte qu'on obtient un total de deux molécules de GAP qui passent à l'étape suivante. Les réactions subséquentes se déroulent donc en double. Cinquièmement, la GAPDH transforme le GAP en 1,3-bisphoglycérate. Cette réaction ajoute un phosphate et requiert la participation de la coenzyme  $\text{NAD}^+$ , qui oxyde le GAP, produisant ainsi un NADH et un

proton en plus du 1,3-bisphoglycérate. Au cours de la sixième étape, la phosphoglycérate kinase catalyse la synthèse du 3-phosphoglycérate à partir du 1,3-bisphoglycérate, ce qui libère un groupe phosphate. Celui-ci est transféré à une molécule d'ADP, produisant ainsi un ATP pour chaque molécule de 3-phosphoglycérate formée (donc deux ATP). À ce moment, la glycolyse atteint une production nette de zéro ATP puisque deux ATP ont initialement été consommés. La septième étape correspond au réarrangement du 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate par l'enzyme phosphoglycérate mutase. Huitièmement, l'énolase déshydrate le 2-phosphoglycérate afin d'obtenir le phosphoénolpyruvate. Lors de la neuvième et dernière étape de la glycolyse, la pyruvate kinase transfère le groupe phosphate du phosphoénolpyruvate à une molécule d'ADP, ce qui produit le pyruvate et un ATP. Comme deux molécules de phosphoénolpyruvate sont transformées à ce moment, deux ATP sont produits. La glycolyse d'une molécule de glucose génère donc deux molécules de pyruvate et un gain net de deux ATP. [86,87]

### *Aérobic et anaérobic*

La glycolyse peut se produire de façon anaérobic ou aérobic dépendamment de la disponibilité d'oxygène dans la cellule. Les étapes de la glycolyse décrites ci-dessus ne requièrent pas d'oxygène et c'est le devenir des molécules de NADH et de pyruvate formées qui diffère entre la glycolyse anaérobic et la glycolyse aérobic.

En absence d'oxygène, la fermentation homolactique permet d'oxyder le NADH et d'ainsi restaurer le  $\text{NAD}^+$ . Dans ce procédé réversible, l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) transfère l'hydrogène du NADH au pyruvate, ce qui produit du lactate et du  $\text{NAD}^+$ . Dans cette situation, aucun ATP supplémentaire n'est synthétisé et le gain net de la glycolyse reste de deux ATP.

En présence d'oxygène, le NADH est transporté dans la mitochondrie où il est utilisé comme donneur d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons. La forme oxydée ( $\text{NAD}^+$ ) est alors régénérée. Le pyruvate est transporté dans la matrice de la mitochondrie grâce à un

symporteur pyruvate- $H^+$ . Le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase, avec la collaboration de la coenzyme A et du  $NAD^+$ , convertit le pyruvate en acétyl-CoA. Cette réaction est irréversible et l'acétyl-CoA peut alors entrer dans le cycle de Krebs. En empruntant la voie aérobie, une molécule de glucose produit un total de 36 ATP à travers la glycolyse, le cycle de Krebs, la chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative. [86,88]

### *Régulation de la glycolyse et PFKFB*

La glycolyse est un processus métabolique essentiel pour la survie et elle est donc étroitement régulée. Les trois principaux points de régulations correspondent à l'hexokinase, à la phosphofructokinase et à la pyruvate kinase. Parmi ces trois enzymes, la phosphofructokinase est considérée comme le point de régulation le plus important. [89]

PFK-1 est activée allostériquement par l'ADP, alors qu'elle est inhibée par l'ATP et le citrate, un métabolite du cycle de Krebs. Toutefois, l'activateur allostérique le plus puissant de PFK-1 est le métabolite fructose-2,6-bisphosphate. Ce dernier est aussi un inhibiteur de l'enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. Alors que PFK-1 promeut la glycolyse en convertissant le F6P en FBP, la fructose-1,6-bisphosphatase favorise la néoglucogénèse en effectuant la réaction inverse. En raison de l'effet antagoniste de ces deux enzymes, le fructose-2,6-bisphosphate joue un rôle crucial dans la coordination des processus de glycolyse versus néoglucogénèse. Les niveaux de fructose-2,6-bisphosphate sont contrôlés par une famille d'enzymes catalysant deux réactions opposées : la famille des 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB). [90]

Les quatre gènes *PFKFB1* à *PFKFB4* encodent plusieurs isoenzymes. Elles se distinguent par leur ratio d'activité phosphatase:kinase et leur spécificité à certains tissus. *PFKFB3* est exprimé dans pratiquement tous les organes et augmente fortement en réponse à l'hypoxie dans les poumons, le foie, les reins, le cerveau, le cœur et les testicules. *PFKFB4* serait nécessaire pour la réponse glycolytique à l'hypoxie et la croissance tumorale. La famille

enzymatique aurait un rôle physiologique dans l'adaptation de l'organisme à un environnement hypoxique. [89,91,92]

### **1.2.1.2 Métabolisme des acides gras (aperçu)**

La  $\beta$ -oxydation des acides gras est le processus par lequel les chaînes d'acides gras sont transformées en molécules d'acétyl-CoA afin d'alimenter le cycle de Krebs. Le processus de  $\beta$ -oxydation produit également des molécules de NADH et FADH<sub>2</sub> qui peuvent être directement utilisées dans la chaîne de transport d'électrons pour produire de l'ATP. La  $\beta$ -oxydation implique une variété d'enzymes, dont les plus importantes sont l'acyl-CoA déshydrogénase, l'énoyl-CoA hydratase, l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la cétoacyl-CoA thiolase. Il existe plusieurs isoformes de ces enzymes avec une affinité variable pour différentes longueurs de chaînes d'acides gras. Par exemple, on distingue l'acyl-coA déshydrogénase des acides gras à très longue chaîne, à longue chaîne, à chaîne moyenne et à courte chaîne. [93] L'activité des enzymes de la  $\beta$ -oxydation est inhibée à chaque niveau par les produits de leurs réactions. Les ratios  $[NAD^+]/[NADH]$  et  $[CoA]/[acétyl-CoA]$  participent aussi à la régulation de la  $\beta$ -oxydation. [94]

Lorsque l'oxydation des acides gras est prépondérante, principalement en situation de jeûne ou chez les diabétiques, des quantités abondantes d'acétyl-CoA sont générées, surpassant la capacité du cycle de Krebs. Il en résulte la synthèse de corps cétoniques, soient l'acétoacétate, le  $\beta$ -hydroxybutyrate et l'acétone. Les principales enzymes impliquées dans la cétogénèse sont la cétoacyl-CoA thiolase, l'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase (HMGCS), la HMG-CoA lyase et l'hydroxybutyrate déshydrogénase. La HMGCS est l'étape limitante dans la synthèse de  $\beta$ -hydroxybutyrate. Les corps cétoniques diffusent ensuite librement pour rejoindre la circulation sanguine systémique et peuvent être utilisés comme source d'énergie. Dans les cellules, les corps cétoniques peuvent être reconvertis en acétyl-CoA par diverses enzymes, dont l'acétyl-CoA synthétase 2. [95,96]

L'oxydation des acides gras génère substantiellement plus d'énergie par atome de carbone que l'oxydation du glucose. Par exemple, le résultat net du métabolisme d'une mole d'acide oléique (acide gras contenant 18 atomes de carbone) est de 146 moles d'ATP, alors qu'un nombre équivalent de carbones de glucose fournit 114 moles d'ATP. [96]

### **1.2.1.3 Métabolisme des acides aminés (aperçu)**

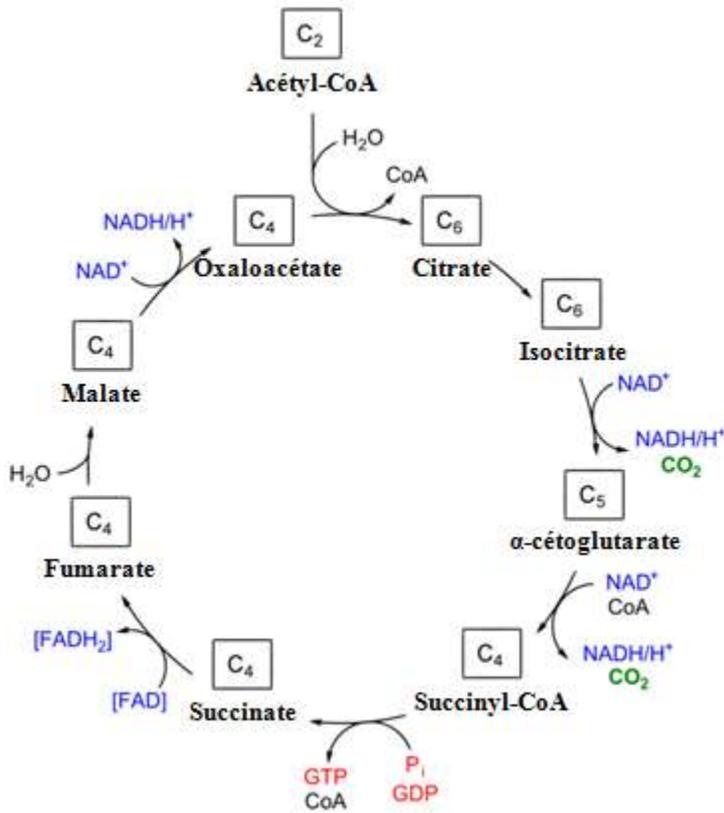
Les acides aminés non utilisés dans l'anabolisme protéique ne peuvent être entreposés et sont dégradés, principalement dans le foie, afin de fournir de l'ATP. Le groupe aminé doit être transféré de l'acide aminé vers un  $\alpha$ -cétoacide, le plus souvent  $\alpha$ -KG qui devient alors du glutamate. Ce processus réversible, appelé transamination, est médié par une multitude d'enzymes transaminases, dont certaines sont spécifiques pour un seul acide aminé alors que d'autres peuvent déaminer quelques acides aminés similaires. Une fois déaminés, les squelettes d'atomes de carbone qui restent sont transformés en acétyl-CoA, acétoacétate, pyruvate ou intermédiaires du cycle de Krebs, dépendamment des acides aminés en question. Les squelettes de carbone sont donc les précurseurs pouvant être utilisés dans le métabolisme énergétique. Conséquemment, des acides gras, des corps cétoniques et, dans certains cas, du glucose peuvent être générés à partir d'acides aminés. [97]

La glutamate déshydrogénase catalyse la déamination du glutamate en  $\alpha$ -KG et ammoniac. L' $\alpha$ -KG ainsi régénéré peut être réutilisé pour le processus de transamination ou servir directement dans le cycle de Krebs. L'activation de la glutamate déshydrogénase a donc comme effet de faciliter le métabolisme des acides aminés. [98]

### **1.2.1.4 Cycle de Krebs**

Le cycle de Krebs, également appelé cycle de l'acide citrique, débute avec une molécule d'acétyl-CoA. Celle-ci peut provenir du métabolisme du glucose, des acides gras ou des acides aminés. Le cycle implique huit enzymes, dont une est encastrée dans la membrane

interne de la mitochondrie, c'est-à-dire l'isocitrate déshydrogénase. Le cycle se déroule donc dans la matrice, le compartiment le plus interne de la mitochondrie. Les sept autres enzymes sont solubles. (Figure 3, ci-dessous)



**Figure 3 :** Cycle de Krebs

Vue d'ensemble des intermédiaires formés dans le cycle de Krebs. Le nombre d'atomes de carbone est indiqué dans une boîte au-dessus du nom de chaque molécule.

Image adaptée à partir de [100], licence *Creative Commons Attribution 3.0*).

La première réaction, catalysée par la citrate synthase, consiste en la condensation de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate. Elle permet la formation du citrate. Lors de la deuxième réaction, l'aconitase catalyse l'isomérisation du citrate afin de produire l'isocitrate. Troisièmement, l'isocitrate déshydrogénase (IDH) transfère deux protons de l'isocitrate au NAD<sup>+</sup> et forme l'α-KG. Au cours de la quatrième réaction du cycle, l'α-KG déshydrogénase catalyse la production de succinyl-CoA. Cinquièmement, la succinyl-CoA synthétase phosphoryle le succinyl-CoA en succinate, libérant ainsi un GTP qui sera ultérieurement

transformé en ATP. La sixième réaction est catalysée par la succinate déshydrogénase (SDH), qui appartient au complexe II de la chaîne de transport d'électrons, et mène à la formation de fumarate. Lors de la septième réaction, la fumarase hydrate le fumarate afin d'obtenir le malate. Finalement, la formation d'oxaloacétate par la malate déshydrogénase correspond à la huitième réaction du cycle. L'oxaloacétate peut ensuite recommencer le cycle en interagissant avec une nouvelle molécule d'acétyl-CoA. [99]

La principale enzyme régulatrice du cycle est l'isocitrate déshydrogénase. Elle est activée allostériquement par l'ADP et le  $\text{NAD}^+$ , ce qui la rend sensible au statut énergétique de la cellule. Lorsque les demandes énergétiques sont relativement plus importantes que les dépenses énergétiques, on assiste à une augmentation de l'ADP et du  $\text{NAD}^+$  et l'activité de l'isocitrate déshydrogénase augmente. Les quantités d'acétyl-CoA, d'oxaloacétate et d'oxygène influencent aussi l'activité du cycle de Krebs. [99]

### **1.2.1.5 Chaîne de transport d'électrons et phosphorylation oxydative**

La chaîne de transport d'électrons (aussi appelée chaîne respiratoire) est constituée d'un ensemble élaboré de protéines membranaires encastrées dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette chaîne sert ultimement à oxyder les coenzymes NADH et FADH afin de créer un gradient transmembranaire de protons ( $\text{H}^+$ ) qui fournira l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP. La phosphorylation oxydative est le concept qui englobe la chaîne de transport d'électrons et l'utilisation de l'énergie générée par celle-ci pour transformer l'ADP et le  $\text{P}_i$  en ATP. Pour une molécule initiale de glucose, les dix NADH qui entrent dans la chaîne de transport d'électrons proviennent de la glycolyse (deux), de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA (deux) et du cycle de Krebs (six). Les deux FADH<sub>2</sub> sont issus du cycle de Krebs. Les électrons libérés par NADH et FADH<sub>2</sub> se déplacent tout au long de la chaîne jusqu'à ce qu'ils soient transférés à l'accepteur d'électron final, l'oxygène. Pour chaque paire d'électrons libérée par NADH, trois molécules d'ATP sont générées. [101,102]

Les quatre complexes multiprotéiques qui forment la chaîne de transport d'électrons sont les suivants :

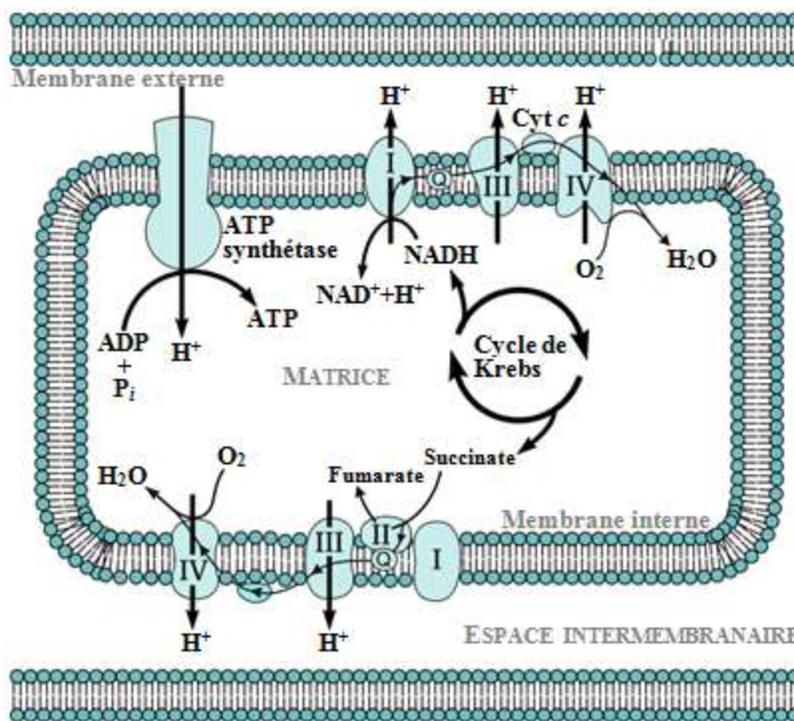
Complexe I (NADH-CoQ oxydoréductase, contient NADH déshydrogénase)

Complexe II (Succinate-CoQ oxydoréductase, contient succinate déshydrogénase)

Complexe III (CoQH<sub>2</sub>-cytochrome *c* oxydoréductase)

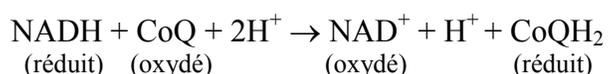
Complexe IV (Cytochrome *c* oxydase)

Les complexes I, III et IV sont des pompes à protons alors que le complexe II ne pompe pas directement de protons dans l'espace intermembranaire. Comme le complexe I, il fournit des électrons au complexe III, mais il utilise les électrons du FADH<sub>2</sub> plutôt que ceux du NADH. La chaîne comprend aussi deux transporteurs d'électrons : la coenzyme Q10 (CoQ), aussi appelée ubiquinone, et le cytochrome *c* (Cyt *c*). [97,103,104] (Figure 4, ci-dessous)

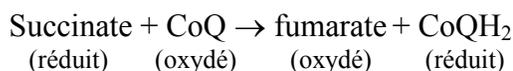


**Figure 4 :** Chaîne de transport d'électrons et phosphorylation oxydative  
Représentation schématique du métabolisme oxydatif dans la mitochondrie, incluant les quatre complexes de la chaîne de transport d'électrons et l'ATP synthétase.  
Image adaptée à partir de [105], domaine public.

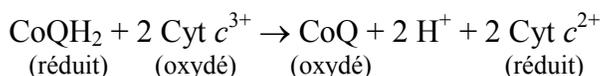
Le complexe I transfère une paire d'électrons du NADH à CoQ. À l'intérieur du complexe I, les électrons passent d'abord du NADH au flavine mononucléotide, un cofacteur semblable à FAD, puis à une protéine fer-soufre avant de réduire CoQ. La réaction catalysée dans le complexe I produit suffisamment d'énergie pour que quatre protons transitent de la matrice vers l'espace intermembranaire à chaque fois qu'une molécule de NADH libère ses électrons. CoQ agit comme transporteur pour acheminer les électrons au complexe suivant, le complexe III. [102,103]



L'enzyme succinate déshydrogénase impliquée dans le cycle de Krebs se retrouve dans le complexe II et permet la transformation de succinate en fumarate, ce qui relâche deux électrons et réduit le FAD en FADH<sub>2</sub>. Dans le complexe II, les électrons sont ensuite transférés à un groupe fer-soufre et finalement au CoQ, produisant ainsi la forme réduite CoQH<sub>2</sub>. Contrairement aux autres complexes, le complexe II produit une quantité d'énergie insuffisante pour déplacer des protons vers l'espace intermembranaire. Il ajoute toutefois de nouveaux électrons à la chaîne. Les électrons confiés à CoQH<sub>2</sub> transiteront vers le complexe III. [102,103]



Le complexe III utilise la molécule de CoQH<sub>2</sub> générée par le complexe I ou le complexe II pour donner deux électrons au cytochrome *c*. Les électrons relâchés par CoQH<sub>2</sub> transitent d'abord par un groupe fer-soufre et deux cytochromes de type *b* avant de réduire le cytochrome *c*. Pour chaque paire d'électrons qui transite à travers le complexe III, suffisamment d'énergie est produite pour effectuer la translocation de quatre protons vers l'espace intermembranaire. Le complexe III ne relâche pas de nouvel électron et la paire d'électrons initialement relâchée dans le complexe I ou II continue son chemin vers le complexe IV. [102,103]





## 1.2.2 Effet Warburg

Il est reconnu depuis longtemps que les tumeurs possèdent un pH extracellulaire plus acide que les tissus normaux. Cette acidité découlerait d'une consommation de glucose plus élevée. Les tumeurs, en contraste avec les cellules normales, convertissent le pyruvate en lactate, même en abondance d'oxygène, plutôt que de l'utiliser pour alimenter le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. D'abord décrite par Otto Warburg il y a plus de cinquante ans, cette utilisation préférentielle de la glycolyse est maintenant désignée sous le nom d'effet Warburg. [106] La glycolyse est un moyen inefficace de générer de l'ATP, mais semblerait conférer un avantage prolifératif en facilitant l'incorporation de nutriments dans la biomasse (nucléotides, acides aminés, lipides) nécessaire à la formation d'une nouvelle cellule. Plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire régulent aussi les mécanismes métaboliques qui permettent l'utilisation des nutriments pour accroître la biomasse. [107] Les mécanismes exacts impliqués restent à préciser, mais l'activation de HIF-1 dans la tumeur et l'induction de l'expression des transporteurs de glucose et enzymes glycolytiques qui en résultent joueraient un rôle. HIF-1 favorise aussi la conversion de pyruvate en lactate en régulant la lactate déshydrogénase A. [108]

Il semblerait que les cellules endothéliales priorisent elles aussi la glycolyse. Bien que ces cellules aient un accès immédiat à l'oxygène dans le sang et ont la possibilité d'utiliser le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, plus de 80% de leur ATP est généré à travers la glycolyse. Les cellules endothéliales oxydent moins de 1% du pyruvate qu'elles génèrent. Dans ces cellules, diminuer la glycolyse en éliminant PFKFB3 altère la prolifération, la migration, la croissance microvasculaire et les ramifications des vaisseaux, ce qui corrobore une étroite collaboration entre la glycolyse et la prolifération cellulaire. [109]

### 1.2.3 Rétinopathie du prématuré et métabolisme énergétique

L'objectif du réseau vasculaire est de fournir les nutriments et l'oxygène nécessaires aux cellules, il est donc impératif que les cellules soient capables de traduire une carence énergétique, tout comme un manque d'oxygène, en une réponse angiogénique. Un nouveau paradigme, selon lequel la signalisation par les métabolites énergétiques contribuerait de façon importante à la vascularisation physiologique et pathologique de la rétine, semble accumuler de plus en plus d'évidences. [110]

Parmi les meilleurs exemples d'un tel système de signalisation conservé à travers l'évolution, on retrouve la signalisation par le succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs. Dans des conditions hypoxiques, le succinate s'accumule à cause d'une rétroaction négative du FADH, du NADH et des ROS sur la succinate déshydrogénase (composante du complexe II de la chaîne de transport d'électrons). L'accumulation de succinate inhibe PHD par rétroaction négative. En effet, dans la réaction pour cibler HIF-1 $\alpha$  pour sa dégradation, PHD utilise de l'oxygène et de l' $\alpha$ -KG comme cosubstrats et relâche du succinate. L'élévation des niveaux de succinate mène donc à la stabilisation de HIF-1 et à l'activation délétère des gènes pro-angiogéniques contrôlés par celui-ci. [111] Aussi, dans un modèle animal de rétinopathie du prématuré, le succinate s'accumule dans la rétine et induit la génération de facteurs pro-angiogéniques indépendamment de HIF-1 $\alpha$ . La croissance vasculaire serait même stimulée plus précocement par le mécanisme indépendant de HIF-1 $\alpha$  que celui dépendant de HIF-1 $\alpha$ . [112] D'autres intermédiaires du cycle de Krebs, entre autres le pyruvate, le malate et l'oxaloacétate montrent des propriétés pro-angiogéniques in vitro. [113,114]

Lorsque les niveaux d'oxygène sont adéquats, le cycle de Krebs produit de l'énergie et les niveaux d'ATP sont élevés, tandis que les niveaux d'adénosine sont bas. Inversement, en hypoxie, les concentrations d'ATP diminuent et celles d'adénosine augmentent. Dans un modèle animal de rétinopathie du prématuré, le cycle de Krebs est régulé à la baisse et des niveaux élevés d'adénosine stimulent l'angiogénèse. [115] La réponse vasculaire robuste entraînée par le succinate et l'adénosine suggère un rôle direct de ces métabolites dans la liaison de la demande énergétique à la réponse angiogénique.

## 1.3 Sirtuine 3

### 1.3.1 Classification des sirtuines

L'acétylation et la déacétylation des résidus lysine sur les protéines sont un phénomène répandu. Ces réactions réversibles affectent des milliers de sites d'acétylation dans une vaste variété de protéines, incluant les histones sur l'ADN. L'acétylation des résidus est renversée par des déacétylases. Ces protéines sont catégorisées en quatre classes, la classe III correspondant à la famille des sirtuines. Les sirtuines forment une classe bien distincte, car elles utilisent le  $\text{NAD}^+$  comme co-substrat. Cette particularité en fait des senseurs métaboliques. [116,117]

L'importance primordiale des sirtuines est soulignée par leur préservation tout au long de l'évolution. On les retrouve dans pratiquement tous les organismes, allant des bactéries et des plantes jusqu'aux humains. Un intérêt grandissant est né dans les années 1990 alors que les études sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont révélé que la première sirtuine identifiée (Sir2, *silent mating-type information regulation 2*) était associée à une prolongation de la longévité. [118]

Il existe sept sirtuines (SIRT1-7) chez les mammifères. Elles se distinguent par leur structure, leur localisation cellulaire et leur spécificité pour divers substrats. SIRT1, l'orthologue mammalien le plus proche de Sir2, se trouve principalement dans le noyau cellulaire où elle interagit avec l'euchromatine et serait un médiateur des effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité. SIRT2 est localisée surtout dans le cytosol, interagit avec les microtubules et serait impliquée dans certaines maladies neurodégénératives. SIRT3, SIRT4 et SIRT5 sont des protéines mitochondriales. Ces dernières régulent des mécanismes de réponse au stress dans la mitochondrie et modifient le métabolisme énergétique. SIRT6 et SIRT7 se trouvent dans le noyau avec SIRT1 et contribuent à la stabilité chromosomique et à la régulation de la transcription des gènes. [116,119]

### 1.3.2 Mécanisme d'action des sirtuines

À l'exception de SIRT4 pour laquelle aucune activité de déacétylation n'a été décrite jusqu'à maintenant, toutes les sirtuines ont une fonction de déacétylases. Alors que SIRT4 agit comme ADP-ribosyltransférase uniquement, certaines sirtuines ont les deux fonctions. Dans tous les cas, l'activité des sirtuines est  $\text{NAD}^+$ -dépendante, ce qui les démarque des histone déacétylases et les lie si étroitement à l'état métabolique de la cellule. La déacétylation s'effectue en deux étapes. La sirtuine catalyse d'abord le clivage d'un lien amide dans la molécule  $\text{NAD}^+$ , ce qui mène à la formation de nicotinamide (NAM) et d'un complexe covalent peptide ADP-ribose - imidate. Dans la deuxième étape, cet intermédiaire est transformé en 2'-*O*-acétyl-ADP-ribose et le substrat déacétylé est libéré. La réaction de déacétylation catalysée par les sirtuines consomme donc du  $\text{NAD}^+$  et produit du NAM, du 2'-*O*-acétyl-ADP-ribose et un substrat déacétylé (la lysine de la protéine cible). Bien que le transfert du groupement acétyl au 2'-*O*-acétyl-ADP-ribose soit défavorable d'un point de vue énergétique, l'hydrolyse du  $\text{NAD}^+$  parvient à fournir la force motrice nécessaire à l'activité des sirtuines. [120,121]

L'activité des sirtuines est donc augmentée en présence de  $\text{NAD}^+$ , alors qu'elle est diminuée par la forme réduite NADH et par NAM. La conversion du NAM en  $\text{NAD}^+$  est favorisée par la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT). L'expression du gène *NAMPT* est augmentée en conditions de stress et de limitation en nutriments. [121,122] Grâce à leur capacité à répondre aux ratios  $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ , les sirtuines transforment les informations sur le statut nutritionnel en changements au niveau du métabolisme cellulaire. Par exemple, en état de carence nutritionnelle, l'activité de SIRT1 augmente et celle-ci active le *peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha* (PPARGC1A), ce qui promeut la néoglucogénèse afin de mieux répondre aux besoins énergétiques. [123]

### 1.3.4 Rôles établis de Sirtuine 3

L'engouement récent pour SIRT3 provient de son rôle dans la prolongation de la longévité chez plusieurs organismes, incluant l'humain. Effectivement, des polymorphismes au niveau des nombres variables de répétitions en tandem (VNTR) dans le gène *SIRT3* sont associés avec une plus longue durée de vie. La modulation des ROS et des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique par SIRT3 établirait possiblement le lien entre la restriction calorique et la longévité. [124-126]

#### 1.3.4.1 Rôle de SIRT3 dans le métabolisme énergétique

SIRT3, la principale sirtuine mitochondriale, joue un rôle central dans le métabolisme énergétique de la cellule. En effet, le niveau basal d'ATP est réduit de plus de 50% dans les cellules de souris déficientes en SIRT3. [127,128] Cette déacétylase est impliquée dans la réponse adaptative à une variété de stress, notamment la restriction calorique et le stress métabolique. Par exemple, l'expression de *SIRT3* augmente dans le foie et les tissus adipeux bruns en période de jeûne. [128,129]

SIRT3 active plusieurs protéines mitochondriales incluant au moins une sous-unité du complexe I, la succinate déshydrogénase dans le complexe II, l'acétyl-CoA synthétase 2, la glutamate déshydrogénase impliquée dans le cycle de Krebs et l'acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne longue (LCAD). En activant le complexe I et le complexe II de la chaîne de transport d'électrons, SIRT3 amplifie la phosphorylation oxydative. [129,130] La déacétylation de la glutamate déshydrogénase facilite le métabolisme oxydatif des acides aminés, car elle permet de renouveler l' $\alpha$ -KG nécessaire au processus de transamination. Quant à la déacétylation de LCAD, elle augmente l'oxydation des acides gras. [98,129] De plus, SIRT3 active la forme mitochondriale de HMGCS (*HMGCS2*), l'étape limitante dans la synthèse du corps cétonique  $\beta$ -hydroxybutyrique. SIRT3 jouerait ainsi un rôle essentiel dans la production de corps cétoniques, une source d'énergie cruciale en période de jeûne. [131]

L'acétyl-CoA synthétase 2 contribue à fournir l'acétyl-CoA nécessaire au fonctionnement du cycle de Krebs. Ce dernier procure les cofacteurs réduits NADH et FADH<sub>2</sub> à la chaîne de transport d'électrons, ce qui augmente la phosphorylation oxydative et la production d'ATP. Lorsque les concentrations de NADH s'élèvent dans la mitochondrie, l'activité de SIRT3 diminue et celle de l'acétyl-CoA synthétase 2 fait de même, ralentissant ainsi le cycle de Krebs. Inversement, en cas de restriction calorique, le ratio [NAD<sup>+</sup>]/[NADH] augmente, ce qui active SIRT3 et, conséquemment, la phosphorylation oxydative. [95,130]

SIRT3 est donc activée en situation de carence nutritionnelle et reprogramme le métabolisme énergétique de façon à optimiser la respiration cellulaire. L'effet global consiste en une diminution de la glycolyse et une plus grande utilisation des acides gras. [132]

#### **1.3.4.2 Rôle de SIRT3 dans le stress oxydatif**

En condition de restriction calorique, SIRT3 est activée et déacétyle/active l'isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2), l'enzyme du cycle de Krebs qui convertit l'isocitrate en alpha-cétoglutarate ( $\alpha$ -KG). Dans la mitochondrie, on assiste donc à une augmentation du NADPH et, grâce à la glutathion réductase NADPH-dépendante, du ratio glutathion réduit/glutathion oxydé ([GSH]/[GSSG]). Le glutathion est un cofacteur majeur utilisé par plusieurs mécanismes de défense antioxydants, dont la glutathion peroxydase, pour dégrader les ROS. [125,133] SIRT3 augmente aussi l'expression des enzymes anti-oxydantes MnSOD et catalase en déacétylant et activant le facteur de transcription *forkhead box O3a* (FoxO3a). [132,134] SIRT3 réduit aussi la synthèse de ROS dans la chaîne de transport d'électrons, possiblement en interagissant avec le complexe III. L'activation de SIRT3 a donc comme effet global de diminuer les niveaux de ROS. [135] Toutefois, en réduisant les concentrations de ROS, SIRT3 supprime l'activité de HIF-1 $\alpha$  et, conséquemment, l'angiogénèse. [136,137]

### 1.3.4.3 Rôle de SIRT3 dans le cancer

Compte tenu de son rôle primordial dans le stress oxydatif et le métabolisme énergétique, il est attendu que SIRT3 joue un rôle important dans la carcinogénèse. De plus en plus d'évidences suggèrent que SIRT3 peut jouer soit un rôle d'oncogène, soit un rôle de suppresseur de tumeur en influençant une série de modulateurs clé dans le cancer. [132]

D'un côté, SIRT3 contribue à la survie cellulaire de plusieurs façons. En déacétylant Ku70, SIRT3 augmente l'interaction entre Ku70 et la protéine X associée à BCL2 (BAX), ce qui a pour effet de prévenir la translocation de BAX dans la mitochondrie et l'apoptose dans des conditions de stress. [138,139] SIRT3 interagit avec le suppresseur de tumeur p53 dans les cellules de cancer de la vessie. La déacétylation de p53 abolit son activité, l'empêchant ainsi d'arrêter la croissance et enclencher la sénescence. Dans ce contexte, SIRT3 promeut la carcinogénèse. [140] En outre, dans les cellules de cancer du sein, SIRT3 diminue les niveaux de ROS et l'apoptose et est associée à la résistance au tamoxifen, un traitement anti-œstrogénique couramment utilisé. [141] SIRT3 joue un rôle pro-survie cellulaire en modulant le stress oxydatif et pourrait exercer certains de ses effets oncogènes en abaissant les niveaux de ROS suffisamment pour ne pas déclencher l'apoptose, tout en maintenant un phénotype prolifératif. Dans le même ordre d'idée, une surexpression de *SIRT3* est associée à un sombre pronostic chez les patients atteints de cancer de l'œsophage. [142]

D'un autre côté, SIRT3 semble aussi avoir un effet protecteur contre le cancer par divers mécanismes, incluant la modulation de l'angiogénèse et des ROS. SIRT3 active l'isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2), l'enzyme du cycle de Krebs qui transfère deux protons de l'isocitrate au  $\text{NAD}^+$  et forme l' $\alpha$ -KG. En plus d'augmenter les systèmes de défense antioxydants, cela a pour effet d'augmenter la concentration d' $\alpha$ -KG, un cofacteur nécessaire à PHD pour accélérer la dégradation de HIF-1 $\alpha$ . Lorsque SIRT3 est activée, on observe donc une diminution de HIF-1 $\alpha$  et de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, l'angiogénèse (dont VEGF), l'inflammation, la croissance cellulaire, l'invasion et la migration. [66,67,131] Une carence en SIRT3 favorise aussi la stabilisation de

HIF-1 $\alpha$  par un autre mécanisme. SIRT3 a comme effet global de diminuer les niveaux de ROS et ceux-ci sont connus pour leur capacité à stabiliser HIF-1 $\alpha$ , possiblement en altérant directement PHD. [68] Lorsque SIRT3 est active, on constate donc une diminution des niveaux de stress oxydatif et de HIF-1 et de l'expression des gènes qui en découlent. HIF-1 augmente aussi la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B qui induit ensuite la transcription de TNF- $\alpha$ , un médiateur inflammatoire qui déclenche la production d'une multitude de chimiokines. Cette cascade inflammatoire joue un rôle majeur dans plusieurs cancers, incluant le cancer du colon et la leucémie. [143-145] Dans ce contexte, SIRT3 joue un rôle de suppresseur de tumeur. Dans le cancer spino-cellulaire, une forme de cancer de la peau, de la tête et du cou, plusieurs sirtuines, dont *SIRT3*, sont sous-exprimées. [146] Dans le cancer du sein, le 4-hydroxynonanal, un produit de la peroxydation lipidique, augmente la croissance tumorale en diminuant les niveaux de SIRT3. Suppléer les cellules en SIRT3 freine l'angiogénèse et l'expansion du cancer. [147] De plus, la perte de SIRT3 mène à une reprogrammation du métabolisme énergétique vers la glycolyse. Cette utilisation préférentielle de la glycolyse, appelée l'effet Warburg, constitue l'empreinte métabolique de plusieurs cancers. On ignore encore si la perte de SIRT3 est un agent causal dans l'initiation du cancer ou si c'est plutôt une perte subséquente de SIRT3 dans une tumeur déjà existante qui aiderait la tumeur à favoriser la glycolyse et proliférer. [148,149]

## **1.4 Hypothèse de recherche**

SIRT3 est impliquée dans la réponse cellulaire au stress en régulant le métabolisme énergétique, le stress oxydatif et l'angiogénèse. Sachant que ces trois éléments sont cruciaux dans la pathogénèse de la rétinopathie du prématuré, nous émettons l'hypothèse selon laquelle SIRT3 contribue à rétablir la vascularisation rétinienne détériorée dans l'OIR à travers l'effet Warburg, c'est-à-dire en favorisant une reprogrammation du métabolisme énergétique.

## **CHAPITRE 2**

# **MÉTHODOLOGIE**

## 2.1 Animaux

Toutes les expériences ont respecté la déclaration pour l'utilisation d'animaux dans la recherche de l'*Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO). [150] Les manipulations animales ont également été approuvées par le comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) du centre de recherche du centre hospitalier universitaire Sainte-Justine, en accord avec les lignes directrices du conseil canadien de protection des animaux en science. Les souris de type sauvage S129 (129S1/SvImJ, numéro de stock 002448) et les souris *Sirt3 knock-out* ou *Sirt3<sup>-/-</sup>* (129-Sirt3<sup>tm1.1Fwa</sup>/J, numéro de stock 012755) ont été achetées chez Jackson Laboratory.

## 2.2 Rétinopathie induite par l'oxygène (OIR)

Le modèle OIR sert à imiter les maladies oculaires humaines caractérisées par une phase tardive d'angiogenèse pathologique délétère, notamment la rétinopathie du prématuré et la rétinopathie diabétique proliférante. [15] Dans ce protocole, les souriceaux sont exposés à une concentration d'O<sub>2</sub> de 75% de l'âge de 7 jours (P7) à 12 jours (P12). Cette concentration d'O<sub>2</sub> est maintenue grâce à l'utilisation d'un oxycycler, un système qui contrôle le niveau d'O<sub>2</sub> dans lequel ont met les cages d'animaux. Dans nos expérimentations, nous avons utilisé l'oxycycler C42 fabriqué par la compagnie BioSpherix. À P12, les animaux sont retirés de l'oxycycler et retournés à l'air ambiant. L'aire de vaso-oblitération (VO) est maximale pendant le séjour en hyperoxie, dès P9, alors que la néovascularisation (NV) atteint un maximum à P17. [151-153] Les souris sont sacrifiées à divers points dans le temps selon l'élément étudié, typiquement P12 pour la vasooblitération, P14 pour l'abondance de facteurs de croissance et comme point intermédiaire pour calculer la vitesse de revascularisation et P17 pour la néovascularisation. [15]

Une injection létale de pentobarbital par voie intrapéritonéale est utilisée pour l'euthanasie des animaux et les yeux son énucléés immédiatement après la mort. Puisque le

poids influence la sévérité de la rétinopathie du prématuré chez l'humain et chez la souris, on procède à la pesée des animaux et les individus trop maigres ou trop gras sont éliminés des expériences. [154] À P12, les animaux de moins de 4 g ou plus de 7 g sont exclus alors qu'à P17, les souriceaux de moins de 7 g ou plus de 10 g sont éliminés.

Il est important de mentionner quelques différences entre le modèle murin et l'humain. Tout d'abord, les vaisseaux rétiniens terminent leur maturation après la naissance chez la souris, alors que le bébé humain à terme possède une rétine pleinement vascularisée. Cette particularité permet d'utiliser des souriceaux à terme pour recréer les changements rencontrés chez le bébé humain prématuré. Une autre distinction pertinente est l'absence de macula chez la souris. Toutefois, la rétine de la souris possède une densité de photorécepteurs plus élevée et une membrane de Bruch plus mince dans sa région centrale, deux caractéristiques également observées dans la macula chez l'humain. [155] Finalement, le modèle OIR chez la souris produit une zone de vasooblitération au centre de la rétine, tandis que la vasooblitération qui se produit chez l'humain au cours de la rétinopathie du prématuré se trouve dans la région périphérique. [156]

## **2.3 Rétines montées sur lames en entier (*whole-mount*) et immunohistochimie**

Brièvement, après l'euthanasie de la souris, les yeux sont énucléés et fixés dans la paraformaldéhyde 4% pendant une heure à la température de la pièce. Les rétines sont ensuite disséquées sous un microscope à dissection. Les rétines sont marquées pendant la nuit avec l'isolectine GS-IB<sub>4</sub> (Alexa Fluor 594, Invitrogen Molecular Probes, numéro de catalogue I21413) dans du PBS avec 1 mM CaCl<sub>2</sub> et 0.1% Triton X-100. Les rétines sont ensuite montées en entier sur des lames de microscope Superfrost/Plus (Fisher Scientific) avec l'extérieur de la cupule rétinienne vers le bas. Les rétines sont ensuite sectionnées périphériquement en quatre afin de s'aplatir sur la lame et le tout est recouvert d'une goutte de réactif SlowFade Antifade (Invitrogen) et d'une lamelle.

## 2.4 Quantification des lésions vasculaires

Pour la quantification de la VO et de la NV après l'OIR, 20 images de chaque rétine montée sur lame ont été obtenues avec un grossissement 10x sur un microscope à fluorescence Zeiss AxioObserver.Z1. Les images ainsi obtenues ont ensuite été fusionnées en une seule image à l'aide du logiciel AxioVision 4.6.3.0. Les lésions vasculaires (VO et NV) ont subséquemment été mesurées avec la méthode SWIFT\_NV. [157] Chaque rétine a été quantifiée à l'aveugle par deux individus de façon indépendante.

## 2.5 Quantification des filopodes sur les cellules endothéliales d'extrémité (*tip cells*)

Pour quantifier le nombre de filopodes par *tip cell*, nous avons procédé à l'examination de rétines montées sur lames en entier par microscopie confocale. Avec un grossissement 40x, une image du front vasculaire a été prise dans chaque quadrant de la rétine en procédant à un empilage d'images au focus (*z-stacking*) de 0,05  $\mu\text{m}$ /section. Toutes les *tip cells* présentes dans le champ de vision du microscope à 40x ont été incluses dans la quantification. Nous avons ensuite procédé au comptage manuel du nombre de filopodes par *tip cell*.

## 2.6 Explants aortiques

Des souris de type sauvage (WT) et *Sirt3*<sup>-/-</sup> ont été sacrifiées à P14 pour prélever leur aorte. Immédiatement après l'euthanasie, l'aorte a été prélevée et sectionnée en anneaux de 1 mm. Les explants ont ensuite été placés dans des puits de Matrigel (Corning) et cultivés avec du medium Opti-MEM (Wisent). Les anneaux ont été photographiés toutes les 48 heures en utilisant un microscope inversé à contraste de phase (Eclipse TE300, Nikon). La croissance microvasculaire a été évaluée après 6 jours de culture à l'aide du logiciel Image Pro 4.5

(Media Cybernetics, Silver Spring). Un ratio entre l'aire de croissance microvasculaire et l'aire de l'anneau aortique a été calculé afin de comparer les résultats.

## **2.7 Consommation de glucose dans la rétine**

Du 2-déoxyglucose marqué radioactivement au tritium ( $^3\text{H}$ -2DG) a été utilisé pour mesurer la consommation de glucose. Une injection de 0,5  $\mu\text{Ci}$ /dose par voie intrapéritonéale a été utilisée afin d'obtenir un niveau non-toxique de radioactivité. Après le protocole OIR, les souriceaux ont reçu une injection quotidienne de 0,5  $\mu\text{L}$  de  $^3\text{H}$ -2DG (1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ) de P12 à P17. Les animaux ont ensuite été sacrifiés à P17 60 minutes après la dernière injection afin d'assurer une incorporation cellulaire du radiotraceur. Les valeurs de radioactivité ont immédiatement été obtenues avec un compteur gamma sur les souris totales et sur les rétines disséquées. À des fins de comparabilité, les souris et les rétines ont été pesées et les valeurs de radioactivité ajustées selon le poids. Les animaux étaient nourris avec une diète régulière (6,2% matières grasses).

## **2.8 Calorimétrie indirecte**

Pour la calorimétrie, les souris adultes ont été acclimatées aux cages métaboliques pendant 24 heures, puis évaluées sur une période totale de 120 heures (5 jours). Les souris ont initialement eu libre accès à la nourriture et à l'eau sur une période de 72 heures, puis la nourriture a été retirée pour 48h dans la deuxième partie de l'expérimentation. La consommation d'oxygène ( $v\text{O}_2$ ), la production de dioxyde de carbone ( $v\text{CO}_2$ ), le ratio d'échange gazeux, la production de chaleur et l'activité physique ont été collectés avec un instrument Oxymax/CLAMS (Colombus Instruments). Le poids de chaque animal a été mesuré avant et après le séjour en cage métabolique. [158]

## 2.9 Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR)

Les échantillons de rétine ont été traités avec la désoxyribonucléase I (Qiagen) pour enlever tout contaminant d'ADN génomique. L'échantillon traité avec l'ADNase a ensuite été converti en ADNc en utilisant la transcriptase inverse (Invitrogen). Les amorces PCR pour les gènes cibles et pour le gène contrôle,  $\beta$ -actine, ont été conçues à l'aide de la banque de séquences d'amorces et de l'outil *Primer BLAST* du NCBI. L'analyse quantitative de l'expression des gènes a été générée en utilisant le *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* et le kit *SYBR Green Master mix*. L'expression relative du gène cible par rapport à la  $\beta$ -actine a été calculée avec la méthode  $\Delta\text{cT}$ .

## 2.10 Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de valeur moyenne +/- erreur-type de la moyenne (SEM). Des tests de Student bilatéraux ont été utilisés pour analyser les données. Lorsque pertinentes, les comparaisons entre groupes ont été effectuées en utilisant une analyse de la variance à deux facteurs ANOVA suivie de l'algorithme de Tukey. Une valeur-p de moins de 0,05 ( $P < 0,05$ ) est considérée significative.

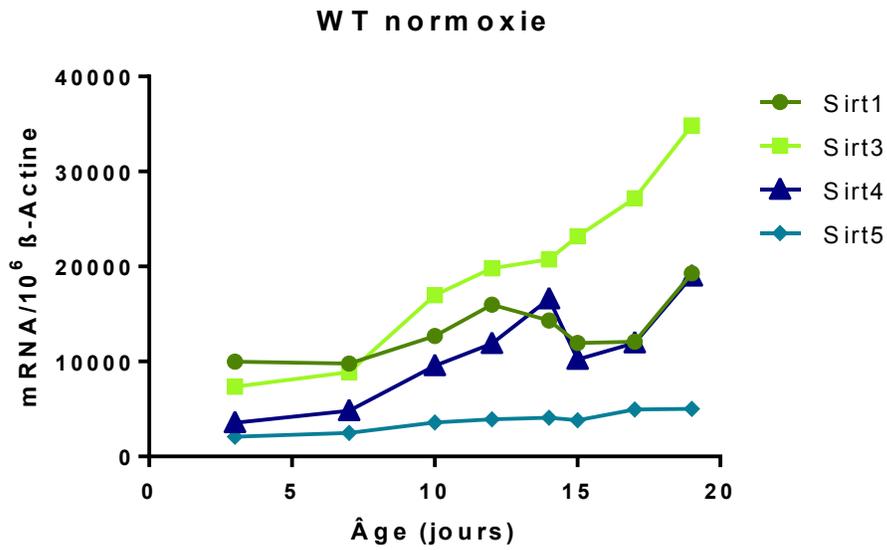
# **CHAPITRE 3**

## **RÉSULTATS**

### **3.1 Expression de SIRT3 dans le développement normal de la rétine**

Puisque SIRT3 joue un rôle central dans le métabolisme mitochondrial, il est attendu qu'elle se retrouve dans une vaste variété d'organes. Effectivement, il a été démontré que *Sirt3* est hautement exprimée dans les tissus les plus énergétiquement actifs, tels les reins, le cerveau, le cœur et le foie alors qu'elle est exprimée à des niveaux plus faibles dans les testicules, les ovaires, la rate, les poumons et le thymus. [159] Nous avons d'abord voulu confirmer l'expression de *Sirt3* dans la rétine, un tissu considérablement demandant énergétiquement.

Afin de caractériser la progression dans le temps de l'expression de *Sirt3* dans des conditions physiologiques, nous avons procédé à la quantification par qPCR de l'ARNm à différents points dans le temps. Des rétines de souriceaux WT élevés en normoxie ont été prélevées à P3, P7, P10, P12, P14, P15, P17 et P19. Les rétines d'au moins six souriceaux provenant de trois portées différentes ont été obtenues pour chaque point et les qPCR ont été performés en triplicata pour chaque point donné. Nous avons choisi de comparer l'expression de *Sirt3* à celle des autres sirtuines mitochondriales et à *Sirt1*, la sirtuine la plus étudiée jusqu'à présent et dont la présence dans la rétine a été confirmée. Tel qu'illustré dans la figure 5 à la page suivante, nos résultats démontrent que *Sirt3* est fortement exprimée dans la rétine. Les niveaux de *Sirt3* sont largement supérieurs à ceux mesurés pour les autres sirtuines. Par ailleurs, l'expression de *Sirt3* augmente graduellement pendant les premières semaines du développement oculaire normal.



**Figure 5 :** Expression des sirtuines dans la rétine de souris WT en normoxie  
 L'expression de *Sirt3* accroît dans la rétine pendant le développement physiologique oculaire (n=6/temps/gène).

## 3.2 Rétinopathie induite par l'oxygène et angiogénèse

### 3.2.1 Rétinopathie induite par l'oxygène

Afin de déterminer l'impact de SIRT3 sur l'angiogénèse et la rétinopathie du prématuré, nous avons quantifié les lésions vasculaires (VO et NV) sur les rétines de souriceaux WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup> après OIR. Les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> développent peu de lésions comparativement aux WT à P12, P14 et P17. Les aires de VO et de NV sont exprimées en pourcentage de l'aire totale de la rétine. Lorsqu'on compare l'ampleur d'une différence en pourcentage, il sera clairement indiqué qu'il s'agit d'une différence relative. Les résultats sont présentés dans la figure 6 à la page 60.

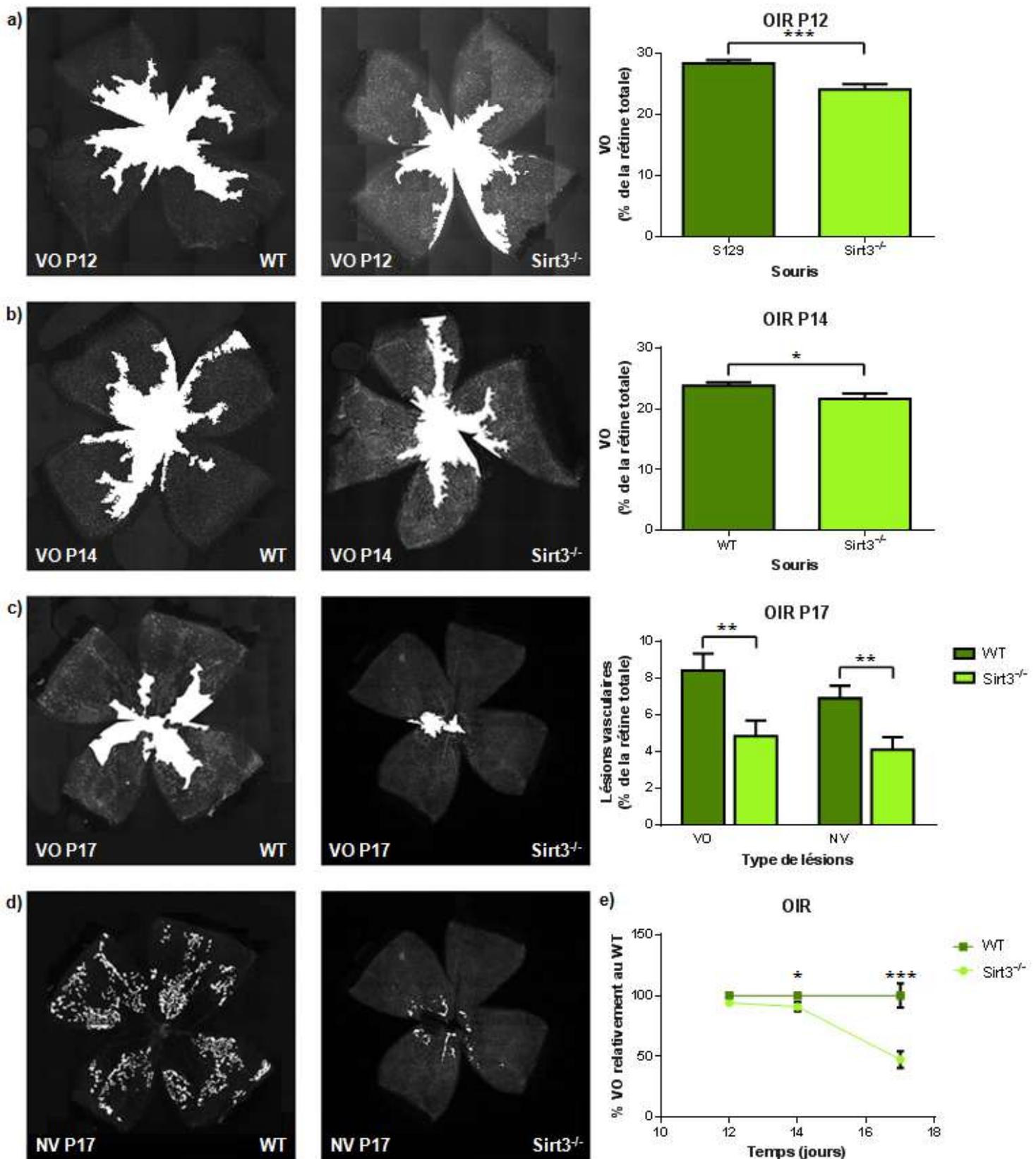
À P12, les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> exhibent moins de VO que les souris WT. En moyenne, les *Sirt3*<sup>-/-</sup> ont une aire de VO qui couvre 24,07 +/- 0,896 % de la rétine totale (moyenne +/- SEM, n = 10) alors que les souris WT ont une VO de 28,33 +/- 0,581% (moyenne +/- SEM, n = 17). Autrement dit, on obtient une différence de VO de 4,261% (2,159 à 6,363, intervalle de confiance 95%) qui est statistiquement significative (P = 0,0003) entre les deux groupes.

À P14, on constate encore une VO moindre chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>. Ces dernières ont une VO de 21,62 +/- 0,886% (moyenne +/- SEM, n = 18) tandis que les WT arborent une VO de 23,80 +/- 0,505% (moyenne +/- SEM, n = 24). La différence entre les deux groupes est de 2,180% (0,236 à 4,123, CI 95%), ce qui est statistiquement significatif (P = 0,0289).

À P17, on observe une différence entre les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> et les WT tant pour la VO que pour la NV. Comme à P12 et P14, les *Sirt3*<sup>-/-</sup> ont moins de lésions que les WT. En ce qui concerne la VO, les *Sirt3*<sup>-/-</sup> ont une aire de 4,847 +/- 0,845% (moyenne +/- SEM, n = 28) alors que les WT ont une aire de 8,404 +/- 0,932% (moyenne +/- SEM, n = 28). La différence absolue de 3,556 (1,033 à 6,079, CI 95%) entre les deux groupes est statistiquement significative (P = 0,0066). Quant à la NV, les *Sirt3*<sup>-/-</sup> développent une aire de 4,098 +/- 0,681%

(moyenne +/- SEM, n =18) et les WT arborent davantage de NV avec une valeur de 6,908 +/- 0,633% (moyenne +/- SEM, n = 26). Cette différence de 2,810 (0,894 à 4,726, CI 95%) est statistiquement significative (P = 0,0051) et représente une diminution de NV d'environ 40% chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> comparativement aux WT.

En exprimant la quantité de lésions chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> relativement à la quantité de lésions chez les souris WT, il est plus facile de bien apprécier l'ampleur des écarts entre les deux groupes. La valeur de VO chez les WT devient ainsi la valeur de référence pour comparer la VO chez les *Sirt3*<sup>-/-</sup>. On peut donc dire que, à P12, les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> tendent vers le développement de 6% moins de VO que les souris WT (P = 0,0864). À P14, une réduction de 9% est notée (P = 0,0289). L'effet le plus drastique est observé à P17, alors que les *Sirt3*<sup>-/-</sup> montrent 53% moins de VO que les WT (P < 0,0001).



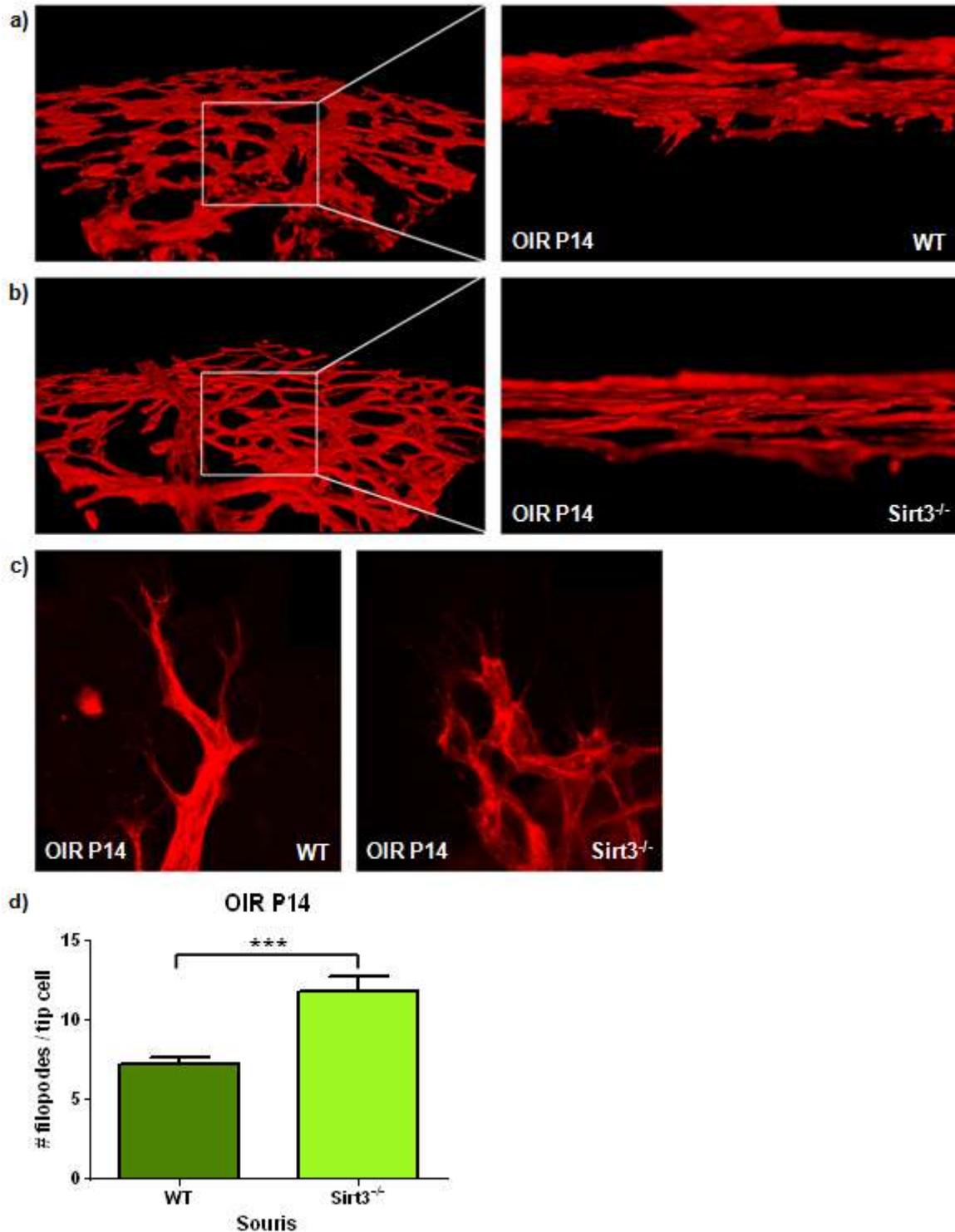
**Figure 6 :** Comparaison des lésions vasculaires chez les souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup> après OIR a) Quantification de la VO à P12 (WT n=17, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=10) b) à P14 (WT n=24, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=18) et c) à P17 (WT n=28, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=28). d) Quantification de la NV à P17 (WT n=26, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=18). e) Progression de la VO chez les *Sirt3*<sup>-/-</sup> relativement aux WT (moyenne +/- SEM, \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).

### 3.2.2 Mesure des filopodes sur les *tip cells*

Sachant que la rétinopathie induite par l'oxygène est moins sévère chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>, nous avons voulu préciser le mécanisme. Afin de vérifier si cette différence est seulement attribuable à une vaso-oblitération moins sévère ou s'il y a aussi une composante d'angiogénèse plus prononcée, nous avons examiné les cellules endothéliales d'extrémité (*tip cells*) sur les rétines. La revascularisation de tissus ischémiques débute avec la sélection au front vasculaire de *tip cells*, des cellules endothéliales spécialisées hautement mobiles. Celles-ci disposent de nombreux récepteurs qui leur permettent de suivre les gradients de facteurs angiogéniques, notamment VEGF-A, libérés par les cellules environnantes. Les *tip cells* élaborent des filopodes qui jouent un rôle à la fois dans la détection de ces chimiokines et dans leur capacité à migrer. L'abondance de filopodes sur les *tip cells* indiquent une migration active, ce qui reflète l'angiogénèse. [160,161]

Après le protocole OIR, les rétines de souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup> prélevées à P14 et marquées à la lectine ont été examinées au microscope à fluorescence. Tel qu'illustré dans la figure 7 à la page suivante, les *tip cells* des rétines des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> développent plus de filopodes que celles des souris WT.

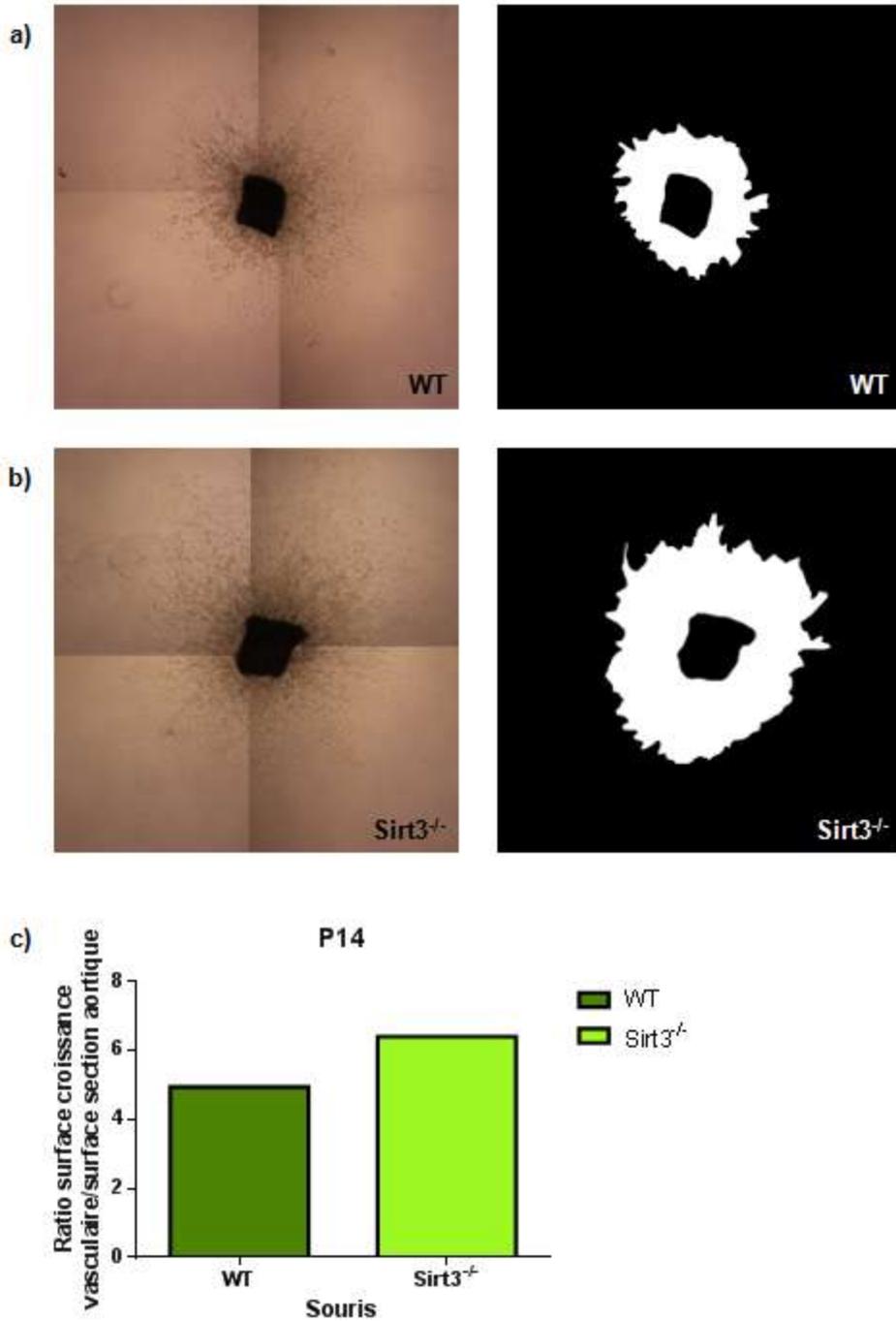
En moyenne, les *tip cells* des *Sirt3*<sup>-/-</sup> présentent 11,75 +/- 1,008 filopodes (n = 20, moyenne +/- erreur-type de la moyenne) alors que les *tip cells* des WT arborent 7,222 +/- 0,418 filopodes (n = 27, moyenne +/- SEM). On obtient donc une différence de 4,566 filopodes par *tip cell* entre les deux groupes (2,530 à 6,525, intervalle de confiance 95%). Cet écart est statistiquement significatif (P < 0,0001). Les *tip cells* étudiées proviennent de rétines d'animaux issus d'au moins trois portées différentes dans chacun des groupes expérimentaux.



**Figure 7 : Filopodes des *tip cells* à P14 chez les souris avec rétinopathie**  
a) Reconstitution 3D des vaisseaux rétiniens à partir d'images de microscopie confocale chez les souris WT et b) *Sirt3*<sup>-/-</sup>. c) Images confocales de *tip cells* chez les souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup>. d) Comparaison du nombre de filopodes par *tip cell* entre les deux groupes de souris (moyenne +/- SEM, WT n=27, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=20, \*\*\*P<0,001)

### 3.2.3 Croissance des explants aortiques

Sachant qu'un manque de SIRT3 est associé à une angiogénèse plus importante dans la rétine après OIR, tant en quantifiant la VO et la NV qu'en mesurant le nombre de filopodes par *tip cell*, nous avons voulu confirmer ces trouvailles *in vivo* en utilisant une méthode *ex vivo* permettant de quantifier l'angiogénèse. À P14, des souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup> ont été sacrifiées et leur aorte a été prélevée. Après six jours de culture, le ratio entre l'aire de croissance microvasculaire et l'aire de l'anneau aortique a été calculé. Les résultats préliminaires sont présentés dans la figure 8 à la page suivante. Les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> exhibent une angiogénèse plus importante, avec un ratio moyen de 6,395 alors qu'on obtient un ratio de 4,943 dans le groupe WT. Ces résultats sont toutefois préliminaires et les échantillons sont trop peu nombreux (n total = 3) pour effectuer des analyses statistiques.

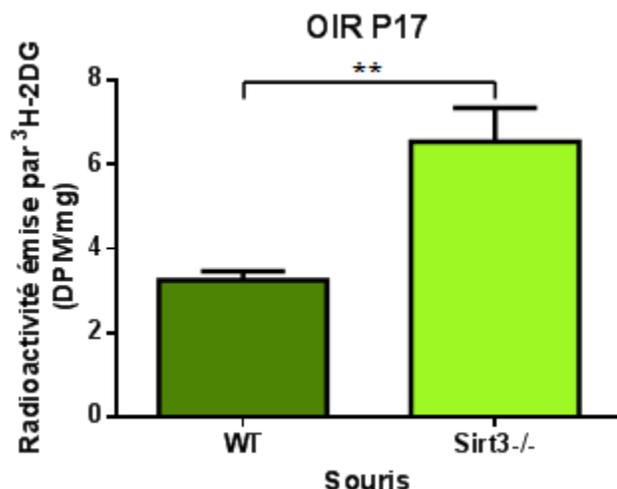


**Figure 8 :** Croissance microvasculaire d'explants aortiques chez les souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup>  
a) Section aortique de souris WT après six jours de culture et quantification des aires de la zone de croissance microvasculaire et de l'anneau aortique. b) Section aortique de souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> après six jours de culture et quantification des aires. c) Comparaison du ratio entre les surfaces de croissance vasculaire et de l'anneau aortique chez les souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup> (moyenne, n=3).

### 3.3 Glycolyse

#### 3.3.1 Incorporation de $^3\text{H}$ -2DG dans la rétine

Puisque SIRT3 est impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique, nous avons émis l'hypothèse que l'effet protecteur d'une carence en SIRT3 soit relié à une variation des nutriments utilisés au niveau de la rétine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré le captage de glucose dans les rétines de souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup> en utilisant du 2-déoxyglucose marqué radioactivement au tritium ( $^3\text{H}$ -2DG) à dose de traceur. Les résultats obtenus à P17 après OIR montrent que les rétines des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> incorporent davantage de glucose que les rétines des souris WT. Tel qu'illustré dans la figure 9 ci-dessous, les rétines des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> émettent une radioactivité de 6,538 +/- 0,7983 DPM/mg (moyenne +/- SEM, n = 8), tandis que les rétines des WT émettent 3,241 +/- 0,2216 DPM/mg (moyenne +/- SEM, n = 8). La radioactivité émise reflète la quantité de  $^3\text{H}$ -2DG incorporée dans les cellules. La différence observée est de 3,296 DPM/mg (1,519 à 5,073, CI 95%) et est statistiquement significative (P = 0,0014).

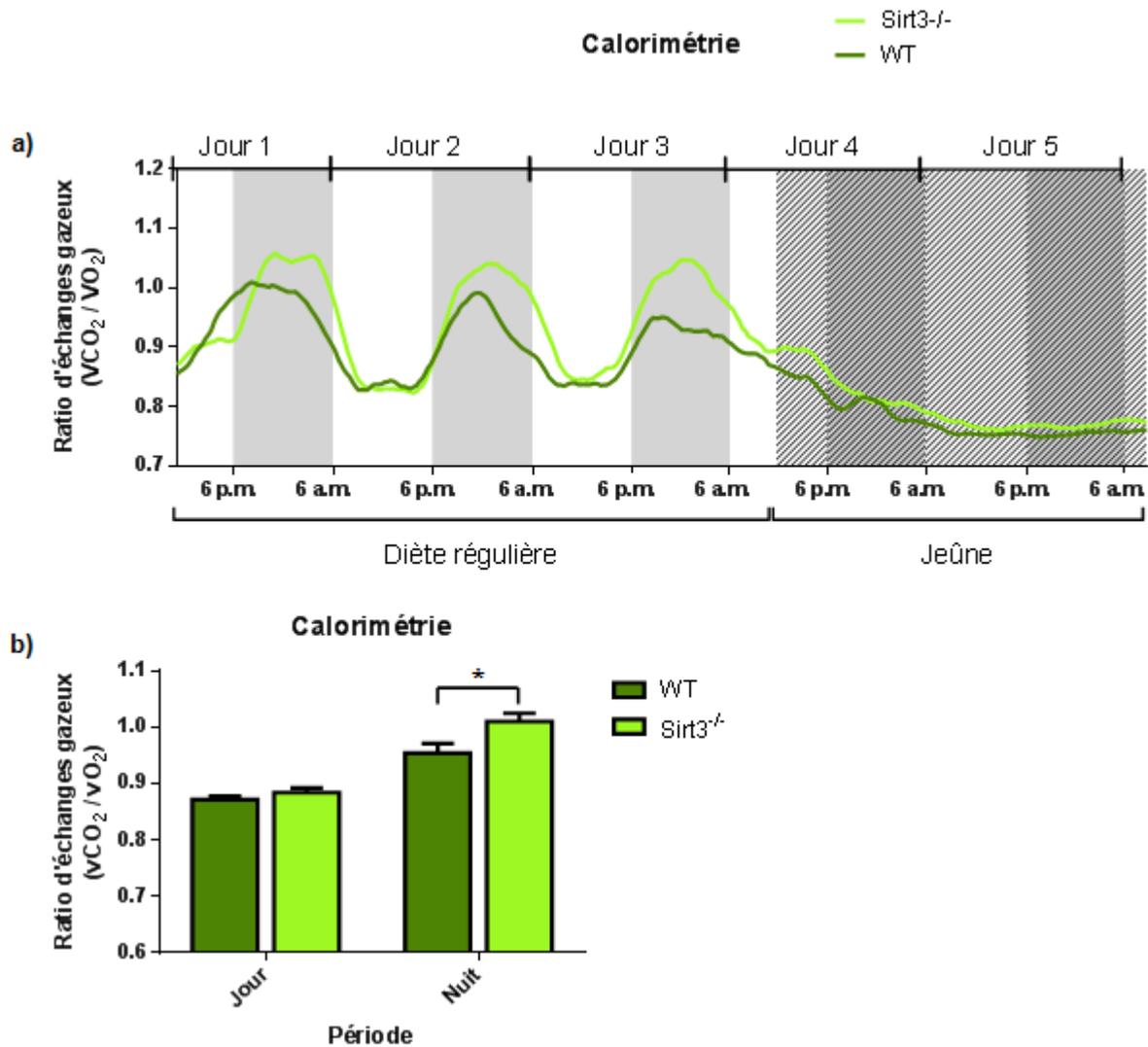


**Figure 9** : Consommation rétinienne de glucose à P17 après OIR

Les rétines des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> émettent plus de radioactivité que celles des souris WT à cause d'une consommation plus importante de  $^3\text{H}$ -2DG (moyenne +/- SEM, WT n=8, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=8, \*\*P<0,01).

### 3.3.2 Métabolisme du glucose au niveau systémique

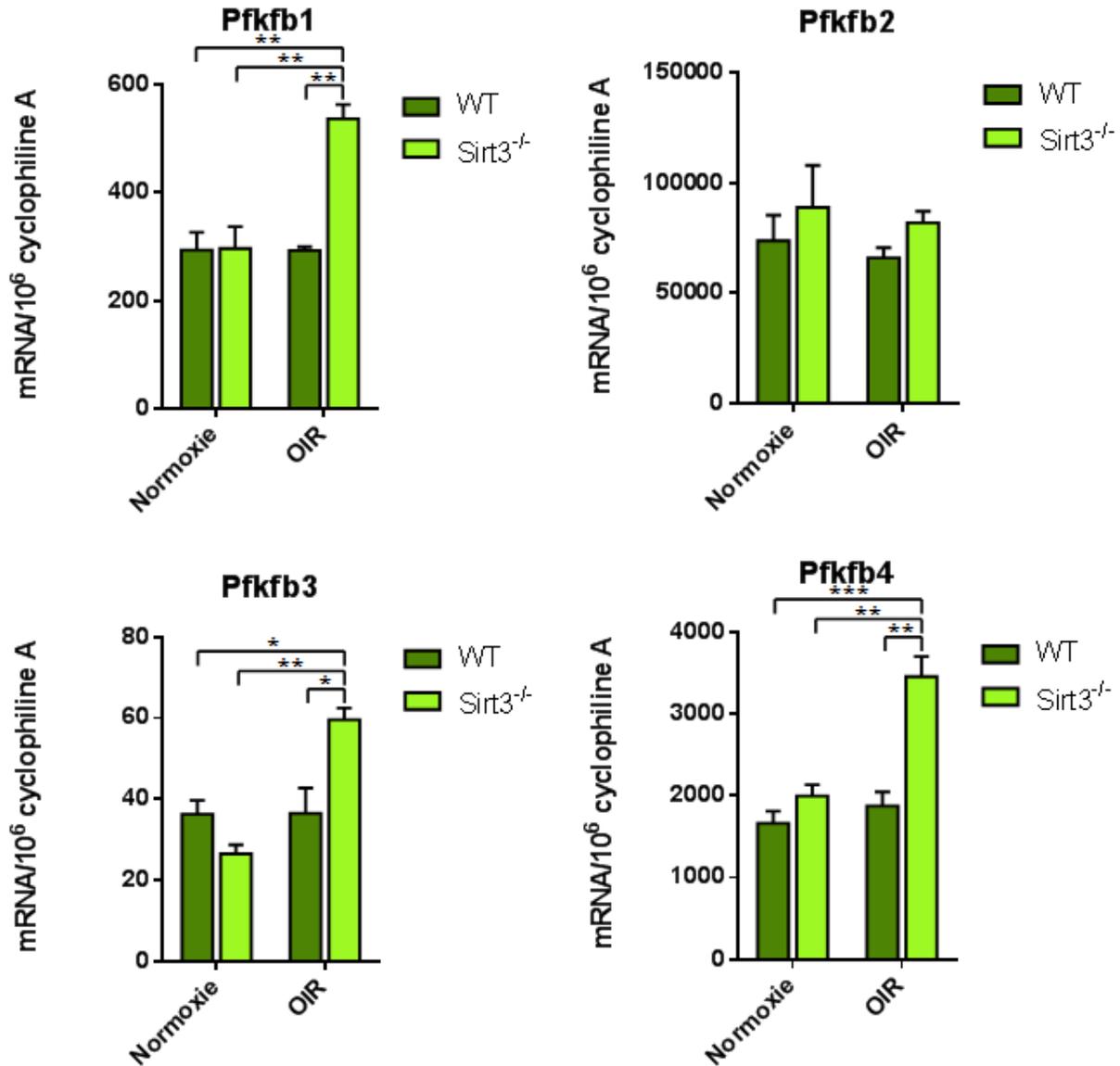
Afin de confirmer la priorisation de la glycolyse chez les souris *Sirt3<sup>-/-</sup>*, nous avons procédé à l'évaluation des ratios d'échanges gazeux chez des souris adultes WT et *Sirt3<sup>-/-</sup>*. Pour ce faire, nous avons utilisé des cages métaboliques. Dans la figure 10 à la page suivante, on voit que le ratio d'échanges gazeux (RER) varie entre le jour et la nuit chez les souris WT et les *Sirt3<sup>-/-</sup>*. Pendant le jour (zone blanche), les souris sont inactives et le RER s'approche de 0,8, ce qui reflète une utilisation cellulaire mixte de glucose et d'acides gras et/ou d'acides aminés. Pendant la nuit (zone grise), les souris sont actives et se nourrissent et le ratio s'approche de la valeur 1, reflétant une consommation cellulaire préférentielle de glucose. À partir du quatrième jour de l'expérience, la nourriture est retirée et les souris jeûnent (section hachurée). Tel qu'attendu, le RER s'approche alors de 0,7, ce qui correspond à un métabolisme préférentiel des acides gras. Pendant les périodes nocturnes d'activité, on remarque que la courbe de RER des souris *Sirt3<sup>-/-</sup>* s'approche davantage de 1, illustrant un métabolisme qui repose principalement sur l'utilisation du glucose. En effet, lorsque les souris ont libre accès à la nourriture, les *Sirt3<sup>-/-</sup>* ont un ratio d'échanges gazeux moyen de 1,01 (n = 3) la nuit alors que les WT ont un ratio moyen de 0,95 (n = 3) la nuit. La différence est statistiquement significative (P = 0,0127). Par contre, les ratios sont similaires pour les deux groupes pendant les périodes diurnes (P = 0,5046).



**Figure 10 :** Comparaison des ratios d'échanges gazeux entre les souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup>  
a) Variation du ratio d'échanges gazeux pendant le jour (zone blanche) et la nuit (zone grise) et durant une période de jeûne (zone hachurée) dans les groupes WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup>. b) Comparaison du ratio d'échange gazeux moyen selon le jour et la nuit lorsque l'accès à la nourriture n'est pas limité (moyenne +/- SEM, WT n=3, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=3, \*P<0,05).

### 3.3.3 Expression des *Pfkfb* dans la rétine

Puisque le métabolisme du glucose est accru chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>, nous avons mesuré l'expression de certains gènes associés à la glycolyse à P17. Tel qu'illustré dans la figure 11 à la page suivante, dans des conditions normoxiques, *Pfkfb1*, *Pfkfb2*, *Pfkfb3* et *Pfkfb4* sont exprimés dans la rétine à des niveaux similaires chez les souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup>. L'expression de *Pfkfb1*, *Pfkfb3* et *Pfkfb4* augmente drastiquement après OIR chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>, alors qu'on n'observe aucun changement significatif chez les WT. L'expression de *Pfkfb1* est plus élevée chez les *Sirt3*<sup>-/-</sup> après OIR comparativement aux souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> à l'air ambiant ou aux souris WT exposées ou non à l'OIR (P < 0,01). L'expression de *Pfkfb2* ne change pas tant en comparant normoxie et OIR qu'en comparant *Sirt3*<sup>-/-</sup> et WT. L'expression de *Pfkfb3* est plus élevée chez les *Sirt3*<sup>-/-</sup> après OIR que chez les *Sirt3*<sup>-/-</sup> en normoxie (P < 0,01) et les souris WT exposées ou non à l'OIR (P < 0,05). L'expression de *Pfkfb4* est plus élevée chez les *Sirt3*<sup>-/-</sup> après OIR que chez les *Sirt3*<sup>-/-</sup> en normoxie (P < 0,01), ou que les souris WT exposées ou non à l'OIR (P < 0,01, n = 6/groupe/gène).



**Figure 11** : Expression des *Pfkfb* en normoxie et après OIR chez les souris WT et *Sirt3*<sup>-/-</sup>. Les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> expriment davantage *Pfkfb1*, *Pfkfb3* et *Pfkfb4* après OIR que les souris WT après OIR (moyenne +/- SEM, WT n=6/condition/gène, *Sirt3*<sup>-/-</sup> n=6/condition/gène, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

**CHAPITRE 4**  
**DISCUSSION**

Nos résultats montrent que *Sirt3* est exprimé dans la rétine tôt durant la période post-natale et suggèrent qu'une déficience en SIRT3 diminue la sévérité de la rétinopathie du prématuré, stimule l'angiogénèse et favorise la glycolyse comme source d'énergie.

## **4.1 L'expression de *Sirt3* accroît dans la rétine pendant le développement**

Nous avons d'abord caractérisé l'expression temporelle de *Sirt3* dans la rétine dans des conditions normales. On remarque que *Sirt3* est exprimé très précocement durant la période post-natale. Les niveaux d'ARNm augmentent graduellement pendant les premières semaines du développement physiologique de l'œil et ce, de façon plus marquée que *Sirt1,4,5,6*. Cette progression corrèle avec l'accroissement de l'activité métabolique dans la rétine.

## **4.2 Les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> développent une rétinopathie moins sévère que les WT**

À l'aide du modèle OIR, nous avons démontré qu'une carence en SIRT3 est associée à une rétinopathie moins sévère. Ces bénéfices sont d'abord observables au niveau de la surface de VO. Effectivement, les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> développent significativement moins de lésions de VO à P12, P14 et P17. En théorie, cet effet protecteur pourrait être expliqué de deux façons : soit l'absence de SIRT3 favorise une revascularisation précoce de la région avasculaire de la rétine, soit la perte de SIRT3 augmente la résistance intrinsèque des vaisseaux rétiniens contre les insultes rencontrées dans la rétinopathie du prématuré, notamment le stress oxydatif. Sachant que SIRT3 a un effet pro-survie cellulaire, cette deuxième hypothèse est moins probable. L'effet pro-survie de SIRT3 est expliqué principalement par la diminution des ROS via son action sur IDH2, FoxO3a et les complexes de la chaîne de transport d'électrons. [125,132,134,137] SIRT3 augmente aussi directement la survie cellulaire en prévenant la translocation de BAX dans la mitochondrie via son interaction avec Ku70 et en abolissant

l'activité de p53. [138-140] Nos données préliminaires supportent l'hypothèse d'une angiogénèse accrue en absence de SIRT3.

Nos expériences avec OIR montrent également qu'une carence en SIRT3 résulte en une diminution des lésions de NV à P17. Les lésions de NV sont des grappes de vaisseaux aberrants et pathologiques qui se forment en réponse à l'hypoxie occasionnée par la VO. Ces lésions sont distinctes des vaisseaux sains. En favorisant une revascularisation physiologique de la rétine, il est probable que les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> limitent la production de facteurs contribuant à l'angiogénèse pathologique, tels la sécrétion de facteurs de guidance ou de croissance spécifiques à l'angiogénèse pathologique. Découvrir les facteurs qui contrôlent et distinguent l'angiogénèse physiologique régénératrice de l'angiogénèse pathologique causant ultimement la cécité est un objectif important de ce travail de recherche.

### **4.3 Une carence en SIRT3 est caractérisée par des *tip cells* riches en filopodes**

Afin de vérifier si le bénéfice observé chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> est seulement attribuable à une vaso-oblitération moins sévère ou s'il y a aussi une activation de l'angiogénèse physiologique, nous avons examiné les *tip cells* guidant la régénérescence du lit vasculaire suite à la VO causée par l'OIR. Les *tip cells* des rétines de souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> présentent près de 40% plus de filopodes que les WT. Les *tip cells* sont des cellules endothéliales hautement spécialisées situées à l'extrémité des vaisseaux en formation et jouent un rôle crucial dans l'angiogénèse. [160] Les filopodes qu'elles arborent leur confèrent non seulement la capacité de détecter les facteurs de croissance environnants grâce à leurs récepteurs, mais aussi leur aptitude à migrer. Ces éléments sont essentiels à la croissance organisée et dirigée de nouveaux capillaires. Par exemple, dans le développement de la rétine pendant la période néonatale chez le rat, VEGF-A guide l'extension des filopodes en activant son récepteur, VEGFR2, localisé sur les filopodes des *tip cells*. L'abondance de filopodes sur les *tip cells* indique une migration active, une des premières étapes de l'angiogénèse. [161,162] Nos

résultats montrent qu'il y a plus de filopodes sur les *tip cells* des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>, suggérant que la perte de SIRT3 stimule la croissance vasculaire.

Bien que la quantification des filopodes permette de caractériser les *tip cells* et de donner un aperçu de l'activité angiogénique, cette mesure présente certaines limitations. Entre autres, elle ne tient nullement compte des cellules du pédicelle (*stalk cells*), un autre type de cellules endothéliales particulièrement important dans la genèse de nouveaux capillaires. Nous avons donc cherché à confirmer la croissance vasculaire en procédant à des essais de prolifération sur explants aortiques.

#### **4.4 Les explants aortiques des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> développent plus d'angiogénèse**

Nos résultats préliminaires d'explants aortiques suggèrent que la carence en SIRT3 s'accompagne d'une croissance vasculaire accrue. Ces résultats sont en accord avec les effets observés après OIR tant par la quantification de la VO et la NV que par la caractérisation des filopodes sur les *tip cells*.

Utiliser des anneaux aortiques pour quantifier l'angiogénèse présente de nombreux avantages. En contraste avec les essais de prolifération *in vitro* à base de cellules endothéliales, ce modèle *ex vivo* permet d'inclure les péricytes, des cellules de support comprises dans la formation de microvaisseaux. Les structures tubulaires sont clairement visibles et forment une lumière sur une période de temps similaire à ce qui est observé *in vivo*. [163-165] De plus, même si les explants aortiques ne contiennent pas uniquement des cellules endothéliales, ce modèle permet d'isoler la croissance vasculaire des interactions complexes qui existent entre les neurones et les cellules gliales de la rétine. Utiliser les explants aortiques en complément avec le modèle OIR *in vivo* permet de vérifier si l'effet pro-angiogénique est limité à un organe spécifique ou s'il est potentiellement généralisable à d'autres tissus. Dans le cas présent, bien que les résultats obtenus sur les explants aortiques soient préliminaires, nos

expériences *in vivo* et *ex vivo* suggèrent une stimulation accrue de l'angiogénèse en absence de SIRT3.

## 4.5 Mécanismes potentiels expliquant une angiogénèse accrue

L'activation de SIRT3 mène à la déstabilisation de HIF-1 $\alpha$ . [148] Divers mécanismes pourraient expliquer cet effet. On sait que SIRT3 active l'isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2), une enzyme du cycle de Krebs qui synthèse l' $\alpha$ -KG et le NADH à partir de l'isocitrate. PHD utilise l' $\alpha$ -KG comme cofacteur avec l'oxygène pour marquer HIF-1 $\alpha$  et accélérer sa dégradation. Activer SIRT3 a donc pour effet de réduire les niveaux de HIF-1 et donc l'expression des gènes régulés par HIF-1. Les rôles de ceux-ci sont nombreux, incluant le métabolisme énergétique, l'angiogénèse, l'inflammation, la prolifération cellulaire, l'invasion et la migration. [66,67,131] Inversement, la perte de SIRT3 pourrait donc stimuler l'angiogénèse en raison de son interaction avec IDH2.

En outre, SIRT3 pourrait stabiliser HIF-1 $\alpha$  via la régulation des ROS. En activant IDH2, on obtient du NADPH en plus de l' $\alpha$ -KG. Le NADPH peut ensuite être utilisé pour réduire le glutathion, un cofacteur majeur utilisé par plusieurs mécanismes de défense antioxydants. [125] SIRT3 augmente aussi l'expression des enzymes anti-oxydantes MnSOD et catalase en déacétylant et activant le facteur de transcription *forkhead box O3a* (FoxO3a). [132,134] L'effet net est donc une réduction des ROS. Ceux-ci sont ont l'aptitude de stabiliser HIF-1 $\alpha$ , possiblement en interagissant directement avec PHD. [68,166] Lorsque SIRT3 est absente, on constate donc une amplification du stress oxydatif, une stabilisation de HIF-1 et une expression accrue des gènes contrôlés par HIF-1, incluant VEGF. [143,144]

Par ailleurs, SIRT3 active aussi l'enzyme succinate déshydrogénase (SDH) impliquée dans le cycle de Krebs. SDH catalyse la transformation de succinate en fumarate et diminue donc la quantité de succinate disponible. [130] PHD produit du succinate dans sa réaction avec HIF-1 $\alpha$ . [167] En absence de SIRT3, SDH est acétylée et le succinate qui s'accumule inhibe

PHD par rétroaction négative. Il en résulte la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et des gènes en aval, et donc une stimulation de l'angiogénèse. [111]

#### **4.6 Les rétines des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> consomment davantage de glucose que les WT**

En utilisant du 2-déoxyglucose marqué radioactivement (<sup>3</sup>H-2DG), nous avons montré que les rétines des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> incorporent plus de glucose que les WT. <sup>3</sup>H-2DG est un analogue du glucose non métabolisable. Lorsque les cellules transportent du glucose pour le métaboliser, elles captent aussi du <sup>3</sup>H-2DG, mais celui-ci s'accumule et le niveau de radioactivité mesuré corrèle avec la quantité de glucose absorbée. [168] Dans les rétines de souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> après OIR, la radioactivité émise par le <sup>3</sup>H-2DG est environ le double de celle mesurée chez les WT. Ces données suggèrent que les cellules de la rétine favorisent la glycolyse en absence de SIRT3. Toutefois, bien que le <sup>3</sup>H-2DG soit un outil largement utilisé et accepté pour estimer l'activité glycolytique, il mesure plutôt l'incorporation de glucose dans les cellules, et non la glycolyse. Nous avons donc voulu confirmer nos résultats en mesurant la consommation de glucose d'une autre façon, c'est-à-dire en procédant par calorimétrie indirecte.

#### **4.7 Le déficit en SIRT3 se traduit en une hausse systémique du métabolisme du glucose**

En utilisant des cages métaboliques, on obtient un circuit fermé qui permet de mesurer les échanges gazeux et de calculer le ratio d'échanges gazeux afin de savoir si l'animal utilise principalement du glucose, des acides gras, des acides aminés ou un mélange de substrats comme source d'énergie. Nos expériences suggèrent que le métabolisme des souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> repose davantage sur l'utilisation du glucose comme substrat énergétique comparativement

aux souris WT. Cette différence est observable surtout la nuit, lorsque les souris sont physiquement actives.

Certaines limitations inhérentes à la calorimétrie indirecte se doivent d'être mentionnées. La principale faiblesse de cet outil est qu'il ne permet pas d'estimer les processus anaérobiques. Les autres limitations sont marginales, par exemple certains événements cellulaires ne sont pas représentés immédiatement dans l'air expiré, les échanges gazeux ne fournissent pas d'informations spécifiques sur quel type de substrat est utilisé dans une catégorie (quel type de carbohydrate ou d'acide gras ou d'acide aminé) et les résultats peuvent être influencés par l'intensité d'un exercice ou la diète.

Les résultats obtenus par le marquage radioactif et la calorimétrie indirecte démontrent que l'utilisation du glucose est plus marquée chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>, suggérant une glycolyse accrue. Nous avons donc décidé d'explorer quels gènes impliqués dans la glycolyse pourraient être modulés en absence de SIRT3.

#### **4.8 L'expression de *Pfkfb1*, *Pfkfb3* et *Pfkfb4* augmente en absence de SIRT3**

Les qPCR effectués chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> et WT élevées en normoxie et en hyperoxie (OIR) révèlent que l'absence de Sirt3 est associée avec une plus grande expression de *Pfkfb1*, *Pfkfb3* et *Pfkfb4* après le protocole d'OIR. Lorsque les souris grandissent en normoxie, on n'observe pas de différence au niveau de l'expression des gènes *Pfkfb1-4* entre souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> et WT. Le stress entraîné par l'OIR semble nécessaire à la surexpression des gènes *Pfkfb1*, *Pfkfb3* et *Pfkfb4* en carence de SIRT3. Les *PFKFB* jouent un rôle important dans la régulation de la glycolyse.

## 4.9 Mécanismes potentiels expliquant une amplification de la glycolyse

Les différentes isoenzymes de la famille PFKFB sont impliquées dans la régulation des niveaux de fructose-2,6-bisphosphate. Ce métabolite module étroitement l'activité de la phosphofructokinase, le point de régulation de la glycolyse considéré le plus important. Les PFKFB se distinguent par leur ratio d'activité kinase:phosphatase et leur spécificité à certains tissus. [91] Le ratio kinase:phosphatase diffère non seulement selon l'isoenzyme, mais aussi selon des modifications post-transcriptionnelles. PFKFB3, la plus étudiée des isoenzymes, est exprimée dans pratiquement tous les organes et augmente fortement en réponse à l'hypoxie dans les poumons, le foie, les reins, le cerveau, le cœur et les testicules. PFKFB3 a un ratio kinase:phosphatase particulièrement élevé, favorisant ainsi fortement la glycolyse. [89,169,170] PFKFB3 et PFKFB4 ont des éléments de réponse à l'hypoxie dans leur région promotrice et font partie des gènes régulés par HIF-1 en réponse à l'hypoxie. [171] L'expression de *PFKFB3* et *PFKFB4* est fortement induite dans plusieurs lignées cancéreuses et seraient nécessaires pour la réponse glycolytique à l'hypoxie et la croissance tumorale. Cette famille enzymatique jouerait donc un rôle physiologique dans l'adaptation de l'organisme à un environnement hypoxique. [92,172] Le métabolisme des cellules endothéliales repose sur la glycolyse plutôt que la phosphorylation oxydative et *PFKFB3* est essentiel à l'angiogénèse, impliquant que la glycolyse régule la croissance vasculaire. [173] Il a été démontré que VEGF augmente la glycolyse en stimulant l'expression de *PFKFB3* et conséquemment la glycolyse. La suppression de PFKFB3 altère la formation de nouveaux vaisseaux dans la rétine en diminuant le nombre de lamellipodes et filopodes par *tip cell*. [109] Puisque PFKFB3, GLUT1, GLUT3 sont des gènes régulés par HIF-1, il est possible que l'augmentation de la glycolyse rencontrée en carence de SIRT3 passe par la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . [174,175]

Les données obtenues avec les expériences de  $^3\text{H}$ -2DG, calorimétrie indirecte et qPCR montrent toutes qu'une déficience en SIRT3 est associée à une priorisation de la glycolyse, ce qui est cohérent avec l'implication de SIRT3 dans l'activation du métabolisme des acides gras.

SIRT3 active LCAD, une isoforme de l'acyl-CoA déshydrogénase, l'une des principales enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras. [93,129] SIRT3 déacétyle aussi la HMGCS, l'enzyme limitante dans la synthèse du  $\beta$ -hydroxybutyrate. Les corps cétoniques peuvent ensuite être reconvertis en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs et générer de l'ATP. L'acétyl-CoA synthétase est une autre enzyme impliquée dans le métabolisme des acides gras qui est activée par SIRT3. C'est une des enzymes qui permet de convertir les corps cétoniques en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs. [95,96] Sachant que SIRT3 reprogramme le métabolisme énergétique en favorisant l'oxydation des acides gras, il est logique que la glycolyse soit augmentée chez les souris déficientes en SIRT3.

#### **4.10 Lien entre la glycolyse et l'angiogénèse**

Il est reconnu depuis longtemps que le métabolisme des tumeurs repose principalement sur la glycolyse pour générer de l'ATP. Contrairement à la plupart des cellules normales, les tumeurs transforment le pyruvate en lactate, même en abondance d'oxygène, plutôt que de l'utiliser pour alimenter le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. [106] Bien qu'il s'agisse d'un processus inefficace pour produire de l'ATP, la glycolyse semblerait conférer un avantage prolifératif en facilitant l'incorporation des nutriments dans la biomasse (nucléotides, acides aminés, lipides). [107] Les mécanismes exacts impliqués restent à préciser, mais l'activation de HIF-1 dans les tumeurs et l'induction de l'expression des transporteurs de glucose et enzymes glycolytiques qui en résultent joueraient un rôle. [108] Bien que l'effet Warburg ait initialement été décrit dans les tumeurs, il semble aussi être présent dans les cellules saines en division. Des expérimentations sur la rétine des embryons de *Xenopus* ont montré que les cellules progénitrices en division utilisent davantage la glycolyse et dépendent moins sur la phosphorylation oxydative pour fournir leur ATP que les cellules différenciées en état quiescent. [176] Les cellules endothéliales priorisent elles aussi la glycolyse. Bien que ces cellules aient un accès immédiat à l'oxygène dans le sang, plus de 80% de leur ATP est généré à travers la glycolyse. Diminuer la glycolyse en éliminant PFKFB3 altère la prolifération, la

migration, la croissance microvasculaire et les ramifications des vaisseaux, ce qui supporte une étroite collaboration entre la glycolyse et la prolifération cellulaire. [109]

## 4.11 Dualité de l'effet de SIRT3

Nous avons trouvé qu'une déficience en SIRT3 semble avoir un effet protecteur dans le modèle OIR. En retournant aux principes soutenant la pathogénèse de la rétinopathie du prématuré, on réalise que les processus régulés par SIRT3 pourraient théoriquement en faire un allié ou un ennemi. SIRT3 a pour effet de diminuer les ROS et, compte tenu de l'importance du stress oxydatif dans le développement de la rétinopathie du prématuré, on pourrait s'attendre à ce que la perte de SIRT3 exacerbe les lésions de VO. Toutefois, on constate plutôt une diminution de la VO chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>. À cause du rôle de SIRT3 dans la promotion du métabolisme des acides gras et dans la déstabilisation de HIF-1 $\alpha$ , on remarque une augmentation de l'angiogénèse et la glycolyse chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>. Sachant que la rétinopathie du prématuré s'explique partiellement par un arrêt de l'angiogénèse durant la phase VO, mais aussi par un excès d'angiogénèse pathologique durant la phase NV, éliminer SIRT3 pourrait tout aussi être favorable ou défavorable. Dans la présente étude, nos résultats suggèrent que l'absence de SIRT3 augmente la glycolyse et l'angiogénèse et diminue la sévérité de la rétinopathie du prématuré. Autrement dit, le manque de SIRT3 contribuerait à l'effet Warburg dans la rétine après OIR. Il est possible que la reprogrammation engendrée par SIRT3 survienne suffisamment tôt dans la phase de VO pour promouvoir la croissance de vaisseaux physiologiques et minimiser les lésions de NV. Nos données suggèrent que, dans la rétinopathie du prématuré, les bénéfices de la glycolyse et l'angiogénèse rencontrés en absence de SIRT3 l'emportent sur l'exacerbation du stress oxydatif.

**CHAPITRE 5**  
**CONCLUSION**

Une carence en SIRT3 diminue la sévérité des lésions de VO et NV dans le modèle animal OIR. La stimulation de l'angiogénèse est aussi reflétée par la quantification des filopodes sur les *tips cells* dans la rétine et ne serait pas limitée à l'œil, tel qu'illustré par la croissance des explants aortiques. Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à l'effet protecteur observé chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup>. Nous avons montré qu'en plus de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux, l'absence de SIRT3 augmente la glycolyse, possiblement en activant indirectement les gènes de la famille *PFKFB*. Cette priorisation de la glycolyse suggère qu'une déficience en SIRT3 est impliquée dans l'effet Warburg et procure ainsi un avantage prolifératif.

Nos résultats démontrent pour la première fois qu'une absence de SIRT3 est liée à une amélioration de la rétinopathie du prématuré dans le modèle animal OIR. Cette maladie entraîne une lourde morbidité à vie et les traitements actuels sont sous-optimaux. La présente étude propose SIRT3 comme nouvelle cible thérapeutique potentielle. L'implication de SIRT3 dans l'effet Warburg en fait également un candidat fort intéressant pour mieux comprendre et éventuellement traiter d'autres pathologies comme les cancers, les désordres prolifératifs et les conditions ischémiques.

En terminant, bien que nos données mettent la table en montrant un lien robuste entre SIRT3 et la sévérité de l'OIR, l'angiogénèse et la glycolyse, l'étude plus poussée de SIRT3 et des mécanismes sous-jacents à ces changements sont nécessaires. Il serait intéressant de confirmer si les effets sont bel et bien attribuables à SIRT3 en rétablissant son expression chez les souris *Sirt3*<sup>-/-</sup> et en la supprimant chez les WT. Inhiber la glycolyse permettrait de préciser si l'effet du manque de SIRT3 dans la rétine et l'angiogénèse est dépendant de la glycolyse. Puisque les modifications post-transcriptionnelles des *PFKFB* jouent un rôle important dans la modulation de leur activité kinase:phosphatase, mesurer les niveaux de phosphorylation de celles-ci en présence ou non de SIRT3 permettrait de préciser davantage le mécanisme par lequel une déficience en SIRT3 favorise la glycolyse.

## Bibliographie

1. Kong L, Fry M, Al-Samarraie M, Gilbert C, Steinkuller PG. An update on progress and the changing epidemiology of causes of childhood blindness worldwide. *Journal of AAPOS*. 2012;16(6):501-507.
2. Blencowe H, Lawn JE, Vazquez T, Fielder A, Gilbert C. Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatric research*. 2013;74 Suppl 1:S35-49.
3. Kim WT, Suh ES. Retinal protective effects of resveratrol via modulation of nitric oxide synthase on oxygen-induced retinopathy. *Korean journal of ophthalmology*. 2010;24(2):108-118.
4. Van Sorge AJ, Termote JU, Kerkhoff FT, Van Rijn LJ, Simonsz HJ, Peer PG, Schalijs-Delfos NE. Nationwide inventory of risk factors for retinopathy of prematurity in the Netherlands. *The journal of pediatrics*. 2014;164(3):494-498.
5. Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Behar-Cohen F, Chemtob S. Epidemiology and pathophysiology of retinopathy of prematurity. *Archives de pédiatrie*. 2011;18 Suppl 2:S79-85.
6. Wang J, Ren X, Shen L, Yanni SE, Leffler JN, Birch EE. Development of refractive error in individual children with regressed retinopathy of prematurity. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(9):6018-6024.
7. Holmström G, Larsson E. Outcome of retinopathy of prematurity. *Clinics in perinatology*. 2013;40(2):311-321.
8. Fledelius HC, Jensen H. Late subsequent ocular morbidity in retinopathy of prematurity patients, with emphasis on visual loss caused by insidious involutive pathology: an observational series. *Acta ophthalmologica*. 2011;89(4):316-323.
9. Smith BT, Tasman WS. Retinopathy of prematurity: late complications in the baby boomer generation (1946-1964). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2005;(103):225-234.
10. MyHealth.Alberta.ca [En ligne]. Boise: Healthwise, Inc.; c1995-2015. [modifié le 9 septembre 2014; cité le 9 juin 2015]. Disponible : <https://myhealth.alberta.ca/health/pages/conditions.aspx?hwid=stl17646&>.
11. Wilkinson AR, Haines L, Head K, Fielder AR. UK retinopathy of prematurity guideline. *Early Hum Dev*. 2008;84(2):71-74.

12. Palmer EA, Hardy RJ, Dobson V, Phelps DL, Quinn GE, Summers CG, et al. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. 15-year outcomes following threshold retinopathy of prematurity: final results from the multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*. 2005;123(3):311-318.
13. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ; BEAT-ROP Cooperative Group. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*. 2011;364(7):603-15.
14. Hu J, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ, Galasso JM, Kapur R. Reactivation of retinopathy of prematurity after bevacizumab injection. *Arch Ophthalmol*. 2012;130(8):1000–1006.
15. Stahl A, Connor KM, Sapielha P, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(6):2813-2826.
16. Équipe de Blausen.com. Wikimedia Commons [en ligne]. n.d. : Wikimedia Project; 2014. [Image], Eye anatomy; [modifié le 25 septembre 2014, cité le 26 juin 2015]. Disponible: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen\\_0389\\_EyeAnatomy\\_02.png?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0389_EyeAnatomy_02.png?uselang=fr)
17. Duong HV. Medscape, Eye globe anatomy [En ligne]. New York: WebMd LLC; c1994-2015 [modifié le 6 juin 2013; cité le 9 juin 2015]. Disponible : <http://emedicine.medscape.com/article/1923010-overview#a30>.
18. Netter FH. Atlas of human anatomy. 5e éd. Philadelphie: Saunders Elsevier; 2010.
19. Piersol GA, Dwight T, McMurrich JP, Hamann CA, White, JW. Human anatomy, including structure and development and practical considerations [En ligne]. 3e éd. Philadelphie & Londres: J. B. Lippincott Company; 1911. Figure 1218, Diagram illustrating structure of retina and relations of three fundamental layers; [cité le 5 juin 2015]; p. 483. Disponible : <https://archive.org/stream/humananatomyincl02pier/humananatomyincl02pier#page/n6/mode/1up>
20. Gariano RF. Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Progress in retinal and eye research*. 2003;22(3):295-306.
21. Penn JS, Henry MM, Tolman BL. Exposure to alternating hypoxia and hyperoxia causes severe proliferative retinopathy in the newborn rat. *Pediatric research*. 1994;36(6):724-731.
22. McLeod DS, Brownstein R, Luttly GA. Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1996;37(2):300-311.
23. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*. 2007;10(2):133-140.

24. Ajayi OA, Raval D, Lucheese N, Pildes RS. Ophthalmological morbidity in very-low-birthweight infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Natl Med Assoc.* 1997;89(10):679-683.
25. Wilkinson-Berka JL, Rana I, Armani R, Agrotis A. Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clinical Science.* 2013;124(10):597-615.
26. Schippers JH, Nguyen HM, Lu D, Schmidt R, Mueller-Roeber B. ROS homeostasis during development: an evolutionary conserved strategy. *Cellular and molecular life sciences.* 2012;69(19):3245-3257.
27. Mulivil S, Narasimha M. Mitochondrial ROS regulates cytoskeletal and mitochondrial remodeling to tune cell and tissue dynamics in a model for wound healing. *Developmental cell.* 2014;28(3):239-252.
28. Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Childlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in retinal and eye research.* 2004;23(1):91-147.
29. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews.* 2002;82(1):47-95.
30. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2009;2(5):259-269.
31. Li SY, Jie Fu Z, C. Y. Lo A. Hypoxia-Induced Oxidative Stress in Ischemic Retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2012; 2012:Article ID 426769.
32. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International journal of biochemistry and cell biology.* 2007;39(1):44-84.
33. Jang S, Imlay JA. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *The journal of biological chemistry.* 2007;282(2):929-937.
34. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000;5(5):415-418.
35. Zemski Berry KA, Gordon WC, Murphy RC, Bazan NG. Spatial organization of lipids in the human retina and optic nerve by MALDI imaging mass spectrometry. *Journal of lipid research.* 2014;55(3):504-515.
36. Yu DY, Cringlea SJ, Balaratnasingama C, Morgana WH, Yu PK, Su EN. Retinal ganglion cells: energetic, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability. *Progress in retinal and eye research.* 2013;36:217-246.

37. Hirano K, Morinobu T, Kim H, Hiroi M, Ban R, Ogawa S, Ogihara H, Tamai H, Ogihara T. Blood transfusion increases radical promoting non-transferrin bound iron in preterm infants. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition.* 2001;84(3):F188-193.
38. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The journal of biological chemistry.* 2003;278(38):36027-36031.
39. Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, Yoshimura N. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Investigative ophthalmology and visual science.* 2000;41(11):3607-3614.
40. Wang H, Zhang SX, Hartnett ME. Signaling pathways triggered by oxidative stress that mediate features of severe retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmology.* 2013;131(1):80-85.
41. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, Ling EA. Cellular and vascular changes in the retina of neonatal rats after an acute exposure to hypoxia. *Investigative ophthalmology and visual science.* 2009;50(11):5364-5374.
42. Leduc M, Kermorvant-Duchemin E, Checchin D, Sennlaub F, Chemtob S. Hypercapnia and trans-arachidonic acid induced microvascular degeneration: implications in the genesis of retinopathy of prematurity. *Médecine sciences.* 2007;23(11):939-943.
43. Moore KL & Dalley AF. *Anatomy clinically oriented.* 5e éd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
44. Alm A, Bill A. The oxygen supply to the retina. II. Effects of high intraocular pressure and of increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Acta Physiologica Scandinavica.* 1972;84(3):306-319.
45. Lutty GA, Hasegawa T, Baba T, Grebe R, Bhutto I, McLeod DS. Development of the human choriocapillaris. *Eye (London, England).* 2010;24(3):408-415.
46. Cringle SJ, Yu DY. Oxygen supply and consumption in the retina: implications for studies of retinopathy of prematurity. *Documenta ophthalmologica.* 2010;120(1):99-109.
47. Shao Z, Dorfman AL, Seshadri S, Djavari M, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, et al. Choroidal involution is a key component of oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2011;52(9):6238-6248.
48. Guyton AC. The relationship of cardiac output and arterial pressure control. *Circulation.* 1981;64(6):1079-1088.

49. Hardy P, Dumont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, R. Varma D, Chemtob S. Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovascular research*. 2000;47(3):489-509.
50. Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(3):284-330.
51. Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL. Autoregulation of human retinal blood flow. An investigation with laser Doppler velocimetry. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1986;27(12):1706-1712.
52. Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatric research*. 1996;39(3):487-493.
53. Hardy P, Peri KG, Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. Increased nitric oxide synthesis and action preclude choroidal vasoconstriction to hyperoxia in newborn pigs. *Circulation research*. 1996;79(3):504-511.
54. Beauchamp MH, Martinez-Bermudez AK, Gobeil F Jr, Marrache AM, Hou X, Speranza G, Abran D, Quiniou C, Lachapelle P, Roberts J 2<sup>nd</sup>, Almazan G, Varma DR, Chemtob S. Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *Journal of applied physiology*. 2001;90(6):2279-2288.
55. Smith WL. Prostanoids biosynthesis and mechanisms of action. *The American journal of physiology*. 1992;263(2):F181-191.
56. Chemtob S, Hardy P, Abran D, Li DY, Peri K, Cuzzani O, Varma DR. Peroxide-cyclooxygenase interactions in postasphyxial changes in retinal and choroidal hemodynamics. *Journal of applied physiology*. 1995;78(6):2039-2046.
57. Dégi R, Thore C, Bari F, Thrikawala N, Nógrádi A, Robins G, et al. Ischemia increases prostaglandin H synthase-2 levels in retina and visual cortex in piglets. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 2001;239(1):59-65.
58. Hardy P, Abran D, Li DY, Fernandez H, Varma DR, Chemtob S. Free radicals in retinal and choroidal blood flow autoregulation in the piglet : interaction with prostaglandins. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1994;35(2):580-591.
59. Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV. Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1991;32(6):1799-1807.

60. Abran D, Dumont I, Hardy P, Peri K, Li DY, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. Characterization and regulation of prostaglandin E2 receptor and receptor-coupled functions in the choroidal vasculature of the pig during development. *Circulation research*. 1997;80(4):463-472.
61. Beauchamp MH, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F Jr, Checchin D, Kermorvant-Duchemin E, et al. Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free radical biology & medicine*. 2004;37(11):1885-1894.
62. Checchin D, Hou X, Hardy P, Abran D, Najarian T, Beauchamp MH, et al. PGE(2)-mediated eNOS induction in prolonged hypercapnia. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(5):1558-1566.
63. Ogawa N, Mori A, Hasebe M, Hoshino M, Saito M, Sakamoto K, et al. Nitric oxide dilates rat retinal blood vessels by cyclooxygenase-dependent mechanisms. *American journal of physiology*. 2009;297(4):R968-977.
64. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-5514.
65. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294(5545):1337-1340.
66. Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 1):L818-826.
67. D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, Vigne P, Frelin C. Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem*. 2003;278(40):38183-38187.
68. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental physiology*. 2006;91(5):807-819.
69. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193(2):631-638.
70. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362(6423):841-844.

71. Chan-Ling T, Gock B, Stone J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(7):1201-1214.
72. Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(11):3500-3510.
73. Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol.* 1996;114(10):1219-1228. Erratum publié par dans: *Arch Ophthalmol* 1997;115(3):427.
74. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(3):905-909.
75. Chan EC, Jiang F, Peshavariya HM, Dusting GJ. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacology & therapeutics.* 2009;122(2):97-108.
76. Barakat DJ, Dvorianchikova G, Ivanov D, Shestopalov VI. Astroglial NF- $\kappa$ B mediates oxidative stress by regulation of NADPH oxidase in a model of retinal ischemia reperfusion injury. *Journal of neurochemistry.* 2012;120(4):586-597.
77. Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(2):526-33.
78. Yang Z, Wang H, Jiang Y, Hartnett ME. VEGFA activates erythropoietin receptor and enhances VEGFR2-mediated pathological angiogenesis. *Am J Pathol.* 2014;184(4):1230-1239.
79. Reece EA, Wiznitzer A, Le E, Homko CJ, Behrman H, Spencer EM. The relation between human fetal growth and fetal blood levels of insulin-like growth factors I and II, their binding proteins, and receptors. *Obstet Gynecol.* 1994;84(1):88-95.
80. Langford K, Nicolaides K, Miell JP. Maternal and fetal insulin-like growth factors and their binding proteins in the second and third trimesters of human pregnancy. *Hum Reprod.* 1998;13(5):1389-1393.
81. Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engstrom E, Hard AL, Liu JL, et al. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5804-5808.
82. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med.* 1999;5(12):1390-1395.

83. Hellström A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet*. 2013;382(9902):1445-1457.
84. Clemmons DR. The relative roles of growth hormone and IGF-1 in controlling insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2004;113(1):25-27.
85. Arboleda G, Huang TJ, Waters C, Verkhatsky A, Fernyhough P, Gibson RM. Insulin-like growth factor-1-dependent maintenance of neuronal metabolism through the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway is inhibited by C2-ceramide in CAD cells. *Eur J Neurosci*. 2007;25(10):3030-3038.
86. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Essentials of exercise physiology*. 3e éd. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
87. SparkNotes, rédacteurs. SparkNote on Glycolysis [En ligne]. SparkNotes LLC. n.d. 2015 [cité le 9 juin 2015]. Disponible : <http://www.sparknotes.com/biology/cellrespiration/glycolysis/>.
88. Bender DA, Mayes PA. Glycolysis & the Oxidation of Pyruvate. Dans: Bender DA, Botham KM, Weil PA, Kennelly PJ, Murray RK, Rodwell VW, rédacteurs. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29e éd. New York: McGraw-Hill; 2011. p. 136-144.
89. Minchenko O, Opentanova I, Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett*. 2003;554(3):264-270.
90. Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ, Lange AJ. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:799-835.
91. Ros S, Schulze A. Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab*. 2013;1(1):8-17.
92. Chesney J, Clark J, Klarer AC, Imbert-Fernandez Y, Lane AN, Telang S. Fructose-2,6-bisphosphate synthesis by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 (PFKFB4) is required for the glycolytic response to hypoxia and tumor growth. *Oncotarget*. 2014;5(16):6670-6686.
93. Schulz, H. Oxidation of fatty acids in eukaryotes. Dans: Vance DE, Vance J, rédacteurs. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 5e éd. Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 131-154.
94. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res*. 2002;41(3):197-239.

95. Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 2006;103(27):10224-10229.
96. King MW. Lypolysis and the oxidation of fatty acids [En ligne]. n.d.: [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org), LCC. c1996-2014 [modifié le 10 mai 2015; cité le 23 juin 2015]. Disponible : <http://themedicalbiochemistrypage.org/fatty-acid-oxidation.php#mitochondria>.
97. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5e éd. New York. W.H. Freeman; 2002.
98. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*. 2007;27(24):8807-8814.
99. Bender DA, Mayes PA. The citric acid cycle: The catabolism of acetyl-CoA. Dans: Bender DA, Botham KM, Weil PA, Kennelly PJ, Murray RK, Rodwell VW, rédacteurs. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 29e éd. New York: McGraw-Hill; 2011. p. 163-169.
100. Yikrazuul. Wikimedia Commons [en ligne]. n.d. : Wikimedia Project; 2010. [Image], TCA cycle; [modifié le 7 avril 2011, cité le 11 juin 2015]. Disponible: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TCA\\_cycle.svg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TCA_cycle.svg?uselang=fr)
101. SparkNotes. rédacteurs. SparkNote on Oxidative Phosphorylation and Electron Transport [En ligne]. SparkNotes LLC. n.d. 2015 [cité le 8 juin 2015] Disponible : <http://www.sparknotes.com/biology/cellrespiration/oxidativephosphorylation/>
102. Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell, J. *Molecular Cell*. 4e éd. New York: W.H. Freeman; 2000.
103. Lieberman MA, Marks A, Peet A. *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. 4e éd. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
104. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*. 2013;340(6140):1567-1570.
105. Wa Kage B. Wikimedia Commons [en ligne]. n.d. : Wikimedia Project; 2008. [Image], Mitochondrial electron transport chain; [modifié le 4 janvier 2015, cité le 11 juin 2015]. Disponible: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial\\_electron\\_transport\\_chain%E2%80%94.svg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial_electron_transport_chain%E2%80%94.svg?uselang=fr)
106. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-314.

107. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-1033.
108. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006;93(8):E73-80.
109. De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab*. 2013;18(5):634-647.
110. Sapienza P, Joyal JS, Carlos Rivera J, Kermorvant-Duchemin E, Sennlaub F, Hardy P, Lachapelle P, Chemtob S. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(9):3022-3032.
111. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7(1):77-85.
112. Sapienza P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature medicine*. 2008;14(10):1067-1076.
113. Murray B, Wilson DJ. A study of metabolites as intermediate effectors in angiogenesis. *Angiogenesis*. 2001;4(1):71-77.
114. Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *The journal of biological chemistry*. 2005;280(51):41928-41939.
115. Grant MB, Davis MI, Caballero S, Feoktistov I, Biaggioni I, Belardinelli L. Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(9):2068-2073.
116. Schutkowski M, Fischer F, Roessler C, Steegborn C. New assays and approaches for discovery and design of Sirtuin modulators. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2014;9(2):183-199.
117. Chen J, Michan S, Juan AM, Hurst CG, Hatton CJ, Pei DT, et al. Neuronal sirtuin1 mediates retinal vascular regeneration in oxygen-induced ischemic retinopathy. *Angiogenesis*. 2013;16(4):985-992.
118. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:253-295.

119. Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol Med.* 2013;5(3):344-352.
120. Yu J, Auwerx J. The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Annals of the New York academy of sciences.* 2009;1173(1):E10-19.
121. Smith BC, Hallows WC, Denu JM. Mechanisms and molecular probes of sirtuins. *Chem Biol.* 2008;15(10):1002-1013.
122. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *The journal of biological chemistry.* 2004;279(49):50754-50763.
123. 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.
124. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metabolism.* 2010;12(6):662-667.
125. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell.* 2010;143(5):802-812.
126. Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De Rango F, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics.* 2005;85(2):258-263.
127. Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14447-14452.
128. Giralt A, Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J.* 2012;444(1):1-10.
129. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, et al. Sirt3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature.* 2010;464(7285):121-125.
130. Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry.* 2010;49(2):304-311.
131. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1479-1514.

132. Chen Y, Fu LL, Wen X, Wang XY, Liu J, Cheng Y, Huang J. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1047.
133. Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K, Xie B, Campochiaro PA. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxidants & redox signaling.* 2009;11(4):715-724.
134. Sundaesan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *The journal of clinical investigation.* 2009;119(9):2758-2771.
135. Bell E, Guarente L. The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Molecular cell.* 2011;42(5):561-568.
136. Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Developmental Cell.* 2009;16(2):167-179.
137. Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L. Sirt3 suppresses hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene.* 2011;30(26):2986-2996.
138. Sundaesan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol.* 2008;28(20):6384-6401.
139. Shulga N, Pastorino JG. Ethanol sensitizes mitochondria to the permeability transition by inhibiting deacetylation of cyclophilin-D mediated by sirtuin-3. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 23):4117-4127.
140. Li S, Banck M, Mujtaba S, Zhou MM, Sugrue MM, Walsh MJ. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. *PLoS One.* 2010;5(5):e10486.
141. Zhang L, Ren X, Cheng Y, Huber-Keener K, Liu X, Zhang Y, et al. Identification of Sirtuin 3, a mitochondrial protein deacetylase, as a new contributor to tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(6):726-733.
142. Zhao Y, Yang H, Wang X, Zhang R, Wang C, Guo Z. Sirtuin-3 (SIRT3) expression is associated with overall survival in esophageal cancer. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17(6):483-485.
143. Griending KK, Sorescu D, Lassèque B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2000;20(10):2175-2183.

144. Koyama T, Kume S, Koya D, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, et al. SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(6):1258-1267.
145. Sun J, Li F, Zhao Y, Zhao L, Qiao C, Li Z, et al. LZ-207, a Newly Synthesized Flavonoid, Induces Apoptosis and Suppresses Inflammation-Related Colon Cancer by Inhibiting the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127282.
146. Lai CC, Lin PM, Lin SF, Hsu CH, Lin HC, Hu ML, et al. Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2013;34(3):1847-1854.
147. Li YP, Tian FG, Shi PC, Guo LY, Wu HM, Chen RQ, et al. 4-Hydroxynonenal promotes growth and angiogenesis of breast cancer cells through HIF-1 $\alpha$  stabilization. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(23):10151-10156.
148. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 $\alpha$  destabilization. *Cancer Cell*. 2011;19(3):416-428.
149. Schumacker PT. SIRT3 controls cancer metabolic reprogramming by regulating ROS and HIF. *Cancer Cell*. 2011;19(3):299-300.
150. Statement for the use of animals in ophthalmic and visual research. [En ligne]. New York: The Association for Research in Vision and Ophthalmology; 2015 [cité le 13 juin 2015]. Disponible : [http://www.arvo.org/About\\_ARVO/Policies/Statement\\_for\\_the\\_Use\\_of\\_Animals\\_in\\_Ophthalmic\\_and\\_Visual\\_Research/](http://www.arvo.org/About_ARVO/Policies/Statement_for_the_Use_of_Animals_in_Ophthalmic_and_Visual_Research/)
151. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(1):101-111.
152. Lange C, Ehlken C, Stahl A, Martin G, Hansen L, Agostini HT. Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(9):1205–1211.
153. Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc*. 2009;4(11):1565-1573.
154. Vanhaesebrouck S, Daniels H, Moons L, Vanhole C, Carmeliet P, De Zegher F. Oxygen-induced retinopathy in mice: amplification by neonatal IGF-I deficit and attenuation by IGF-I administration. *Pediatr Res*. 2009;65(3):307-310.

155. Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS. A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS One*. 2015;10(4):e0125631.
156. Das A, Byrd J. Retinal vasculature: structure and pathologies. Dans : McManus LM, Mitchell RN, rédacteurs. *Pathobiology of human disease: a dynamic encyclopedia of disease mechanisms*. 1ère éd. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 2137-2161.
157. Stahl A, Connor KM, Sapielha P, et al. Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis*. 2009;12(3):297-301.
158. Wu JW, Wang SP, Casavant S, Moreau A, Yang GS, Mitchell GA. Fasting energy homeostasis in mice with adipose deficiency of desnutrin/adipose triglyceride lipase. *Endocrinology*. 2012;153(5):2198-2207.
159. Jin L, Galonek H, Israelian K, Choy W, Morrison M, Xia Y, et al. Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3. *Protein Sci*. 2009;18(3):514–525.
160. Joyal JS, Sitaras N, Binet F, Rivera JC, Stahl A, Zaniolo K, et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood*. 2011;117(22):6024-6035.
161. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1163-1177.
162. Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(5):617-625.
163. Masson V VÉ, Devy L, Grignet-Debrus C, Bernt S, Bajou K, Blacher S, et al. Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol Proced Online*. 2002;4(1):24-31.
164. Bellacen K, Lewis EC. Aortic ring assay. *J Vis Exp*. 2009;(33):1564.
165. Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc*. 2011;7(1):89-104.
166. Kietzmann T, Görlach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Seminars in cell & developmental biology*. 2005;16(4-5):474-486.
167. Schofield CJ, Zhang Z. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. 1999;9(6):722-731.

168. Vogel HG. Drug Discovery and evaluation: pharmacological assays, volume 1. 3e éd. New York: Springer; 2008.
169. Hirata T, Kato M, Okamura N, Fukasawa M, Sakakibara R. Expression of human placental-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in various cells and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(3):680-684.
170. Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabatè A, Riera L, Bartrons R, Lange AJ. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(1):30-35.
171. Minchenko O, Opentanova I, Minchenko D, Ogura T, Esumi H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Lett*. 2004;576(1-2):14-20.
172. Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL, Moenner M, Caro J, Esumi H, et al. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(4):789-99.
173. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*. 2013;154(3):651-663.
174. Liu W, Shen SM, Zhao XY, Chen GQ. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(2):165-178.
175. Obach M, Navarro-Sabate A, Caro J, Kong X, Duran J, Gomez M, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2004;279(51):53562-53570.
176. Agathocleous M, Love NK, Randlett O, Harris JJ, Liu J, Murray AJ, et al. Metabolic differentiation in the embryonic retina. *Nat Cell Biol*. 2012;14(8):859-864.