

Université de Montréal

**Le rôle du stress oxydant dans les changements
épigénétiques contribuant aux complications du
syndrome métabolique**

par

Sabrina Yara

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en Nutrition

Septembre 2014

© Sabrina Yara, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Le rôle du stress oxydant dans les changements épigénétiques contribuant aux complications
du syndrome métabolique

Présentée par :
Sabrina Yara

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Eric Thorin, président-rapporteur
Dr Emile Levy, directeur de recherche
Dr Jean-Claude Lavoie, co-directeur de recherche
Dre Stéphanie Fulton, membre du jury
Dr David St-Pierre, examinateur externe
Dr Gilles Beaudoin, représentant de la doyenne de la FE

Résumé

La méthylation de l'ADN est l'une des modifications épigénétiques au niveau des îlots CpG. Cette modification épigénétique catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMTs) consiste en la méthylation du carbone 5' d'une cytosine ce qui aboutit à la formation de 5-méthylcytosine. La méthylation de l'ADN est clairement impliquée dans l'inactivation des gènes et dans l'empreinte génétique. Elle est modulée par la nutrition, en particulier par les donneurs de méthyle et par une restriction protéique. Ces modifications épigénétiques persistent plus tard dans la vie et conduisent au développement de nombreuses pathologies telles que le syndrome métabolique et le diabète de type 2. En fait, de nombreux gènes clés subissent une modification de leur état de méthylation en présence des composants du syndrome métabolique. Cela montre que la méthylation de l'ADN est un processus important dans l'étiologie du syndrome métabolique. Le premier travail de ce doctorat a porté sur la rédaction d'un article de revue qui a examiné le cadre central du syndrome métabolique et analyser le rôle des modifications épigénétiques susceptibles d'influer sur l'apparition du stress oxydant et des complications cardiométaboliques. D'autre part, les cellules intestinales Caco-2/15, qui ont la capacité de se différencier et d'acquérir les caractéristiques physiologiques de l'intestin grêle, ont été utilisées et traitées avec du Fer-Ascorbate pour induire un stress oxydant. Le Fer-Ascorbate a induit une augmentation significative de l'inflammation et de la peroxydation des lipides (malondialdéhyde) ainsi que des altérations de la défense antioxydante (SOD2 et GPx) accompagnées de modifications épigénétiques. De plus, la pré-incubation des cellules avec de la 5-aza-2'-désoxycytidine, un agent de déméthylation et/ou l'antioxydant Trolox a normalisé la défense antioxydante, réduit la peroxydation des lipides et prévenu l'inflammation. Ce premier travail a démontré que les modifications du redox et

l'inflammation induites par le Fer-Ascorbate peuvent impliquer des changements épigénétiques, plus particulièrement des changements dans la méthylation de l'ADN. Pour mieux définir l'impact du stress oxydant au niveau nutritionnel, des cochons d'Inde âgés de trois jours ont été séparés en trois groupes : 1) Témoins: alimentation régulière; 2) Nutrition parentérale (NP) 3) H₂O₂ : Témoins + 350 uM H₂O₂. Après quatre jours, pour un groupe, les perfusions ont été stoppées et les animaux sacrifiés pour la collecte des foies. Pour l'autre groupe d'animaux, les perfusions ont été arrêtées et les animaux ont eu un accès libre à une alimentation régulière jusqu'à la fin de l'étude, huit semaines plus tard où ils ont été sacrifiés pour la collecte des foies. Ceci a démontré qu'à une semaine de vie, l'activité DNMT et les niveaux de 5'-méthyl-2'-désoxycytidine étaient inférieurs pour les groupes NP et H₂O₂ par rapport aux témoins. A neuf semaines de vie, l'activité DNMT est restée basse pour le groupe NP alors que les niveaux de 5'-méthyl-2'-désoxycytidine étaient plus faibles pour les groupes NP et H₂O₂ par rapport aux témoins. Ce travail a démontré que l'administration de NP ou de H₂O₂, tôt dans la vie, induit une hypométhylation de l'ADN persistante en raison d'une inhibition de l'activité DNMT. Finalement, des souris ayant reçu une diète riche en gras et en sucre (HFHS) ont été utilisées comme modèle in vivo de syndrome métabolique. Les souris ont été nourries soit avec un régime standard chow (témoins), soit avec une diète riche en gras et en sucre (HFHS) ou avec une diète HFHS en combinaison avec du GFT505 (30 mg/kg), un double agoniste de PPAR α et de PPAR δ , pendant 12 semaines. La diète HFHS était efficace à induire un syndrome métabolique étant donnée l'augmentation du poids corporel, du poids hépatique, des adiposités viscérales et sous-cutanées, de l'insensibilité à l'insuline, des lipides plasmatiques et hépatiques, du stress oxydant et de l'inflammation au niveau du foie. Ces perturbations étaient accompagnées d'une déficience dans l'expression des gènes hépatiques

PPAR α et PPAR γ concomitant avec une hyperméthylation de leurs promoteurs respectifs. L'ajout de GFT505 à la diète HFHS a empêché la plupart des effets cardiométaboliques induits par la diète HFHS via la modulation négative de l'hyperméthylation des promoteurs, résultant en l'augmentation de l'expression des gènes hépatiques PPAR α et PPAR γ . En conclusion, GFT505 exerce des effets métaboliques positifs en améliorant le syndrome métabolique induit par l'alimentation HFHS via des modifications épigénétiques des gènes PPARs. Ensemble, les travaux de cette thèse ont démontré que le stress oxydant provenant de la nutrition induit d'importants changements épigénétiques pouvant conduire au développement du syndrome métabolique. La nutrition apparaît donc comme un facteur crucial dans la prévention de la reprogrammation fœtale et du développement du syndrome métabolique. Puisque les mécanismes suggèrent que le stress oxydant agit principalement sur les métabolites du cycle de la méthionine pour altérer l'épigénétique, une supplémentation en ces molécules ainsi qu'en antioxydants permettrait de restaurer l'équilibre redox et épigénétique.

Mots clés : méthylation de l'ADN, nutrition, stress oxydant, défense antioxydante, inflammation, syndrome métabolique, programmation fœtale.

Abstract

DNA methylation is one of the epigenetic modifications to CpG islands. This covalent epigenetic modification, catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs), consists of localized cytosine methylation in carbon 5' of the CpG islands resulting in 5-methylcytosine. DNA methylation is clearly implicated in stable gene inactivation and also in the genetic footprint. It is modulated by nutrition, particularly methyl donors and protein restriction. These epigenetic changes persist later in life and lead to the development of numerous pathologies such as metabolic syndrome and type 2 diabetes. In fact, many key genes undergo a modification to their methylation status in the presence of metabolic syndrome components. This shows that DNA methylation is a major process in the etiology of metabolic syndrome. The first work of this Ph.D focused on writing a journal article that examined the central part of the metabolic syndrome and analyze the role of epigenetic changes that may affect the occurrence of oxidative stress and cardiometabolic complications. Furthermore, intestinal cells Caco-2/15, which have the capacity to differentiate and acquire the physiological characteristics of the small intestine, were used and treated with iron-ascorbate to induce oxidative stress. Iron-ascorbate induced a significant increase in inflammation and lipid peroxidation (malondialdehyde) and alterations of the antioxidant defense (GPx and SOD2) accompanied by epigenetic changes. Moreover, pre-incubation of Caco-2/15 cells with 5-Aza-2'-deoxycytidine, a demethylating agent, and/or Trolox antioxidant normalized the activities of SOD2 and GPx, reduced lipid peroxidation and prevented inflammation. This initial work has shown that changes in the redox and inflammation induced by iron-ascorbate may involve epigenetic changes, particularly DNA methylation. To better define the impact of oxidative stress on the nutritional level, Guinea pigs aged three days were divided into three groups : 1)

Control: animals enterally fed with regular chow; 2) Total parenteral nutrition (TPN); 3) H₂O₂: Control+ i.v. infusion with 350 μ M H₂O₂. After four days, for one group, animals were sacrificed for liver sampling. The other group of animals had free access to regular chow and water until the end of study, 8 weeks later and were sacrificed after this period. This work has shown that at one week of age, DNMT activity and 5'-methyl-2'-deoxycytidine levels were lower in TPN and H₂O₂ groups compared to controls. At nine weeks, DNMT activity remained lower in TPN group whereas 5'-methyl-2'-deoxycytidine levels were lower in TPN and H₂O₂ groups. This work has demonstrated that administration of TPN or H₂O₂, early in life in Guinea pigs, induces a sustained hypomethylation of DNA following inhibition of DNMT activity. Finally, mice that have received a high-fat high-sugar diet (HFHS) were used as *in vivo* model of metabolic syndrome. Mice were fed either a standard chow diet (controls), a high-fat/high-sucrose (HFHS) diet, or the HFHS diet in combination with GFT505 (30 mg/kg), for 12 weeks. The HFHS diet was effective in inducing metabolic syndrome characteristics in view of increases in body weight, visceral adiposity, insulin insensitivity, plasma and hepatic lipids, oxidative stress and inflammation in liver. These derangements were accompanied with deficient in PPAR α and PPAR γ hepatic gene expressions and hypermethylation of their respective promoters. Addition of GFT505 to the HFHS diet prevented most of the cardiometabolic effects induced by HFHS diet via negative modulation of promoter hypermethylation, resulting in raised PPAR α and PPAR γ hepatic gene expression. In conclusion, GFT505 exerts positive metabolic effects by improving HFHS diet-induced metabolic syndrome due to epigenetic alterations of PPARs genes.

Together, the work of this thesis has shown that oxidative stress from nutrition can regulate epigenetic that lead to the development of metabolic syndrome. Nutrition appears as a critical

factor in the prevention of fetal reprogramming and development of the metabolic syndrome. Since the mechanisms suggest that oxidative stress acts on metabolites of methionine cycle to alter the epigenetic, supplementation of these molecules and antioxidants could help to restore the redox balance and the epigenetic.

Keywords: DNA methylation, nutrition, oxidative stress, antioxidant defense, inflammation, metabolic syndrome, fetal programming.

Table des matières

Liste des tableaux :.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
I INTRODUCTION	1
1. LA MÉTHYLATION DE L'ADN	2
2. LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET L'ENVIRONNEMENT NUTRITIONNEL	6
3. LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET LE SYNDROME MÉTABOLIQUE	13
3.1. Le syndrome métabolique.....	13
3.2. La méthylation de l'ADN et le syndrome métabolique	15
4. LE STRESS OXYDANT ET LE SYNDROME MÉTABOLIQUE.....	20
4.1. Le stress oxydant	22
4.1.1. Les prooxydants cellulaires.....	22
4.1.1.1. Les oxydants radicalaires.....	22
4.1.1.1.1. L'anion superoxyde.....	23
4.1.1.1.2. Le radical hydroxyle.....	24
4.1.1.1.3. Le radical peroxyde.....	25
4.1.1.2. Les oxydants non radicalaires.....	26
4.1.1.2.1. Le peroxyde d'hydrogène.....	26
4.1.2. Les principales sources de ROS.....	27
4.1.2.1. La chaîne respiratoire mitochondriale.....	27
4.1.2.2. Les cellules phagocytaires.....	30
4.1.2.3. La xanthine oxydase.....	31
4.1.3. ROS et macromolécules.....	31
4.1.4. Le stress oxydant et l'inflammation.....	32
4.1.5. Les antioxydants cellulaires.....	35

4.1.5.1.	Les antioxydants non enzymatiques.....	35
4.1.5.1.1.	Le glutathion.....	35
4.1.5.1.2.	L'acide ascorbique.....	37
4.1.5.1.3.	La vitamine E.....	37
4.1.5.1.4.	Le β -carotène.....	39
4.1.5.2.	Les antioxydants enzymatiques (Figure 3).....	40
4.1.5.2.1.	Les superoxydes dismutases.....	40
4.1.5.2.1.1.	Superoxyde dismutase 1.....	41
4.1.5.2.1.2.	Superoxyde dismutase 2.....	42
4.1.5.2.1.3.	Superoxyde dismutase 3.....	43
4.1.5.2.1.4.	La catalase.....	43
4.1.5.2.2.	Les Glutathions peroxydases.....	44
4.1.5.2.2.1.	Glutathion peroxydase 1.....	45
4.1.5.2.2.2.	Glutathion peroxydase 2.....	45
4.1.5.2.2.3.	Glutathion peroxydase 3.....	46
4.1.5.2.2.4.	Glutathion peroxydase 4.....	46
4.1.6.	Régulation de la défense antioxydante.....	47
4.1.7.	Le stress antioxydant.....	52
4.2.	<i>Le stress oxydant et les composantes du syndrome métabolique</i>	54
4.2.1.	L'obésité et le stress oxydant.....	54
4.2.2.	Le diabète et le stress oxydant.....	57
4.2.3.	L'hypertension et le stress oxydant.....	58
4.3.	<i>Résumé.....</i>	61
5.	LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET LE STRESS OXYDANT	62
6.	RÉSUMÉ ET PROBLÉMATIQUE	65
II	PROJET DE RECHERCHE	67
1.	HYPOTHÈSE	68

2.	OBJECTIFS PRINCIPAUX	69
3.	ARTICLES SCIENTIFIQUES.....	71
3.1.	Article 1.....	71
3.1.1.	Apport original et contribution.....	71
3.2.	Article 2.....	113
3.2.1.	Apport original et contribution.....	113
3.3.	Article 3 :.....	131
3.3.1.	Apport original et contribution.....	131
3.4.	Article 4.....	185
3.4.1.	Apport original et contribution.....	185
III	DISCUSSION	249
IV	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	264
1.	CONCLUSION	265
2.	PERSPECTIVES.....	266
V	ANNEXES.....	XVI
1.	LISTE DES PRÉSENTATIONS	XVI
2.	LISTE DES BOURSES OBTENUES	XVII

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Impact de l'environnement nutritionnel sur la méthylation de l'ADN et le syndrome métabolique	12
Tableau 2 : Critères pour le diagnostic du syndrome métabolique par les différents organismes	14
Tableau 3 : Syndrome métabolique et méthylation de l'ADN	19
Tableau 4 : Syndrome métabolique, stress oxydant et inflammation	60

Liste des figures

Figure 1 : Réaction de méthylation de l'ADN par les ADN méthyltransférases (DNMTs) et inhibition de la transcription.	4
Figure 2 : La voie de méthylation/transulfuration.	8
Figure 3 : Activités enzymatiques des superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) et catalase (CAT). ...	21
Figure 4 : La chaîne respiratoire mitochondriale.	29
Figure 5 : NOX2 et ses sous-unités.	30
Figure 6 : Activation du facteur de transcription NF- κ B.	34
Figure 7 : Le glutathion.	36
Figure 8 : Représentation schématique des domaines du Nrf2 et de Keap 1 (INrf2).	48
Figure 9 : Activation des gènes antioxydants par le stress oxydant activant Nrf2.	50
Figure 10 : Réaction de méthylation de l'ADN impliquant l'anion superoxyde.	63
Figure 11 : Schéma de problématique.	66
Figure 12 : Inhibition du cycle de la méthionine par le redox.	263

Liste des abréviations

5-aza	5-aza-2'-deoxycytidine
8-epi-PGF2 α	8-epi-prostaglansine-F2 α
ACE-1	Angiotensin-converting-enzyme
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	advanced glycation end product
ALE	advanced lipoxidation end product
ARN	Acide ribonucléique
ATP III	Adult Treatment Panel III
Avy	Agouti viable yellow
CAT	Catalase
CpG	Cytosine Phosphodiester Guanosine
Cu	Cuivre
DNMT	DNA méthyltransférase
DT2	Diabète de type 2
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion Réductase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfide
H \cdot	Radical Hydrogène
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HADHB	hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase
HDL	High-density lipoprotein
HFHS	High Fat High Sugar
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HNF4A	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
HO \cdot	Radical hydroxyle
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IDF	International Disease Federation
Igf2r	Insulin-like growth factor-2 receptor

I κ B	Inhibitor of Kappa B
IMC	Indice de Masse Corporelle
IL-6	Interleukine-6
IRS-1	Insulin Receptor Substrat
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDL	Low-density lipoprotein
LOO \cdot	Radical peroxyde
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver X Receptor
MCR4	Récepteur mélanocortine 4
MCVs	Maladies Cardiovasculaires
MDA	Malondialdéhyde
MnSOD	Manganèse Superoxyde dismutase
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NKCC1	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ cotransporteur 1
NOX	NADPH oxydase
NP	Nutrition parentérale
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pdx-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PGD2	Prostaglandine-2
PKC	Protéine kinase C
POMC	proopiomélanocortine
PPAR α	peroxisome proliferator activator receptor- α
PPAR γ	peroxisome proliferator activator receptor- γ
PRC	Protein Reactive C
RG	Récepteur Glucorticoïde
RNS	Reactive Nitrogen Species

ROS	Reactive Oxygen Species
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
RXR	Retinoid X Receptor
SAM	S-adénosylméthionine
SERPINA3	Serine protease inhibitor
SOD	Superoxyde Dismutase
TBARS	Thiobarbituric acide reactive substance
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
UCP 1	Uncoupling Protein 1
UVBs	Ultraviolets B
Zn	Zinc

À ma famille...

Remerciements

En effectuant mon doctorat au Québec, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables. Cette expérience a été des plus enrichissantes.

Tout d'abord, il convient de remercier mon directeur de recherche, le Dr Émile Levy, qui m'a offert la chance d'effectuer mes travaux de recherche dans son laboratoire de renommée internationale. Un merci également à mon co-directeur, le Dr Jean-Claude Lavoie. Je remercie mes directeurs de m'avoir dirigé et de m'avoir fait évoluer en tant que scientifique. Effectivement, en travaillant à leurs côtés, j'ai pu développer des compétences en rédaction et communication scientifiques, accroître mon esprit critique et élargir mes connaissances en analyse de laboratoire. J'ai également pu côtoyer des équipes formidables. Merci à Carole, Zola, Danielle, Thérèse et Wesam.

Je remercie également le département de nutrition pour son accompagnement tout au long de mon doctorat.

Pendant ces années de doctorat de nombreuses personnes sont passées au laboratoire et des amitiés ont pu se créer : Émilie, Marie-Claude, Marie-Laure, Alain S, Thierry, Léa et Élodie, merci pour votre amitié !

Un grand merci également à Valérie, Louis-Philippe, Rame, Sylvain, Andréa, Alain M, Alain V, Sophia, Ali et Khalil.

Pour finir, un grand merci aux personnes de ma vie. Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes projets. J'ai eu la chance d'avoir une mère attentive et dévouée qui malgré le peu de moyens dont elle disposait, nous a toujours donné le meilleur. Merci à mes frères et sœurs. Merci à mon mari pour son précieux soutien, son écoute, sa compréhension et sa disponibilité. Merci d'être à mes côtés dans les bons moments comme dans les mauvais. Merci d'être un aussi bon papa !

Enfin merci à notre fille, Inaya. Merci de faire partie de nos vies. Tu es la plus belle chose qui nous soit arrivée. Merci pour le bonheur que tu nous apportes et merci de m'avoir montré ce qui est réellement essentiel.

I INTRODUCTION

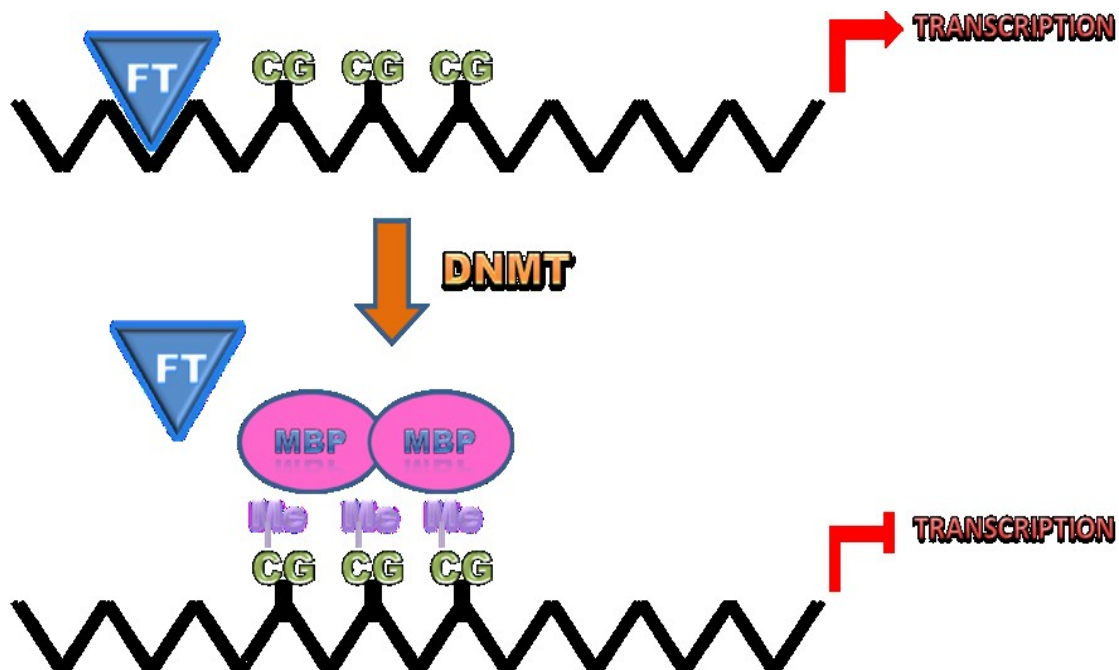
1. LA MÉTHYLATION DE L'ADN

En 1942, Conrad Hal Waddington a désigné l'étude des processus dans lesquels des changements programmés du génotype, lors du développement, donnent lieu à des phénotypes. Par la suite, l'épigénétique a été démontrée comme étant héréditaire, impliquée dans l'expression des gènes et ne pas être due à des altérations de la séquence nucléotidique (1). De nos jours, l'épigénétique est définie comme l'étude des modifications génomiques stables entraînant des changements dans l'expression et la fonction des gènes sans aucune altération de la séquence de l'ADN. Les mécanismes épigénétiques englobent la méthylation de l'ADN, les modifications covalentes des histones ainsi que les ARNs non-codants. Cette revue s'intéressera plus particulièrement à la méthylation de l'ADN en relation avec le syndrome métabolique.

La méthylation de l'ADN est la modification postrépllicative épigénétique la plus étudiée, consistant en la méthylation des cytosines des dinucléotides CpG (2). Cette modification biochimique covalente au niveau du carbone 5' de la cytosine aboutit à la 5-méthylcytosine. Dans les cellules humaines somatiques, les cytosines méthylées représentent 1 % des bases totales de l'ADN et affectent 70 % à 80 % de tous les dinucléotides CpG dans le génome (3). Les dinucléotides CpGs sont représentés de façon asymétrique dans le génome avec des régions pauvres ou riches en CpG qu'on appelle des îlots CpG. Les îlots CpG couvrent les régions promotrices jusqu'aux premiers exons de certains gènes (4) et sont habituellement non méthylés dans les cellules normales (5). Les enzymes impliquées dans cette réaction de méthylation sont les ADN méthyltransférases (DNMTs). DNMT1, DNMT3a et DNMT3b établissent et maintiennent la méthylation de l'ADN en catalysant le transfert d'un groupe

méthyle provenant d'une S-adénosylméthionine (SAM) vers une cytosine. Le maintien de la méthylation est bien évident entre les générations cellulaires et est majoritairement effectué par la DNMT1. Cette enzyme est la plus abondante dans les cellules somatiques. DNMT1 est connue pour copier les motifs de méthylation au niveau du nouveau brin d'ADN après sa réplication (6;7) et est nécessaire pour le bon développement de l'embryon, l'hérédité ainsi que l'inactivation du chromosome X (8;9). Il est important d'ailleurs de préciser que les DNMT3a et DNMT3b constituent les deux ADN méthyltransférases fondamentales pour le développement embryonnaire et nécessaires pour la méthylation *de novo* (10-12) se déroulant dans le génome après l'implantation de l'embryon (13;14). Des études démontrent que ces trois enzymes coopèrent en participant à la méthylation *de novo* et de maintenance (15;16).

Bien que la méthylation de l'ADN empêche la fixation de certaines protéines, elle est attractive pour d'autres. Les groupes méthyles en excroissance du squelette nucléotidique empêchent la liaison des facteurs de transcription (17). De plus, les sites de méthylation exposés attirent les protéines « CpG methyl-binding proteins » impliquées dans la répression de la transcription (18). Plus particulièrement, les protéines humaines MECP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4 sont connues pour former une famille de protéines nucléaires reliées par la présence d'un domaine de liaison méthyle-CpG (19), capable de se lier spécifiquement à l'ADN méthylé (19;20) à l'exception de MBD3 qui est impliquée dans le recrutement des ADN méthyltransférases (Figure 1).



Yara S. *et al*, 2014

Figure 1 : Réaction de méthylation de l'ADN par les ADN méthyltransférases (DNMTs) et inhibition de la transcription.

La réaction de méthylation de l'ADN est effectuée par les DNMTs. Les sites de méthylation des dinucléotides CpG attirent les «CpG méthyle -binding protein» (MBP) impliquées dans l'inhibition de la transcription via la prévention de la liaison des facteurs de transcription (FT).

Le motif de méthylation est généralement conservé après la réplication de l'ADN afin de le transmettre à la descendance cellulaire, créant donc un lien ou une communication pour la transmission des pressions environnementales engendrées aux générations cellulaires précédentes.

La méthylation de l'ADN est le mécanisme le plus connu de l'épigénétique et est manifestement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, la méthylation de l'ADN réprime la transcription dépendamment de l'emplacement et de la densité des îlots CpG du promoteur (21-23). Les exemples les plus éloquents sont les inactivations du chromosome X (24-26) et rétrovirale (27) qui sont atténuées par le traitement des cellules somatiques avec un agent déméthylant, ce qui démontre explicitement l'implication de la méthylation de l'ADN dans l'inactivation stable des gènes. Cette inactivation impliquant la méthylation de l'ADN est également démontrée par la réactivation des transgènes X des cellules embryonnaires de souris et des cellules somatiques en culture, lorsque la DNMT1 est absente ou inhibée (28).

La méthylation de l'ADN est également impliquée dans l'hérédité, puisque, pour une même cellule, un des deux allèles est stablement réprimé épigénétiquement tandis que l'autre allèle est maintenu dans un état actif. D'ailleurs, une délétion de la DNMT1 conduit à une altération de l'expression monoallélique de plusieurs gènes héréditaires (8).

Cette régulation spécifique est déterminée selon l'origine parentale de l'allèle qui peut être hérité de la mère ou du père. C'est seulement depuis 1991 que les chercheurs ont commencé à isoler une variété de gènes dont l'expression dépend de leur origine parentale comme *Igf2r* (insulin-like growth factor-2 receptor), *H19* et *Igf2* (insulin-like growth factor-2). *Igf2r* et *H19* sont actifs seulement lorsqu'ils sont hérités de la mère tandis que *Igf2* est actif lorsqu'il est hérité du père (29).

La méthylation de l'ADN apparaît comme un mécanisme clé par lequel une copie d'un gène est préférentiellement réprimée selon l'origine parentale et maintenue éteinte durant la

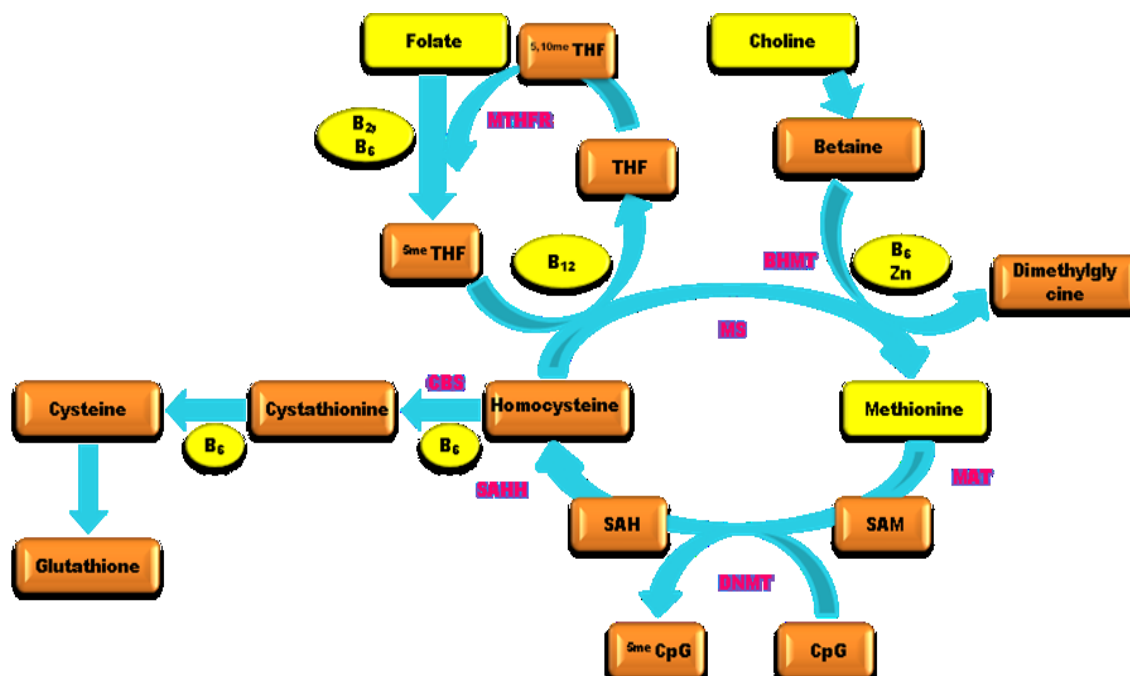
division cellulaire par la DNMT1 (11;30). Toutefois, une dérégulation épigénétique de gènes « empreintes » est associée avec plusieurs syndromes et maladies humaines (31).

2. LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET L'ENVIRONNEMENT NUTRITIONNEL

L'épigénétique est un processus répondant aux variations de l'environnement. En effet, des altérations du statut de méthylation de l'ADN ont été documentées comme étant le résultat de stress environnementaux. Tobi *et al.* (32) ont démontré que les individus ayant été exposés, pendant leur période prénatale, à la famine hollandaise (hiver 1944) présentent une diminution de la méthylation de l'ADN du gène IGF2, six ans après, comparé aux individus non exposés et de même sexe. Cette étude supporte l'évidence que les conditions environnementales peuvent conduire, très tôt dans la vie, à des modifications épigénétiques persistantes plus tardivement. Ceci est une confirmation de l'hypothèse de Barker suggérant qu'une malnutrition intra-utérine et postnatale résulte en une reprogrammation foetale persistante durant la vie adulte et peut contribuer à l'apparition de pathologies comme les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II (33).

Les meilleures études démontrant que les conditions environnementales affectent les progénitures sont celles étudiant l'alimentation maternelle. Les souris Agouti en constituent un bon exemple, notamment à travers leurs allèles qui régulent la production d'un pigment au niveau des follicules pileux. Les souris exprimant le gène Agouti « agouti viable yellow » ou *Avy* sont jaunes, tachetées, obèses et sujettes au développement de diabète et de cancer tandis que les souris dites pseudoagouti sont minces et non diabétiques. Le phénotype des souris Agouti dépend de l'expression de la protéine Agouti qui est régulée par le statut de

méthylation de l'ADN du promoteur Agouti (34). Des chercheurs ont supplémenté les souris Agouti, avant et pendant la grossesse, en folate, vitamine B12, choline, bêtaïne, connus pour leur implication dans la génération de donneurs de méthyles (S-adenosylméthionine) (Figure 2). Cette supplémentation a conduit à élever la méthylation de l'ADN du gène Agouti de façon substantielle et spécifique chez les progénitures, accompagnée d'un changement du phénotype (35-38). Cette étude démontre clairement comment la nutrition peut affecter l'organisation épigénétique des gènes et avoir des conséquences à long terme sur les phénotypes et l'expression génique.



Yara S. *et al*, 2014

Figure 2 : La voie de méthylation/transulfuration. L'acide folique sous forme de 5-méthyltétrahydrofolate (5^{me} THF) est impliqué dans la méthylation de l'homocystéine pour donner de la méthionine, le précurseur de la S- adényl-méthionine (SAM) connue comme le donneur de groupe méthyle à l'ADN. La méthionine adényltransférase (MAT) catalyse la synthèse de SAM. La S-adénylhomocystéine (SAH), produite à partir de la déméthylation de SAM, est généralement rapidement transformée en homocystéine par la SAH hydrolase (SAHH). L'homocystéine peut entrer de manière irréversible dans la voie de transsulfuration pour produire de la cystéine qui peut être utilisée pour former du glutathion via la voie de transsulfuration qui comprend la cystathionine bêta-synthase (CBS). L'homocystéine peut également être convertie en méthionine par la méthionine synthase (MS). La bêtaïne est également une source de groupes méthyles qui sont transférés à l'homocystéine par la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT). La MTHFR (méthyl tétrahydrofolate réductase) catalyse la conversion de 5,10-méthyltétrahydrofolate ($5,10^{\text{me}}$ THF) en 5-méthyltétrahydrofolate (5^{me} THF).

Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact de la nutrition sur l'épigénétique. Une étude avec des rongeurs montre qu'une restriction maternelle en protéine peut réduire la méthylation des régions promotrices de régulateurs métaboliques tels que le peroxisome proliferator activator receptor- α (PPAR- α), le récepteur des glucocorticoïdes (RG) et l'acyl-CoA oxydase, dans le foie des progénitures de première et seconde génération (F1 et F2) (39). Cette même restriction en protéine maternelle cause une hypométhylation du RG, de PPAR- α et de l'acyl-CoA oxydase, qui est reversée par une supplémentation en folate (40). Ces résultats sont également observés lorsque les progénitures reçoivent une diète restreinte en protéine c'est-à-dire une hypométhylation du RG induite par une diminution de l'expression génique de la DNMT1 et non de la DNMT3a et de la DNMT3b (41). Bien que l'hypométhylation du RG et de PPAR- α soit rétablie par la supplémentation en folate, l'hypométhylation des promoteurs d'autres gènes comme celui du récepteur de l'insuline tout comme l'augmentation du poids et des niveaux de triglycérides sont maintenues, reflétant la spécificité des changements épigénétiques durant le développement, mais aussi que cette supplémentation juvénile ne renverse pas le phénotype induit par la diète maternelle (42).

Une autre étude a démontré qu'une diète maternelle faible en protéine conduit à une hypométhylation du récepteur AT1b de l'angiotensine II chez les fœtus en développement, pouvant ainsi conduire à une surexpression de ce gène dans la glande adrénale et contribuer au développement d'hypertension durant la vie adulte (43). Van Straten *et al.* ont aussi montré que les progénitures de souris ayant reçu des restrictions en protéine présentent une hypométhylation du facteur de transcription LXR au niveau hépatique et moindre au niveau intestinal. Ce gène est impliqué dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras, ce qui confirme la capacité des processus épigénétiques transgénérationnels à moduler l'homéostasie

des lipides hépatiques (44). Ceci laisse supposer que la nutrition périnatale a la capacité d'influencer le métabolisme des lipides durant la vie adulte, par la méthylation de l'ADN, et donc contribuer au développement de maladies adultes.

Les précurseurs du SAM (donneur de méthyles) tels que le folate, la méthionine et la vitamine B12 (Figure 2) semblent avoir un impact majeur sur le statut de méthylation. En effet, chez le mouton, une restriction de la supplémentation en folate, vitamine B12 et méthionine, durant la période périconceptionnelle, est associée à des progénitures plus lourdes caractérisées par des altérations épigénétiques, de la résistance à l'insuline et de l'hypertension (45). Le fer semble également avoir un impact majeur puisqu'une étude a démontré que l'anémie, durant la grossesse, est associée avec un placenta de grande masse et un ratio poids placenta/poids naissance élevé (46), mais aussi avec l'hypertension (47).

D'autres exemples de modulations épigénétiques, en réponse à des facteurs environnementaux, incluent ceux en lien avec les fonctions pancréatiques. En effet, l'administration d'une diète faible en protéines (8 % vs 20 %) durant la grossesse affecte la structure et la fonction du pancréas des progénitures, induit une diminution de leur prolifération cellulaire, de la taille des îlots et de leur vascularisation, une altération de la sécrétion de l'insuline des cellules β en réponse au glucose et aux acides aminés ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des îlots (48). De plus, des rates mal nourries durant leur grossesse et présentant des progénitures avec des retards de croissance ont engendré des portées caractérisées par une diminution du nombre de cellules α et β , des perturbations des fonctions endocrines du pancréas et une diminution de l'expression de Pdx-1 (49). Par ailleurs, une restriction en méthionine, en vitamine B12 et en folate, durant la grossesse de mouton, a

conduit à des progénitures avec un surpoids et plus grasses, insulino-résistantes, avec une hypertension et une altération du statut de méthylation de 4 % des îlots CpG (45).

Des études réalisées chez des rats Wistar ont démontré que la supplémentation en folate d'une diète faible en protéine prévient l'augmentation de la tension artérielle pendant la vie adulte des progénitures (50) et que la suralimentation néonatale aboutit au développement du syndrome métabolique, c'est-à-dire à de l'obésité, à de l'hyperleptinémie, de l'hyperglycémie, de l'hyperinsulinémie ainsi qu'à une hyperméthylation du promoteur du gène de la neurohormone anorexigène, la proopiomélanocortine (POMC) (51). Hales CN *et al.* ont réalisé une étude de population avec 468 hommes nés en Angleterre entre 1920 et 1930, avec des poids de naissance connus, et ont prouvé qu'un retard de croissance à la naissance et/ou très tôt dans la vie, est fortement associé avec l'altération de la tolérance au glucose, le diabète de type 2, le dysfonctionnement des cellules β , une haute tension artérielle et donc à de l'hypertension (52).

Toutes ces études mettent en évidence le fait que les conditions environnementales ainsi que l'alimentation, très tôt dans la vie, peuvent induire des changements épigénétiques pouvant persister plus tardivement et aboutir à de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, la résistance à l'insuline, le diabète de type II, l'hypertension et le syndrome métabolique (Tableau 1). La nutrition apparaît donc comme un facteur déclencheur du syndrome métabolique. Le paragraphe suivant a pour objectif de vérifier si le syndrome métabolique est associé à certains changements épigénétiques, plus particulièrement à la méthylation de l'ADN.

Tableau 1 : Impact de l'environnement nutritionnel sur la méthylation de l'ADN et le syndrome métabolique

Nutriments	Modèles	Organes	Conclusion	Conclusion	Références
Restriction calorique	Progénitures de rongeurs (F2)	Foie	Hypométhylation de PPAR α , du RG et de l'acyl CoA oxydase Augmentation de l'expression génique de PPAR α , du RG et de l'acyl CoA oxydase. Diminution de la DNMT1	Altération méthylation des gènes chez progénitures F1 par une restriction protéique maternelle est transmise à la génération F2.	(39)
Restriction protéique maternelle	Progénitures de rats	Foie	Hypométhylation de PPAR α , du RG et de l'acyl CoA oxydase. La supplémentation en acide folique prévient ces changements	Une nutrition prénatale déséquilibrée induit des changements épigénétiques de gènes spécifiques ce qui correspond à un mécanisme de reprogrammation fœtale.	(40)
Restriction protéique des progénitures	Progénitures de rats	Foie	Hypométhylation du RG. Diminution de la DNMT1 mais pas de la DNMT3a et de la DNMT3b	Altération épigénétique de gène du RG, chez les progénitures, est due à une baisse de l'expression de la DNMT1.	(41)
Restriction protéique maternelle	Supplémentation en folate des progénitures de rats	Foie Plasma Tissu adipeux	Gain de poids, augmentation des triglycérides hépatiques et plasmatiques Restauration méthylation de PPAR α , du RG dans le foie. Hypométhylation du récepteur à l'insuline dans le foie et le tissu adipeux	La supplémentation en folate durant la période juvénile et la puberté ne reverse pas le phénotype induit par la diète maternelle.	(42)
Diète maternelle faible en protéine	Rats Wistars	Glande adrénales	Hypométhylation du promoteur d' AT(1b) Expression in vitro du gène d' AT(1b) est dépendante de la méthylation de son promoteur	Offenses prénatales induisent des changements épigénétiques résultant à des modifications de l'expression de gènes et donc à l'hypertension, pendant la vie adulte.	(43)
Diète maternelle faible en protéine	Progénitures de souris	Foie Intestin	Hypométhylation de LXR dans le foie. Même effet dans l'intestin, mais moins prononcé	La nutrition prénatale peut influencer le métabolisme lipidique adulte par la méthylation de l'ADN et donc contribuer au développement de maladies adultes.	(44)
Restriction en folate, méthionine et vitamine B12	Mouton, période périconceptionnelle	Foie	Progénitures adultes plus lourdes et plus grasses, altérations épigénétiques, résistances à l'insuline et hypertension	Réduction des donneurs de méthyles, durant la période périconceptionnelle, peut mener à des altérations épigénétiques et modifier le phénotype des progénitures, en lien avec les maladies adultes.	(45)
Restriction en fer, anémie	8684 femmes enceintes	Placenta	Placenta de haut poids et ratio poids placenta/poids naissance élevé	La déficience en fer maternelle cause des discordances entre la croissance placentaire et fœtale.	(46)
Diète maternelle faible en protéine	Progénitures	Pancréas	Altération structure et fonction pancréas Diminution prolifération cellulaire Diminution taille des îlots et de leur vascularisation Altération sécrétion insuline Apoptose des îlots	Une diète non équilibrée résulte à l'altération du développement du pancréas.	(48)
Mauvaise diète maternelle de rates	Progénitures de rates	Pancréas	Diminution des cellules β et α Perturbations des fonctions endocrines du pancréas. Baisse de l'expression de Pdx-1	Malnutrition très tôt dans la vie induit une baisse des cellules β et de Pdx-1.	(49)
Supplémentation en folate d'une diète faible en protéine	Rats Wistars	Artères	Prévention de l'hypertension pendant la vie adulte des progénitures	Le statut en folate, durant la grossesse, peut influencer le développement fœtal et donc le risque de MCVs chez la prochaine génération.	(50)
Suralimentation néonatale	Rats Wistars	Tissu hypothalamique	Développement du syndrome métabolique, d'hyperléptinémie, d'hyperglycémie, d'hyperinsulinémie et d'hyperméthylation de POMC	La suralimentation apparaît comme un facteur de risque épigénétique dans la programmation de l'obésité et consécutivement aux MCVs.	(51)
Retard de croissance	468 hommes nés entre 1920 et 1930	Plasma	Altération de la tolérance au glucose. Développement du diabète, dysfonctionnement des cellules β et d'hypertension	Un retard de croissance très tôt dans la vie est associé à l'intolérance au glucose, à l'hypertension.	(52)

3. LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET LE SYNDROME MÉTABOLIQUE

3.1. Le syndrome métabolique

En 1988, le Dr Gerald Reaven a utilisé l'expression « syndrome X » pour décrire le regroupement de plusieurs facteurs de risque (dyslipidémie, hypertension et hyperglycémie) et son lien avec la résistance à l'insuline. Actuellement, plusieurs organisations ont défini des critères cliniques pour le diagnostic du syndrome métabolique comme l'obésité, l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie, un HDL cholestérol bas et l'hypertension (Tableau 2). Chaque année, 372 millions de personnes décèdent de complications associées au diabète. Chez la plupart des personnes ayant une intolérance au glucose ou un diabète de type II, un ensemble de facteurs de risque est retrouvé et forme le syndrome métabolique conférant un risque cardiovasculaire. L'obésité et la résistance à l'insuline sont considérées comme les facteurs les plus importants dans l'apparition du syndrome métabolique, mais la génétique, l'inactivité physique, le vieillissement, des changements hormonaux, le stress oxydant et un état pro-inflammatoire peuvent aussi y contribuer. Récemment, la méthylation de l'ADN s'est vue impliquée dans l'étiologie du syndrome métabolique.

Tableau 2 : Critères pour le diagnostic du syndrome métabolique par les différents organismes

OMS Organisation Mondiale de la Santé	ATP III Adult Treatment Panel III	IDF International Diabetes Federation
<p>Résistance à l'insuline identifiée par un des critères suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diabète de type II • Glycémie à jeun anormale • Tolérance au glucose anormale • ou pour ceux avec des niveaux normaux de glucose à jeun (110 mg/dL ou 5.6 mmol/L), une absorption du glucose en dessous du quartile le plus bas pour la population de fond dans des conditions hyperinsulinémiques et euglycémiques <p>Plus deux des facteurs suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Médication antihypertensive et/ou haute pression sanguine (≥ 140 mm Hg systolique ou ≥ 90 mm Hg diastolique) • Triglycérides plasmatiques ≥ 1.7 mmol/L • HDL cholestérol < 0.9 mmol/L pour les hommes ou < 1.0 mmol/L pour les femmes • IMC > 30 kg/m² et/ou un ratio taille : hanche > 0.9 pour les hommes ou > 0.85 pour les femmes • Taux d'excrétion urinaire d'albumine ≥ 20 μg/min ou un ratio albumine : créatine ≥ 30 mg/g 	<p>Combinaison de 3 des 5 facteurs suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obésité abdominale donnée par le tour de taille (homme > 102 cm, femme > 88 cm) • Triglycérides ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) • HDL cholestérol (homme < 40 mg/dL, femme < 50 mg/dL) • Pression sanguine $\geq 130/\geq 85$ mm Hg • Glucose à jeun ≥ 110 mg/dL (5.6 mmol/L) 	<p>Obésité centrale définie selon le tour de taille et les valeurs ethniques spécifiques plus deux des quatre facteurs suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Triglycérides élevés : ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) ou un traitement spécifique pour des anomalies lipidiques • Réduction du HDL cholestérol : homme < 40 mg/dL ou 1.03 mmol/L, femme < 50 mg/dL ou 1.29 mmol/L ou un traitement spécifique pour des anomalies lipidiques • Pression artérielle élevée : systolique ≥ 130, diastolique ≥ 85 mm Hg ou un traitement pour une hypertension diagnostiquée • Glucose plasmatique à jeun élevé : ≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L) ou un diabète de type 2 diagnostiqué. Si la valeur est en dessous de 100 mg/dL (5.6 mmol/L), un test oral de tolérance au glucose est fortement recommandé, mais est nécessaire pour la définition du syndrome.

3.2. La méthylation de l'ADN et le syndrome métabolique

Au cours des dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à la génétique du syndrome métabolique puisque le gène du récepteur de la leptine, une hormone anorexigène, a été trouvé muté chez des obèses (53). D'autres gènes candidats tels que le gène du récepteur melanocortine 4 (MCR4) et du pro-opiomelanocortine (POMC) sont mutés dans les conditions d'obésité morbide (54;55). Les récepteurs β_2 adrénergiques, impliqués dans la lipolyse, apparaissent également mutés (56). Le gène HSL (Hormone Sensitive Lipase) a un polymorphisme associé au diabète de type II qui caractérise le syndrome métabolique (57). Finalement, d'autres gènes associés au syndrome métabolique présentent des mutations telles que celles du gène UCP 1 (Uncoupling Protein 1) (58), du gène PC-1 (59), du PPAR- γ (60) et de l'IRS-1 (Insulin Receptor Substrat) (61). Par la suite, les études se sont intéressées à l'épigénétique du syndrome métabolique, c'est-à-dire son lien avec la méthylation de l'ADN.

Park JH *et al.* ont réalisé une étude sur le retard de croissance intra-utérin et ont démontré que les dysfonctionnements des îlots de Langerhans ainsi que le développement du diabète sont associés à l'extinction de l'expression de Pdx-1 via la méthylation de son promoteur au niveau des cellules bêta de rongeurs avec un retard de croissance intra-utérin, gène impliqué dans la différenciation des cellules β et dans l'expression du gène de l'insuline (62). Ling C *et al.* ont réalisé une étude avec des animaux ayant un diabète de type II et ont illustré une hyperméthylation du promoteur du gène du PGC-1 α dans les îlots pancréatiques de patients diabétiques (PPAR gamma coactivator 1 alpha) ayant pour conséquence une diminution de PGC-1 α ainsi qu'une inhibition de la production d'insuline (63). Finalement, le gène HNF4A, un gène candidat du diabète, présente une méthylation aberrante dans les cellules de sang de cordon de bébé ayant un retard de croissance intra-utérin (64). Ceci démontre l'implication de

la méthylation de l'ADN dans la programmation fœtale de maladies adultes. Il aurait été intéressant de vérifier si cette dérégulation de méthylation de l'ADN est présente à long terme et pourrait avoir un impact à l'âge adulte, notamment dans l'apparition de pathologies, ce qui aiderait à adopter la méthylation de l'ADN comme un biomarqueur efficace.

L'obésité a également fait l'objet d'une attention particulière dans les études épigénétiques. En effet, des études cellulaires montrent des variations de méthylation pour des gènes intervenant dans le métabolisme énergétique tels que le PPAR α hépatique, la phosphoénolpyruvate carboxykinase hépatique et UCP1 des adipocytes blancs (39;65). Une étude réalisée avec des rats Wistar ayant reçu une diète riche en énergie, a affirmé que le promoteur du gène de la leptine est beaucoup plus méthylé au niveau des adipocytes rétropéritonéales ce qui coïncide avec un taux plus faible de leptine, comparé aux rats témoins (66). Une suralimentation néonatale, chez ce type de rat, conduit à un gain de poids rapide résultant à un phénotype syndrome métabolique (obésité, hyperleptinémie, hyperglycémie et hyperinsulinémie), à une hyperméthylation du promoteur du gène de la neurohormone anorexigène, la proopiomélanocortine (POMC) ainsi qu'à une hypométhylation du promoteur du gène du neuropeptide Y au niveau du tissu hypothalamique (51). La suralimentation apparaît donc comme un facteur de risque épigénétique dans la programmation de l'obésité, du diabète et donc du syndrome métabolique. L'administration d'une diète riche en gras et en sucrose à des animaux n'induit pas de changement dans l'expression des gènes de la glucokinase hépatique et de la NADPH oxydase hépatique et adipocytaire, mais à une augmentation de l'expression de l'hydroxyacyl-coenzyme A déhydrogénase hépatique (HADHB). Toutefois, aucun changement du statut de méthylation des gènes HADHB et glucokinase n'est observé malgré un apport lipidique augmenté (67). Ceci est surprenant puisque ces deux gènes sont impliqués

respectivement dans la β oxydation et la glycolyse. Finalement, Campion *J et al.*, en 2009, ont démontré que des hommes ayant eu du succès dans leur régime restreint en énergie, ont une faible méthylation du promoteur du gène TNF- α dans les cellules sanguines mononucléaires. Ceci illustre que la méthylation du promoteur du TNF- α est un bon marqueur d'inflammation indiquant une perte de poids induite par une diète hypocalorique et constitue une première étape vers une nutrition personnalisée basée sur des critères épigénétiques (68).

L'hypertension, une autre pathologie du syndrome métabolique, démontre des variations au niveau de la méthylation de l'ADN. En effet, des études avec des rats hypertendus ont démontré une hypométhylation du promoteur des gènes (pro) rénine (69) et adrénergique $\beta 1$ au niveau du myocarde (70) ainsi qu'une augmentation, au niveau de l'artère mésentérique, de l'expression de NKCC1 (Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporteur 1) régulée épigénétiquement lors du développement postnatal de l'hypertension (71). D'autres gènes ont des variations de leur taux de méthylation tel que SERPINA3 (serine protease inhibitor) qui est hypométhylé dans les placentas de grossesse prééclampsique et avec une restriction de croissance (72), le promoteur proximal du gène AT (1 b) de la glande adrénales qui est hypométhylé (43) et ACE-1 (enzyme 1 qui convertit l'angiotensine), un régulateur clé de l'hypertension chez l'adulte qui est également hypométhylé dans le cerveau de souris lors d'une restriction maternelle en protéine (73).

La méthylation de l'ADN est par conséquent impliquée dans les composantes du syndrome métabolique de par la régulation épigénétique de nombreux gènes candidats (Tableau 3). Dans le diabète, de nombreux gènes apparaissent hyperméthylés tels que Pdx-1 (impliqué dans le développement pancréatique et la maturation des cellules β), PGC-1 α (impliqué dans le métabolisme énergétique), UNC13B (impliqué dans le métabolisme glucidique) et HNF4A

(impliqué dans le développement du foie, des reins et de l'intestin). L'obésité semble être associée avec l'hyperméthylation de gènes impliqués dans la régulation de l'appétit tels que la leptine et POMC mais aussi avec l'hypométhylation du gène du neuropeptide Y.

L'hypertension, quant à elle, est associée à des variations du statut de méthylation de gènes connus pour être impliqués dans cette pathologie comme la pro-rénine, l'adrénergique β , NKCC1, SERPINA3, AT(1b) et ACE-1. Toutes ces variations de méthylation aboutissent à l'inactivation ou à la surexpression des gènes impliqués dans les composantes du syndrome métabolique. Par conséquent, le syndrome métabolique apparaît comme une pathologie programmable associée à des modifications épigénétiques de gènes vitaux. Toutes ces études ont identifié les niveaux de méthylation lors de la pathologie. Il aurait été intéressant de vérifier les niveaux de méthylation de ces gènes avant le développement des composantes du syndrome métabolique et de proposer la méthylation de l'ADN comme biomarqueur. On pourrait donc se demander si ces changements épigénétiques sont la conséquence du développement du syndrome métabolique ou s'ils précèdent celui-ci. Parmi les gènes cités ci-dessus, certains semblent avoir un lien avec le stress oxydant comme PGC-1 α (74). Ce phénomène pourrait donc avoir une influence sur le syndrome métabolique. Dans le futur, d'autres études seront nécessaires afin d'accroître la liste des gènes impliqués dans ce syndrome.

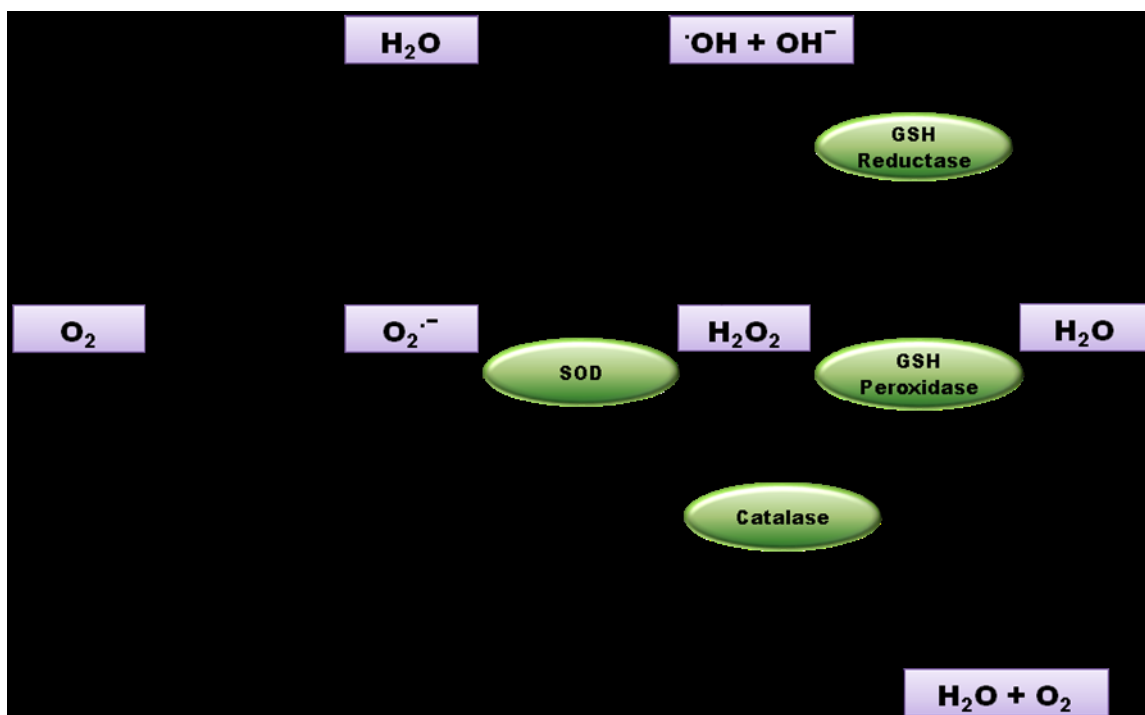
Tableau 3 : Syndrome métabolique et méthylation de l'ADN

Pathologies	Modèles	Conclusion	Références
Diabète de type II	Rongeurs	Hyperméthylation de Pdx-1	(62)
Diabète de type II	48 non diabétiques 12 diabétiques type II	Hyperméthylation de PPARGC-1 α , diminution de PGC-1 α , inhibition de la production d'insuline	(63)
Diabète de type II	Muscles squelettiques de patients diabétiques type II	Hyperméthylation de PPARGC-1 α	(75)
Diabète de type II	Sang de Cordon ,retard de croissance intra-utérin	Méthylation aberrante de HNF4A	(64)
Obésité	Adipocytes	Variations de méthylation de PPAR α , de la phosphoénolpyruvate kinase et d'Ucp1	(39;65)
Obésité	Rats Wistars, diète riche en gras et en énergie	Hyperméthylation de la leptine	(66)
Obésité	Rats Wistars, diète riche en gras et en énergie	Hyperméthylation de la POMC, hypométhylation du neuropeptide Y	(51)
Obésité	Rats Wistars, Diète riche en gras et en énergie	Pas de changement du niveau de méthylation de HADHB et de la glucokinase	(67)
Obésité	Hommes, restriction en énergie	Hypométhylation de TNF- α , marqueur de perte de poids	(68)
Hypertension	Rats hypertendus	Hypométhylation de la pro rénine, du gène adrénergique β 1 et une hyperméthylation de NKCC1	(69),(70), (71)
Hypertension	Placenta grossesse avec prééclampsie	Hypométhylation de SERPINA3, AT1b, ACE-1	(72),(43), (73)

4. LE STRESS OXYDANT ET LE SYNDROME MÉTABOLIQUE

Un stress métabolique a lieu lorsque l'homéostasie est rompue. Le stress oxydant prend place dans des circonstances où la concentration des molécules oxydantes est anormalement élevée. La génération intracellulaire des oxydants se déroule dans la mitochondrie au moment de la réduction de l'oxygène en eau, durant le processus de formation de l'ATP. Dans la mitochondrie, environ 1% de l'oxygène est partiellement réduit en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (76). Ce radical dérivé de l'oxygène est spontanément dismuté en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), mais, *in vivo*, cette réaction est catalysée par les superoxydes dismutases (SODs). La concentration cytosolique du H_2O_2 dépend de sa production par la SOD mitochondriale (MnSOD ou SOD2) (77) et de sa réduction par la glutathion peroxydase (GPx) (Figure 3). À l'exception des érythrocytes, la catalase, disposant d'une haute activité (78), est localisée dans les peroxysomes et dans la mitochondrie (79). Son affinité pour le H_2O_2 est plus faible que celle de la GPx, de l'ordre de 10^5 - 10^6 (80;81).

La rupture de l'équilibre normal entre les oxydants et les antioxydants des tissus peut causer des effets toxiques via la production de peroxydes et de radicaux libres qui détériorent certains composants cellulaires incluant les protéines, les lipides et l'ADN. Ceci entraîne une perte de fonction et d'intégrité cellulaire. Il en résulte plusieurs aberrations fonctionnelles telles que des mutations géniques ainsi qu'une altération des membranes et des organites qui peuvent être à l'origine du processus de vieillissement et des maladies chroniques (cancer, diabète, fibrose kystique, maladies cardiovasculaires). Néanmoins, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont des joueurs clés dans plusieurs voies métaboliques pour lesquelles une perturbation mènera au syndrome métabolique.



Yara S. *et al*, 2014

Figure 3 : Activités enzymatiques des superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) et catalase (CAT). Les enzymes SOD, GPX, GR et CAT offrent une protection en piégeant directement l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en les convertissant en espèces moins réactives. SOD catalyse la dismutation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , neutralisé par GPX qui utilise de l'hydrogène provenant de deux molécules de glutathion (GSH) pour former deux molécules d' H_2O . La GR régénère alors le GSH à partir du glutathion disulfide (GSSG). La CAT (une partie importante de la défense enzymatique) neutralise H_2O_2 en le convertissant en H_2O . Bien que H_2O_2 ne soit pas un radical, il peut être rapidement converti en radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) via la réaction de Fenton.

Les paragraphes suivants seront destinés à vérifier la relation entre les composantes du syndrome métabolique et ces molécules dont la génération et les concentrations dépendent de l'activité de la MnSOD et de la GPx, deux enzymes tributaires du niveau de la transcription de leurs gènes, qui sont eux-mêmes régulés par la méthylation de leur région promotrice. Néanmoins, au préalable, une description du stress oxydant est nécessaire.

4.1. Le stress oxydant

4.1.1. Les prooxydants cellulaires

Un oxydant est une molécule ayant la capacité d'accepter un ou plusieurs électrons devenant ainsi une molécule réduite. L'oxygène est une molécule ayant un caractère oxydant en raison de sa réactivité avec les électrons. La réactivité de l'oxygène avec des électrons aboutit à la formation d'oxydants radicalaires et non radicalaires. Ces deux classes de molécules sont regroupées sous le nom « espèces réactives de l'oxygène » (ROS) lorsqu'elles proviennent de l'oxygène et « espèces réactives du nitrogène » (RNS) lorsqu'elles proviennent du monoxyde d'azote. Les ROS et RNS sont essentielles pour de nombreux processus physiologiques tels que les activités enzymatiques, la défense immunitaire, la vasodilatation, l'expression génique et l'apoptose des cellules.

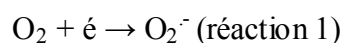
4.1.1.1. Les oxydants radicalaires

Un radical libre est une molécule, un atome ou une espèce chimique ayant un ou plusieurs électrons non appariés. Cet électron célibataire confère une grande instabilité transitoire à ces molécules pouvant être comblée par l'acceptation d'un électron ou par le transfert de l'électron non apparié à une autre molécule.

4.1.1.1.1. *L'anion superoxyde*

L'anion superoxyde est la conséquence des processus métaboliques. Le radical superoxyde (O_2^-) est formé par réduction de l'oxygène lorsque ce dernier accepte ou capture un électron provenant d'une autre molécule (réaction 1). Ce processus est catalysé par la NADPH oxydase (NOX) et la xanthine oxydase. La NOX est une enzyme impliquée dans de nombreuses voies métaboliques et sa dérégulation peut amener au développement de pathologies. Elle joue un rôle crucial dans les cellules endothéliales où son activité est augmentée par l'angiotensine II (82) pour la formation d'anion superoxyde afin de maîtriser l'oxyde nitrique circulant, ce qui induit la contraction vasculaire (83). Dans les neutrophiles, l'activité de la NOX est très élevée et rapide afin de produire une rafale d'espèces radicalaires au niveau des réactions indésirables (84). NOX est aussi impliquée dans la stimulation du récepteur de l'insuline (85).

L' O_2^- peut interagir avec d'autres molécules pour former des ROS secondaires, directement ou via des enzymes et des métaux catalysant ce processus.

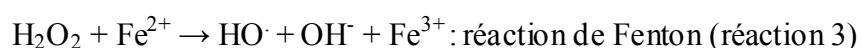
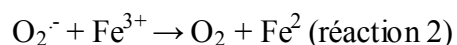


L'anion superoxyde est principalement produit dans la mitochondrie lors du fonctionnement de la chaîne de transport des électrons (86), mais aussi dans les macrophages lors de la destruction bactérienne (phagocytose) (87), dans les lymphocytes (88), les cellules endothéliales (89) et les fibroblastes (90). Le pouvoir oxydant de l' O_2^- est faible, mais son pouvoir réducteur en présence des métaux tels que le fer, le cuivre et le zinc, présents dans les sites actifs enzymatiques, aboutit à la formation d'espèces encore plus réactives comme le radical hydroxyle, un radical très puissant.

L'anion superoxyde est réduit en O_2 par l'ajout d'un électron provenant de molécules riches en électrons telles que les acides gras polyinsaturés qui deviennent des hydroperoxydes.

4.1.1.1.2. *Le radical hydroxyle*

Le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) est la forme neutre de l'ion hydroxyle et est très dangereux. Il possède une très haute réactivité ainsi qu'une demi-vie très courte, 10^{-9} seconde, ce qui lui permet de réagir très près de ses sites de formation (91). Le radical hydroxyle est produit à partir du peroxyde d'hydrogène, en présence de fer ferreux (réaction 3).

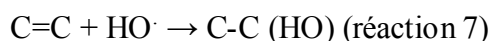
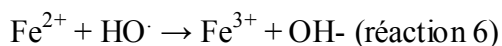
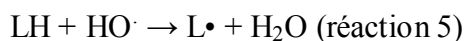


En 1934, Haber et Weiss ont proposé le fait que radical hydroxyle pouvait être produit à la suite de l'interaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (réaction 4) (92).

D'un point de vue thermodynamique, la réaction d'Haber et Weiss nécessite des catalyseurs, car elle n'est pas très favorable en milieu aqueux. La présence d'un métal de transition comme catalyseur est associée à la production nette du radical hydroxyle via deux réactions distinctes ou réaction de Fenton (réaction 2 et 3). La réaction d'Haber Weiss catalysée par le fer est de nos jours considérée comme le mécanisme principal de production du radical hydroxyle (92).

Le fer est régulé *in vivo* par plusieurs systèmes, il n'est donc pas libre au niveau intracellulaire (93). Toutefois, en situation de stress, l'anion superoxyde a la capacité de libérer le fer des molécules et c'est de cette manière qu'il participe à la production du radical hydroxyle. En effet, en situation de stress, l'anion superoxyde agit comme un oxydant des sites [4Fe-4S] des protéines, rendant ainsi le fer ferreux disponible et facilite la production de $\text{HO}\cdot$ à partir du peroxyde d'hydrogène (94). Ce radical est produit dans les cellules sujettes aux irradiations ionisantes ayant la capacité de cliver l'eau et donc de générer le $\text{HO}\cdot$, en plus du radical hydrogène ($\text{H}\cdot$). Le $\text{HO}\cdot$ peut engendrer des chaînes de réactions radicalaires capables

d'atteindre les molécules environnantes. En effet, le radical hydroxyle a l'aptitude d'oxyder des molécules via l'arrachement d'un atome d'hydrogène ou d'un électron, ou par son addition au niveau d'une double liaison.



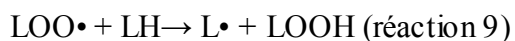
Ce radical peut soustraire un atome d'hydrogène au niveau d'une double liaison d'un acide gras (LH) (réaction 5) et c'est pour cela qu'il est pensé être impliqué dans la peroxydation lipidique. Ce radical oxyde également les protéines, l'ADN et les glucides pour aboutir à la formation de radicaux libres dits « secondaires ».

4.1.1.1.3. *Le radical peroxyde*

Le radical peroxyde est formé durant la peroxydation lipidique. En effet, l'abstraction d'un hydrogène, au niveau du squelette hydrocarboné d'un acide gras, par le radical hydroxyle, conduit à la formation du radical L•. Lorsque celui-ci réagit avec une molécule d'oxygène, le radical peroxyde est formé (LOO•) (réaction 8).



Le radical peroxyde est très réactif et a la capacité d'oxyder les protéines membranaires ainsi que les acides gras pour à nouveau générer le radical L• et un hydroxyde lipidique (LOOH) (réaction 9). Le nouveau radical L• continuera la formation du radical peroxyde créant ainsi des cascades de réaction.



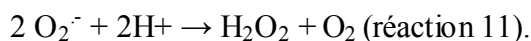
Le radical peroxyde peut arracher des atomes d'hydrogène au niveau des acides gras à chaînes longues ce qui formera des peroxydes cycliques (95) mais également soustraire des atomes d'hydrogène au niveau de l' α tocophérol pour donner le radical tocophéryl ($\text{TO}\cdot$) ainsi qu'un LOOH (réaction 10).



4.1.1.2. Les oxydants non radicalaires

4.1.1.2.1. *Le peroxyde d'hydrogène*

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est formé par dismutation de l'anion superoxyde (réaction 11).



Même si le H_2O_2 est considéré comme un oxydant faible, celui-ci a la capacité d'oxyder les groupements thiols (SH) des protéines et donc d'altérer leur activité, faisant de lui un intermédiaire important intervenant dans la signalisation cellulaire. Par ailleurs, le H_2O_2 peut devenir toxique, dans le sens où il participe à la formation du $\text{HO}\cdot$ via les réactions de Fenton et d'Haber Weiss, citées ci-dessus. Effectivement, sa décomposition catalysée par le fer ferreux non libre au niveau intracellulaire, mais libéré par l'anion superoxyde en situation de stress, est considérée comme le dommage oxydant le plus courant dans les cellules (96).

Le H_2O_2 est détoxifié par la GPx qui transfère deux électrons provenant du glutathion (GSH) au H_2O_2 afin de le réduire en eau. La forme oxydée du glutathion est alors générée (GSSG). Une modification des concentrations intracellulaires de GSH et de GSSG est à l'origine de la perturbation du redox (97;98).

4.1.2. Les principales sources de ROS

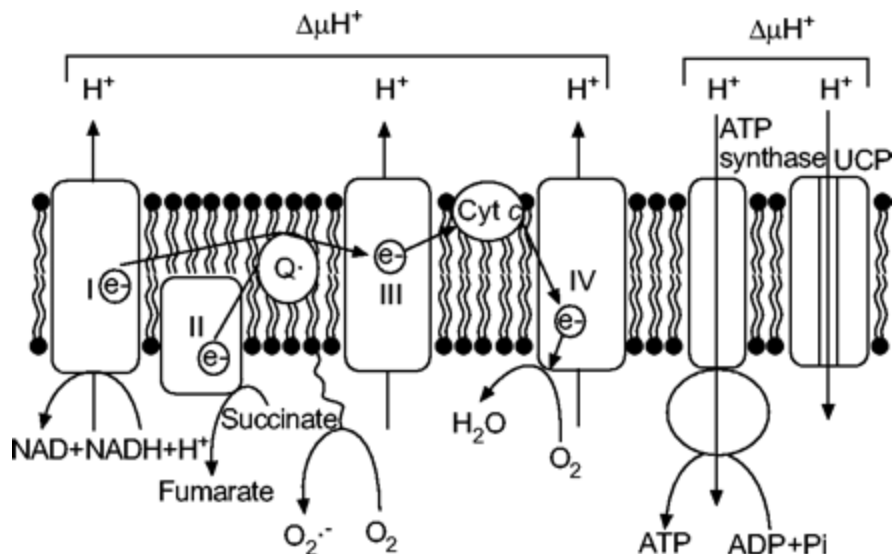
La production des ROS est quasi continue dans la cellule via plusieurs processus impliquant la chaîne respiratoire mitochondriale, les cellules phagocytaires et les oxydases.

4.1.2.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

La respiration mitochondriale des cellules aérobies représente une ressource énergétique cellulaire majeure puisque 95 % de l'oxygène respiré sera réduit pour produire de l'eau et de l'ATP. Néanmoins, une formation d' $O_2^{\cdot-}$ se produit de façon continue lors du fonctionnement normal de la chaîne respiratoire mitochondriale suite à la réaction de l'oxygène avec un radical semi-ubiquinone (99;100).

L'oxydation des coenzymes réduit NADH et $FADH_2$, et le transport des électrons par les différents complexes de la chaîne respiratoire, permet la production d'un gradient électrochimique de H^+ . L'énergie de ce gradient électrochimique est utilisée par l'ATP synthase qui forme de l'ATP via la phosphorylation de l'ADP. Pourtant, des électrons peuvent prématurément réagir avec l' O_2 et former de l' $O_2^{\cdot-}$, particulièrement au niveau des complexes I et III, au lieu de réduire l' O_2 en H_2O (Figure 4) (101). La formation de l' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial dépend de l'état de cet organite, des antioxydants mitochondriaux, mais aussi des anti-apoptiques mitochondriaux. Parmi eux, la famille de protéines Bcl-2 qui exerce un rôle pro ou anti-apoptotique en contrôlant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (102). Les protéines telles que Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 sont caractérisées comme des inhibiteurs de l'apoptose (103) tandis que Bax, Bcl-xs et Bad sont définis comme des activateurs de l'apoptose (104). Bcl-2 prévient la libération du cytochrome C qui lorsque libéré de la

mitochondrie vers le cytosol active la caspase-9, qui elle, active la caspase 3 responsable du programme apoptotique (105).

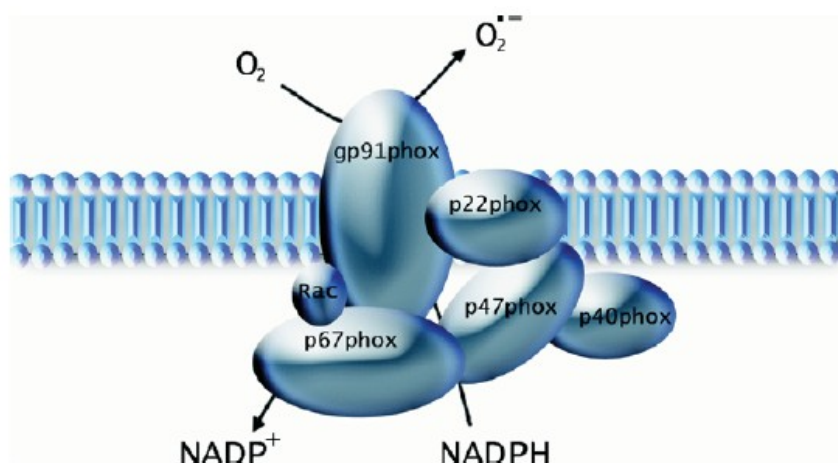


Couillard *et al.*, 2005 26 (4) : 703-719

Figure 4 : La chaîne respiratoire mitochondriale. La production d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriales (ROS) est dépendante du potentiel membranaire. Un potentiel élevé de la membrane mitochondriale conduit à une inhibition du transport des électrons par la chaîne respiratoire ce qui entraîne une augmentation de la demi-vie des intermédiaires tel que le radical semi-quinone ($Q\cdot$) capable de réduire l' O_2 en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La protéine de découplage UCP peut diminuer le potentiel de membrane, en particulier lorsque l'adénosine diphosphate (ADP est peu disponible, réduisant ainsi la production de ROS mitochondriale. $\Delta\mu H^+$: gradient électrochimique ; ATP : adénosine triphosphate ; Cyt c : cytochrome c ; NAD^+ : nicotinamide - adénine-dinucléotide oxydé ; $NADH$: réduit nicotinamide adénine dinucléotide.

4.1.2.2. Les cellules phagocytaires

Les neutrophiles, les polynucléaires et les macrophages disposent d'une enzyme membranaire spécialisée dans la production d' $O_2^{\cdot-}$ à partir d'électrons dérivés du NADPH qui réduisent l'oxygène moléculaire, la NADPH oxydase (NOX) (106). On compte 7 NOXs dont la plus connue est la NOX2. NOX2 est constituée de 2 sous-unités membranaires p22^{phox} et gp91^{phox} ainsi que de 2 sous-unités cytosoliques p67^{phox} et p47^{phox} (Figure 5). NOX2 est activée avec la phosphorylation de p47^{phox} entraînant son association avec le cytochrome *b558*, lorsque la cellule phagocytaire est stimulée. Il en résulte une production d' $O_2^{\cdot-}$ responsable de la synthèse d' H_2O_2 et d'hypochlorite qui sont indispensables à la destruction du matériel phagocyté (106).



Ray et al, (2005) 109, (217–226)

Figure 5 : NOX2 et ses sous-unités.

La NADPH oxydase est constituée d'un hétérodimère comprenant gp91^{phox}/p22^{phox} lié à la membrane et d'autres sous-unités (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} et Rac). Le domaine de liaison de NADPH est sur un côté de la membrane, tandis que la génération $O_2^{\cdot-}$ se produit de l'autre côté.

4.1.2.3. La xanthine oxydase

La xanthine oxydoréductase est une enzyme qui existe sous 2 formes, la xanthine déshydrogénase et la xanthine oxydase (107). C'est lorsque la pression en O₂ change que la xanthine déshydrogénase est modifiée en xanthine oxydase. La xanthine déshydrogénase utilise le NAD⁺ pour capter les électrons de l'hypoxanthine et de la xanthine pour former du NADH et de l'acide urique. La xanthine oxydase, quant à elle, utilise l'oxygène comme accepteur des électrons provenant de l'hypoxanthine et de la xanthine pour former l'O₂⁻ (108).

4.1.3. ROS et macromolécules

Une concentration élevée en ROS peut causer des dommages aux structures cellulaires, aux acides nucléiques, aux lipides ainsi qu'aux protéines (109). Le radical HO[•] est connu pour réagir avec l'ADN, plus précisément au niveau des bases puriques et pyrimidiques. Généralement, les ROS induites par les métaux attaquent l'ADN ainsi que d'autres composants cellulaires tels que les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides connus pour être très sensibles au stress oxydant (110). Par ailleurs ROO[•] peut se réarranger en endoperoxyde, un précurseur de plusieurs aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (111). Ces composés sont des aldéhydes réactifs qui induisent un stress au niveau des cellules et forment des adduits de protéines appelés ALE (advanced lipoxidation end products). Le MDA peut réagir avec la désoxyadénosine et la désoxyguanosine de l'ADN ce qui aboutit à des adduits d'ADN mutagènes. Le HNE peut être produit par les cellules, les tissus des organismes vivants et par la nourriture durant la

fabrication ou le stockage. Le MDA est démontré pour être mutagène chez les bactéries ainsi que chez les cellules mammifères et carcinogènes pour le rat tandis que le HNE est moins mutagène.

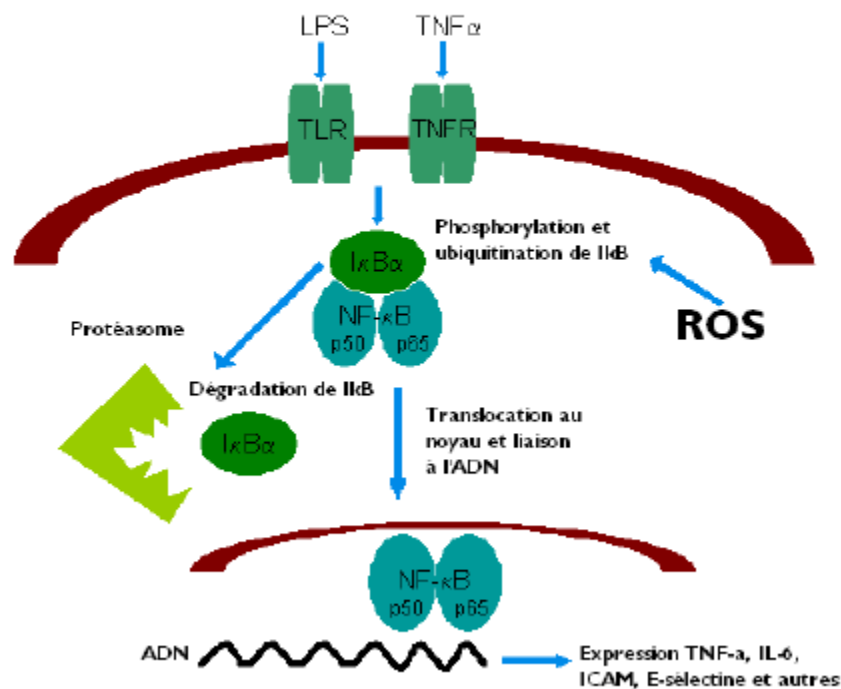
Les acides aminés des protéines, particulièrement la cystéine et la méthionine, sont extrêmement sensibles à l'oxydation induite par les ROS (112). Les AGEs résultent de l'interaction des glucides avec les acides aminés des protéines. Les intermédiaires de cette réaction sont les produits Amadori, les bases de Schiff et les produits de Maillards. Les AGEs sont très instables, très réactifs, produisent des ROS (113) et sont connus pour jouer un rôle dans les complications vasculaires du diabète (114).

4.1.4. Le stress oxydant et l'inflammation

L'inflammation est un processus de régulation homéostatique qui exerce des effets bénéfiques, mais aussi des effets néfastes en contribuant à la pathogenèse des maladies. L'inflammation est finement régulée et permet une réponse tissulaire complexe afin de faciliter les processus de guérison (115-117). Les molécules impliquées dans les réponses inflammatoires incluent les prostaglandines, la protéine réactive C (PRC) et les cytokines telles que le TNF- α et l'IL-6. Les cytokines sont essentielles pour le système immunitaire notamment dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes (116;118). Les ROS peuvent activer la production de facteurs chémotactiques comme MCP-1, via l'activation du NF- κ B, et ainsi augmenter l'infiltration des macrophages (119;120). Elles activent également l'expression de molécules d'adhésion comme la E-sélectine, ICAM et VCAM, via l'activation du NF- κ B, et faciliter l'adhérence des cellules phagocytaires (121;122). Néanmoins, dans des conditions

pathophysiologiques, une dérégulation de certains processus peut conduire à une inflammation chronique où les médiateurs inflammatoires peuvent devenir dommageables (115-118).

Le stress oxydant et l'inflammation sont des phénomènes étroitement liés. En effet, l'inflammation entraîne forcément un stress oxydant qui lui induit généralement de l'inflammation puisque les oxydants peuvent agir sur la signalisation cellulaire et ainsi déclencher une réaction inflammatoire. En effet, le facteur de transcription NF- κ B est activé par les oxydants tel que le H₂O₂ (123;124) et peut induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire comme l'IL-6 et le TNF- α (125) (Figure 6).



Précourt *et al*, 2011

Figure 6 : Activation du facteur de transcription NF-κB. Le facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB est activé par des facteurs tels que le lipopolysaccharides (LPS) ou le TNF-α lorsqu'ils se lient à leurs récepteurs respectifs. Ceci entraîne le déclenchement d'une cascade de signalisation menant à la dégradation du IκB, la protéine inhibitrice du NF-κB. Les radicaux libres (ROS) peuvent eux aussi mener à la dégradation du IκB et ainsi activer le NF-κB. Une fois libéré du IκB, le NF-κB est transloqué au noyau où il se lie à l'ADN pour induire l'expression de différents gènes impliqués dans la réponse inflammatoire qui peuvent aussi à leur tour activer le NF-κB.

4.1.5. Les antioxydants cellulaires

4.1.5.1. Les antioxydants non enzymatiques

Différents composés de faibles poids moléculaires participent à la défense antioxydante de l'organisme.

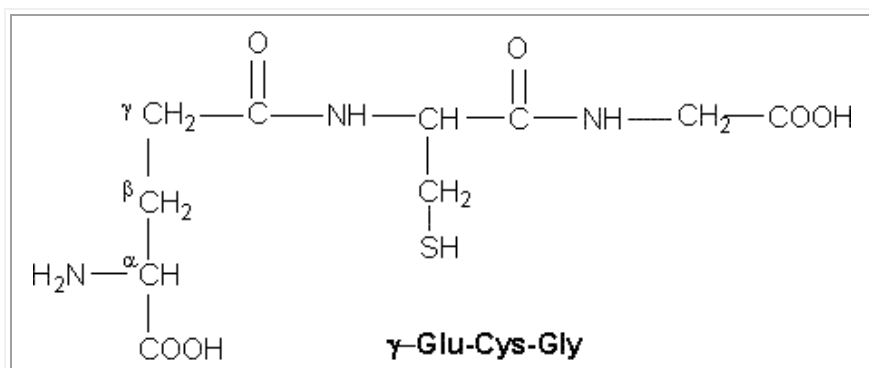
4.1.5.1.1. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (126) (Figure 7). Il est synthétisé dans le cytosol sous l'action séquentielle de la gamma-glutamylcystéine synthétase et de la glutathion synthétase (127). Ce peptide est hautement abondant dans le cytosol (1-11 mM), dans le noyau (3-15 mM) et dans la mitochondrie (5-11mM) (128).

Le γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine existe sous forme réduite (GSH) et sous forme disulfure (GSSG). GSH est le principal régulateur intracellulaire non enzymatique et possède un rôle protecteur. En effet, il est un cofacteur de plusieurs enzymes détoxifiantes telles que la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion transférase (128;129). Il participe au transport des acides aminés à travers la membrane plasmique (128;129). GSH a la capacité de directement piéger le HO \cdot et le radical superoxyde, mais aussi de détoxifier indirectement le H₂O₂ et les peroxydes lipidiques via l'action catalytique de la GPx (128;129). Ce tripeptide participe à la régénération de la vitamine E et de la vitamine C sous leurs formes actives. Il réduit le radical tocophérol directement ou indirectement via la réduction du semidéhydroascorbate en ascorbate (128;129). Ces réactions mènent à la formation de GSSG

qui est réduit en GSH par la glutathion réductase, une enzyme qui utilise le NADPH provenant de la voie des pentoses phosphates (130).

La capacité du glutathion à régénérer les antioxydants les plus importants est liée à l'état redox du couple GSSG-GSH (131). L'environnement redox cellulaire est un facteur métabolique essentiel pour plusieurs fonctions cellulaires. Il est représenté par la sommation des états redox des couples oxydoréducteurs les plus abondants dans un milieu biologique (98). La mesure des concentrations en GSH et GSSG au niveau des compartiments intracellulaires, mais aussi celles d'autres couples redox tels que NADP-NADPH, déshydroascorbate-ascorbate, permet d'évaluer l'environnement redox d'une cellule qui varie constamment selon son environnement, son état de fonctionnalité et son développement.. Lorsque le stress oxydant augmente, l'équilibre redox est altéré en fonction de GSSG, pouvant être aussi dû à la diminution de la capacité réductrice de la cellule (130). Il est donc clair que le glutathion est un acteur important dans l'équilibre redox cellulaire.



<http://webpeda.ac-montpellier.fr>

Figure 7 : Le glutathion. Le glutathion est un tripeptide composé de cystéine, de glutamine et de glycine : γ -Glu-Cys-Gly.

4.1.5.1.2. *L'acide ascorbique*

L'acide ascorbique est un antioxydant important des fluides biologiques tels que le plasma (132;133). La vitamine C existe sous deux conformations : l'acide L-ascorbique ($C_6H_8O_6$) ou sous sa forme oxydée l'acide L-déhydroascorbique. L'acide ascorbique est l'une des vitamines antioxydantes hydrosolubles les plus importantes en raison de sa capacité à donner des électrons et d'éliminer les radicaux libres tels que les radicaux peroxydes (134;135).

Une des autres fonctions de l'ascorbate est de recycler la vitamine E lorsqu'elle se trouve sous la forme radical tocophéroxyl afin d'éviter la peroxydation lipidique des membranes cellulaires (136). Le radical ascorbyle obtenu est peu réactif envers les constituants cellulaires et est ensuite réduit en ascorbate par les thiols tels que le glutathion ainsi que par NADPH semiascorbyl réductase (137). L'acide ascorbique est un antioxydant important des fluides biologiques tels que le plasma, mais nécessite un recyclage efficace de sa forme puisque le plasma seul n'a pas la capacité de réduire l'acide L-déhydroascorbique. En effet, les érythrocytes ainsi que les neutrophiles réduisent le déhydroascorbate en ascorbate (138;139).

Hormis ses fonctions antioxydantes, l'ascorbate peut développer une activité prooxydante en raison de sa réactivité avec les métaux comme le fer et le cuivre et donc participer à la formation de $HO\cdot$, via la réaction de Fenton. Ce phénomène bien démontré *in vitro* n'est pas retrouvé *in vivo* où l'ascorbate semble avoir une activité protectrice (134).

4.1.5.1.3. *La vitamine E*

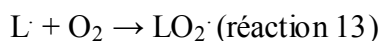
La vitamine E, découverte en 1922, est connue sous le nom de vitamine anti-stérilité puisque sa déficience a causé la stérilité de rats. La vitamine E est un terme générique qui regroupe 8 isomères (4 tocophérols et 4 tocotriénols) (140). Le nom tocophérol a été proposé par Evans et

ses collaborateurs en 1936 et les préfixes α , β , γ et δ ont été utilisés pour distinguer les différents isoformes (140). L' α -tocophérol représente la forme la plus active *in vivo* (140). Les dérivés de l' α -tocophérol diffèrent par le nombre et la position des groupes méthyles au niveau de l'anneau benzenoïde (les β , γ et δ). Le stéréoisomère naturel de l' α -tocophérol est le 2R, 4'R, 8'R α -tocophérol ou RRR α -tocophérol (140). La vitamine E est apportée par l'alimentation sous les formes α -tocophérol et γ -tocophérol libre ou estérifié et est libérée par hydrolyse (141).

La vitamine E est connue pour son rôle d'antioxydant et est liposoluble. En effet, l' α -tocophérol neutralise les radicaux peroxydes lipidiques, formés lors de l'attaque des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres et par l'oxygène. Le radical peroxyde formé peut continuer la propagation de cette chaîne via l'attaque de l'atome d'hydrogène appartenant à d'autres lipides cibles (réaction 12) (142).



Le radical L \cdot peut réagir avec de l'oxygène pour générer un nouveau radical peroxyde (réaction 13).

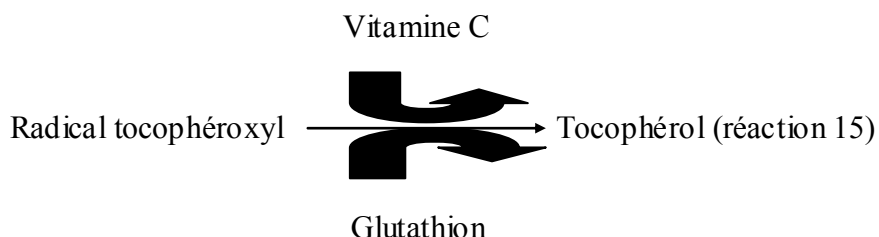


Le rôle antioxydant de la vitamine E est basé sur la neutralisation du radical peroxyde juste avant l'attaque d'un autre acide gras polyinsaturé (réaction 14).

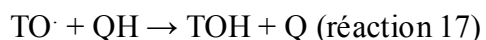


Le tocophérol peut agir avec plusieurs oxydants comme l'oxygène singulet (143), les radicaux alkoxydes (144) et le peroxyde nitrite (145). Cependant, le γ -tocophérol est beaucoup plus efficace comme antioxydant contre les espèces réactives de nitrogène. Le cycle redox de l' α -

tocophérol joue un rôle important dans la fonction antioxydante des vitamines. En effet, en milieu hydrosoluble, le glutathion et la vitamine C participent au recyclage du tocophérol via la réaction suivante (146) :

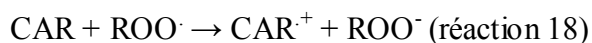


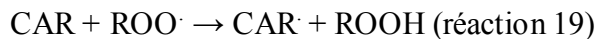
Le coenzyme Q participe également au recyclage du tocophérol (réactions 16 et 17) (147).



4.1.5.1.4. Le β -carotène

Les caroténoïdes sont présents dans les végétaux et sont des précurseurs de la vitamine A (148). Il existe plusieurs caroténoïdes, le β -carotène, l' α -carotène, le γ -carotène et le cryptoxanthine. Le β -carotène est le caroténoïde le plus abondant et le plus actif biologiquement. Les caroténoïdes sont absorbés comme lipides. Des études épidémiologiques ont suggéré que le β -carotène pourrait avoir un rôle dans la prévention du cancer, indépendamment de son rôle de précurseur de la vitamine A (149). Cependant, son principal rôle est dédié à sa fonction antioxydante. Les caroténoïdes peuvent neutraliser les radicaux peroxydes via les réactions suivantes (148) :

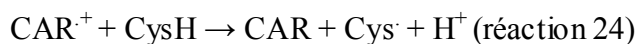
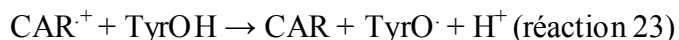




Les caroténoïdes peuvent également réagir avec l'oxygène moléculaire (150) :



La réaction des caroténoïdes avec certains radicaux libres forme $\text{CAR}^{\cdot+}$ qui peut induire des dommages biologiques (151). Il est capable d'oxyder les tyrosines et les cystéines et donc d'affecter les fonctions des protéines (152).



Cependant, $\text{CAR}^{\cdot+}$ peut être recyclé via des réactions impliquant d'autres vitamines, comme la vitamine E (153) et l'acide ascorbique (154). La vitamine E résultante est recyclée via une réaction impliquant l'acide ascorbique et le radical ascorbyle, qui lui est recyclé via une réaction impliquant la NADPH semiascorbyl réductase (155).

4.1.5.2. Les antioxydants enzymatiques (Figure 3)

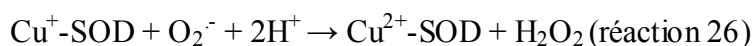
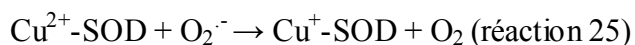
4.1.5.2.1. *Les superoxydes dismutases*

Les superoxydes dismutases (SODs) sont une famille d'enzymes ubiquitaires et anti-radicales, qui ont pour fonction de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde en

peroxyde d'hydrogène. Trois SODs ont été caractérisées biochimiquement et moléculairement.

4.1.5.2.1.1. *Superoxyde dismutase 1*

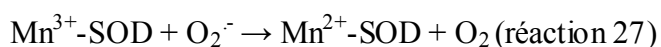
La superoxyde dismutase 1 (SOD1 ou CuZn-SOD) est une enzyme de 32000 Da ayant un Cu et un Zn au niveau de son centre catalytique. Cette enzyme est localisée dans le cytoplasme, dans les compartiments nucléaires, mais aussi dans les lysosomes de cellules mammifères (156-158). La présence de l'ion cuivre facilite la réaction de dismutation de l'anion superoxyde du fait de sa capacité à alterner entre son état oxydé et réduit (réactions 25 et 26). C'est d'ailleurs de cette façon que cette enzyme est inhibée par certains agents chélateurs (96).



Le gène de SOD1 est localisé sur le chromosome 21 chez l'humain (159). Plus de 90 mutations du gène de SOD1 sont associées à la sclérose latérale amyotrophique (160). L'expression de SOD1 est augmentée par de nombreux agents induisant un stress oxydant tels que les UVBs, les irradiations X, l'ozone, l'oxyde nitrique, l'acide arachidonique, le peroxyde d'hydrogène et les chocs thermiques. Cependant, son expression s'est vue être diminuée dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II suite à l'administration d'une hypoxie. Ceci est peut être dû au fait que l'hypoxie diminue la disponibilité de l'oxygène puis l'activité de la chaîne de transport des électrons et donc le substrat de l'enzyme c'est-à-dire l'anion superoxyde.

4.1.5.2.1.2. *Superoxyde dismutase 2*

La manganèse superoxyde dismutase appelée aussi superoxyde dismutase 2 (SOD2) et qui a pour cofacteur le manganèse, est synthétisée dans le cytoplasme et est localisée dans la mitochondrie (161). La SOD2 est un homotétramère où chacune des sous-unités a un poids moléculaire de 23 000 Da (162). Cette enzyme joue un rôle dans la différenciation cellulaire (163) et transforme l'anion superoxyde, un produit de la chaîne de transport d'électron, en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène (réactions 27 et 28).



L'importance de la fonction de la SOD2 dans l'organisme a été démontrée par l'inactivation de son gène qui s'est avérée être létale pour les souris. En effet, ces souris présentaient des dommages et une dégénération au niveau du cœur (164). Le polymorphisme de l'alanine-9 est associé à l'augmentation du risque du cancer du sein, mais aussi au vieillissement prématuré (165). L'hypothèse sous-jacente est que cette mutation pourrait altérer la localisation cellulaire de cette enzyme, mais aucune évidence ne supporte cette idée.

Différemment de la SOD1, la transcription du gène de la SOD2 est activée par de nombreux agents inflammatoires tels que l'interleukine-1, le lipopolysaccharide, les cytokines et l'interféron- γ (166). Dans de nombreux cancers, l'expression de SOD2 est réduite due à la méthylation de certaines séquences particulières (167).

4.1.5.2.1.3. *Superoxyde dismutase 3*

La superoxyde dismutase (EC-SOD ou SOD3) est moins caractérisée que les autres dismutases et contient aussi du zinc ainsi que du cuivre. Cet homotétramère de 135 000 Da a une forte affinité pour l'héparine et a été détecté dans le plasma humain, la lymphe, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fluides cérébrospinaux (168;169). La SOD3 est restreinte à certains types cellulaires et tissulaires où son activité peut excéder celles de la SOD1 et SOD2. Cette protéine contient un peptide signal ce qui permet de la diriger vers ces sites d'action. Ceci pourrait donc expliquer son poids moléculaire supérieur à celui de la SOD1.

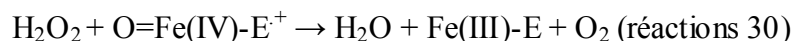
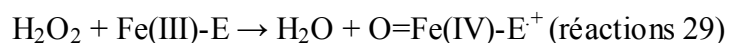
Le gène de la SOD3 dispose de 40-60 % de similarité avec SOD1 au niveau des exons, mais aucune avec SOD2. Le gène SOD3 est localisé sur le chromosome 4 humain (170). Une substitution de l'arginine-213 par une glycine induit l'augmentation de la concentration plasmatique de SOD3 (171). Ce polymorphisme a été retrouvé chez les sujets de plusieurs études, 4% des Suisses (172), 3 % des Australiens (173) et 6% des Japonais (174). Ceci n'est pas encore très clair, mais cette mutation pourrait altérer la liaison de l'héparine et la surface des cellules endothéliales et réduire la liaison des tyrosines protéases. De plus, une mutation de l'alanine-241 en glycine induit la mutation de la thréonine-40 en alanine (T40A) et l'inhibition de la mutation de la cystéine-280 en thréonine. La mutation T40A n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme ainsi que sur la liaison de l'héparine (175).

4.1.5.2.1.4. *La catalase*

La catalase est une enzyme retrouvée chez tous les organismes. Cette enzyme est ubiquitaire, mais est fortement exprimée dans le foie et les érythrocytes. Cette enzyme est un tétramère

composé de 4 chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés. La catalase contient un hème porphyrine ce qui lui permet de réagir avec le peroxyde d'hydrogène (176). En effet, la catalase est capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène généré par les SODs et les oxydases en eau (réactions 29 et 30). Le peroxyde d'hydrogène interagit avec l'asparagine-147 et l'histidine-74 du site actif de l'enzyme et induit un transfert de proton entre les atomes d'oxygène. La catalase protège la cellule lors d'un stress oxydant (177). Même si cette enzyme n'est pas essentielle pour certains types cellulaires, dans des conditions normales, elle joue un rôle important contre le stress oxydant. En effet, la survie de rats exposés à de l'oxygène à 100 % est augmentée lorsque des liposomes contenant la SOD et la catalase sont injectés par voie intraveineuse avant et durant l'exposition à l'oxygène (178). Ceci est expliqué par le fait que la catalase prévient la consommation d'oxygène induit par certaines drogues, capture le peroxyde d'hydrogène et le convertit en eau et oxygène (179).

Plusieurs études ont démontré que cette enzyme pouvait être induite par diverses cytokines lors d'hyperoxie ainsi que par certains oxydants (180;181). Cependant, certaines études démontrent des résultats contradictoires (182).



4.1.5.2.2. *Les Glutathions peroxydases*

La glutathion peroxydase est un nom général regroupant une famille d'enzymes tétramériques ayant une activité peroxydase, c'est-à-dire la réduction de peroxydes. Il existe différents isoformes codés par des gènes différents. Ces enzymes possèdent une sélénocystéine au

niveau de leur site actif sauf la glutathion peroxydase 5 (GPx5) retrouvée chez les rongeurs et le singe. La GPx6 est uniquement retrouvée chez l'homme (183).

4.1.5.2.2.1. *Glutathion peroxydase 1*

La glutathion peroxydase 1 (GPx1) fut la première sélénoprotéine identifiée. Cette protéine tétramérique a un poids moléculaire de 22000 – 23000 Da et dispose d'une sélénocystéine dans chacune de ses sous-unités. Elle est la forme la plus abondante et est retrouvée dans le cytoplasme. Cette enzyme a une préférence pour le peroxyde d'hydrogène et le convertit en eau. Cette enzyme métabolise également les hydroperoxydes des acides gras (LOOH) en eau et en alcools lipidiques (LOH) (184). Accompagnée de la phospholipase A2, la GPx1 libère les acides gras, mais ne peut métaboliser les hydroperoxydes des phospholipides (185). Cette enzyme agit comme un véhicule de stockage du sélénium, contenant 4 résidus sélénocystéines (186). L'activité de la GPx1 est souvent discutée en parallèle de l'activité de la glutathion réductase qui permet de maintenir un approvisionnement en GSH à partir du GSSG.

4.1.5.2.2.2. *Glutathion peroxydase 2*

La glutathion peroxydase 2 (GPx2) est une enzyme intestinale et présente 65% de similarité de sa séquence en acides aminés avec GPx1 (187). Cette enzyme est présente au niveau des cellules recouvrant le tractus gastro-intestinal et est impliquée dans la détoxification des peroxydes alimentaires (188). En effet, la GPx1 et la GPx2 ont des substrats similaires, c'est-à-dire la réduction du peroxyde d'hydrogène, des hydroperoxydes des acides gras, mais pas ceux des phospholipides. Les souris n'exprimant pas la GPx2 présentent un phénotype normal (189) tandis que celles invalidées pour GPx1 et GPx2 développent des cancers intestinaux et la maladie de Crohn (190;191), en présence de bactéries gastro-intestinales.

4.1.5.2.2.3. *Glutathion peroxydase 3*

La glutathion peroxydase 3 (GPx3) est une glycoprotéine ayant des fonctions extracellulaires (192). Cette protéine plasmatique de 23-25 kDa démontre 40-50 % d'homologie avec GPx1 (193). Cette enzyme a des substrats similaires à ceux de la GPx1, mais ne réagit pas avec l'anticorps GPx1.

L'ARNm de la GPx3 est retrouvé dans les reins et les cellules épithéliales de tubules (194). D'autres types cellulaires ont été proposés pour produire la GPx3 en raison de la présence de son ARNm tels que le cœur, le placenta, les poumons, les cellules gastro-intestinales et la thyroïde (195-198). Les cellules HepG2, la lignée humaine d'adénocarcinome et les Caco 2 synthétisent la GPx3 (199;200)

4.1.5.2.2.4. *Glutathion peroxydase 4*

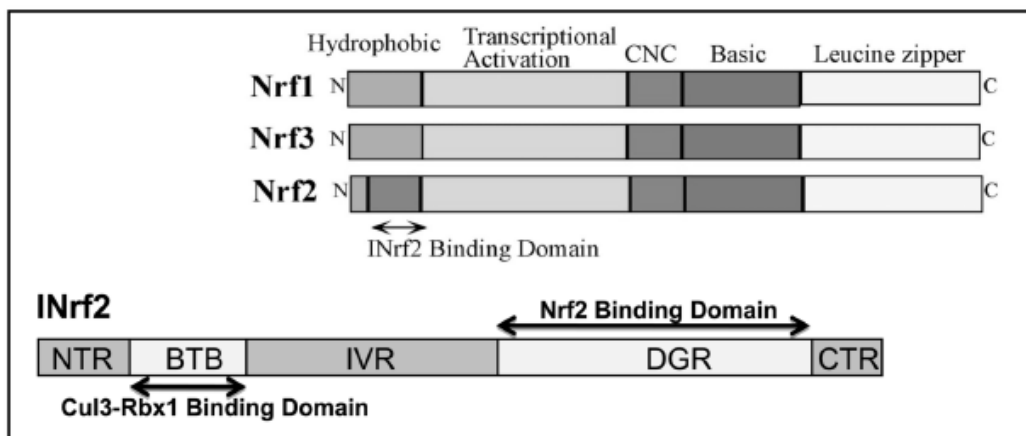
La glutathion peroxydase 4 (GPx4) ou GPx hydroperoxyde des phospholipides est la quatrième GPx contenant du sélénium et possède 30 à 40 % de similarité avec la GPx1. Ce monomère de 20-22 kDa réagit avec les hydroperoxydes des phospholipides (201). Cette enzyme utilise le peroxyde d'hydrogène ainsi que d'autres hydroperoxydes lipidiques. Sa structure monomère pourrait lui permettre de se lier avec une gamme plus large de substrat, contrairement aux autres GPxs tétramériques. D'ailleurs, contrairement aux autres GPx, la GPx4 peut utiliser une gamme plus large de substrat réduit. Cette enzyme est faiblement exprimée dans les cellules et est localisée dans le cytosol ainsi que liée aux membranes des mitochondries et des noyaux (202;203).

Cette enzyme semble essentielle pour l'embryogenèse puisque des souris invalidées pour la forme cytosolique meurent au stade embryonnaire (204). La GPx4 a un rôle anti-

inflammatoire puisqu'elle a la capacité d'inhiber la prostaglandine H synthase-2, une enzyme responsable de la synthèse de PGD₂ via la réduction des niveaux d'hydroperoxydes nécessaire à l'activation de la prostaglandine H synthase-2 (205). La GPx4 mitochondriale a une fonction antiapoptotique en raison de l'inhibition des hydroperoxydes lipidiques impliqués dans la libération mitochondriale du cytochrome C (206).

4.1.6. Régulation de la défense antioxydante

L'expression des gènes antioxydants est assurée par des facteurs de transcription comme le « nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 » (Nrf2). Le facteur de transcription Nrf2 est exprimé dans plusieurs types tissulaires et cellulaires. Il dispose d'un domaine « leucine zipper » ou glissière à leucine (207) c'est-à-dire deux hélices alpha reliées par des ponts entre leurs leucines. La chaîne alpha est située à l'extrémité C-terminale de chaque monomère et contient une région basique (en amont) qui est responsable de la liaison à l'ADN (208) tandis que la région acide est nécessaire à l'activation de la transcription (207) (Figure 8).



Kaspar JW *et al*, 2009; 47/9: 1304-1309.

Figure 8 : Représentation schématique des domaines du Nrf2 et de Keap 1 (INrf2). Représentation schématique des différents domaines de Nrf (Nrf1, Nrf2, Nrf3) et INrf2. INrf2, inhibiteur de Nrf2; NTR, région N-terminale; BTB, vaste broad complex, tramtrack, bric-a-brac; IVR, intervening/linker region; DGR, Kelch domain/épétition de diglycine; CTR, région C-terminale.

Le Nrf2 se lie à l'ADN sur une région appelée « élément réponse antioxydant » (ERA) qui contrôle l'expression basale et inductible des gènes antioxydants suite à une exposition aux xénobiotiques, métaux lourds et rayons UVs (207;209-211). Des analyses ont révélé que le motif nucléotidique « GTGACA***GC » est la séquence centrale du ERA (212) et que celle-ci est présente dans les gènes activés par le Nrf2 (208;209;213). L'inhibiteur principal du Nrf2 est INrf2 ou Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1), un dimère qui permet la rétention du Nrf2 dans le cytoplasme (214).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'activation, par le stress oxydant, de la voie Nrf2-Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) ayant pour résultat la suractivation des gènes antioxydants via la séquence ERA (Figure 9). Le premier mécanisme proposé est celui de la protéine kinase C (PKC) qui, une fois activée par les molécules oxydantes, phosphoryle Nrf2

au niveau de la sérine 40 pour le libérer de Keap 1 (215). Le second mécanisme consiste en l'oxydation des cystéines 151, 273 et 288, proposées comme étant les senseurs du stress oxydant et indispensables à l'activité de Keap 1 (216).

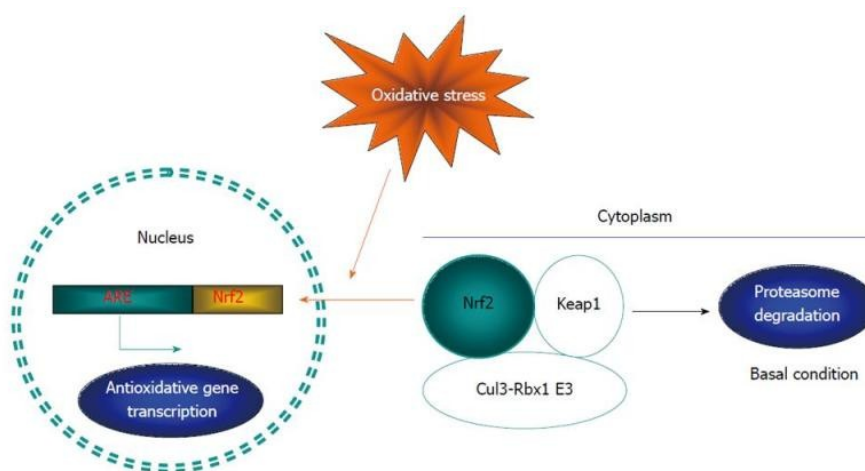
Le pouvoir antioxydant du Nrf2 provient de sa capacité à induire l'expression de gènes antioxydants lorsqu'il se lie sur la séquence ERA. Parmi ces gènes, il y a NQO1 (NAD(P)H : quinone oxydoréductase 1), GST Ya (Glutathion S transférase Ya) et HO-1 (Hème oxygénase) (207). Le Nrf2 est donc un activateur des gènes antioxydants de phase II.

Parmi les cibles du Nrf2, certaines sont impliquées dans le métabolisme du glutathion (GSH). La synthèse du GSH dépend des niveaux de cystéine disponibles et de l'activité de l'enzyme responsable de sa synthèse c'est-à-dire la glutamate-cystéine ligase. Un échangeur permet l'entrée de cystéine dans la cellule, en échange de la sortie d'un glutamate. Il s'agit du système x(-)(c), dont l'expression génique est régulée par l'activation de Nrf2 (217). De plus, l'expression génique des deux sous-unités de l'enzyme glutamate-cystéine ligase est modulée par le Nrf2 (218). L'enzyme glutathion synthétase contient également des sites ERA au niveau de son promoteur, ce qui indique que son expression pourrait être modulée par le Nrf2 (219).

L'enzyme glutathion peroxydase (GPx) est aussi une cible de Nrf2 puisque dans les cellules Caco-2, l'expression génique de la GPx est induite par la surexpression de Nrf2 et renversée par la surexpression de son inhibiteur Keap-1 (220). Dans des cellules épithéliales pulmonaires, l'invalidation de Keap-1 augmente l'expression génique de la GPx, alors qu'elle est diminuée par l'invalidation du Nrf2 (221).

L'enzyme glutathion réductase (GR) est également modulée par le Nrf2. En effet, les cellules pulmonaires de souris Nrf2^{-/-}, exposées à de la fumée de cigarette, ont une expression réduite de la GR (222).

Le Nrf2 pourrait aussi être impliqué dans la régulation de l'expression des SODs et de la catalase (223). En effet, une étude clinique a démontré que l'administration de Prostandim, un activateur du Nrf2, induit une augmentation de 30% de la SOD et 54% de la catalase (224).



Yu ZW *et al*, 2012; 3(1): 19-28.

Figure 9 : Activation des gènes antioxydants par le stress oxydant activant Nrf2. Le stress oxydant favorise l'expression des gènes antioxydants en activant le Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like 2). À l'état basal, le niveau de Nrf2 libre est très faible car il forme un complexe avec Keap1 et la ligase E3 CUL3-Rbx-1 conduisant à sa dégradation par le protéasome. En situation de stress oxydant, le niveau de Nrf2 libre augmente car il est dissocié de Keap1. Les molécules Nrf2 entreront ensuite dans le noyau, liront l'élément cis du ARE et stimuleront l'expression des gènes cibles du Nrf2. ARE : élément de réponse antioxydant; CUL3 : Cullin 3; E3: ubiquitine ligase; Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1; Rbx-1 : RING box protein 1.

Nrf2 régule également l'expression d'autres facteurs de transcription comme PPAR γ qui joue un rôle central dans le métabolisme en raison de son interaction avec PGC-1 α (« PPAR γ coactivator 1 α) (225;226). PGC-1 α est impliqué dans la biogenèse et la fonction mitochondriale (227). Il est également fortement exprimé lors d'un stress oxydant. D'ailleurs,

l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes telles que SOD, GPx et catalase augmente parallèlement à l'expression de PGC-1 α . PGC-1 α exerce également un rôle anti-inflammatoire en raison de son interaction avec les PPARs. En effet, la famille des PPARs est composée de trois membres PPAR α , PPAR γ and PPAR δ (ou PPAR β) (228), codés par différents gènes (228). Les PPARs sont des récepteurs nucléaires activés par des ligands endogènes (acides gras libres, prostaglandines, leucotriènes) ou par des ligands synthétiques (glitazones, fibrates). Lorsque ces ligands se lient aux domaines lipidiques de liaison des PPARs une hétérodimérisation se produit avec le RXR (229-231). C'est ainsi, qu'un changement conformationnel a lieu induisant une transrépression ou une transactivation des gènes cibles. Durant, la transrépression, le PPAR activé se lie à un facteur de transcription activant les cytokines, tel que le NF- κ B impliqué dans la réponse inflammatoire (232). C'est ainsi que PPAR peut inhiber ce processus en bloquant l'interaction NF- κ B avec les régions promotrices des gènes cibles. Durant la transactivation, le PPAR activé se lie à une séquence spécifique des gènes cibles (233) tels que *apo A-I, A-II and A-V, LPL, SR-BI* qui sont activés par PPAR α et ADIPOQ ainsi qu' ADRP qui sont activés par PPAR γ (233). PPAR α qui est abondant dans les tissus comme le foie, les reins, le cœur, le tissu adipeux brun et les macrophages est impliqué dans le métabolisme lipidique tandis que PPAR γ , qui est principalement retrouvé dans le tissu adipeux, les macrophages et le grand intestin est impliqué dans l'obésité et la résistance à l'insuline (233). Par conséquent, PPAR α régule l'homéostasie lipidique (234) alors que PPAR γ régule l'adipogénèse et l'homéostasie glucidique (235). Au contraire, PPAR δ est exprimé ubiquitairement et joue un rôle crucial dans les fonctions mitochondriales, l'oxydation des lipides et la sensibilité à l'insuline (236;237). Les trois types PPARs exhibent des propriétés anti-inflammatoires (238).

4.1.7. Le stress antioxydant

Le stress oxydant est à l'origine de plusieurs pathologies comme les maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont proposé que l'athérosclérose accélérée par le stress oxydant soit la cause essentielle des affections cardiovasculaires (239). En effet, l'oxydation des lipoprotéines de faible densité («low density lipoproteins», LDLs) a été identifiée comme l'un des premiers mécanismes impliqué dans la pathogenèse de l'athérosclérose (240;241). C'est ainsi que plusieurs études d'interventions de supplémentation en antioxydants ont été mises en place puisque, théoriquement, les antioxydants tels que la vitamine C, la vitamine A et la vitamine E, devraient prévenir l'oxydation des LDLs et interrompre le processus d'athérosclérose.

Malgré cela, ces études de supplémentation n'ont pas donné les résultats escomptés, voire menés à des effets adverses. En 2004, le Comité de Nutrition de la Société Américaine du Cœur a rapporté que dix, cinq et deux études n'ont démontré aucun effet d'une supplémentation en vitamine E, β -carotène ou un mélange des deux, respectivement. Cinq et trois études ont illustré un effet positif (diminution des infarctus et de l'épaisseur de l'intima) lors d'une supplémentation en vitamine E et en vitamine C, respectivement. Enfin, plusieurs études ont démontré un effet adverse d'une supplémentation en vitamine E (5 études montrant l'augmentation des accidents cérébraux-vasculaires), en β -carotène (1 étude exposant l'augmentation de la mortalité) et en un mélange des deux vitamines (3 études dévoilant une augmentation de la mortalité) (242).

C'est ainsi que les termes «paradoxe antioxydant» et «stress antioxydant» sont apparus faisant référence au stress pouvant être induit par les antioxydants. Par exemple, plusieurs polyphénols ont une importante activité antioxydante *in vitro*, mais sont aussi instables et

facilement oxydables, ce qui conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (243). Les antioxydants ont démontré leur capacité à augmenter la viabilité cellulaire, mais ceci n'est pas toujours bénéfique, surtout dans le cas des cellules cancéreuses. En effet, en diminuant la toxicité carcinogène, les antioxydants assurent la survie des cellules altérées et, par conséquent, augmentent l'incidence des cancers. D'ailleurs, plusieurs études d'intervention ont confirmé cette hypothèse. Effectivement, des hommes fumeurs ont été exposés à une supplémentation en vitamine E et en β -carotène pendant 5 à 8 ans et une augmentation de la mortalité, probablement due à la prolifération cellulaire, fut observée pour ceux supplémentés en β -carotène (244).

Les métaux de transition, tel que le fer, jouent un rôle important dans la production des ROS en participant à réaction de Fenton. La réaction d'Haber-Weiss, qui implique l'anion superoxyde, produit également la forme réduite du fer qui, par la suite, participe à la réaction de Fenton. La présence de fer est donc nécessaire pour la génération du radical hydroxyle, mais celui-ci est peu disponible dans les systèmes biologiques. Cependant, l'anion superoxyde et certains antioxydants, comme l'ascorbate, réduisent le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) qui promeut la réaction de Fenton. Bien que l'ascorbate soit considéré comme un agent antioxydant, il peut ainsi devenir pro-oxydant en participant à la génération du radical hydroxyle.

4.2. Le stress oxydant et les composantes du syndrome métabolique

4.2.1. L'obésité et le stress oxydant

L'obésité représente le principal facteur menant au syndrome métabolique. Ces dernières années, de nombreuses études ont démontré que l'obésité viscérale est associée à une inflammation systémique reflétée par l'élévation de marqueurs inflammatoires tels que la Protéine Réactive C (PRC) (245) et le TNF- α (246) qui induit la production d'interleukine-6. Cette dernière est le premier régulateur de la synthèse de la PRC dans le foie, ce qui amène à un état inflammatoire (247). D'ailleurs, les interleukines pro-inflammatoires sont induites par le stress oxydant et inversement (124).

De nombreuses études animales ont investigué l'association du stress oxydant avec l'obésité. Des souris KKAY obèses non diabétiques (7 jours de vie) et obèses diabétiques (13 jours de vie) exhibant une obésité sévère ont été comparées à des souris témoins. Les souris de 7 jours et 13 jours présentent une augmentation de la peroxydation des lipides dans le plasma, de l'expression génique de PAI-1, de TNF- α et de la NADPH oxydase dans le tissu adipeux blanc, par rapport aux souris témoins. Ces mêmes souris ont une baisse de l'expression des gènes codant pour la CuZn-SOD, la GPx et la catalase, ainsi qu'une baisse de l'activité totale des SODs et de la GPx dans le tissu adipeux blanc, par rapport aux souris témoins (248). Le stress oxydant associé à l'obésité et représenté par l'augmentation de 8-isoprostane, du TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) et du ratio GSSG/GSH chez des rats, est renversé significativement par l'inhibition de la cyclooxygénase 2 puisque celle-ci induit la génération d'oxydants lorsqu'elle est activée (249).

Skalicky J *et al.* ont réalisé, en 2008, une étude avec 40 sujets adultes obèses dont 20 avec un syndrome métabolique et 48 témoins, et ont affirmé que les sujets obèses avec un syndrome métabolique ont une augmentation de la glycémie à jeun, du malondyaldéhyde (MDA), du ratio GSSG/GSH, de la PRC et de la fibrinogène² ainsi qu'une réduction du HDL-cholestérol, au niveau plasmatique (245). Furukawa *et al.* ont illustré une corrélation significative entre l'indice de masse corporelle (IMC) et le tour de taille avec la peroxydation lipidique représentée par le TBARS plasmatique et la 8-isoprostane urinaire, chez des sujets obèses. De plus, les niveaux plasmatiques d'adiponectine sont corrélés de façon inverse avec l'IMC et le tour de taille (248). Les obèses diabétiques présentent également une augmentation du 8-isoprostane urinaire, du LDL-oxydé et du TBARS plasmatiques ainsi qu'une diminution du β -carotène et rétinol plasmatique à jeun et après un repas riche en gras (250). Codoñer-Franch *et al.* ont réalisé une étude avec 60 enfants obèses et 42 non obèses et montrent des niveaux élevés de polyamines (précurseur de l'oxyde nitrique) chez les enfants obèses, en corrélation avec des marqueurs du stress oxydant (MDA sanguin) et du stress nitrosant (spermine sanguine) (251). Finalement, l'assignation de 40 adultes en surpoids et obèses à une diète de maintenance du poids, faible ou adéquate en produits laitiers, démontre qu'une diète adéquate en produits laitiers diminue le MDA, le LDL-oxydée, le TNF- α , l'interleukine-6, le tour de taille et accroît l'adiponectine (252).

Ces études mettent en évidence que l'obésité est associée au stress oxydant. En effet, une dérégulation du métabolisme des glucides et des lipides expose la cellule à un excès de nutriments qui sont oxydés par la mitochondrie. Cet excès de nutriment conduit donc à une oxydation mitochondriale excessive pouvant résulter à la génération d'espèces réactives dérivées de l'oxygène. De plus, une consommation élevée d'acides gras saturés altère la

fonction des récepteurs des apolipoprotéines-B. Lorsque le contenu en cholestérol des hépatocytes est élevé par l'ingestion d'aliments riches en acides gras saturés et en cholestérol, les récepteurs des LDLs diminuent tandis que les niveaux de LDLs plasmatiques augmentent (253). Dans ces conditions, les LDLs ne sont pas métabolisées normalement et restent plus longtemps dans le plasma où elles sont plus susceptibles d'être oxydées (254). Les LDLs non reconnues s'infiltrent dans l'espace sous-endothélial où elles induisent l'expression de molécules d'adhésion et de facteurs chimiotactiques. Les monocytes circulants s'attachent alors à l'endothélium, migrent dans l'espace sous-endothélial via l'action de cytokines chimiotactiques, ingèrent les lipoprotéines et se différencient en macrophages au niveau de l'intima vasculaire. Ces macrophages génèrent des radicaux libres ce qui convertit les LDLs modérément oxydées en LDLs hautement oxydées. Ces macrophages captent les LDLs oxydées via les récepteurs éboueurs (ou «scavengers») et sont transformés en cellules spumeuses, impliquées dans les lésions athérosclérotiques (255).

Il en est de même pour les acides gras polyinsaturés qui sont très sensibles à la lipoperoxydation. En effet, les produits de peroxydation lipidique peuvent induire des réponses cytotoxiques favorisant la génération de ROS et la peroxydation lipidique (256).

L'inflammation, largement présente dans l'obésité, pourrait être également une source de production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène, via les macrophages. Actuellement, des efforts supplémentaires sont encore nécessaires afin de déterminer si le stress oxydant intervient en amont ou en aval du développement de l'obésité.

4.2.2. Le diabète et le stress oxydant

Le diabète de type II (DT2) est également associé au stress oxydant, mais aussi avec l'inflammation. En effet, des cellules endothéliales aortiques humaines exposées à des concentrations élevées de glucose (22 mmol/L) pendant 5 jours, démontrent une augmentation de l'expression génique et protéique de la nitrique oxydase synthase, une augmentation de l'oxyde nitrique mesuré indirectement par la réaction de Griess (quantification du nitrite) ainsi qu'une augmentation de la production d'anion superoxyde (257). Ces résultats démontrent qu'une exposition chronique à de fortes concentrations en glucose induit un déséquilibre entre l'oxyde nitrique et l'anion superoxyde pouvant à l'origine des altérations endothéliales retrouvées chez les diabétiques.

Des souris transgéniques surexprimant l'aldose réductase, une enzyme catalysant la transformation du glucose en sorbitol, présentent une augmentation du flux de glucose à travers la voie des polyols, une source majeure de stress oxydant, de par la diminution du glutathion et l'augmentation du MDA (258). En effet, en transformant le glucose en sorbitol, la surexpression de l'aldose réductase induit une déplétion du NADPH nécessaire à la régénération du GSH. Matsunami T *et al.* ont démontré que les rats diabétiques présentent un accroissement du TBARS sanguin, de l'autooxydation du glucose, des ROS et une diminution de l'activité de la SOD, au niveau des érythrocytes, du foie, du pancréas et des muscles (259).

Plusieurs études effectuées avec des patients diabétiques, ont montré que le DT2 est associé avec une augmentation du MDA des fluides subrétinaux (260), des carbonyles protéiques des fluides subrétinaux (260), de l'excrétion urinaire de la 8-iso-PGF2 α (261), du LDL-cholestérol plasmatique (262), du TNF- α plasmatique (262), de l'interleukine-1 α plasmatique (262) et des dommages oxydant de l'apolipoprotéine B100 plasmatique (263). Les patients diabétiques

démontrent une diminution des concentrations plaquettaires de vitamine E et de GPx (264) ainsi qu'une diminution de l'activité des SODs plasmatiques (262).

Les patients diabétiques sont caractérisés par une hyperglycémie pouvant induire une augmentation de la production d'anion superoxyde par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Théoriquement, la présence d'anion superoxyde devrait activer les superoxydes dimustases puis les autres enzymes antioxydantes. Or, les études présentées ci-dessus démontrent plutôt une diminution de l'activité des défenses antioxydantes par un mécanisme qui est encore inconnu.

4.2.3. L'hypertension et le stress oxydant

L'hypertension semble également associée au stress oxydant puisque des rats hypertendus présentent une plus grande expression rénale de p47phox et p67phox, deux sous-unités de la NADPH oxydase (265). Cette enzyme produit de l'anion superoxyde connu pour contribuer à l'hypertension (266). Une étude réalisée avec des souris surexprimant la NADPH oxydase au niveau des cellules des muscles lisses vasculaires, a montré que l'infusion d'angiotensine II augmente l'hypertension (267). Harrison, Griendling *et al.* ont établi que l'hypertension induite par l'angiotensine II, chez des rats, est accompagnée du stress oxydant, dans les vaisseaux sanguins (268;269). De plus, l'administration de superoxyde dismutase réduit la pression artérielle dans ce modèle (270). Ces auteurs ont suggéré que l'augmentation de la NADPH oxydase est à l'origine de ce stress oxydant. En lien avec cette hypothèse, une augmentation de l'ingestion de sel augmente la NADPH oxydase, altère l'activité de la SOD et cause un stress oxydant même en l'absence d'hypertension (271). Finalement, plusieurs auteurs ont illustré que les antioxydants peuvent diminuer la tension artérielle et

l'inflammation chez des animaux hypertendus (106;272-275).

Tableau 4 : Syndrome métabolique, stress oxydant et inflammation

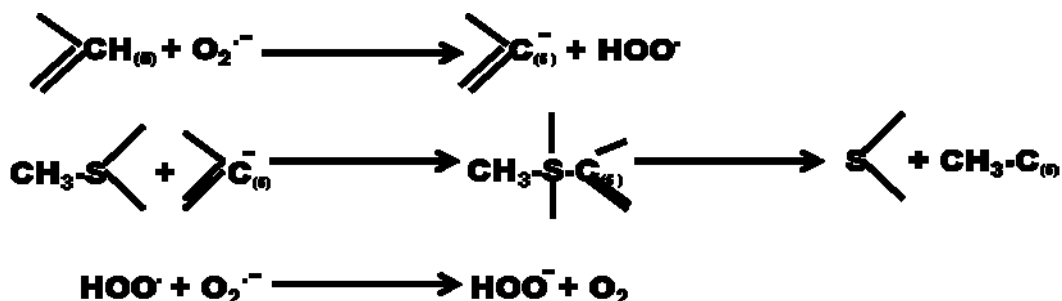
Pathologies	Modèles	Conclusion	Références
Obésité/Diabète de type II	Souris KKAY obèses non diabétiques et diabétiques	Peroxydation lipidique, augmentation du H ₂ O ₂ , de l'expression génique de PAI-1, de TNF- α et de la NADPH oxydase. Diminution de l'expression génique de la Cu,Zn-SOD, de la PGx et de la catalase. Baisse de l'activité de la SOD totale et de la GPx.	(248)
Obésité	Rats	Augmentation du 8-isoprastane, du TBARS et diminution de GSH/GSSG reversée par l'inhibition de COX-2.	(249)
Obésité	40 sujets adultes obèses avec syndrome métabolique	Augmentation du MDA, de la peroxydation lipidique, du ratio GSSG/GSH, de la PRC. Diminution du HDL-cholestérol	(245)
Obésité	Sujets obèses	Corrélation de l'IMC, du tour de taille et de la peroxydation lipidique (TBARS et 8-epi-PGF ₂ α)	(248)
Obésité/Diabète de type II	Obèses diabétiques	Augmentation du F ₂ -isoprastane, du LDL oxydé et du TBARS. Diminution du β carotène et du rétinol	(250)
Obésité	Enfants obèses	Augmentation de polyamine en corrélation avec les marqueurs du stress oxydant et nitrosant.	(251)
Obésité	Adultes en surpoids et obèses	Diète adéquate en produits laitiers diminue le MDA, le LDL oxydé, le TNF- α et l'IL-6.	(252)
Diabète de type II	Cellules endothéliales exposées à des [glucose] élevées (22 mM)	Augmentation de l'anion superoxyde	(257)
Diabète de type II	Cellules tubulaires proximales de rats	Augmentation de la consommation d'oxygène en raison du stress oxydant. Inhibition de la nitrique oxydase prévient cette augmentation	(276)
Diabète de type II	Souris transgéniques surexprimant l'aldose réductase	Diminution du GSH, augmentation de la peroxydation lipidique.	(258)
Diabète de type II	Rats diabétiques	Augmentation de TBARS, de l'autooxydation du glucose, et baisse de l'activité SOD totale.	(259)
Diabète de type II	Patients diabétiques	Augmentation du MDA, des carbonyles protéiques	(260)
Diabète de type II	Patients diabétiques	Augmentation du 8-iso-PGF ₂ α et de la peroxydation lipidique	(261)
Diabète de type II	Patients diabétiques	Augmentation du LDL-cholestérol, du TNF- α , du 8-isoprastane, de l'IL-1 α et du LDL glycée. Diminution activité SOD plasmatique.	(262)
Diabète de type II	Patients diabétiques	Augmentation des dommages oxydatifs de l'apoB-100	(263)
Diabète de type II	Patients diabétiques	Augmentation du thromboxane B ₂ , diminution activité GPx cytosolique et vitamine E.	(264)
Hypertension	Rats hypertendus	Plus grande expression de p47phox et p67phox (NADPH oxydase)	(265)
Hypertension	Souris surexprimant la NADPH oxydase (muscles lisses vasculaires)	Infusion d'angiotensine augmente l'hypertension	(267)
Hypertension	Rats infusés avec angiotensine II	Plus grande expression de p22phox et de Nox1. Diminution de l'expression de la EC-SOD rénale.	(277)
Hypertension	Cellules tubulaires rénales	Augmentation de l'O ⁻ et diminution de l'acide nitrique incitent la réabsorption du sodium menant à une hypertension sodium et volume dépendant	(277;278)
Hypertension	Injections intracérébroventriculaire d'un adénovirus SOD2	Diminution de l'hypertension causée par angiotensine II.	(279;280)

4.3. Résumé

À présent, il est donc clair que les composantes du syndrome métabolique c'est-à-dire l'obésité, le diabète de type II et l'hypertension sont associées avec un stress oxydant ainsi qu'avec une inflammation élevée (tableau 4) et que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, contrôlés par la SOD et les GPx, sont des joueurs clés pouvant expliquer les phénotypes du syndrome métabolique. En effet, la protéine kinase C est activée par les espèces réactives de l'oxygène telles que le H_2O_2 et l' $O^{\cdot-}$ pour induire, par la suite, l'expression du TNF- α (281). Le H_2O_2 est également démontré pour être un inducteur du NF- κ B (282;283) qui régule les gènes du TNF- α , IL-1 et IL-6 (284). Le 8 isoprostane est aussi produit à partir des radicaux libres comme l'anion superoxyde (285). Le MDA est un marqueur de la peroxydation lipidique, un processus généré par le HO^{\cdot} , lui-même produit à partir du H_2O_2 en présence de fer ferreux. De plus, plusieurs études ont démontré des altérations des défenses antioxydantes SOD et GPx (262;264). Il se pourrait donc qu'une rupture de l'homéostasie du H_2O_2 et de l' $O^{\cdot-}$ puisse induire le syndrome métabolique. Toutefois, le mécanisme amenant à cette détérioration du syndrome métabolique n'est pas élucidé. À l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à l'importance des modifications épigénétiques des défenses antioxydantes, dans un contexte de syndrome métabolique.

5. LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET LE STRESS OXYDANT

Plusieurs études ont montré l'implication des ROS dans les réactions de méthylation de l'ADN, dans des conditions physiologiques et pathologiques (286). Il a été démontré que des niveaux anormaux de ROS peuvent affecter les mécanismes épigénétiques (287;288). Plus précisément, l'anion superoxyde, participe à ce processus comme un agent nucléophile en déprotonant la molécule de cytosine en position C-5, ce qui accélère la réaction entre l'ADN et l'intermédiaire S-adenosylméthionine (SAM) chargé positivement (289) (Figure 10). Dans ce contexte, il a été montré que les ROS augmentent la méthylation de l'ADN puisque la production de ROS induites par la noradrénaline augmente la méthylation du promoteur de PKC (290). Une augmentation de l'anion superoxyde conduit également à une hyperméthylation globale de l'ADN et stimule l'expression de Dnmt1 suivant l'ancrage et le blocus des mélanocytes (287). En outre, l'hyperméthylation de l'ADN d'un seul des dinucléotides CpG, à proximité du site de début de transcription, est associée au stress oxydant en raison d'une faible expression de la SOD, chez des individus adultes nés prématurément (291). Le H_2O_2 semble tout autant impliqué que l'anion superoxyde puisqu'il augmente la méthylation de RUNX3 (runt-related transcription factor 3) dans des cellules exposées au H_2O_2 (292) et régule à la hausse DNMT1 dans des cellules cancéreuses (293).



Afanas'ev I, 5(1), 52-62 (2014)

Figure 10 : Réaction de méthylation de l'ADN impliquant l'anion superoxyde. Le superoxyde peut déprotoner la molécule de cytosine en position C-5 ce qui accélère la réaction entre l'ADN et la S- adénylméthionine chargée positivement (SAM).

Tel qu'expliqué ci-dessus, il est probable qu'une perturbation de l'homéostasie de H_2O_2 et de l'anion superoxyde, dans le syndrome métabolique, puisse être causée par une altération épigénétique des défenses antioxydantes comme c'est le cas pour le cancer. En effet, l'activité transcriptionnelle de SOD2 est contrôlée, pour en partie, par un mécanisme épigénétique, aux différents stades de développement du cancer humain (294). Il a été suggéré qu'une perte de l'activité SOD puisse contribuer à des changements dans la régulation épigénétique, créant ainsi un cercle vicieux en renforçant une l'instabilité épigénétique (294).

Peu d'articles se sont intéressés aux altérations épigénétiques des défenses antioxydantes dans le syndrome métabolique excepté Archer *et al.* qui ont montré que des rats hypertendus présentent une hyperméthylation du promoteur du gène de la SOD2, et que cet effet est reversé par l'administration de 5-aza-2'-desoxycytidine (295). La 5-aza-2'-desoxycytidine est un analogue de la desoxycytosine qui inhibe la méthylation de l'ADN nouvellement synthétisé (296), favorise la dégradation protéosomale de la DNMT1 (297) et est associée avec une faible expression protéique de la DNMT1 et de la DNMT3b (298).

Cependant, de nombreux articles ont démontré l'altération des défenses antioxydantes par la méthylation de l'ADN dans des cas de cancer. En effet, le promoteur de la SOD2 apparaît hyperméthylé au niveau de la lignée cellulaire KAS6/1 humaine de myélome multiple (299), mais aussi au niveau des cellules épithéliales humaines de poumon A549. Cependant, les cellules de fibroblastes de poumon embryonnaire humain, MRC5, démontrent une hypométhylation de la SOD extracellulaire (300).

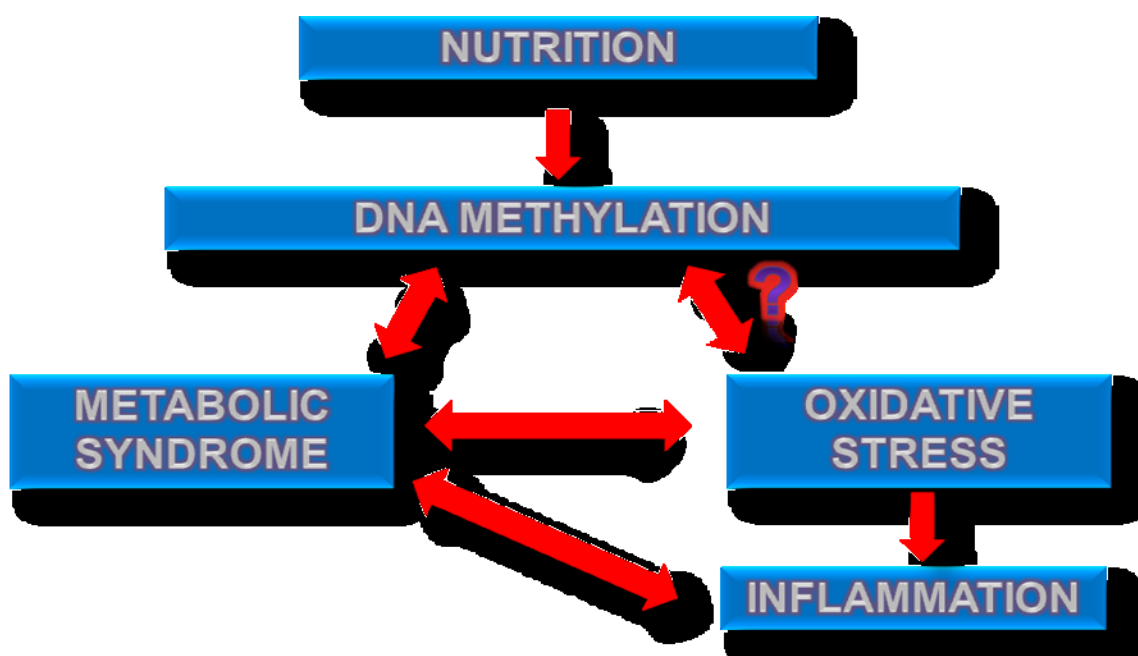
La GPx présente aussi des variations de méthylation pour ses différents isoformes puisque les enzymes GPx3 et GPx7 sont démontrées hyperméthylées dans les cancers, des altérations reversées par l'administration de 5-aza-2'-desoxycytidine (301-304). Le Nrf2, un facteur de transcription activant l'expression génique des enzymes antioxydantes de phase II fait également l'objet d'étude puisqu'il est démontré hyperméthylé chez des souris ayant un cancer de la prostate (305) tout comme la catalase (306). Finalement, le gène de la glutathion transférase I est hyperméthylé pour les lignées cellulaires RAJI et MEG-01.

La littérature démontre que l'épigénétique, plus particulièrement la méthylation de l'ADN, a la capacité d'altérer l'expression des gènes antioxydants tels que la SOD et la GPx ce qui pourrait conduire au stress oxydant, un processus majeur du syndrome métabolique. Toutefois, il existe quelques nutriments ayant l'aptitude d'influencer les niveaux de méthylation tels que les précurseurs du donneur de méthyles (folates, la méthionine et la vitamine B), les polyphénols comme le epigallocatechin 3-gallate du thé et la génistéine du soya (307-309), le sélénite (310), l'isothiocyanate (311) et le curcumin (305).

6. RÉSUMÉ ET PROBLÉMATIQUE

La littérature démontre que l'environnement nutritionnel prénatal ou postnatal peut influencer la méthylation de l'ADN de gènes impliqués dans l'obésité, le diabète de type II (DT2) ainsi que l'hypertension, et conduire au développement du syndrome métabolique. Bien que la méthylation de l'ADN apparaisse comme un processus majeur dans l'étiologie du syndrome métabolique, aucune étude ne s'est intéressée à la méthylation des gènes avant le développement du syndrome métabolique. Ainsi, la méthylation de l'ADN servirait de biomarqueur et aiderait à prévenir les complications du syndrome métabolique.

Par ailleurs, le syndrome métabolique est associé au stress oxydant en raison d'une diminution des défenses antioxydantes (Figure 11). Aucun mécanisme n'est encore proposé pour expliquer ces altérations. D'ailleurs, l'association entre le stress oxydant et le syndrome métabolique n'indique pas si le stress oxydant en est la cause ou la conséquence du syndrome métabolique. Il est fort probable que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, dont les niveaux sont contrôlés par la SOD et la GPx, soient centraux dans ce processus et puissent expliquer les phénotypes du syndrome métabolique. En effet, ils ont la capacité d'affecter les mécanismes épigénétiques et ainsi contribuer au développement du syndrome métabolique. Il est plausible que la méthylation de l'ADN soit responsable de ces dommages puisque l'ensemble de la littérature propose qu'une modification épigénétique des gènes SOD et GPx, très tôt dans la vie, puisse induire un stress oxydant et finalement le syndrome métabolique.



Yara *et al*, 2014

Figure 11 : Schéma de problématique. Relation entre la nutrition, la méthylation de l'ADN, le stress oxydant et l'inflammation dans le syndrome métabolique. L'environnement nutritionnel influe sur la méthylation de l'ADN de gènes essentiels et peut conduire au développement du syndrome métabolique. Le stress oxydant et l'inflammation sont deux composantes majeures du syndrome métabolique et il est possible que la méthylation d'ADN soit à l'origine de leurs développements.. Un processus réciproque est également possible.

II PROJET DE RECHERCHE

1. HYPOTHÈSE

La nutrition est la première cause du stress oxydant en début de vie et est impliquée dans la reprogrammation néonatale ainsi que dans le développement de pathologies comme le syndrome métabolique. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un stress oxydant, tôt dans la vie ou même plus tardivement, influence des mécanismes épigénétiques favorisant le maintien de ce stress et le développement de l'inflammation, durant toute la vie de l'individu. Plus précisément, ces mécanismes épigénétiques modifient l'expression de plusieurs gènes codant pour des molécules clés de la défense antioxydante pouvant se répercuter sur la balance oxydants/prooxydants ainsi que sur l'inflammation, deux facteurs impliqués dans le syndrome métabolique. La démonstration d'un tel processus pourrait mettre en évidence un nouveau mécanisme épigénétique relatif à la régulation du redox, mais aussi au développement de nouveaux outils pour le diagnostic précoce du syndrome métabolique.

2. OBJECTIFS PRINCIPAUX

Volet n°1 : Impact du stress oxydant sur l'épigénétique des défenses antioxydantes dans l'intestin

Les objectifs sont :

- 1) De vérifier si, *in vitro*, le stress oxydant qui sera quantifié à l'aide de l'indicateur malondialdéhyde et des marqueurs biologiques habituels associés à l'inflammation (cyclooxygénase-2, interleukine-6, NF-κB et IκB), altère les taux de méthylation de gènes intervenant dans la défense antioxydante, particulièrement ceux codant pour les SODs et la GPX; une perturbation de leur expression affecterait le maintien de la concentration intracellulaire de H₂O₂ ;
- 2) De valider l'association entre leurs activités protéiques ainsi que leurs expressions géniques avec les changements épigénétiques.

Plusieurs composés nutritionnels et pharmacologiques seront testés afin d'établir les mécanismes biochimiques impliqués tels que l'antioxydant Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E, et la 5'-Aza-2'-desoxycytidine, un agent intervenant dans la déméthylation de l'ADN.

Volet n°2 : Impact du stress oxydant de la nutrition parentérale (NP) sur l'épigénétique

La nutrition parentérale (NP) administrée à des cochons d'Inde sera utilisée comme un modèle *in vivo* de stress oxydant induit par la nutrition. En effet, ces solutions génèrent d'importantes quantités de peroxydes (312). Puisque la DNMT1 contient des cystéines sensibles au redox

(313;314), l'objectif sera de vérifier si les peroxydes de la NP induisent une hypométhylation de l'ADN en raison d'une inhibition oxydative de la DNMT.

Volet n°3 : Impact, chez la souris, du syndrome métabolique induit par une diète riche en gras et sucre (HFHS) et de l'inflammation induite par du LPS, sur le stress oxydant et l'épigénétique.

Une diète riche en gras et en sucre (HFHS) sera administrée à des souris pendant 4, 6, 8 et 12 semaines pour induire un syndrome métabolique qui sera évalué en mesurant le poids corporel, la glycémie, l'insulinémie et les lipides. D'un autre côté, des souris recevront du lipopolysaccharide (LPS) afin d'induire de l'inflammation. Les objectifs sont donc de vérifier si la diète HFHS ainsi que le LPS sont associés :

- 1) À de l'inflammation (cyclooxygénase-2, TNF- α , NF- κ B et I κ B);
- 2) À un stress oxydant (malondialdéhyde, acides gras, activités antioxydantes);
- 3) À des altérations mitochondriales (Bcl-2, Nrf-2, cytochrome C, mtRNA polymérase, PGC-1 α);
- 4) À des changements épigénétiques.

Le composé pharmacologique, GFT505, un dual agoniste de PPAR α et PPAR δ , sera également évalué afin d'identifier les mécanismes biochimiques impliqués.

3. ARTICLES SCIENTIFIQUES

3.1. Article 1

Sabrina Yara, Jean-Claude Lavoie, Jean-François Beaulieu, Edgard Delvin, Devendra Amre, Valerie Marcil, Ernest Seidman and Emile Levy. Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *Plos One*. 2013; 8(5): e63456.

3.1.1. Apport original et contribution

Cet article confirme que le stress oxydant et l'inflammation induits par le complexe fer-ascorbate sont associés à des changements épigénétiques de la défense antioxydante et que l'ajout de 5-Aza-2'-deoxycytidine, un agent déméthylant, et/ou de l'antioxydant Trolox antioxydant prévient ces effets.

En tant que premier auteur ma contribution a été majeure. En effet, sous la supervision du Dr Levy, j'ai participé aux choix et à la réalisation des expériences, mais aussi à la rédaction et la révision de l'article. Le Dr Beaulieu a fourni les cellules Caco-2/15 en plus de contribuer aux discussions des mécanismes. Les autres coauteurs (Dr Lavoie, Dr Delvin, Dr Amre, Dre Marcil et Dr Seidman) ont contribué par leurs commentaires ainsi que leurs suggestions, et ont participé à la révision du manuscrit.

Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation

Sabrina Yara¹, Jean-Claude Lavoie², Jean-François Beaulieu³, Edgard Delvin⁴, Devendra Amre², Valerie Marcil⁵, Ernest Seidman^{5,3} and Emile Levy^{1,3}

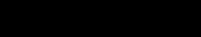
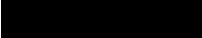
Research Centre, CHU-Sainte-Justine, Departments of ¹Nutrition, ²Pediatrics and ⁴Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

³Canadian Institutes for Health Research Team on the Digestive Epithelium, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

⁵Research Institute, McGill University, Campus MGH, C10.148.6, Montreal, Quebec, Canada, H3G 1A4

Keywords: Intestine, oxidative stress, inflammation, DNA methylation, iron-ascorbate, Trolox, 5-Aza-2'-deoxycytidine, antioxidants

Address of correspondence:

*Dr. Emile Levy
Research Center
CHU Sainte-Justine
3175 Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5
Tel.: 
Fax: *

ABSTRACT

The gastrointestinal tract is frequently exposed to noxious stimuli that may cause oxidative stress, inflammation and injury. Intraluminal pro-oxidants from ingested nutrients especially iron salts and ascorbic acid frequently consumed together, can lead to catalytic formation of oxygen-derived free radicals that ultimately overwhelm the cellular antioxidant defense and lead to cell damage. **Hypothesis:** Since the mechanisms remain sketchy, efforts have been exerted to evaluate the role of epigenetics in modulating components of endogenous enzymatic antioxidants in the intestine. To this end, Caco-2/15 cells were exposed to the iron-ascorbate oxygen radical-generating system. **Results:** Fe/Asc induced a significant increase in lipid peroxidation as reflected by the elevated formation of malondialdehyde along with the alteration of antioxidant defense as evidenced by raised superoxide dismutase 2 (SOD2) and diminished glutathione peroxidase (GPx) activities and genes. Consequently, there was an up-regulation of inflammatory processes illustrated by the activation of NF- κ B transcription factor, the higher production of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 as well as the decrease of I κ B. Assessment of promoter's methylation revealed decreased levels for SOD2 and increased degree for GPx2. On the other hand, pre-incubation of Caco-2/15 cells with 5-Aza-2'-deoxycytidine, a demethylating agent, or Trolox antioxidant normalized the activities of SOD2 and GPx, reduced lipid peroxidation and prevented inflammation. **Conclusion:** Redox and inflammatory modifications in response to Fe/Asc -mediated lipid peroxidation may implicate epigenetic methylation.

INTRODUCTION

Reactive Oxygen Species (ROS) are by-products of normal aerobic metabolism. Various studies have evidenced their effectiveness as important signaling molecules that modulate gene expression, cell growth and survival, as well as oxygen sensing in various cell types [1,2]. However, their excessive formation leads to lasting oxidative stress (OxS), characterized by an imbalance between oxidant-producing systems and antioxidant defense mechanisms, which can trigger cell damage by oxidizing macromolecular structures (lipids, proteins and DNA) and causes cell death [3]. Thus, depending on their cell concentrations, ROS can act as either beneficial or harmful biological agents that contribute to the development of chronic diseases, including osteoporosis, type 2 diabetes, neurodegenerative, cardiovascular disorders, and cancer [4].

Normally, cells struggle to efficiently remove ROS in order to avoid deleterious effects. To this end, several enzymes metabolize reactive species and their byproducts, thereby reducing OxS. For example, the superoxide dismutase enzyme (SOD) acts as an endogenous cellular defense system that converts superoxide anion into oxygen and hydrogen peroxide, with the latter being further detoxified by catalase and glutathione peroxidase (GPx). Variation in their genes may impact their enzymatic antioxidant activity and, thus, the ability to scavenge, neutralize and remove reactive species, to inhibit oxidative chain reactions, chelate reactive metals and repair damage to biological molecules. For example, single nucleotide polymorphisms in genes that code for endogenous antioxidant enzymes or proteins involved in dietary antioxidant uptake and utilization may have a direct impact on the ability to manage OxS and prevent subsequent disease development in humans [5–7]. Individual genetic

variation may also influence dietary antioxidant status in a fashion of gene-diet interactions and, consequently, the body's ability to manage OxS [8].

Recent data in the turning on/off of genes and gene regulation in organism proteins have converged with the discoveries of epigenetic mechanisms. In fact, epigenetic modifications of DNA alter gene expression profiles, and phenotypes as well as portions of the DNA that are transcribed can be turned on or off depending on the epigenetic modifications physically acting at specific loci of the genome. It has already been demonstrated that environmental exposures, such as diets, tobacco and alcohol use, physical activity, OxS and exposure to chemical carcinogens can influence the epigenome [9–11]. Although the information is still very limited, it seems that the endogenous antioxidants are not immune to this type of regulation. Notably, SOD2 transcriptional activity may be controlled at least in part via epigenetic mechanisms at different stages in the development of human cancer by processes that include histone methylation, histone acetylation and DNA methylation [12,13]. Similarly, hypermethylation of GPx promoter is frequently observed in a wide spectrum of human malignancies [14].

Growing attention is being paid to the implication of OxS in various intestinal disorders. Marked increase of ROS may contribute to disruption of the intestinal epithelial barrier and the subsequent development of systemic inflammation by enabling influx of endotoxin and other noxious luminal contents into the systemic circulation as it is the case for chronic kidney disease [15], cystic fibrosis [16] and inflammatory bowel diseases [17]. Mucosal antioxidant defense is altered as very often evidenced by attenuated redox status that contributes to disease progression and exacerbation of the pathological states [18]. Accordingly, obesity- and diabetes-associated inflammation and intestinal lipoprotein overproduction may be related to

local OxS involving weak antioxidant defense [19,20]. Under all these pathophysiological conditions, a substantial lowering was recorded in endogenous antioxidants, including SODs and GPx [16,21–23]. In light of these numerous findings, understanding the regulation of intestinal endogenous enzymatic antioxidants is of the utmost importance since they provide solid protection against stress-induced diseases. In particular, it has not been established whether OxS alters the antioxidant status by acting on the epigenetic machinery, more specifically the DNA-methylation pathway. To tackle this issue, we evaluated how the iron-ascorbate (Fe/Asc) oxygen radical-generating system modulated SOD2 and GPx enzymes in the Caco-2/15 cell line, a reliable human intestinal model. We examined whether regulatory changes in SOD2 and GPx2 expression are attributable to epigenetic mechanisms. Evidence for the contribution of methylation of cytosines within CpG sites in their DNA was tested by measuring their activities and by using the demethylation agent 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-AZA).

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and treatments

The human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cell line, a stable clone of the parent Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD), was obtained from Dr. JF Beaulieu (Department of Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada). Caco-2/15 cells were grown at 37°C with 5% CO₂ in minimal essential medium (MEM) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY) containing 1% penicillin-streptomycin, 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL) and supplemented with 10% decompemented fetal bovine serum (FBS) (Flow, McLean, VA) as described previously [24–27]. Caco-2/15 cells (passages 20-25) were maintained in T-75 cm² flasks (Corning Glass Works, Corning, NY) and were split (1:5) when they reached 80-90% confluence by using 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO-BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of 5×10^5 cells/well on 6-well plate with flat bottom (Costar, Cambridge, MA), in MEM containing 10% FBS and grown for 2 days. Before exposure to Fe/Asc (200 μ M/2 mM) for 6 h at 37°C, Caco-2/15 cells were pre-incubated with 0.25 mM 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), with ethanol as a vehicle, for 24 h. Four experimental cell groups were considered: control (with 0.25 mM ethanol as a vehicle), Fe/Asc (to induce OxS), Trolox (as antioxidant) and Trolox + Fe/Asc (to assess the direct contribution of OxS via its neutralisation by the antioxidant). For the studies of DNA methylation, Caco-2/15 cells were pre-incubated with 5-AZA at a concentration of 10 μ M [28] for 54 h [28,29], and 5 experimental cell groups were established: control (with ethanol as a vehicle), 5-AZA (to preclude methylation), Fe/Asc+5-AZA (to prevent

methylation in the presence of OxS), Trolox+5-AZA (to evaluate the combined effect of antioxidant and demethylating agent), and Fe/Asc+Trolox+5-AZA (to evaluate the combined effect of antioxidant and demethylating agent in the presence of OxS).

Cellular viability assays

Cellular proliferation and viability were evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT, Sigma) assay. At the end of cell incubation, the medium was aspirated and replaced with an MTT solution (0.5 mg/mL) and cells were incubated for 2 h at 37°C with 5% CO₂ to allow MTT oxidation by the succinate dehydrogenase enzyme in viable cells. The MTT solution was then aspirated and 500 µl of dimethyl sulfoxide was added to each well to dissolve the resulting blue formazan crystals. The absorbance was measured at 535 nm with DMSO as a blank.

Lipid peroxidation markers

Lipid peroxidation was estimated by measuring the release of free malondialdehyde (MDA) from Caco-2/15 cells in the culture medium by HPLC as described previously [24–26]. Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate solution (Sigma). The protein-free supernatants then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/v) thiobarbituric acid solution (Sigma) at 95°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(thiobarbituric acid) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a potassium dihydrogen phosphate-methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA determination by HPLC with fluorescence detection.

Western Blotting

To determine the protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), I κ B, nuclear factor- κ B (NF- κ B) and interleukin (IL)-6, Caco-2/15 cells were collected in mammalian protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) containing a mixture of antiproteases (Roche Diagnostics, Laval, QC). Cells were sonicated (five burst) and centrifuged at 15,000 x g for five minutes at 4°C and the supernatant was transferred to a fresh tube. The protein concentration of each sample was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Mississauga, ON). Proteins (30 μ g) were denatured at 95°C for 5 min in sodium dodecyl sulfate (SDS), dithiothreitol and β -mercaptoethanol-containing sample buffer, separated on a 12% gradient SDS/PAGE, and electroblotted onto Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham) in 192 mM glycine and 25 mM Tris-base. Membranes were then blocked for 60 min at room temperature with solution containing 50 mM Tris-base, 150 mM sodium chloride (NaCl), 0.1% Tween and 5% non-fat dry milk. The different primary antibodies were added as follow: 1:1000 rabbit anti-COX-2 (74 kDa; Novus, Oakville, ON), 1:5000 goat anti-NF- κ B (65 kDa; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 1:5000 rabbit anti-I κ B α (39 kDa; Cell signaling, Beverly, MA) and 1:500 mouse anti-IL-6 (25 kDa; R&D Systems, Minneapolis, MN). After overnight incubation, species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) were added for 1 h at room temperature to detect the primary antibodies. The β -actin protein expression was determined to confirm equal loading (Fermentas, Glen Burie, Maryland). Protein mass was quantified using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and the UN-SCAN-IT gel 6.1 software.

Enzymatic activity of endogenous antioxidant enzymes

The activities of SOD2, GPx and G-Red was measured as described previously [26]. Briefly, Caco-2/15 cells were harvested in hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM PMSF). Total SOD2 activity was determined as described by McCord et al [30]. Briefly, superoxide radicals (O₂⁻) were generated by the addition of xanthine and xanthine oxidase, and oxidation of the SOD assay cocktail was followed using a spectrophotometer at 550 nm for 5 min. The same reaction was repeated with addition of the sample, and the SOD assay cocktail was less oxidized because of the SOD activity in the sample. Total SOD activity was then calculated in the presence or absence of potassium cyanide (1 mM) that allows defining the contribution of MnSOD activity.

For GPx activity, aliquots of cell homogenates were added to a PBS buffer containing 10 mM GSH, 0.1 U of G-Red, and 2 mM NADPH with 1.5% H₂O₂ to initiate the reaction. Absorbance was monitored every 30 s at 340 nm for 5 min.

For G-Red activity, cell homogenates were added to a PBS buffer containing 2 mM NADPH and 10 mM GSSG to initiate the reaction. Absorbance was monitored every 30 s at 340 nm for 5 min.

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted from Caco-2/15 cells using TRIzol reagent (Invitrogen), and its amount was determined by spectrophotometer. Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) was used to obtain cDNA according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription lasted 50 min at 37°C, and a quantity of 1 µg total RNA was added in each reaction.

Determination of mRNA by PCR

cDNA was amplified by PCR using a *Taq* polymerase (Feldan Bio, Quebec, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 20–28 cycles of amplification were used at 95°C for 30 s, annealing temperature for 30 s, and 72°C for 30 s. The primers used for the SOD2 amplification were: sense primer 5'-CGACCTGCCCTACGACTACG-3' and antisense primer 5'-TGACCACCACCATTGAACTT-3'. Annealing temperature was 58°C and 22 cycles were used to obtain amplicon (198 bp). The primers used for the GPx amplification were: 5'-TTCGCTCTGAGGCACAACC-3' and antisense primer 5'-ACAGGGCTCCAAATGATGAG-3'. Annealing temperature was 58°C and 28 cycles were used to obtain amplicon (151 bp). PCR was performed using the UNO II thermocycler (Biometra). Amplicons were visualized on standard ethidium bromide-stained agarose gels. The number of amplification cycles corresponds to the linear portion of the exponential phase, as determined in preliminary experiments. Fold induction was calculated using GAPDH as a housekeeping gene, and quantification was determined with the software UN-SCAN-IT gel 6.1.

Genomic DNA isolation and bisulfite modification

DNA was isolated and modified (unmethylated cytosines) employing the EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, Irvine, CA) according to the manufacturer's instructions.

Polymerase chain reaction of bisulfite-treated DNA

Two sequential PCRs were performed to amplify the modified DNA fragments of interest [31,32]. 1 µl of modified DNA was used in the first PCR (a) and 1 µl of PCR product was used in the subsequent PCR (b). The primers used for the SOD2 amplification were: sense primer 5'-GTA TTT TTA GGG G[C/T]G GAT [C/T]GG AGG TAG GGT TT-3' and antisense primer 5'-CCA AAC CC[A/G] ATA C[A/G]A CCA CTA TC[A/G] CCA TTA C-3', sense primer 5'-GGG T[C/T]G TAT TAA TTT TA[C/T] GGG GGT AGG GGT-3' and antisense primer 5'-AAC CCC TTA CCC CTT AAA AC[A/G] TAA CC[A/G] AAT CCC-3'. Conditions for the first PCR (a) were: initial enzyme activation at 95°C for 5 min followed by 35 cycles at 94°C 1 min for denaturation, annealing at 55°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 10 min. For the second PCR (b), the same conditions were used. The PCR reaction of 50 µl contained 10 x CoralLoad PCR buffer (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada), 25 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each primer and 2.5 units HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada).

A volume of 1 µl of modified DNA and the following primers were used for GPx2 promoter amplification. Sense primer 5'-GAG AAG AA[C/T] GTG AAT AGG AAT PGX2-3' and antisense primer 5'-CA ATA AAA ACC ATA ATA AAA C[A/G]C-3'. PCR conditions and reactions were the same as those described above except the annealing temperature that was 54°C.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean ± SEM. The data were analysed by ANOVA with Prism 5.01 (GraphPad Software) and the differences between the means were assessed post-hoc using Tukey's test.

RESULTS

Cellular viability following various treatments

Caco-2/15 cell viability was not affected by the addition of the various treatments. Therefore, it could be concluded that our experimental conditions, including the use of Fe/Asc, 5'-AZA or combination of both, did not exert any cytotoxic effects on Caco-2/15 cells following a 6h-incubation (Figure 1).

Malondialdehyde production following Fe/Asc treatment

Before evaluating the impact of OxS on various cellular processes, we assessed the effectiveness of Fe/Asc in initiating lipid peroxidation after incubation with Caco-2/15 cells. At the end of a 6h-culture period, the degree of lipid peroxidation was determined by measuring MDA in cells. As illustrated in Figure 2, Fe/Asc induced a significant increase in MDA levels above baseline values compared with control cells. The concentration of MDA was 20-fold higher in cells supplemented with Fe/Asc compared to untreated cells. Pre-incubation with the strong antioxidant Trolox markedly limited the production of MDA and displayed the ability to maintain MDA concentration near baseline values, providing direct evidence for the ability of the Fe/Asc system to provoke profound lipid peroxidation.

Inflammation induction in response to Fe/Asc exposition

Since inflammation and OxS are closely associated, we examined the protein expression of NF- κ B, a powerful transcription factor endowed with the high capacity to activate the inflammatory pathway. We also assessed the protein expression of I κ B that prevents NF- κ B

translocation to nucleus for transcription activation of pro-inflammatory genes. Western Blot analysis revealed a marked rise of NF- κ B protein (Figure 3A) and decrease of I κ B (Figure 3B) protein expression following incubation of Caco-2/15 cells with Fe/Asc. Consequently, the NF- κ B/I κ B protein ratio was higher (Figure 3C) in experimental cells in comparison with control cells. Nevertheless, pre-incubation with Trolox restored both of them to control levels. As expected from the NF- κ B data, measurement of the cytokine IL-6, a pro-inflammatory component produced by cells in response to injury, revealed the same trend of increase (Figure 4A). We finally noted in Caco-2/15 cells, incubated with Fe/Asc, higher levels of COX-2 (Figure 4B), a highly regulated enzyme that catalyzes the production of prostaglandins under pathologic conditions. COX-2 values returned to normal with the administration of Trolox (Figure 4B). Overall, these results provide direct evidence for the ability of the Fe/Asc system to provoke not only lipid peroxidation, but also inflammation in intestinal epithelial cells.

Profile of endogenous antioxidants following Fe/Asc administration

Since cells have developed an enzymatic antioxidant pathway against free radicals and ROS, which are generated during oxidative metabolism, we first measured the activity of SOD2 that converts superoxide anion to hydrogen peroxide. The treatment of Caco-2/15 cells with Fe/Asc led to a significant elevation of the SOD2 activity (Figure 5A). Addition of the antioxidant Trolox cancels the effects of Fe/Asc. The next experiments aimed to assess the anti-oxidative response of GPx, an important enzyme that catalyzes the conversion of hydrogen peroxide to water. The addition of Fe/Asc to Caco-2/15 cells induced a significant decrease in GPx activity (Figure 5B). Addition of the antioxidant Trolox cancels the effects of Fe/Asc. We finally measured glutathione reductase (GR) that reduces glutathione disulfide to

the sulfhydryl form. No significant changes were found when Caco-2/15 cells were treated with Fe/Asc (Figure 5C).

SOD2 and GPX gene expression following Fe/Asc exposition

The mRNA expression of antioxidant genes SOD and GPX was analyzed to determine whether it presented the same trend as the enzymatic activities. The treatment of Caco-2/15 cells with Fe/Asc led to a significant elevation of the SOD2 transcript (Figure 6A) and marked decrease of the GPx transcript (Figure 6B). Addition of the antioxidant Trolox suppressed the modulatory effects of Fe/Asc.

SOD2 and GPX2 promoter methylation following Fe/Asc exposition

As Fe/Asc induced a rise in SOD2 activity in Caco-2/15 cells, we sought to investigate whether potential mechanisms implicate DNA methylation. Exposure of Caco-2/15 cells to Fe/Asc oxygen radical-generating system decreased methylation of the SOD2 promoter (44 % less compared to controls). Pre-incubation with Trolox before the addition of Fe/Asc almost maintained the SOD2 promoter methylation at the level of controls (Figure 7A). Conversely, GPx₂ promoter was more methylated when Caco-2/15 cells were treated with Fe/Asc (18 % more compared to controls). Once again, Trolox prevented the increase in the GPX₂ promoter methylation caused by the addition of Fe/Asc (Figure 7B). These results demonstrate that Fe/Asc-mediated OxS alters DNA methylation modulation of SOD2 and GPx2 genes in opposite fashion.

Reactivation of SOD2 and GPx2 expression after treatment with 5-Aza-2'-deoxycytidine

We treated Caco-2/15 cells with 5-AZA, a strong demethylating agent to determine whether the activity of SOD2 and GPx2 as well as their DNA methylation, could be reactivated. As shown in Figures 5D and 5E, the activity of both enzymes was re-established at the same level of control cells after treatment with 5-AZA. In parallel, 5-AZA restored gene expression (Figures 6C and 6D) and the DNA methylation (Figures 7C and 7D) of these antioxidants and counteracted all the Fe/Asc effects. Moreover, it resulted in the substantial reduction of MDA, but without a complete neutralization of lipid peroxidation (Figure 2), the prevention of NF- κ B increase (Figure 3D) and I κ B decrease (Figure 3E) protein expression as well as in normalization of NF- κ B/ I κ B ratio (Figure 3F), IL-6 and COX-2 protein expression (Figures 4C and 4D). Interestingly, the combination of Trolox and 5-AZA was more effective in reducing MDA levels (Figure 2).

DISCUSSION

Lipid peroxides are a major source of dietary oxidants of mutagenic or carcinogenic potential that are of nutritional and toxicological importance [33,34]. In addition, the intestine is exposed to intraluminal oxidants from catalase-negative bacteria to oxidase-producing desquamated cells (e.g. xanthine oxidase) that amplify the generation of free radicals, and to hypothiocyanous acid-containing saliva (formed from the interaction between salivary peroxidases with H_2O_2 and thiocyanate), which may increase luminal reactive oxygen metabolite content [35,36]. Clearly, the ingestion and/or occurrence of peroxides may have implications for human health, particularly in the long term since they may cause transient or permanent damage to cellular constituents, including nucleic acids, proteins, lipids, and membranes [37–39]. By virtue of their ability to generate oxyradicals, lipid peroxides are able to initiate degenerative processes and promote digestive system disorders, such as inflammation and cancer [40,41]. The presence of potent cellular detoxification systems minimizes radical generation, terminates radical processes, and repairs damaged macromolecules [42]. Nevertheless, the mechanisms involved in these metabolic derangements remain obscure and warrant further studies. In the present investigation, we succeeded in achieving a reliable model of cellular lipid peroxidation and inflammation using Caco-2/15 cells and Fe/Asc oxygen radical-generating system that modified the activity of SOD2 and GPx enzymes. Scrutiny in the molecular mechanisms revealed the regulatory action of epigenetic mechanisms that functionally changed methylation of promoter CpG islands of *SOD* and *GPx* genes. The use of the Trolox and 5-AZA, as antioxidant and demethylating agents, respectively, confirmed the implication of lipid peroxidation and epigenetics processes since they alleviated MDA and methylation magnitude while limiting inflammatory extent.

To evaluate the influence of lipid peroxidation on the antioxidant defense in the current study, we used the Caco-2/15 cell line that spontaneously differentiates into polarized mature enterocytes, expresses several morphological and functional characteristics of the small intestine under standard culture conditions, and lends itself to the *in vitro* study of human gut in view of its efficient intestinal transport processes [25,43–46]. Caco-2/15 cell monolayers have been, by far, the most utilized cell model to predict the flux of drugs across human small intestinal tissue [47,48]. They have also been demonstrated to be extremely useful for the screening of antioxidant defense, OxS, inflammation and intestinal barrier as highlighted by various groups [49–51] and our own laboratory [25–27,52]. The Caco-2/15 cells develop structural characteristics like those of a small intestinal enterocyte epithelium [53] and share functional similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption [54], providing an alternative to the use of other intestinal models [55]. In order to induce robust lipid peroxidation, we used the complex of iron-ascorbate, since iron causes oxidative damage to biological macromolecules, alters the intracellular redox environment and is involved in numerous pathological states [25,56–60], whereas ascorbic acid can amplify the oxidative potential of iron by promoting metal ion-induced lipid peroxidation [61]. It is noteworthy that the iron dose used in the current study is comparable with normal iron concentration in the gut [62]. We have extensively used iron/ascorbate as a strong oxygen-radical generating system in our previous studies. To provide only few examples, we could document the ability of these combined molecules to (i) initiate sturdy lipid peroxidation in native cell membranes thereby affecting regulatory enzymes [63]; (ii) disturb the assembly and secretion of lipoproteins, thereby resulting in abnormal lipid transport [61,64]; (iii) provoke inflammatory reactions in intestinal cells [65]; (iv) induce various dysregulations [24–26,66]; and (v) produce harmful

effects on mitochondrial function and DNA integrity [27]. Before performing many of these studies, we examined the impact of Fe/Asc on lipid peroxidation as a function of concentration and incubation periods [65]. In addition, relevant studies from our laboratory demonstrated that a 6h-period is sufficient to induce inflammation by Fe/Asc [26,27,52]. The deteriorations resulting from the exposure of Caco-2/15 cells to Fe/Asc are probably attributable to OxS, because the addition of the Trolox antioxidant simultaneously alleviated, without totally preventing, the occurrence of lipid peroxidation along with inflammation relief. Trolox was selected as an antioxidant because it represents a powerful agent inhibiting iron-mediated OxS and does not have any toxic effects on Caco-2/15 cell culture [67]. However, the incomplete neutralization of lipid peroxidation may be due to the insufficient efficiency of Trolox to scavenge the diversity of free radicals.

Since NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor that can be altered by OxS, we tested the expression of its subunits. We found that upon Fe/Asc -mediated lipid peroxidation, Caco-2/15 cells exhibited an activation of NF- κ B in view of the increased expression of the p50/p65 heterodimer and decreased expression of I κ B. In intestinal epithelial cells, the inflammatory response is largely controlled through regulation of the transcription nuclear factor NF- κ B, which exists primarily in the cytosol as a p50/p65 heterodimer complexed with its inhibitor protein I κ B. Activation of the I κ B kinase complex by numerous stimuli leads to the phosphorylation of I κ B, causing its dissociation from the NF- κ B heterodimer and subsequent degradation by the proteasome. Loss of I κ B reveals a nuclear localization sequence on the NF- κ B heterodimer that allows its rapid translocation to the nucleus and facilitates transcription of pro-inflammatory proteins [68]. In our experiments, the pro-oxidant Fe/Asc system was capable of decreasing I κ B protein expression directly in line with the hypothesis that the

release and translocation of p50/p65 heterodimer to the nucleus take place, which may trigger the trans-activation of the inflammatory IL-6 gene. Apparently, Fe/Asc-mediated lipid peroxidation led to amplification of the inflammatory response in Caco-2/15 cells given the activation of COX-2 that catalyzes the formation of prostaglandins from arachidonic acid and is found in high levels in inflammatory state [69,70].

We reasoned that excessive lipid peroxidation caused by Fe/Asc treatment in Caco-2/15 overwhelmed the antioxidant defense. Indeed, we noted activity stimulation of SOD2, the antioxidant defense that catalyzes the dismutation of the superoxide radical into hydrogen peroxide, which is generally converted to water by GPx. Our experiments showed an up-regulation of SOD2 activity along with a down-regulation of GPx while GR activity remained unchanged. Validation was obtained by RT-PCR that reveals the same trend of mRNA expression, suggesting an upstream transcriptional regulation. Of note, previous studies have reported that H₂O₂ accumulation could inhibit GPx [71], activate kinases capable of phosphorylating IKB, and promote the translocation of NF-κB components (i.e. p65, p50, p52) to the nucleus where they bind DNA promoters and trigger transcription [72]. In view of our findings related to mRNA elevation and available literature, one may posit that NF-κB activates SOD transcription [73]. GR activity remained unchanged probably because oxidized glutathione, which is the product generated by GPx, is reduced [74]. Our further studies illustrated the hypomethylation of the SOD2 promoter as well as the hypermethylation of the GPx2 promoter in Caco-2/15 cells exposed to Fe/Asc. Interestingly, we detected both hypomethylation and hypermethylation in our cellular model just as has been reported in tumors characterized by the paradoxical co-presence of local and global DNA hypomethylation together with the regional hypermethylation of certain genes [75]. Similar

situations were noted following short-term arsenic-exposed newborns, which resulted in a significant global hypomethylation and p53 hypermethylation [76]. Moreover, early overfeeding altered DNA methylation patterns of hypothalamic promoter regions: neuropeptide Y was methylated at low levels whereas the main anorexigenic neurohormone, proopiomelanocortin showed hypermethylation [77]. How this methylation imbalance evolves remains puzzling. It was hypothesized that chromatin structure changes occur during oncogenesis that predisposes to both demethylation and *de novo* methylation [78]. Additional studies are necessary to clarify this fascinating issue.

DNA methylation is controlled by DNA methyltransferase (DNMT), an enzyme that catalyzes the transfer of a methyl moiety from S-adenosyl-1-methionine to the 5-position of cytosines in the CpG dinucleotide [79]. In the present investigation, we employed the nucleotide analogue 5-AZA that inhibits the methylation of newly synthesis of DNA [80,81], favors the proteasomal degradation of DNMT1 [82], and is associated with lower level of DNMT1 and DNMT3a protein expression [83]. The incubation of Caco-2/15 cells with 5-AZA led to the reduction, but not fully, of MDA levels which is enough to prevent NF- κ B, COX-2, and IL-6 expressions. In addition, it increased I κ B and reestablishing the enzymatic activity and gene expression of SOD2 and GPx2 by restoring DNA methylation. Our observations are in line with the studies reporting that 5-AZA had the capacity to normalize Keap1, a cytoplasmic anchor for nuclear factor E2-related factor 2, a transcription factor that induces most of the antioxidant enzymes [84]. Moreover, a number of reports indicated that 5-AZA altered DNA binding activation of NF- κ B in macrophage [85], reversed inflammation (COX-2) in Epstein-Barr Virus-positive gastric epithelial cells [86] and inhibited IL-6 in a cohort of ulcerative colitis patients with varying degrees of dysplasia [87]. These observations can explain why

Fe/Asc/5-AZA group does not generate inflammation, despite the high residual OxS. In conclusion, our studies indicate that the Fe/Asc oxidant stress system leads to changes in SOD2 and GPx activities that are associated with epigenetic changes in promoter DNA methylation, and stimulation of inflammation markers. Further studies are needed to determine the role of this mechanism in different intestinal complex diseases, especially since important recent advances in epigenetics research have indicated that the loss of SOD2 activity itself may contribute to change in epigenetic regulation, establishing a vicious cycle driving further epigenetic instability [88].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Richard Montparler for giving 5-AZA and Mrs Schohraya Spahis for her technical assistance.

REFERENCES

1. Brown DI, Griendling KK (2009) Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 47: 1239-1253.
2. Gillespie MN, Pastukh V, Ruchko MV (2009) Oxidative DNA modifications in hypoxic signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1177: 140-150.
3. Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nat Med* 10 Suppl: S18-S25.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M et al. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
5. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA (1996) On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4471-4473.
6. Hansen RD, Krath BN, Frederiksen K, Tjonneland A, Overvad K et al. (2009) GPX1 Pro(198)Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, interaction with alcohol consumption and smoking, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res* 664: 13-19.
7. Nadif R, Mintz M, Jedlicka A, Bertrand JP, Kleeberger SR et al. (2005) Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli. *Free Radic Res* 39: 1345-1350.
8. Da Costa LA, Garcia-Bailo B, Badawi A, El-Sohemy A (2012) Genetic determinants of dietary antioxidant status. *Prog Mol Biol Transl Sci* 108: 179-200.
9. Choudhuri S, Cui Y, Klaassen CD (2010) Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. *Toxicol Appl Pharmacol* 245: 378-393.

10. Korkmaz A, Oter S, Seyrek M, Topal T (2009) Molecular, genetic and epigenetic pathways of peroxynitrite-induced cellular toxicity. *Interdiscip Toxicol* 2: 219-228.
11. Mathers JC, Strathdee G, Relton CL (2010) Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. *Adv Genet* 71: 3-39.
12. Hitchler MJ, Oberley LW, Domann FE (2008) Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* 45: 1573-1580.
13. Cyr A, Hitchler MJ, Domann F (2012) Closing the epigenetic loop in redox biology: Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation. *Antioxid Redox Signal* .
14. Chen B, Rao X, House MG, Nephew KP, Cullen KJ et al. (2011) GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Lett* 309: 37-45.
15. Vaziri ND (2012) CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* .
16. Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, Berthiaume Y, Poitout V et al. (2009) Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev* 30: 153-177.
17. Okayasu I (2012) Development of ulcerative colitis and its associated colorectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammation-carcinoma sequence. *Pathol Int* 62: 368-380.

18. Circu ML, Aw TY (2011) Redox biology of the intestine. *Free Radic Res* 45: 1245-1266.
19. Ozkaya D, Naziroglu M, Armagan A, Demirel A, Koroglu BK et al. (2011) Dietary vitamin C and E modulates oxidative stress induced-kidney and lens injury in diabetic aged male rats through modulating glucose homeostasis and antioxidant systems. *Cell Biochem Funct* 29: 287-293.
20. Sefi M, Fetoui H, Lachkar N, Tahraoui A, Lyoussi B et al. (2011) Centaurium erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *J Ethnopharmacol* 135: 243-250.
21. Karatug A, Sacan O, Coskun ZM, Bolkent S, Yanardag R et al. (2012) Regulation of gene expression and biochemical changes in small intestine of newborn diabetic rats by exogenous ghrelin. *Peptides* 33: 101-108.
22. Zhu H, Li YR (2012) Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med (Maywood)* 237: 474-480.
23. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW (2003) Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 201: 28-36.
24. Precourt LP, Seidman E, Delvin E, Amre D, Deslandres C et al. (2009) Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1628-1637.
25. Marcil V, Seidman E, Sinnott D, Boudreau F, Gendron FP et al. (2010) Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte

- nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 285: 40448-40460.
26. Precourt LP, Marcil V, Ntimbane T, Taha R, Lavoie JC et al. (2012) Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G623-G634.
 27. Taha R, Seidman E, Mailhot G, Boudreau F, Gendron FP et al. (2010) Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One* 5: e11817.
 28. Fatima N, Schooley JF, Jr., Claycomb WC, Flagg TP (2012) Promoter DNA methylation regulates murine SUR1 (Abcc8) and SUR2 (Abcc9) expression in HL-1 cardiomyocytes. *PLoS One* 7: e41533.
 29. Zhang JF, Zhang JG, Kuai XL, Zhang H, Jiang W et al. (2013) Reactivation of the homeotic tumor suppressor gene CDX2 by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation inhibits cell proliferation and induces caspase-independent apoptosis in gastric cancer cells. *Exp Ther Med* 5: 735-741.
 30. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
 31. Hodge DR, Peng B, Pompeia C, Thomas S, Cho E et al. (2005) Epigenetic silencing of manganese superoxide dismutase (SOD-2) in KAS 6/1 human multiple myeloma cells increases cell proliferation. *Cancer Biol Ther* 4: 585-592.
 32. Thaler R, Karlic H, Rust P, Haslberger AG (2009) Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr* 101: 743-749.

33. Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.
34. Kinlen LJ (1983) Fat and cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286: 1081-1082.
35. Parks DA (1989) Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 30: 293-298.
36. Parks DA, Williams TK, Beckman JS (1988) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol* 254: G768-G774.
37. Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard JY (2012) Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *J Antimicrob Chemother* 67: 1589-1596.
38. Li RG, Li TT, Hao L, Xu X, Na J (2009) Hydrogen peroxide reduces lead-induced oxidative stress to mouse brain and liver. *Bull Environ Contam Toxicol* 82: 419-422.
39. Williams MV, Lee SH, Pollack M, Blair IA (2006) Endogenous lipid hydroperoxide-mediated DNA-adduct formation in min mice. *J Biol Chem* 281: 10127-10133.
40. Grisham MB, Granger DN (1988) Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 33: 6S-15S.
41. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN (1983) Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 94: 415-422.
42. Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
43. Levy E, Mehran M, Seidman E (1995) Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 9: 626-635.
44. Grenier E, Maupas FS, Beaulieu JF, Seidman E, Delvin E et al. (2007) Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis,

lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1178-G1189.

45. Sane AT, Sinnott D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V et al. (2006) Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 47: 2112-2120.
46. Levy E, Harmel E, Laville M, Sanchez R, Emonnot L et al. (2011) Expression of Sar1b enhances chylomicron assembly and key components of the coat protein complex II system driving vesicle budding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2692-2699.
47. Fearn RA, Hirst BH (2006) Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: Human intestinal and hepatic in vitro cell models. *Environ Toxicol Pharmacol* 21: 168-178.
48. Rubas W, Cromwell ME, Shahrokh Z, Villagran J, Nguyen TN et al. (1996) Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J Pharm Sci* 85: 165-169.
49. Zhai X, Lin M, Zhang F, Hu Y, Xu X et al. (2013) Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res* 57: 249-259.
50. O'Sullivan AM, O'Callaghan YC, O'Grady MN, Queguineur B, Hanniffy D et al. (2012) Assessment of the ability of seaweed extracts to protect against hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide induced cellular damage in Caco-2 cells. *Food Chem* 134: 1137-1140.

51. Couto MR, Goncalves P, Catarino T, Araujo JR, Correia-Branco A et al. (2012) The effect of oxidative stress upon the intestinal uptake of folic acid: in vitro studies with Caco-2 cells. *Cell Biol Toxicol* 28: 369-381.
52. Denis MC, Furtos A, Dudonne S, Montoudis A, Garofalo C et al. (2013) Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One* 8: e53725.
53. Beaulieu JF (1997) Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* 31: 1-78.
54. Delie F, Rubas W (1997) A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14: 221-286.
55. Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M (2007) In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol* 23: 241-256.
56. Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD (2002) Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* 32: 577-583.
57. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L (1997) Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 22: 1115-1126.
58. Zhang WJ, Wei H, Frei B (2010) The iron chelator, desferrioxamine, reduces inflammation and atherosclerotic lesion development in experimental mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 235: 633-641.
59. Ahluwalia N, Genoux A, Ferrieres J, Perret B, Carayol M et al. (2010) Iron status is associated with carotid atherosclerotic plaques in middle-aged adults. *J Nutr* 140: 812-816.

60. Stevens RG, Graubard BI, Micozzi MS, Neriishi K, Blumberg BS (1994) Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* 56: 364-369.
61. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E et al. (2000) Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G12-G19.
62. Babbs CF (1992) Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 13: 169-181.
63. Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dube N et al. (2000) Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 28: 46-54.
64. Courtois F, Delvin E, Ledoux M, Seidman E, Lavoie JC et al. (2002) The antioxidant BHT normalizes some oxidative effects of iron + ascorbate on lipid metabolism in Caco-2 cells. *J Nutr* 132: 1289-1292.
65. Bernotti S, Seidman E, Sinnett D, Brunet S, Dionne S et al. (2003) Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G898-G906.
66. Trudel K, Sinnett D, James RW, Delvin E, Amre D et al. (2005) Iron-ascorbic acid-induced oxidant stress and its quenching by paraoxonase 1 in HDL and the liver: comparison between humans and rats. *J Cell Biochem* 96: 404-411.
67. Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E et al. (2007) Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of

- paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1252-G1261.
68. Liou HC, Baltimore D (1993) Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 5: 477-487.
 69. Wallace JL (2001) Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 30: 971-980.
 70. Kankuri E, Vaali K, Korpela R, Paakkari I, Vapaatalo H et al. (2001) Effects of a COX-2 preferential agent nimesulide on TNBS-induced acute inflammation in the gut. *Inflammation* 25: 301-310.
 71. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C et al. (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51: 283-297.
 72. Kretz-Remy C, Mehlen P, Mirault ME, Arrigo AP (1996) Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol* 133: 1083-1093.
 73. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 44: 126-131.
 74. Ziegler DM (1985) Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 54: 305-329.
 75. Cartron PF, Hervouet E, Debien E, Olivier C, Pouliquen D et al. (2012) Folate supplementation limits the tumourigenesis in rodent models of gliomagenesis. *Eur J Cancer* 48: 2431-2441.

76. Intarasunanont P, Navasumrit P, Woraprasit S, Chaisatra K, Suk WA et al. (2012) Effects of arsenic exposure on DNA methylation in cord blood samples from newborn babies and in a human lymphoblast cell line. *Environ Health* 11: 31.
77. Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K et al. (2009) Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 587: 4963-4976.
78. Nishiyama R, Qi L, Lacey M, Ehrlich M (2005) Both hypomethylation and hypermethylation in a 0.2-kb region of a DNA repeat in cancer. *Mol Cancer Res* 3: 617-626.
79. Yanagisawa Y, Ito E, Yuasa Y, Maruyama K (2002) The human DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B have two types of promoters with different CpG contents. *Biochim Biophys Acta* 1577: 457-465.
80. Zhao XM, Ren JJ, Du WH, Hao HS, Wang D et al. (2012) Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on methylation of the putative imprinted control region of H19 during the in vitro development of vitrified bovine two-cell embryos. *Fertil Steril* 98: 222-227.
81. Singh KP, Treas J, Tyagi T, Gao W (2012) DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine treatment abrogates 17 beta-estradiol-induced cell growth and restores expression of DNA repair genes in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 316: 62-69.
82. Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D et al. (2010) Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res* 38: 4313-4324.
83. Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck A, Foltzer-Jourdainne C, Boltze C et al. (2005) 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces

apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 525-536.

84. Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R et al. (2012) Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 12: 66.
85. Jiang M, Xiang Y, Wang D, Gao J, Liu D et al. (2012) Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages. *Aging Cell* 11: 29-40.
86. Ryan JL, Jones RJ, Kenney SC, Rivenbark AG, Tang W et al. (2010) Epstein-Barr virus-specific methylation of human genes in gastric cancer cells. *Infect Agent Cancer* 5: 27.
87. Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, de HC et al. (2012) IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis* 33: 1889-1896.
88. Cyr AR, Hitchler MJ, Domann FE (2012) Regulation of SOD2 in Cancer by Histone Modifications and CpG Methylation: Closing the Loop Between Redox Biology and Epigenetics. *Antioxid Redox Signal*. Epub Ahead of Print.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1** **Effects of iron/ascorbate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on cell viability in Caco-2/15 cells.** Caco-2/15 cells were incubated with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) and Trolox (0.25 mM) for 6h at 37°C and/or with 5-AZA (10 μ M) as described in Materials and Methods, Cellular viability was assessed by MTT. Results represent the means \pm SEM of n=3 independent experiments.
- Figure 2** **Malondialdehyde concentrations in Caco-2/15 cells challenged with iron/ascorbate and/or Trolox.** Caco-2/15 cells were exposed to Fe/Asc (200 μ M/2 mM) and Trolox (0.25 mM) for 6h at 37°C and/or with 5-AZA (10 μ M). Oxidative stress was assessed by measuring MDA as an index of lipid peroxidation. Values are means \pm SEM for three independent experiments. ***P<0.001 vs. controls; ###P<0.001 vs. Fe/Asc.
- Figure 3** **Effects of oxidative stress on transcription factor NF- κ B in Caco-2/15 cells.** Caco-2/15 cells were incubated with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) and Trolox (0.25 mM) for 6h at 37°C and/or with 5-AZA (10 μ M). The protein expression of NF- κ B (A, D) and I κ B (B, E) were determined by western blot as described in Materials and Methods. Then the NF- κ B/ I κ B was calculated (C, F). Results represent the means \pm SEM of n=3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 vs. controls; #P<0.05, ##P<0.01 vs. Fe/Asc.
- Figure 4** **Effects of oxidative stress on inflammatory markers in Caco-2/15 cells.** Cells were incubated with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) and Trolox (0.25 mM) for 6h at 37°C and/or with 5-AZA (10 μ M). The protein expression of Interleukin-6 (IL-6) (A, C) and cyclooxygenase 2 (COX2) (B, D) was determined by western

blot as described in Materials and Methods. Results represent the means \pm SEM of $n=3$ independent experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. controls; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. Fe/Asc.

Figure 5 **Effects of oxidative stress on regulatory endogenous antioxidant activities in Caco-2/15 cells.** Cells were incubated with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) and Trolox (0.25 mM) for 6h at 37°C and/or with 5-AZA (10 μ M). The activities of SOD2 (A, D), GPx (B, E) and G-Red (C) were then measured as described in Materials and Methods. Results represent the means \pm SEM of $n=3$ independent experiments. * $P<0.05$ vs. controls; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. Fe/Asc.

Figure 6 **Effects of oxidative stress on antioxidant genes in Caco-2/15 cells.** Cells were incubated with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) and Trolox (0.25 mM) for 6h at 37°C and/or with 5-AZA (10 μ M). Gene expression of SOD2 (A, C) and GPx (B, D) were then measured as described in Materials and Methods. Results represent the means \pm SEM of $n=3$ independent experiments. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs. controls; ## $P<0.01$, #### $P<0.001$ vs. Fe/Asc.

Figure 7 **SOD2 and GPX2 promoter methylation following Fe/Asc exposition.** Cells were incubated with Fe/Asc (200 μ M/2 mM) and Trolox (0.25 mM) for 6h at 37°C and/or with 5-AZA (10 μ M). DNA methylation of SOD2 (A, C) and GPx2 (B, D) was then determined as described in Materials and Methods. Results represent the means \pm SEM of $n=3$ independent experiments. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. controls; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs. Fe/Asc.

Figure 1

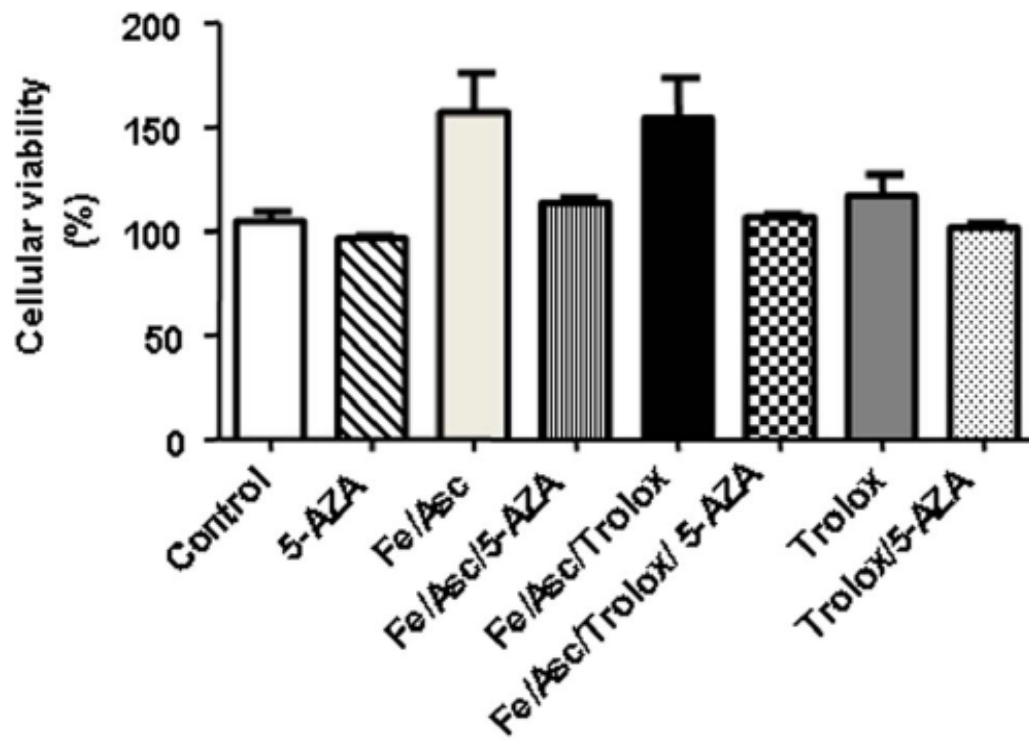


Figure 2

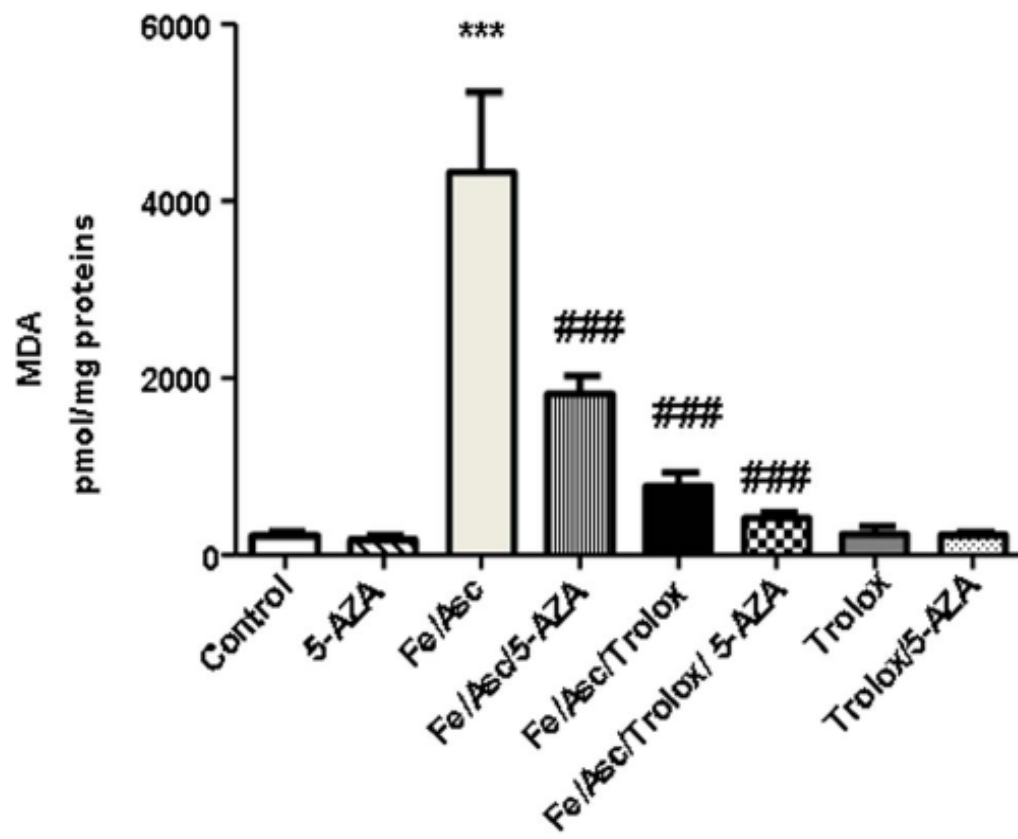


Figure 3

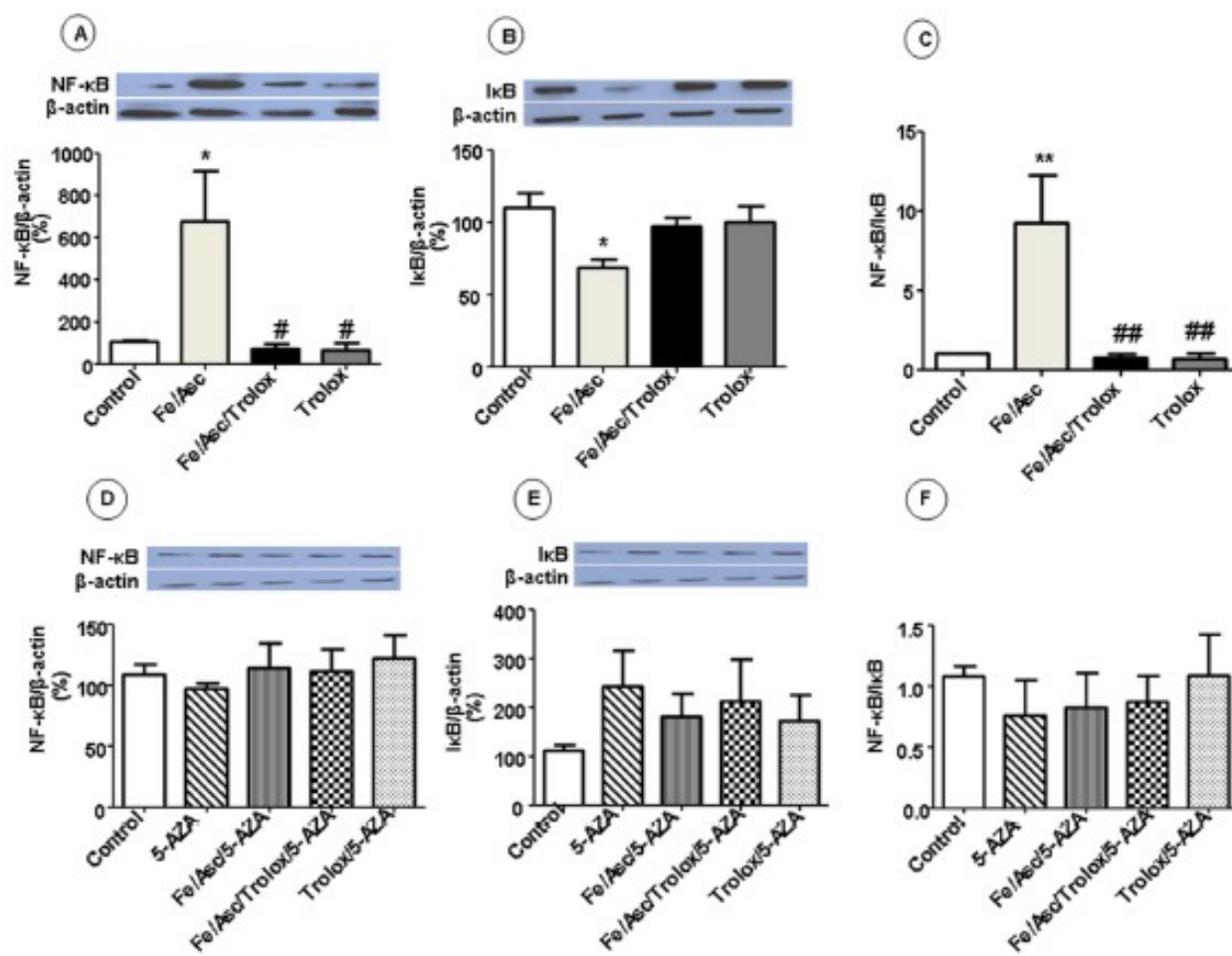


Figure 4

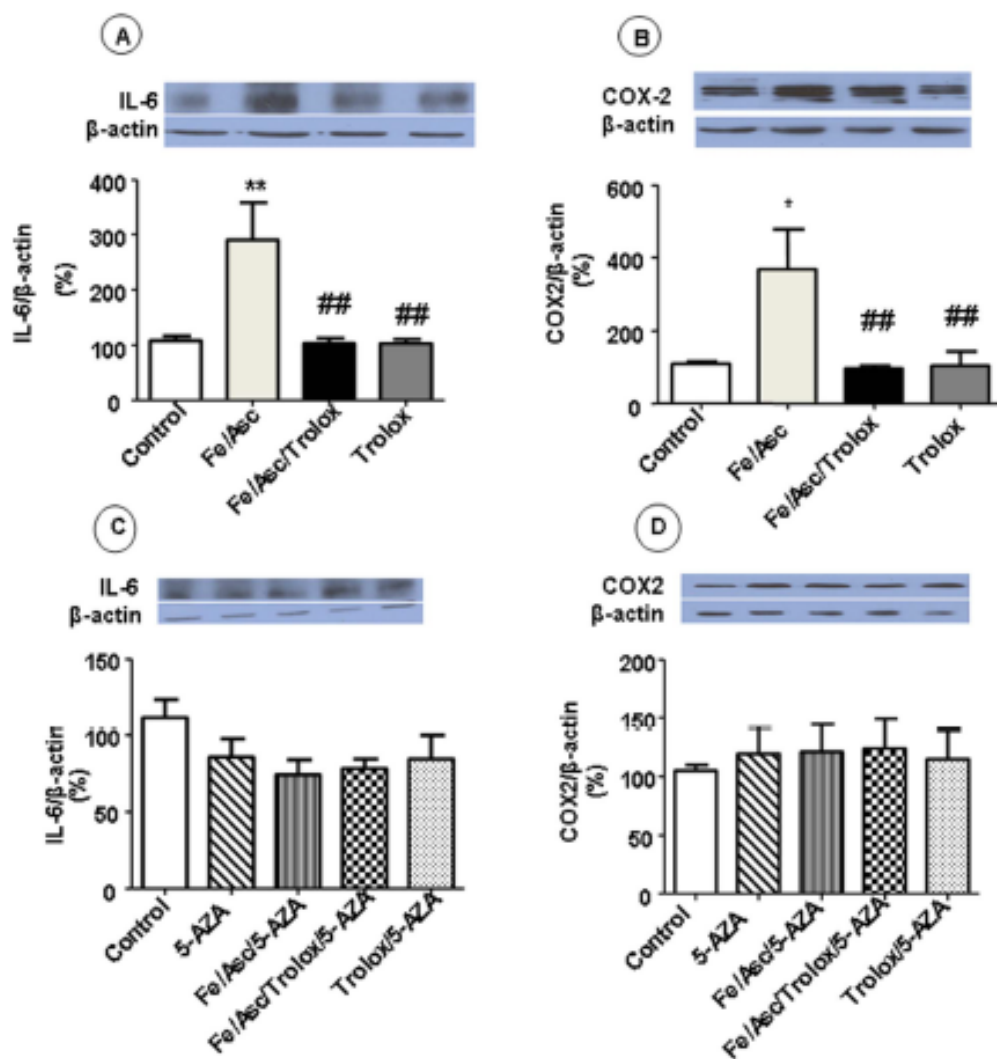


Figure 5

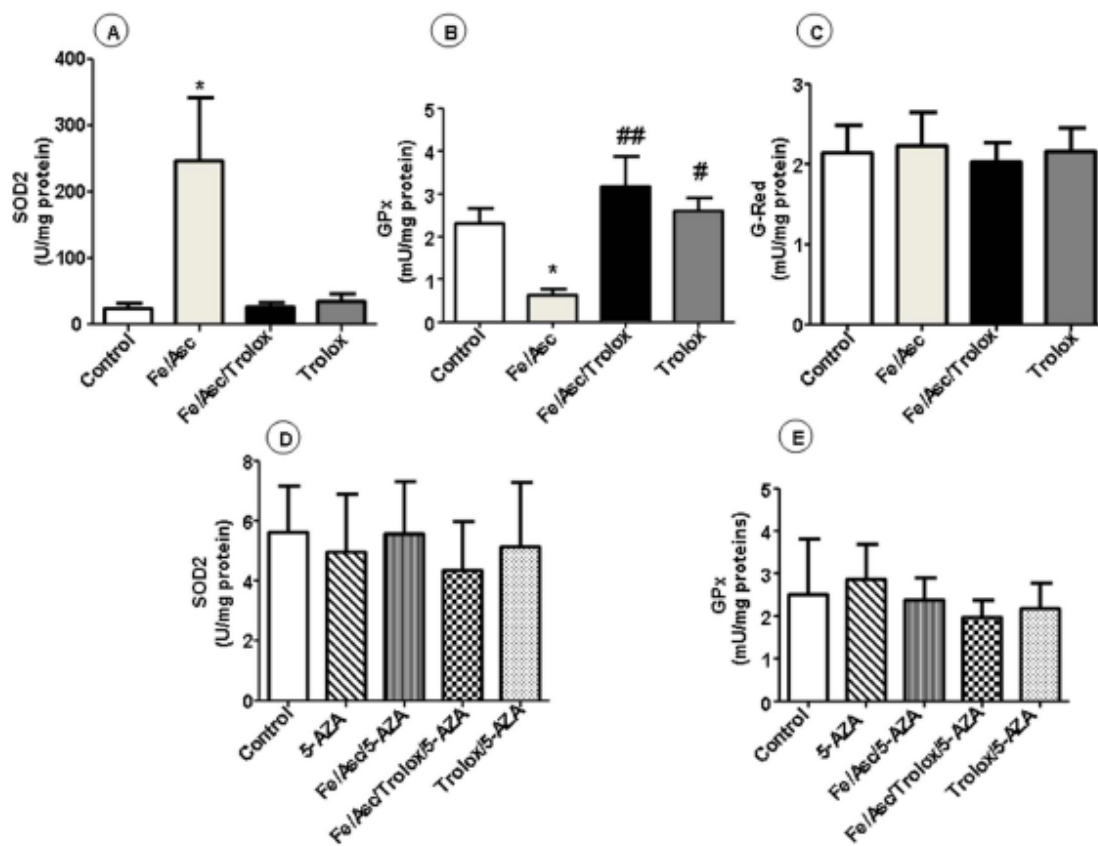


Figure 6

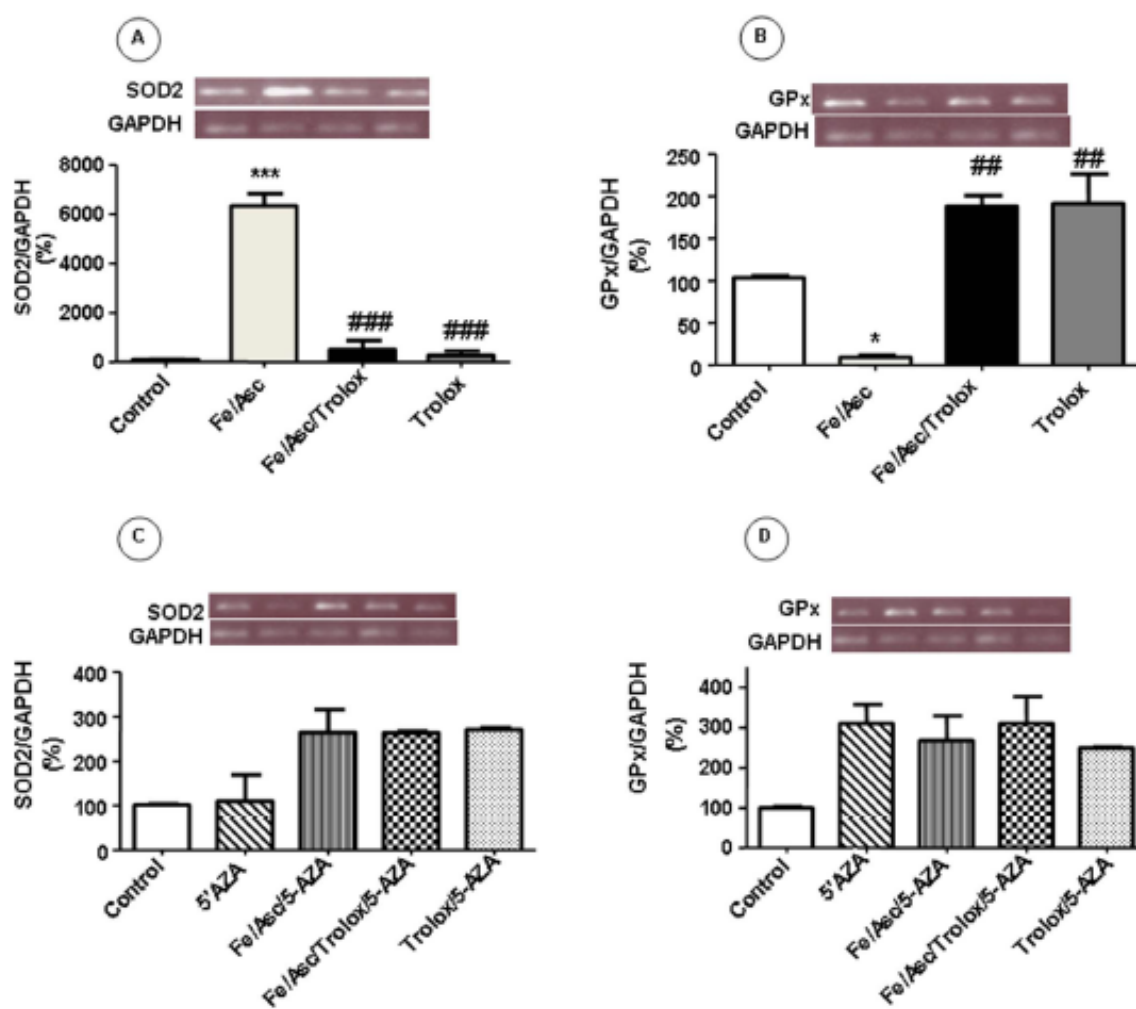
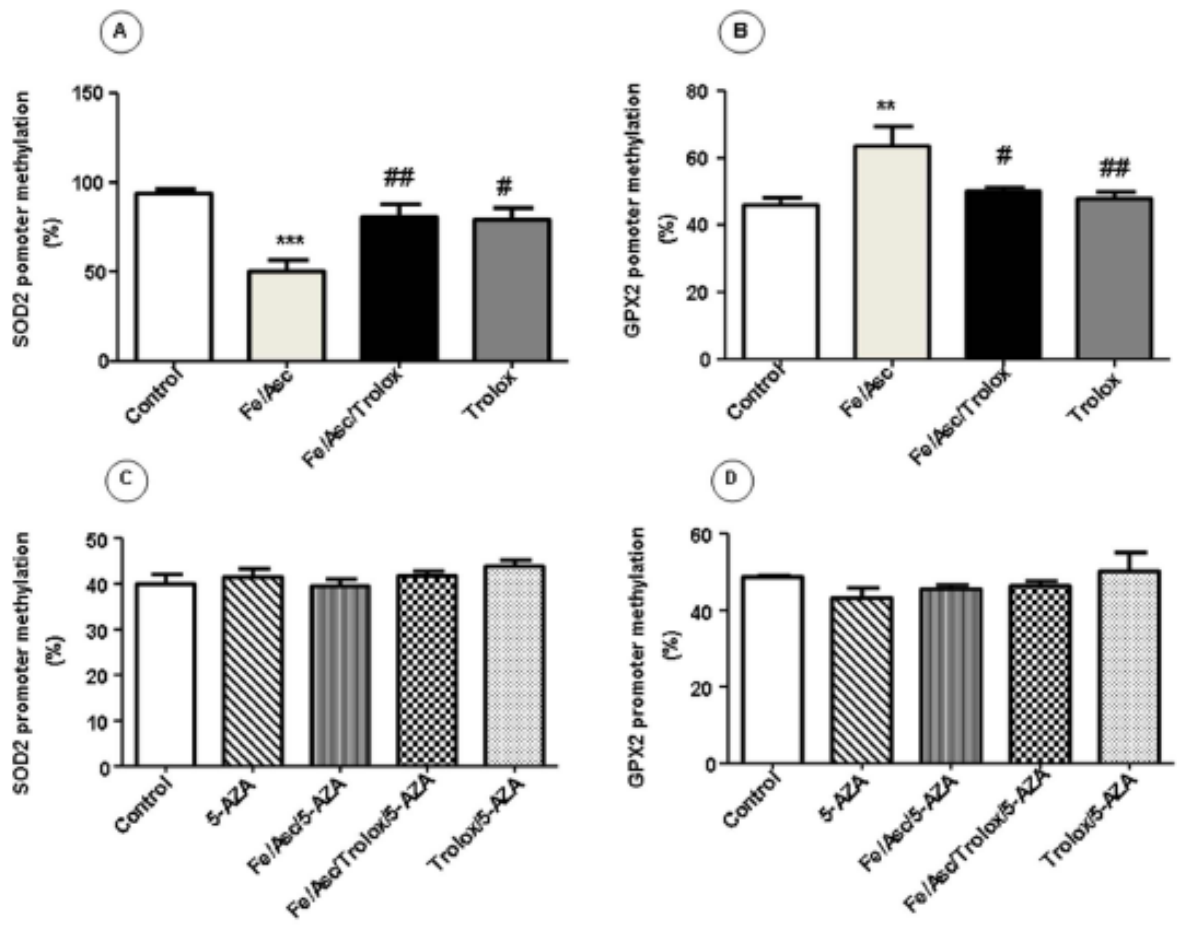


Figure 7



3.2. Article 2

Sabrina Yara, Emile Levy, Wesam Elremaly, Thérèse Rouleau, Jean-Claude Lavoie. Total parenteral nutrition induces sustained hypomethylation of DNA in newborn guinea pigs. *Pediatric Research*, 2013 May;73(5):592-5.

3.2.1. Apport original et contribution

Cet article confirme que l'administration d'une nutrition parentérale ou de H₂O₂ à des cochons d'Inde, très tôt dans la vie, induit une hypométhylation de l'ADN en raison d'une inhibition de la DNMT.

En tant que premier auteur ma contribution a été majeure. En effet, sous la supervision du Dr Lavoie j'ai participé aux choix et à la réalisation des dosages, aux analyses des résultats mais aussi à la rédaction et la révision de l'article. Mme Thérèse Rouleau et Mme Wesam Elremaly, sous la supervision du Dr Lavoie, se sont occupées de la création de la réalisation du dessein expérimental (animaux) et de la collecte des échantillons. Le Dr Levy a contribué par ses commentaires ainsi que ses suggestions, et a participé à la révision du manuscrit.

**Total parenteral nutrition induces sustained hypomethylation of DNA in
newborn guinea pigs.**

Running title: **Permanent hypomethylation of DNA by TPN**

Sabrina Yara¹, Emile Levy¹, Wesam Elremaly¹, Thérèse Rouleau^{1,2}, *Jean-Claude Lavoie^{1,2}

¹Departments of Nutrition, University of Montréal, Montréal, Qc, Canada

²Departments of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, University of Montréal, Montréal, Qc, Canada

*Corresponding author:

Jean-Claude Lavoie

Research Centre, CHU Sainte-Justine

3175 Chemin de la Côte Ste-Catherine

Montreal, Qc, CANADA H3T 1C5

Phone: XXXXXXXXXX

This work was supported by grant from the Canadian Institutes of Health Research (NMD-98028 and MOP-115035), J.A. deSève Research Chair in Nutrition (EL) and *Fondation de la recherche sur les maladies infantiles & Fondation du CHU Sainte-Justine* (studentship for WE).

ABSTRACT

Background: Neonatal total parenteral nutrition (TPN) is associated in animals with low glucose tolerance, body weight and physical activity at adulthood. The early life origin of adult metabolic perturbations suggests a reprogramming of metabolism following epigenetic modifications induced by a change in the pattern of DNA expression. Hypothesis: Peroxides contaminating TPN inhibit the activity of DNA methyltransferase (DNMT) by oxidation of its sensitive thiol, leading to a modified DNA methylation state.

Methods: At three days of age, a catheter was fixed in jugular of guinea pigs. Three groups were compared: 1) Control: enterally fed with regular chow; 2) TPN: fed exclusively with TPN (dextrose, amino acids, lipids, multivitamins, contaminated with $350 \pm 29 \mu\text{M}$ peroxides; 3) H_2O_2 : Control+ $350 \mu\text{M}$ H_2O_2 intravenously. After four days, infusions were stopped and animals enterally fed. Half the animals were sacrificed immediately after treatments or eight weeks later (n=4-6 per group) for hepatic determination of DNMT activities and of 5'-methyl-2'-deoxycytidine levels, a marker of DNA methylation.

Results: At one week of age, DNMT activity and 5'-methyl-2'-deoxycytidine levels were lower in TPN and H_2O_2 compared to controls. At nine weeks, DNMT activity remained lower in TPN whereas 5'-methyl-2'-deoxycytidine levels were lower in TPN and H_2O_2 .

Conclusion: Administration of TPN, or H_2O_2 , early in life in guinea pigs induces a sustained hypomethylation of DNA following inhibition of DNMT activity.

INTRODUCTION

Total parenteral nutrition (TPN) may be required in neonates with impaired oral feeding capability following intestinal surgery or in premature newborns with immature gastrointestinal track. Even if this mode of nutrition enables sustained growth and development, its contamination by oxidant molecules such as peroxides (1) is associated with oxidative stress (2). The neonatal impacts of this stress have been demonstrated in animal model of TPN (3) as well as in premature neonates (2). An oxidative stress early in life is also suspected to modulate the health status into adulthood (4, 5).

Administration of TPN or H_2O_2 during the first week of life in guinea pig pups has been shown to induce, three months later, a modification in energy metabolism that was associated with a phenotype of energy deficiency (6). Compared to orally fed controls, the animals receiving TPN had a lower body weight, a weaker spontaneous physical activity and a worst glucose tolerance. These characteristics are also reported in young adults 20 years of age who were born very low birth weight (7-9), and in whom, the use of TPN was a frequent occurrence. This early-life origin of adult metabolic perturbations suggests a re-programming of metabolism following epigenetic modifications induced by a change in the pattern of DNA expression. We suspect that this might take place through a permanent effect of TPN on DNA methylation.

The metabolic activities are dependent of the expression of genes. Transcription of genes is dependant of their availability to interact with transcription factors and other components required to induce the biochemical processes leading to production of transcripts. The availability of genes is mainly regulated by epigenetic phenomena such as methylation /

acetylation of histones as well as methylation of DNA (10-15). Three enzymes are implied in methylation of DNA: DNA methyltransferase 1 (DNMT1), DNMT3a and DNMT3b. DNMT3a and 3b are implied in *de novo* methylation of DNA (16-18) whereas DNMT1 is responsible for maintenance of DNA methylation between cell replications (19, 20). The activity of DNMT1 is reported to be sensitive to the redox status of its cysteine residues (21, 22). We hypothesize that the peroxide content of TPN favors DNA hypomethylation through inhibition of DNMT activity caused by oxidation of its sensitive cysteine residues. Therefore, the present study aims to evaluate in guinea pigs 1) the impact of TPN infused early in life on hepatic DNMT activity as well as on DNA methylation level immediately after treatment and 2 months later; 2) whether the effects of TPN are associated with its H₂O₂ content.

MATERIALS AND METHODS

The institutional committee for good practice with animals in research of CHU Sainte-Justine, in accordance with the principles of the Canadian Council, has approved the present research protocol.

Experimental design

At three days on life, Guinea pigs (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) (109 ± 4 g) were anesthetized in order to fix a catheter (SAI Infusion, USA) in a jugular vein (23-25). Animals were assigned to receive one of the following treatments for 4 days:

Control: Animals were fed orally with the laboratory food for guinea pigs, with no intravenous solution provided; a knot obstructed the catheter.

TPN: Animals fed exclusively with TPN [8.7% (wt/vol) dextrose, 2.0 % (wt/vol) amino acids (Travasol; Baxter, Mississauga, Ontario, Canada), 1.6% (wt/vol) lipids (Intralipid 20%; Pharmacia Upjohn, Baie d'Urfé, Quebec, Canada), 1 U/ml heparin, electrolytes and 1% (v/v) pediatrics multivitamins (Multi-12 pediatric; Sandoz, Montreal, Quebec, Canada)]. This solution was contaminated with $350 \pm 29 \mu\text{M}$ peroxides generated spontaneously (1).

H₂O₂: Animals infused through the catheter with a solution containing $350 \mu\text{M}$ H₂O₂, 6% (w/v) dextrose, 0.3 % (w/v) NaCl and 1 U/ml heparin. Animals had free access to regular laboratory food for guinea pig.

The studied intravenous solutions were infused continuously through the catheter at rate of 200 mL/kg body/day. The solutions were changed daily.

Four days later, at one week of age, half of the animals from each group (n=4-6 per group) were sacrificed for liver collection. For the other animals, intravenous infusions were stopped and animals had free access to regular chow and water until the end of study, 8 weeks later, when the animals were sacrificed for liver sampling. The collected specimens were divided into aliquots and stored at -80°C until biochemical determinations.

Isolation of nuclei and preparation of nuclear extract

The liver nuclei were isolated following the protocol of Gorski *et al.* (26) and Rose *et al.* (27) by homogenization in a high density sucrose buffer and centrifugation at $100\ 000 \times g$ for 30 min at 4°C . After dissolution of the pellet in a buffer containing 0.3 M KCl, DNMT protein was isolated following the protocol of Wadzinski *et al.* (28) by centrifugation at $100\ 000 \times g$

for 30 min at 4 °C. The supernatant was mixed with 0.3 g (NH₄)₂SO₄ /mL and centrifuged at 150 000 x g for 30 min at 4 °C. The pellet was recovered in 500 µL buffer (25 mM Na-Hepes, 40 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DDT, 10 % glycerol) before filtration by centrifugation on Amicon with a cut-off of 100 000 Daltons (Amicon Ultra-0.5 mL, 100 000 MWCO, Millipore, Billerica, Massachusetts, United States).

DNA methyltransferase activity

The DNMT activity from the nuclear extract was determined by a colorimetric assay, using the EpiQuik DNMT Activity/Inhibition Assay Ultra kit (Epigentek, Farmingdale, New York, United States), according to the manufacturer's user guide. This assay measures the global activity of DNMT, including all isoforms of the enzyme.

DNA extraction

The extraction of DNA from the liver was performed by using the E.Z.N.A HP Tissue DNA Midiprep Kit (OMEGA, bio-tek) according to the manufacturer's user guide. Briefly, samples were homogenized in a high salt buffer containing cetyltrimethyl ammonium bromide following by proteinase digestion. After addition of 3 mL chloroform:isoamyl alcohol (24:1; v/v), the homogenate was separated into aqueous and organic phases by centrifugation at 4000 x g for 5 min at room temperature. The aqueous phase was extracted and purified using DNA affinity column. Extracted DNA was quantified by measuring absorbance at 280 and 260 nm to determine the A₂₆₀/A₂₈₀ ratio. Values of this ratio between 1.4-1.9 indicate 85%-90% purity. The concentration of DNA was determined according to Beckman Coulter notes as follows: Concentration = 50 µg/mL x Absorbance₂₆₀ x [Dilution Factor].

DNA methylation level

The methylation of DNA occurs on the position 5' of the 2'-deoxycytidine. The level of this compound (5'-methyl-2'-deoxycytidine or 5medCyd) was quantified on 1 µg of hepatic DNA by colorimetric assay using the Global DNA methylation ELISA kit (5'-methyl-2'-deoxycytidine Quantification) from Cell Biolabs Inc (Arjons Drive, San Diego, CA).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM and compared by ANOVA ((TPN vs. H₂O₂) vs. control) after verification of homoscedasticity by the test of Bartlett's χ^2 . The threshold of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS:

At the end of the treatment, at one week of age, the DNMT activity (**Figure 1A**) was lower in TPN and H₂O₂ groups, with no difference between TPN and H₂O₂. At nine weeks of age, 2 months after cessation of treatment, the activity of the enzyme (**Figure 1B**) remained lower only in the TPN group.

The methylation of DNA in liver expressed as the concentration of 5 MedCyd in whole DNA, was lower in TPN and H₂O₂ animal groups than in controls, at the end of the treatments (**Figure 2A**) and 2 months later (**Figure 2B**). The concentrations of 5MedCyd did not differ between TPN and H₂O₂ groups. The mean value for the control group in Figure 2B, excludes two data points (2.7 and 3.3 nmol/□g DNA) that are outside the 99.9% confidence interval (0 - 2.3 nmol/μg DNA) of the mean.

DISCUSSION:

The main finding of the present study is that administration of TPN early in life of guinea pig induces a sustained DNA hypomethylation following inhibition of DNMT activity. The effects of TPN are reproduced by an infusion of H_2O_2 . It is the first time to our knowledge that a link is reported between a short-term exposure (four days) to TPN and a modification of the pattern of DNA methylation, a modification that appears to be sustained into adulthood.

DNA methylation occurs on cytosine, preferentially in the CpG islets, by the action of DNMT. Methylation in the promoter area of the gene is recognized to modulate the level of its transcription. Hypermethylation is associated with a silencing of genes, whereas hypomethylation favors gene transcription. Hence, the level of methylation of a gene is associated with the number of copies of the protein encoded by this gene. Therefore, a change in methylation pattern of a gene is associated with a modification of the global activity of this protein in the cell.

Pradhan M *et al.* (22) showed that the activity of DNMT is dependent on the integrity of sensitive thiol functions (R-SH). Different molecules can react with R-SH. For instance, H_2O_2 induces the formation of R-SOH whereas 4-hydroxynoneal (HNE), derived from lipid peroxidation, leads to formation of R-S-HNE. Both molecules (H_2O_2 and HNE) are generated in TPN solutions (29). The infusion of H_2O_2 will also induce *in vivo* lipid peroxidation (24, 30). We can expect that the quality of the anti-oxidant defenses or/and the capacity to detoxify peroxides and HNE molecules would play a significant role in the process leading to hypomethylation of DNA. Thus, the level of glutathione, which is the essential co-factor in reducing peroxides by glutathione peroxidase and in detoxification of HNE by glutathione S-

transferase, should be a key player in the process leading to DNA methylation. In human neonates, the glutathione level increases with gestational age (31). Because our results show that early exposure to TPN affects DNA methylation in a term animal model, we would expect to observe a similar effect in newborn infants receiving TPN. Premature infants would be even more at risk of TPN induced DNA hypomethylation because of their immature antioxidant system and low glutathione levels.

An interesting secondary observation is that the level of methylation in DNA increases as a function of age. It was increased by 3 to 4 times between one and nine weeks of age, independently of the treatment received during the first week of life of animals. This suggests that normal development of the organism could need silencing of some genes. If the level of methylation is important for the evolution of some metabolic pathways during life, it should be no surprise that a neonatal administration of TPN would cause metabolic perturbations later in his life (6). The persistence of a lower DNMT activity until 9 weeks of age in TPN group relatively to the control and H₂O₂ group is surprising and not well understood. This observation should be elucidated by a further study.

In accordance with the finding of epigenetic modifications associated with the administration of intravenous nutrition solutions contaminated with oxidant molecules, the present report underlines the importance of studying in human the long-term impact of TPN administered early in life and to develop new and improved TPN solutions devoid of undesirable oxidant molecules.

REFERENCES:

1. Lavoie JC, Belanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 1997;99:E6.
2. Chessex P, Watson C, Kaczala GW *et al.* Determinants of oxidant stress in extremely low birth weight premature infants. *Free Radic Biol Med* 2010;49:1380-6.
3. Turcot V, Rouleau T, Tsopmo A *et al.* Long-term impact of an antioxidant-deficient neonatal diet on lipid and glucose metabolism. *Free Radic Biol Med* 2009;47:275-82.
4. Luo ZC, Fraser WD, Julien P *et al.* Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 2006;66:38-44.
5. Luo ZC, Xiao L, Nuyt AM. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. *World J Diabetes* 2010;1:89-98.
6. Kleiber N, Chessex P, Rouleau T, Nuyt AM, Perreault M, Lavoie JC. Neonatal exposure to oxidants induces later in life a metabolic response associated to a phenotype of energy deficiency in an animal model of total parenteral nutrition. *Pediatr Res* 2010;68:188-92.
7. Gaddlin PO, Finnstrom O, Sydsjo G, Leijon I. Most very low birth weight subjects do well as adults. *Acta Paediatr* 2009;98:1513-20.
8. Hack M, Schluchter M, Cartar L, Rahman M, Cuttler L, Borawski E. Growth of very low birth weight infants to age 20 years. *Pediatrics* 2003;112:e30-e38.
9. Hack M, Cartar L, Schluchter M, Klein N, Forrest CB. Self-perceived health, functioning and well-being of very low birth weight infants at age 20 years. *J Pediatr* 2007;151:635-41, 641.

10. Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 1992;11:327-33.
11. Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 1994;14:5487-94.
12. Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 1997;7:157-65.
13. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964;51:786-94.
14. Das C, Kundu TK. Transcriptional regulation by the acetylation of nonhistone proteins in humans -- a new target for therapeutics. *IUBMB Life* 2005;57:137-49.
15. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:838-49.
16. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998;19:219-20.
17. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-57.
18. Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 1999;19:8211-8.
19. Bestor TH, Gundersen G, Kolsto AB, Prydz H. CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation. *Genet Anal Tech Appl* 1992;9:48-53.

20. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999;274:33002-10.
21. Frauer C, Rottach A, Meilinger D *et al.* Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1. *PLoS One* 2011;6:e16627.
22. Pradhan M, Esteve PO, Chin HG, Samaranyake M, Kim GD, Pradhan S. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry* 2008;47:10000-9.
23. Chessex P, Lavoie JC, Laborie S, Rouleau T. Parenteral multivitamin supplementation induces both oxidant and antioxidant responses in the liver of newborn guinea pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:316-21.
24. Chessex P, Lavoie JC, Rouleau T *et al.* Photooxidation of parenteral multivitamins induces hepatic steatosis in a neonatal guinea pig model of intravenous nutrition. *Pediatr Res* 2002;52:958-63.
25. Lavoie JC, Chessex P, Gauthier C *et al.* Reduced bile flow associated with parenteral nutrition is independent of oxidant load and parenteral multivitamins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:108-14.
26. Gorski K, Carneiro M, Schibler U. Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 1986;47:767-76.
27. Rose KM, Stetler DA, Jacob ST. Phosphorylation of RNA polymerases: specific association of protein kinase NII with RNA polymerase I. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1983;302:135-42.

28. Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S *et al.* Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 1993;13:2822-34.

29. Miloudi K, Comte B, Rouleau T, Montoudis A, Levy E, Lavoie JC. The mode of administration of total parenteral nutrition and nature of lipid content influence the generation of peroxides and aldehydes. *Clin Nutr* 2012. [Epub ahead of print].

30. Miloudi K, Tsopmo A, Friel JK, Rouleau T, Comte B, Lavoie JC. Hexapeptides from human milk prevent the induction of oxidative stress from parenteral nutrition in the newborn guinea pig. *Pediatr Res* 2012;71:675-81.

31. Lavoie JC, Chessex P. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic Biol Med* 1997;23:648-57.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Hepatic activity of DNA methyltransferase (DNMT) as a function of treatments.

Control: animals fed orally with regular chow (n=6 in each panel); TPN: animals fed exclusively with TPN between day 3 and 7 of age, followed by regular chow (n=4 in panel A; n=6 in panel B); H₂O₂: animals fed regular chow and infused with 350 μ M H₂O₂ between day 3 and 7 of age (n=5 in panel A; n=6 in panel B). *Panel A*: After treatments, at one week of age, the activity of DNMT was lower in TPN and H₂O₂ groups compared to control. There was no difference between TPN and H₂O₂ groups. *Panel B*: Eight weeks after cessation of treatments, the activity of DNMT remained lower in the TPN group. Means \pm SEM; *: p < 0.05; **: p < 0.01.

Figure 2. Hepatic levels of 5'-methyl-2'-deoxycytidine (5MedCyd) in DNA as a function of enteral vs. parenteral nutrition.

Control: animals fed orally with regular chow (n=6 in each panel); TPN: animals fed exclusively with TPN between day 3 and 7 of age, followed by regular chow (n=5 in panel A; n=6 in panel B); H₂O₂: animals fed regular chow and infused with 350 μ M H₂O₂ between day 3 and 7 of age (n=5 in each panel). The levels of 5MedCyd in whole DNA was lower in TPN and H₂O₂ groups than in controls, both at the end of the treatments (*panel A*) and 2 months later (*panel B*). The concentrations did not differ between TPN and H₂O₂ groups. In panel B, the mean value of control group excludes two data (2.7 and 3.3 nmol/ μ g DNA) since they are outside the 99.9% confidence interval (0 - 2.3 nmol/ μ g DNA) of the mean. Means \pm SEM; **p<0.01.

Figure 1

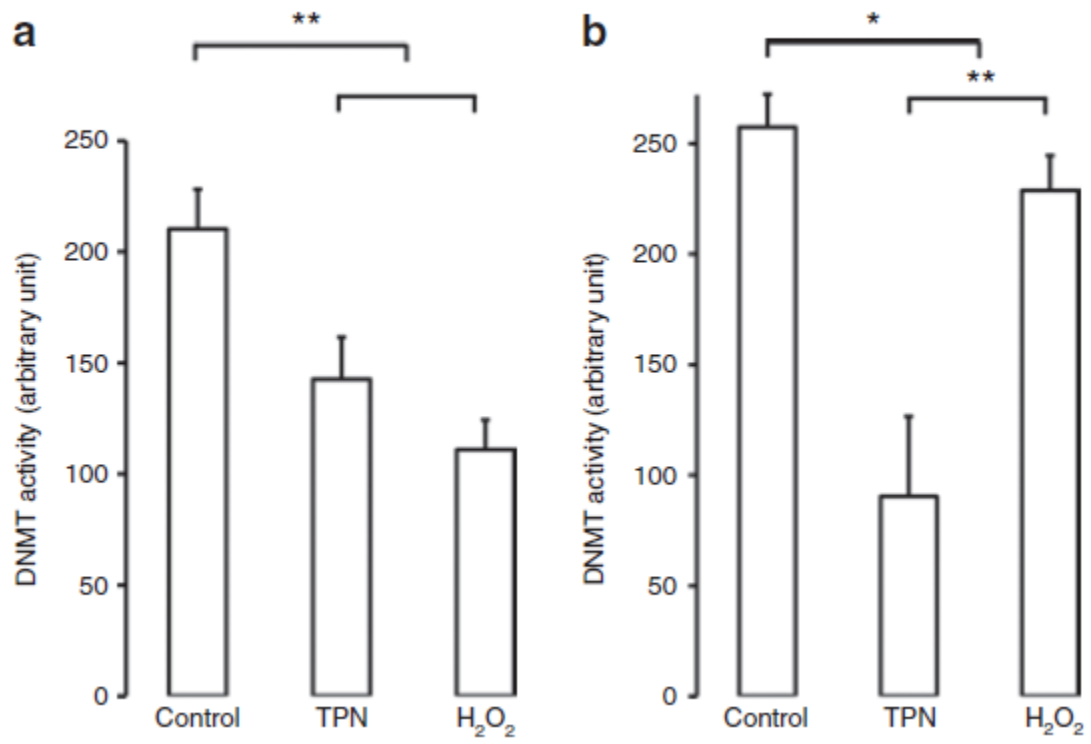
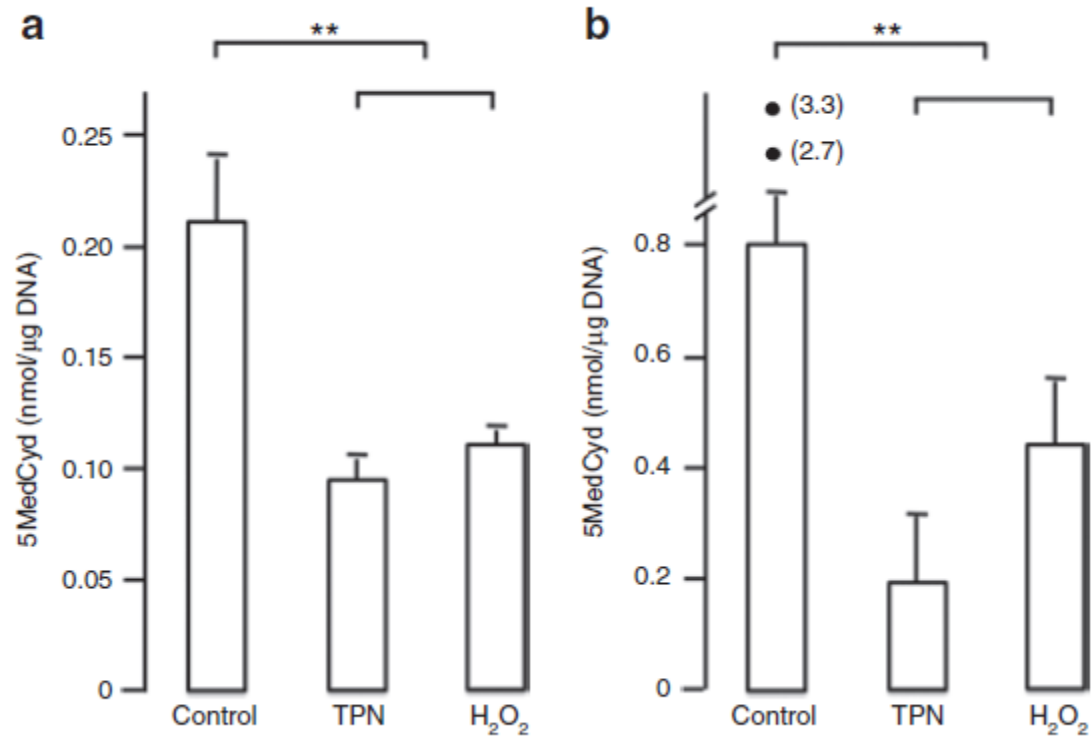


Figure 2



3.3. Article 3 :

Sabrina Yara, Jean Claude Lavoie and Emile Levy. Epigenetic alterations influencing cardiometabolic derangements in high fat, high sucrose-fed mice.

3.3.1. Apport original et contribution

Cet article confirme que le syndrome métabolique, induit par l'administration d'une diète riche en gras et en sucre à des souris, est associé au stress oxydant, à l'inflammation et à des altérations épigénétiques. Le double agoniste de PPAR α/δ , le GFT105, prévient les effets de la diète riche en gras et en sucre.

Pour cet article, sous la supervision du Dr Levy, j'ai participé à plusieurs expériences (animaux 4, 6 et 8 semaines de diète riche en gras et en sucre ainsi que les animaux LPS), aux analyses des résultats mais aussi à la rédaction de l'article. Les expériences sur les animaux 12 semaines de diète riche en gras et en sucre ont été effectuées dans l'unité du Dr Levy.

Epigenetic alterations influencing cardiometabolic derangements in high fat, high sucrose-fed mice

Sabrina Yara¹, Jean-Claude Lavoie² and Emile Levy^{1,3}

Research Centre, CHU-Sainte-Justine, Departments of¹Nutrition and ²Pediatrics, University of
Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

³Canadian Institutes for Health Research Team on the Digestive Epithelium, Department of
Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de
Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

Keywords: metabolic syndrome, oxidative stress, inflammation, DNA methylation, liver,
peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), GFT505.

Address of correspondence:

*Dr. Emile Levy
Research Center
CHU Sainte-Justine
3175 Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5*

ABSTRACT

Introduction: Metabolic syndrome (MetS) is a major public health problem characterized by obesity, insulin resistance, dyslipidemia and cardiovascular diseases. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) play important roles in the pathogenesis of the MetS. **Aim:** As there is a failure of conventional treatments to curb these MetS, we investigated the metabolic and therapeutic effects of GFT505, a dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist. **Design:** C57BL/6J mice were fed either a standard chow diet (controls), a high-fat, high-sucrose (HFHS) diet, or the HFHS diet in combination with GFT505 (30 mg/kg) for 12 weeks. **Results:** The HFHS diet was effective in inducing metabolic syndrome characteristics in view of increases in body weight, visceral adiposity, insulin insensitivity, plasma and hepatic lipids, oxidative stress and inflammation. These derangements were accompanied with deficient PPAR α and PPAR γ gene expressions and hypermethylation of their respective promoters. Addition of GFT505 to the HFHS diet prevented most of the cardiometabolic effects induced by HFHS diet via negative modulation of promoter hypermethylation, resulting in raised PPAR α and PPAR γ gene expression. **Conclusions:** GFT 505 exerts positive metabolic effects by improving HFHS diet-induced metabolic syndrome due to epigenetic alterations of PPARs genes.

INTRODUCTION

One billion adults worldwide are overweight and more than 300 million are obese (1). Environmental factors such as dietary intake and physical activity, genetic predisposition and individual behaviours are the various causes of overweight and obesity (2). Thus, unhealthy diet like high saturated fat and refined sucrose are important determinants for the overweight and obesity development (3). Obesity is a factor which can contribute to metabolic disorders, a major cause of death in developed countries (1). The metabolic syndrome can be defined as a cluster of disorders (e.g. hyperglycemia, hyperinsulinemia, hyperlipidemia, hypertension and insulin resistance) (4) and represents an important contributor of type 2 diabetes (DT2) and cardiovascular diseases (3).

Metabolic syndrome (MetS) is characterised by oxidative stress and inflammation. In particular, visceral obesity is associated with systemic inflammation reflected by a rise in inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP) (5) and TNF- α (6), but also with plasmatic lipid peroxidation and decreased expression of Copper-Zinc superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase genes (7). In fact, several studies conducted with diabetic patients showed that DT2 is associated with an increase in lipid peroxidation (8) and decrease in vitamin E (9), GPx (9) and SOD activity (10). Accordingly, Harrison, Griendling *et al.* found that hypertension induced by angiotensin II in rats is accompanied by oxidative stress in blood vessels (11;12). Conversely, administration of superoxide dismutase reduces arterial pressure in this model (13).

Among the mechanisms mentioned above in the development of obesity and MetS, the epigenetic regulation of gene expressions has emerged as another contributor in recent years

(2). Epigenetics, in particular DNA methylation, a biochemical process involving the addition of a methyl group to the cytosine, can be changed by nutritional, chemical and physical factors, and leads to gene expression profile modifications. The changes in gene expression alter the risk of diseases and may explain the inter-individual differences in obesity and metabolic syndrome development (2). This phenomenon is in line with the concept of an adaptive fetal programming process where nutrition and environmental factors alter developmental pathways during prenatal growth, thereby inducing changes in postnatal metabolism and susceptibility to chronic disease (14).

Over the last few years, a number of studies have focused on the epigenetic impact of nutrition and especially on methyl donors, including betaine, choline, methionine, folate and macronutrients such as proteins and fatty acids. The reversibility of DNA methylation makes it a target for therapeutic intervention and thus several genes implicated in metabolic syndrome have been described as being regulated by DNA methylation. In this context, a study conducted on animals with DT2 shows hypermethylation of the PGC-1 α (PPAR gamma coactivator 1 alpha) gene promoter that decreases its expression along with insulin production (15). The PPARGC1 α promoter has also been hypermethylated in the skeletal muscles of patients with DT2 (16).

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) subfamily is composed of three members, PPAR α , PPAR γ and PPAR δ (also known as PPAR β) (17). Each is encoded by a separate gene (17). PPARs are nuclear receptors activated when endogenous ligands (i.e free fatty acids, prostaglandins, leukotrienes) or synthetic PPAR agonists (i.e glitazones, fibrates) bind their lipid-binding domain allowing heterodimerisation with a ligand activated retinoid X-receptor (RXR) (18-20). Consequently, a conformational change occurs leading to a

transrepression or transactivation of target genes. During transrepression, the activated PPAR binds to cytokine-activated transcription factors such as NF- κ B (nuclear factor kappa B) involved in the inflammatory response (21). Thus, PPAR could inhibit this process by blocking the interaction between NF- κ B and the promoter region of target genes. During transactivation, the activated PPAR binds to a specific sequence of nucleotides (the PPAR receptor response element) on target genes (22). A cofactor or coactivator renders the PPAR complex transcriptionally active. A large number of genes display response elements for PPARs, including *apo A-I*, *A-II* and *A-V*, *LPL*, *SR-BI*, which are activated by PPAR α , while *ADIPOQ* and *ADRP* are themselves activated by PPAR γ (22). Thus, PPAR α which is abundant in highly active metabolic tissues (e.g. liver, kidney, heart, muscle, brown tissue and macrophages) is implicated in lipid metabolism while PPAR γ (predominantly found in adipose tissue, macrophages and large intestine) is involved in obesity and insulin resistance (22). Therefore, PPAR α regulates lipid homeostasis (23) whereas PPAR γ regulates adipogenesis and glucose homeostasis (24). In contrast, PPAR δ is ubiquitously expressed and plays a critical role in mitochondrial function, fatty acid oxidation and insulin sensitivity (25;26). All three PPAR isotypes exhibit anti-inflammatory effects (27).

Because of the multifaceted effects on lipid and carbohydrate metabolism, inflammatory response and innate immunity, the different PPARs represent an important pharmacological target. Therefore, efforts have been made to develop new agents that simultaneously combine the beneficial effects of different PPARs. Among them, there is the dual PPAR- α/δ agonist, GFT505, an attractive agent with therapeutic potential for DT2, metabolic syndrome and dyslipidemia. GFT505, along with its main circulating metabolite GFT1007, shows a preferential activity on human PPAR α in vitro with an additional activity on human PPAR δ

(28). Both undergo extensive enterohepatic cycling and are liver targets (29). More specifically, GFT505 has been demonstrated as the new drug candidate for the treatment of lipid and glucose disorders associated with metabolic syndrome (29).

Overall, it is clear that the components of the metabolic syndrome, i.e., obesity, DT2 and hypertension, are associated with inflammation and oxidative stress. Possibly, the reasons for these alterations are still unknown and may involve epigenetic alterations of vital transcription factor genes. Therefore, in the present work, we have attempted to determine whether MetS in mice, induced by a high-fat, high-sugar diet (HFHS), is related to the methylation process that directly implicates modifications of PPARs.

MATERIAL AND METHODS

Animals

C57Bl/6 mice, 6 weeks old, were fed with chow diet (Teklad 2018, Harland, Indianapolis, IN) or HFHS diet as previously described (30;31), for 12 weeks. A group of animals received a daily oral gavage with GFT505 (30 mg/kg) when the other groups received the vehicle only (0.1% Tween 80 and 1% carboxymethyl cellulose in 98.9% distilled water). The overall composition of experimental diets is given in Table 1. The HFHS diet provides more than one half of the dietary energy in the form of fat as opposed to chow diet where fat represents 18 % of energy. Body weight gain and food intake were assessed twice a week. After 12 weeks of HFHS feeding, animals were fasted for 6 h, anesthetised in chambers saturated with isoflurane and then sacrificed by cardiac puncture. Blood was drawn in EDTA-treated tubes and immediately centrifuged in order to separate plasma from cells. Subcutaneous and visceral fat pads were carefully collected along with the liver, weighed, snap-frozen, and stored at -80°C . All procedures were previously approved by CHU Sainte-Justine Animal Ethics Committee.

Fasting glycemia and insulinemia determinations

Blood glucose values were obtained immediately after sampling using a glucose reagent strip and a glucometer (MediSense Precision PCx, Cherry Hill, NJ). Plasma insulin levels were also determined using an insulin radioimmunoassay kit (Linco, St Charles, MO). Insulin sensitivity was determined using the HOMA-IR index. The score was calculated using the following formula: $\text{HOMA-IR} = \text{glycemia (mmol/L)} \times \text{insulinemia (mIU/L)} / 22.5$. Plasma TG and

cholesterol levels were measured enzymatically (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany).

Liver preparation

Hepatic tissues were ground in liquid nitrogen. They were homogenized in 8 vol of lysis buffer (Phosphate Buffered Saline, 4 mM EDTA, 1 % BHT, protease inhibitors and phosphatase inhibitor). 1 ml of tissue homogenate was aliquoted, stored at -80 °C after protein concentration determination by Bradford assay (Bio-Rad, Mississauga, ON). 0.5 % of Triton 10 % was added to the rest of homogenate that was shaken for 30 min at 4 °C and then clarified by centrifugation at 14 000 x g for 10 min. The pellets were stored at -80°C until DNA extraction. The protein concentration of each tissue sample was determined in supernatants by Bradford assay (Bio-Rad, Mississauga, ON).

Lipid analysis

Hepatic lipids were extracted from homogenates by overnight incubation at 4 °C with 2:1 (vol/vol) chloroform/methanol. Triglycerides were measured colorimetrically with a commercial kit, according to the manufacturer's user guide (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). Plasma triglycerides and cholesterol levels were also measured enzymatically.

Lipid peroxidation analysis

Lipid peroxidation was estimated by measuring the release of free malondialdehyde (MDA) from tissue samples by HPLC as described previously (32-34). Proteins were first precipitated

with a 10% sodium tungstate solution (Sigma). The protein-free supernatants then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/v) thiobarbituric acid solution (Sigma) at 95°C for 60 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(thiobarbituric acid) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a potassium dihydrogen phosphate-methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA determination by HPLC with fluorescence detection.

Enzymatic activity of endogenous antioxidant enzymes

The SOD activity was determined using the Superoxide Dismutase Assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), according to the manufacturer's user guide. This assay measures all the total activity of the three types of SOD (SOD1, SOD2 and SOD3) but also the SOD2 activity.

For GPx activity, tissue samples were homogenized in a buffer (50 mM Tris-HCl and 0.1 mM EDTA-Na₂ pH 7.6), centrifuged at 10 000 x g for 5 min at 4 °C and the supernatants were collected. GPx activity was determined as previously described (35) using 1 mM t-butyl hydroperoxide (Aldrich) and 1 M GSH as cosubstrates. The GSSG formed was reduced by GR using 0.1 M NADPH. The drop in absorbance at 340 nm was quantified using the molar extinction coefficient of 6.22 mM⁻¹.cm⁻¹. The activity reflected the amount of NADPH oxidized (nmol/min/mg of proteins).

Prostaglandin E2 quantification

Hepatic prostaglandin E2 (PGE2) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Arbor Assay, Michigan, USA). After a short incubation, the reaction was stopped and the

intensity of the generated color was measured in a microtiter plate reader (EnVision Multilabel Plate Readers, PerkinElmer) capable of measuring 450 nm wavelengths.

Measurement of mRNA by qRT-PCR

RNA from mouse liver was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen), cDNA was synthesized, and qRT-PCR performed as previously described (36;37). As reported, we used Custom Taqman® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) and primers that amplified mouse *COX-2*, *TNF- α* , *NF- κ B*, *FAS*, *PPAR α* , *PPAR γ* or *Gapdh* (that served as a housekeeping gene).

Quantitative DNA methylation analysis

Genomic DNA from liver was isolated by DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) and the methylation status of *Ppara* was evaluated by EpiTYPER, which uses MALDI-TOF MS analysis with base-specific cleavage of single-stranded nucleic acids. Primers were designed in the CpG island of the promoter region in *Ppara* immediately upstream of the transcription start site; methylation of individual CpG nucleotides in this region has been reported to affect *Ppara* expression (38-40).

Statistical analysis

The data were analysed with Prism 5.01 (GraphPad Software) and are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with a post hoc Bonferroni multiple comparison test. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Body weight, body fat pad weight and organ weight

As shown in Fig. 1, the 12-week HFHS diet induced a significant increase in body weight (Fig. 1A), liver weight (Fig. 1B), visceral adiposity (Fig. 1C) and subcutaneous adiposity (Fig. 1D). However, the dual PPAR- α/δ agonist GFT50, an attractive agent with therapeutic potential for type 2 diabetes, MetS and dyslipidemia, was capable to prevent the HFHS diet-mediated increments (Fig. 1A-1D).

Glycemia and insulinemia

Glucose and insulin homeostasis were measured in all animal groups while the HOMA-IR index was calculated. As noted in Fig. 2A and 2B, the HFHS diet led to augmented glycemia and insulinemia compared to mice on regular chow diet. As a result, the HOMA-IR index showed a significant elevation in the HFHS group (Fig. 2C), indicating less insulin sensitivity. Nevertheless, these alterations were avoidable in the presence of the GFT505 drug (Fig. 2A-2C).

Plasma and Liver lipids

Since the MetS is frequently associated with hyperlipidemia, we measured lipids in the plasma and liver. As shown in Fig. 3, the 12-week HFHS diet resulted in a significant rise in plasma triglycerides (Fig. 3A), plasma cholesterol (Fig. 3B) and hepatic triglycerides (Fig. 3C) compared to the control group. The GFT505 administration to the animals was able to prevent

these changes in lipid risk factors (Fig. 3A-3C). A similar pattern characterized the impact of GFT505 on FAS that is considered as an important marker for lipogenesis (Fig 3D).

Inflammation

As mentioned before, the metabolic syndrome is associated with inflammation. Therefore, we have examined the gene expression of NF- κ B, a powerful transcription factor endowed with the high capacity to activate the inflammatory pathway. qRT-PCR analysis revealed a significant rise in hepatic NF- κ B gene expression (Fig. 4A) as well as in TNF- α induced NF- κ B activation (Fig. 4B), a process that was ruled out by GFT505, in HFHS group compared to the chow group.

We have also measured gene expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), a pro-inflammatory component and a highly regulated enzyme that catalyzes the production of prostaglandins under pathologic conditions. Apparently, COX-2 was also triggered in the liver of mice belonging to the HFHS group (Fig. 4D). Accordingly, its proinflammatory PGE2 product was induced in this same group (Fig. 4E), Besides, the activation of COX-2 and the production were inhibited by the treatment of mice treated with GFT505 (Fig. 4D-4E).

Oxidative stress

Since inflammation and oxidative stress are closely associated, we examined different markers of oxidative stress. As illustrated in Fig. 5, the 12-week HFHS diet provoked a significant increase in hepatic MDA levels compared to the chow group while the GFT505 drug prevented this increment (Fig. 5A). We next evaluated the profile of endogenous antioxidants

SOD which converts superoxide anion to hydrogen peroxide and GPx an important enzyme that catalyzes the conversion of hydrogen peroxide to water. We observed a significant decrease in hepatic SOD2 (Fig. 5B) and GPX (Fig. 5C) activities for the 12-week HFHS group compared to the control chow group, but GFT505 addition prevented these marked inhibitions (Fig. 5B and 5C).

PPARs variations

Because of their multifaceted effects on lipid and carbohydrate metabolism, inflammatory response and innate immunity, we have decided to analyze the different PPARs. qRT-PCR analyses revealed a significant decrease in hepatic PPAR α (Fig. 6A) and PPAR γ (Fig. 6B) gene expressions in the 12-week HFHS group compared to the chow group. Concomitantly, the epigenetic data showed a significant hypermethylation of hepatic PPAR α (Fig. 6C) and PPAR γ (Fig. 6D) gene promoters. The ability of GFT505 to prevent the down-regulation and hypermethylation of PPAR is observed in Fig. 6A and Fig. 6B.

DISCUSSION

The MetS, a group of metabolic diseases occurring concomitantly, leads to the development of type 2 diabetes or cardiovascular diseases (41). The risk factors include hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, liver steatosis, abnormalities in circulating lipid levels, oxidative stress and systemic inflammation (42). The results of the present study show that DNA methylation, one type of epigenetic mechanisms, serves as a postreplication modification of PPAR and occurs in response to environmental influences such as HFHS. Our data also provide evidence that normalizing DNA methylation in PPAR promoters by a powerful, dual PPAR α/δ -agonist has the potential to eliminate several pathological aberrations of the MetS.

GFT505 is a relatively novel PPAR modulator that has the potential to address multiple biological processes involved in the more global-associated metabolic and cardiovascular risk factors. In recent phase II studies in obese patients with combined dyslipidemia and prediabetes, a 1-month treatment with GFT505 significantly improved lipid and glucose homeostasis (43). A marked improvement of liver function markers was also observed in GFT505-treated patients, illustrated by decreases in gamma-glutamyl transpeptidase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase (ALP) levels (43). The efficacy of GFT505 in mouse models of NAFLD/NASH was proposed by the first preclinical study of Staels et al. (44). Based on these studies, we used the dual GFT505 PPAR- α/δ agonist to document its potential to counteract cardiometabolic disorders in the HFHS mouse model. Altogether, these data suggest the critical importance of GFT505 for the treatment of the MetS and its associated consequences.

PPARs are lipid-activated nuclear receptors that, upon activation by proper ligands, control complex networks of target genes involved in numerous processes, including energy homeostasis, inflammatory response, and lipid and carbohydrate metabolism (45).

Several epidemiological and animals studies demonstrated that a detrimental environment during fetal and postnatal periods like maternal obesity and diabetes, is associated with increased risk of obesity and metabolic complications later in life (46;47). This long term complications are explained by epigenetic alterations, particularly DNA methylation modifications of key genes like PPARs, due to exposition to nutritional, chemical and physical factors (2;48). PPARs were described as regulated by DNA methylation since it has been demonstrated that PPAR γ gene expression, regulated by DNA methylation and decrease in PPAR γ in adipocytes, may contribute to the pathogenesis of the MetS (49). Moreover, hepatic PPAR α promoter methylation was significantly lower in a protein-restricted diet group in the F1 and F2 generations (50). Our data are not only consistent with this statement, but they also demonstrate the role of methylation in the regulation of PPAR- α and PPAR- γ , with an evident impact on insulin resistance, hyperlipidemia, oxidative stress, inflammation and liver steatosis. This key cellular epigenetic mechanism highlighted by the activation of both PPAR- α and PPAR- δ by GFT505 appears to be fully operational in the MetS.

We examined inflammation that represents a major etiologic factor of the MetS (51). The transcription nuclear factor NF- κ B exists primarily in the cytosol as a p50/p65 heterodimer complexed with its inhibitor protein I κ B. Activation of the I κ B kinase complex by numerous stimuli leads to the phosphorylation of I κ B, causing its dissociation from the NF- κ B heterodimer and subsequent degradation by the proteasome. Loss of I κ B reveals a nuclear localization sequence on the NF- κ B heterodimer that allows its rapid translocation to the

nucleus and facilitates transcription of pro-inflammatory proteins (52). In our experiments, the 12-week HFHS diet induced an increase in hepatic gene expression of NF- κ B and its TNF- α product. The PPAR α/γ promoter hypermethylation could explain liver inflammation observed in the present work. Indeed, DNA methylation patterns were responsible for the decreased mRNA level of PPAR γ in chronic hepatitis B patients, liver inflammation and fibrosis that collectively were found to be associated with hypermethylation of PPAR γ promoter (53). Moreover, low maternal PPAR α expression, possibly through the promoter hypermethylation, increased Interferon γ and decrease IL-10 levels (54). Upregulation of PPAR- γ mRNA and protein levels induced inhibition of the NF- κ B pathway, which in turn decreased the protein overexpression of the downstream inflammatory mediators TNF- α , IL-6 (55).

We have also measured the COX-2 gene expression, an enzyme which catalyzes the formation of prostaglandins from arachidonic acid, and is found in high levels in inflammatory state (56;57). COX-2 gene expression was increased in the liver of the 12-week HFHS group, and this could be explained by PPAR inhibitions. In fact, hyperosmolar medium, in renal epithelial cells, decreased PPAR γ protein resulting in the induction of COX-2 expression (58). It has also been demonstrated that the recovery of PPAR γ expression with a recombinant deficiency adenoviral PPAR γ resulted in the inhibition of COX-2 in MC-3T3 E1 cells. (59). COX-2 protein expression was also decreased by an upregulation of PPAR- γ mRNA and protein levels (55).

We next examined oxidative stress because it is closely associated with inflammation by different signaling pathways. We have measured lipid peroxidation reflected by the malondialdehyde (MDA) and found an increase in the liver of the 12-week HFHS groups.

Moreover, the 12 weeks HFHS diet was associated with the inhibition of hepatic SOD2 and GPx activity probably due to a high oxidative since it has been demonstrated that these enzymes could be inhibited in the case of high oxidative stresses {Pigeolet, 1990 1 /id}. This oxidative stress could be explained by PPAR α/γ inhibition due to the hypermethylation of their promoters. In fact, cyclophosphamide administration to rats induced a PPAR γ downregulation, which was associated with reduced SOD and GPx activities as well as increased liver lipid peroxidation (60). Administration of urolithins (the metabolites of ellagic acid by intestinal flora in gastrointestinal tract) and ellagic acid increased the PPAR- γ protein expression, which was associated with a decrease in the intracellular ROS and MDA levels, and an increase in SOD activity in H₂O₂-treated T24 cells (61). This oxidative stress found in the HFHS mouse model could also participate to the epigenetic alterations of PPAR α/γ promoters since altered ROS levels could affect epigenetic mechanisms (62;63). It was suggested that ROS, more precisely the superoxide anion, participates in this process as a nucleophilic agent by deprotonating the cytosine molecule at C-5 position, thereby accelerating the reaction of DNA with the positive charged intermediate S-adenosyl-L-methionine (SAM), a methyl donor (64).

By using the dual agonist PPAR α/δ agonist GFT505, all MetS features, including oxidative stress and inflammation, were eliminated in HFHS mouse model. Collectively, our data show that in addition to counteracting cardiometabolic disorders, GFT505 significantly attenuates inflammation. Indeed, GFT-505 effects correlated with reduced hepatic gene expression of proinflammatory genes like interleukin-1 β and TNF- α (44;65;66). Its impact on oxidative stress could be explained by its effects on inflammation since these two phenomena are

closely related, but also because PPAR γ agonists were able to reduce superoxide generation in endothelial cells (67) and generation of ROS (68).

In conclusion, this study has demonstrated that HFHS diet has induced hypermethylation of key metabolic genes PPAR α and PPAR γ , thereby promoting most of the features of the MetS, including inflammation and oxidative stress. The dual PPAR α/δ agonist GFT505 has counteracted several pathological aberrations of the MetS in the HFHS mouse model by normalizing DNA methylation of PPAR promoters.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the J.A. DeSève Research Chair in Nutrition.

REFERENCES

- 1 Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007; **132/6**: 2087-2102.
- 2 Champion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009; **10/4**: 383-392.
- 3 Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol* 1998; **84/4**: 1311-1315.
- 4 Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* 2006; **17/9**: 571-588.
- 5 Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008; **46/4**: 499-505.
- 6 Mohamed-Ali V, Goodrick S, Bulmer K, Holly JM, Yudkin JS, Coppel SW. Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Am J Physiol* 1999; **277/6 Pt 1**: E971-E975.

- 7 Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114/12**: 1752-1761.
- 8 Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F, Micelli-Ferrari T, Cardia L, Altomare E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 1998; **25/3**: 369-372.
- 9 Vericel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, Lagarde M. Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 2004; **53/4**: 1046-1051.
- 10 Chao PC, Huang CN, Hsu CC, Yin MC, Guo YR. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycated LDL, IL-1 α and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Eur J Nutr* 2010; **49/7**: 429-434.
- 11 Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR et al. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997; **80/1**: 45-51.
- 12 Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production

- via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; **97/8**: 1916-1923.
- 13 Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; **95/3**: 588-593.
 - 14 Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007; **261/5**: 412-417.
 - 15 Ling C, Del GS, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* 2008; **51/4**: 615-622.
 - 16 Barres R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K et al. Non-CpG methylation of the PGC-1 α promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab* 2009; **10/3**: 189-198.
 - 17 Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; **347/6294**: 645-650.
 - 18 Dietz M, Mohr P, Kuhn B, Maerki HP, Hartman P, Ruf A et al. Comparative molecular profiling of the PPAR α /gamma activator aleglitazar: PPAR selectivity, activity and interaction with cofactors. *ChemMedChem* 2012; **7/6**: 1101-1111.

- 19 Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; **10/3**: 245-257.
- 20 Fruchart JC, Staels B, Duriez P. PPARs, metabolic disease and atherosclerosis. *Pharmacol Res* 2001; **44/5**: 345-352.
- 21 Delerive P, De BK, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999; **274/45**: 32048-32054.
- 22 Fruchart JC. Selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulators (SPPARalpha): the next generation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-agonists. *Cardiovasc Diabetol* 2013; **12**: 82.
- 23 Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; **205/1**: 1-8.
- 24 Roberts LD, Murray AJ, Menassa D, Ashmore T, Nicholls AW, Griffin JL. The contrasting roles of PPARdelta and PPARgamma in regulating the metabolic switch

- between oxidation and storage of fats in white adipose tissue. *Genome Biol* 2011; **12/8**: R75.
- 25 Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100/26**: 15924-15929.
- 26 Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM et al. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103/9**: 3444-3449.
- 27 Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 2012; **23/7**: 351-363.
- 28 Cariou B, Hanf R, Lambert-Porcheron S, Zair Y, Sauvinet V, Noel B et al. Dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist GFT505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects. *Diabetes Care* 2013; **36/10**: 2923-2930.
- 29 Cariou B, Zair Y, Staels B, Bruckert E. Effects of the new dual PPAR alpha/delta agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 2011; **34/9**: 2008-2014.

- 30 Lavigne C, Tremblay F, Asselin G, Jacques H, Marette A. Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; **281/1**: E62-E71.
- 31 Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C et al. Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism* 2009; **58/7**: 909-919.
- 32 Precourt LP, Seidman E, Delvin E, Amre D, Deslandres C, Dominguez M et al. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41/7**: 1628-1637.
- 33 Marcil V, Seidman E, Sinnett D, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF et al. Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2010; **285/52**: 40448-40460.
- 34 Precourt LP, Marcil V, Ntimbane T, Taha R, Lavoie JC, Delvin E et al. Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; **303/5**: G623-G634.
- 35 Lavoie JC, Spalinger M, Chessex P. Glutathione synthetic activity in the lungs in newborn guinea pigs. *Lung* 1999; **177/1**: 1-7.

- 36 Marcil V, Seidman E, Sinnett D, Sanchez R, Spahis S, Sane A et al. Tissue distribution and regulation of the small Sar1b GTPase in mice. *Cell Physiol Biochem* 2014; **33/6**: 1815-1826.
- 37 Levy E, Spahis S, Garofalo C, Marcil V, Montoudis A, Sinnet D et al. Sar1b transgenic male mice are more susceptible to high-fat diet-induced obesity, insulin insensitivity and intestinal chylomicron overproduction. *J Nutr Biochem* 2014; **25/5**: 540-548.
- 38 Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005; **135/6**: 1382-1386.
- 39 Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br J Nutr* 2008; **100/2**: 278-282.
- 40 Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007; **97/3**: 435-439.

- 41 Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; **112/17**: 2735-2752.
- 42 Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 2008; **122/6**: 727-735.
- 43 Cariou B, Zair Y, Staels B, Bruckert E. Effects of the new dual PPAR alpha/delta agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 2011; **34/9**: 2008-2014.
- 44 Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013; **58/6**: 1941-1952.
- 45 Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005; **51/2**: 85-94.
- 46 McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; **85/2**: 571-633.

- 47 Delisle H. [Foetal programming of nutrition-related chronic diseases]. *Sante* 2002; **12/1**: 56-63.
- 48 Bruce KD, Cagampang FR. Epigenetic priming of the metabolic syndrome. *Toxicol Mech Methods* 2011; **21/4**: 353-361.
- 49 Fujiki K, Kano F, Shiota K, Murata M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biol* 2009; **7**: 38.
- 50 Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007; **97/3**: 435-439.
- 51 Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol* 2013; **231/3**: 290-300.
- 52 Liou HC, Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5/3**: 477-487.

- 53 Zhao Q, Fan YC, Zhao J, Gao S, Zhao ZH, Wang K. DNA methylation patterns of peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene associated with liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2013; **20/6**: 430-437.
- 54 Mikael LG, Pancer J, Wu Q, Rozen R. Disturbed one-carbon metabolism causing adverse reproductive outcomes in mice is associated with altered expression of apolipoprotein AI and inflammatory mediators PPARalpha, interferon-gamma, and interleukin-10. *J Nutr* 2012; **142/3**: 411-418.
- 55 Zeng C, Xiao JH, Chang MJ, Wang JL. Beneficial effects of THSG on acetic acid-induced experimental colitis: involvement of upregulation of PPAR-gamma and inhibition of the Nf-Kappab inflammatory pathway. *Molecules* 2011; **16/10**: 8552-8568.
- 56 Wallace JL. Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; **30/4**: 971-980.
- 57 Kankuri E, Vaali K, Korpela R, Paakkari I, Vapaatalo H, Moilanen E. Effects of a COX-2 preferential agent nimesulide on TNBS-induced acute inflammation in the gut. *Inflammation* 2001; **25/5**: 301-310.
- 58 Casali CI, Weber K, Faggionato D, Gomez EM, Tome MC. Coordinate regulation between the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and cyclooxygenase-2 in renal epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2014; **90/4**: 432-439.

- 59 Kim TG, Lee YH, Bhattari G, Lee NH, Lee KW, Yi HK et al. PPARgamma inhibits inflammation and RANKL expression in epoxy resin-based sealer-induced osteoblast precursor cells E1 cells. *Arch Oral Biol* 2013; **58/1**: 28-34.
- 60 Mahmoud AM. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPARgamma and abrogation of oxidative stress and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2014; 1-8.
- 61 Qiu Z, Zhou B, Jin L, Yu H, Liu L, Liu Y et al. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food Chem Toxicol* 2013; **59**: 428-437.
- 62 Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V et al. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* 2007; **9/12**: 1111-1121.
- 63 Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 2007; **43/7**: 1023-1036.
- 64 Afanas'ev I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. *Aging Dis* 2014; **5/1**: 52-62.

- 65 Quintero P, Arrese M. Nuclear control of inflammation and fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: therapeutic potential of dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonism. *Hepatology* 2013; **58/6**: 1881-1884.
- 66 Cariou B, Staels B. GFT505 for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis and type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* 2014; 1-8.
- 67 Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23/12**: 2203-2208.
- 68 Aljada A, Garg R, Ghanim H, Mohanty P, Hamouda W, Assian E et al. Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor-kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action?. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86/7**: 3250-3256.

FIGURE LEGENDS

Table 1 **Composition of dietary regimens.** The overall composition of dietary regimens is expressed as a percentage of total weight. HFHS diet is composed of 65.4 % fat and the chow diet is characterized by 18 % fat.

Figure 1 **Effects of the 12-week HFHS diet and GFT505 on body and tissue weights.** Body (A), liver (B), visceral adiposity (C) and subcutaneous adiposity (D) weights were measured as described in “Materials and Methods”. Values are expressed as means \pm SEM of seven animals per group. ***P<0.001 vs. 12 weeks HFHS group; ###P<0.001 vs. 12 weeks chow.

Figure 2 **Effects of the 12-week HFHS diet and GFT505 on fasting glycemia and insulin sensitivity.** Blood glucose concentrations (A) and plasma insulin level (B) were determined as described in “Materials and methods”. To evaluate glucose/insulin homeostasis the HOMA-IR index was calculated (C). Values are expressed as means \pm SEM of seven animals per group. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. 12 weeks HFHS group; ##P<0.01 vs. 12 weeks chow.

Figure 3 **Effects of the 12-week HFHS diet and GFT505 on lipid accumulation.** Plasma (A) and liver (C) triglycerides as well as plasma cholesterol (B) were measured as described in “Materials and methods”. Values are expressed as means \pm SEM of seven animals per group. *P<0.05, ***P<0.001 vs. 12 weeks HFHS group; ##P<0.01, ###P<0.001 vs. 12 weeks chow.

Figure 4 **Effects of the 12-week HFHS diet and GFT505 on inflammatory markers.** Gene expressions of NF- κ B (A), TNF- α (B), FAS (C) and COX-2 (D) were

determined by qRT-PCR as described in “Materials and Methods”. Hepatic PGE2 amount (E) was measured as described in “Materials and Methods”. Values are expressed as means \pm SEM of seven animals per group. ***P<0.001 vs. 12 weeks HFHS group; ##P<0.01 vs. 12 weeks chow.

Figure 5 **Effects of the 12-week HFHS diet and GFT505 on oxidative stress.** Lipid peroxidation reflected by malondialdehyde (A) as well as SOD2 (B) and GPx (C) activities were measured as described in “Materials and methods”. Values are expressed as means \pm SEM of seven animals per group. ***P<0.001 vs. 12 weeks HFHS group.

Figure 6 **Effects of the 12-week HFHS diet and GFT505 on PPAR α and PPAR γ .** PPAR α and PPAR γ gene expressions were determined by qRT-PCR as described in “Materials and methods”. PPAR α and PPAR γ promoter methylations were determined as described in “Materials and methods”. Values are expressed as means \pm SEM of seven animals per group. ***P<0.001 vs. 12 weeks HFHS group. ###P<0.001 vs. 12 weeks chow.

Table 1

	Chow diet	HFHS diet	
Ingredients (g/100g)	Crude protein	18.6	Casein 20
	Fat	6.2	Lard 19.8
	Carbohydrate	44.3	Corn oil 19.8
	Crude fiber	3.5	Sucrose 27
	Insoluble fiber	14.7	Cellulose 5
	Ash	5.3	Vitamin + mineral 8.4
Composition (kcal %)			
	Protein	24	15
	Carbohydrate	58	19.6
	Lipid	18	65.4
Energy density (kcal/g)		3.1	5.4

Figure 1

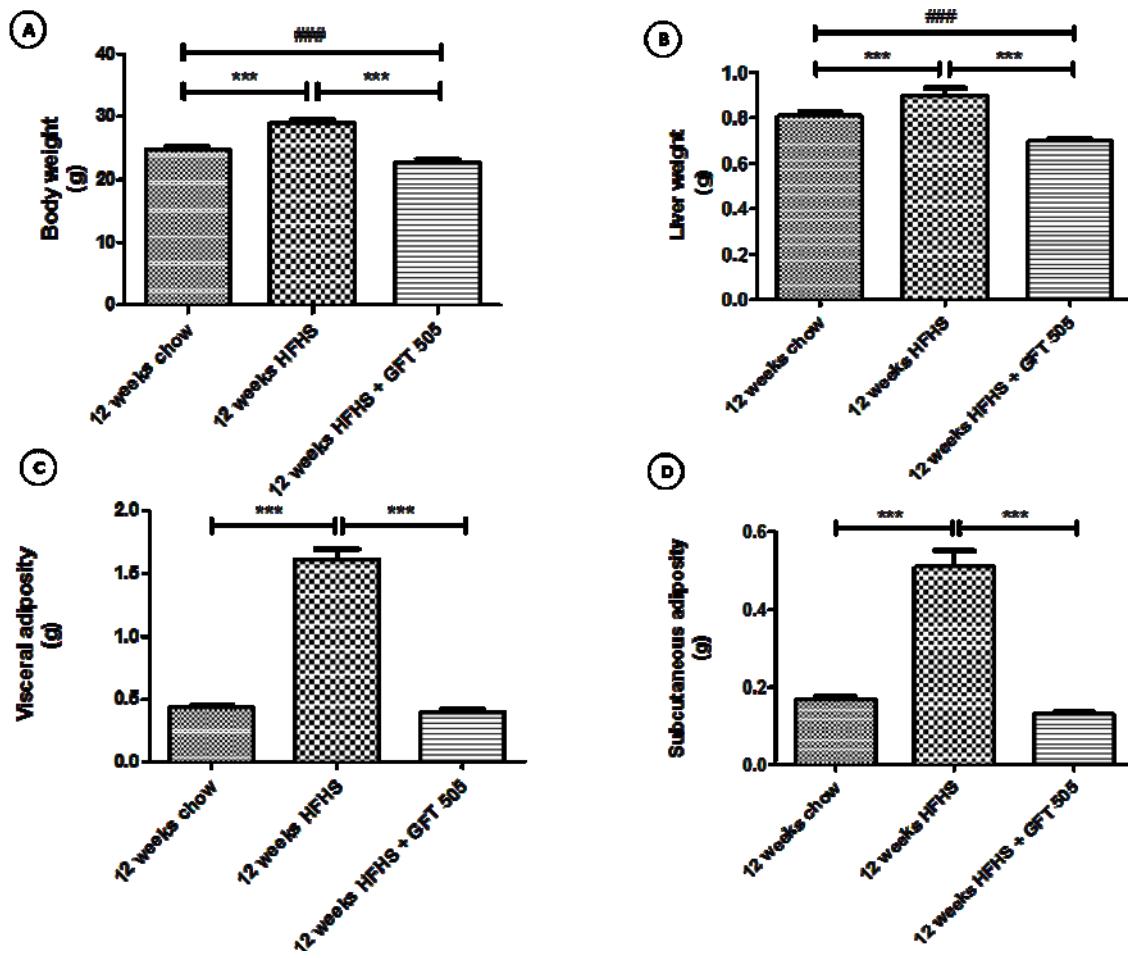


Figure 2

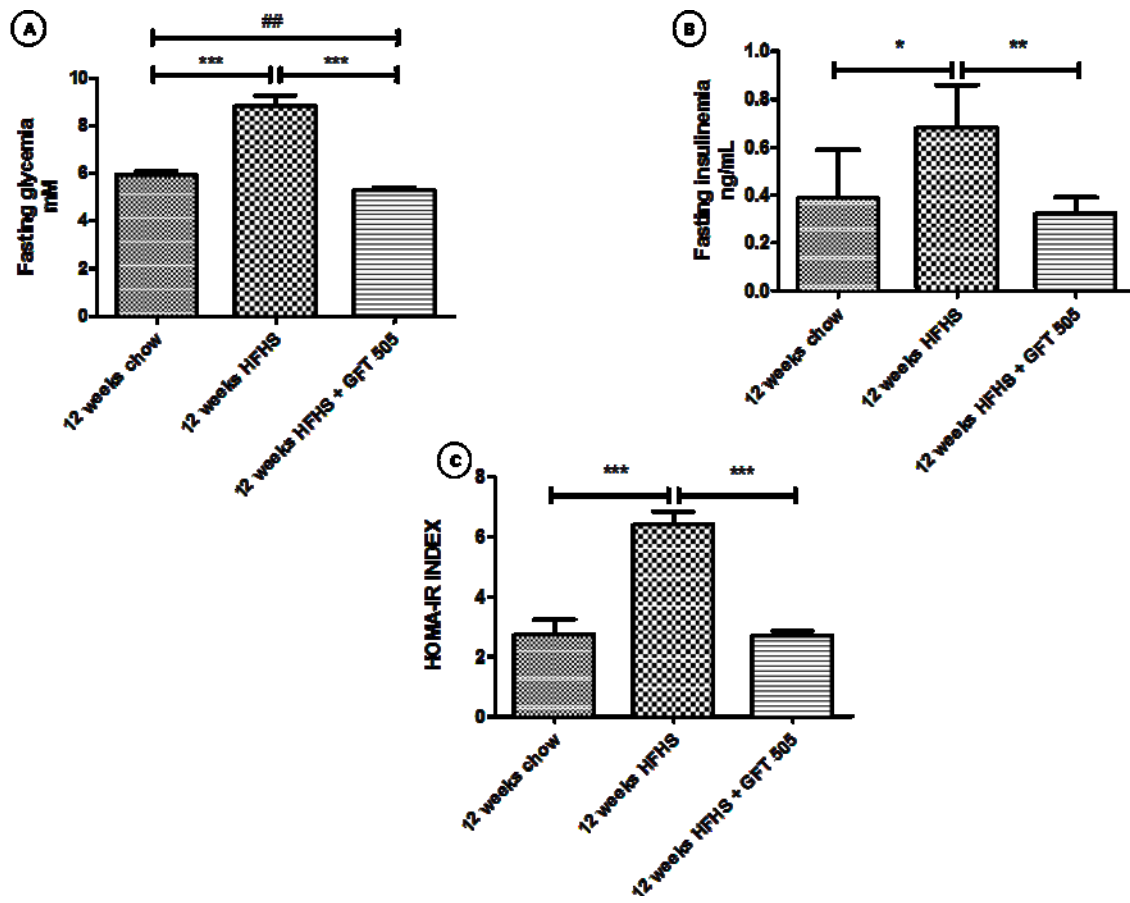


Figure 3

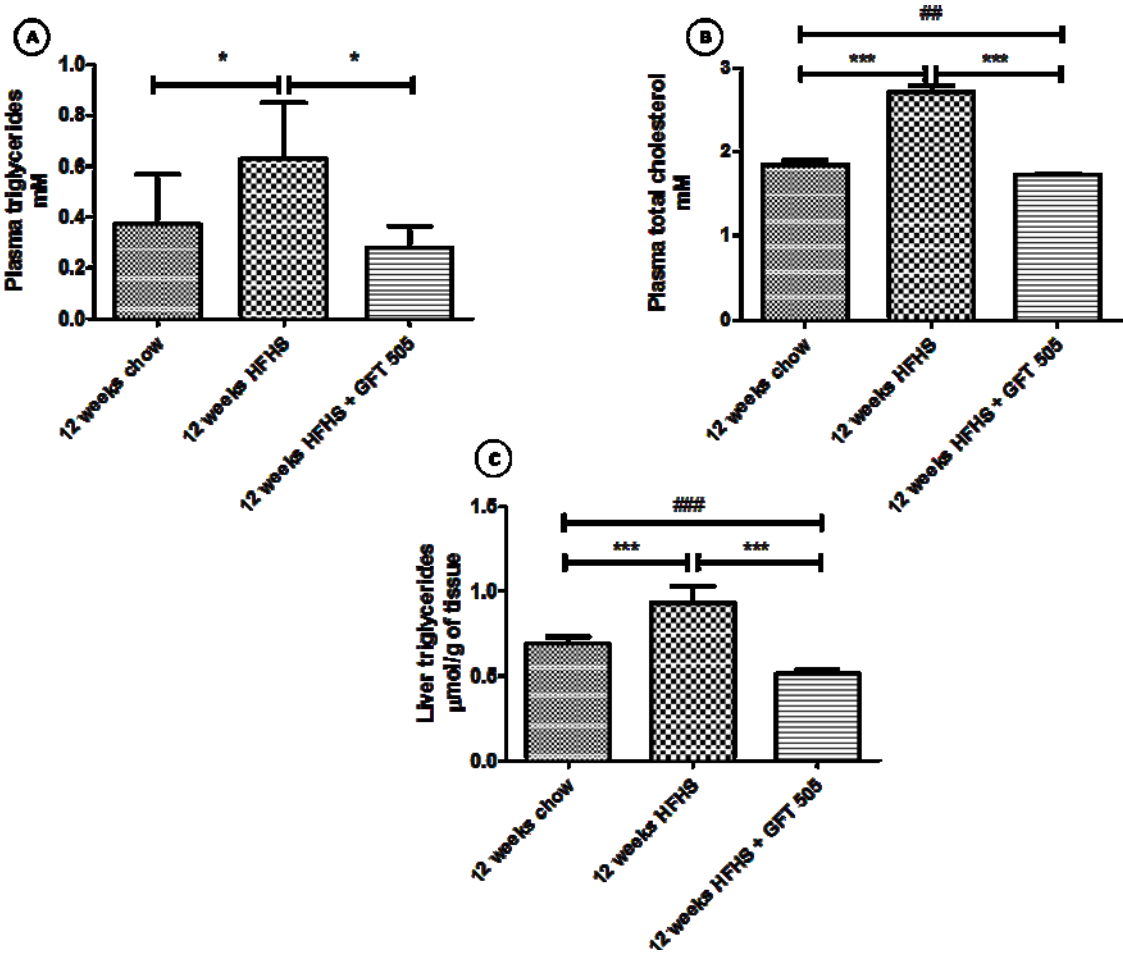


Figure 4

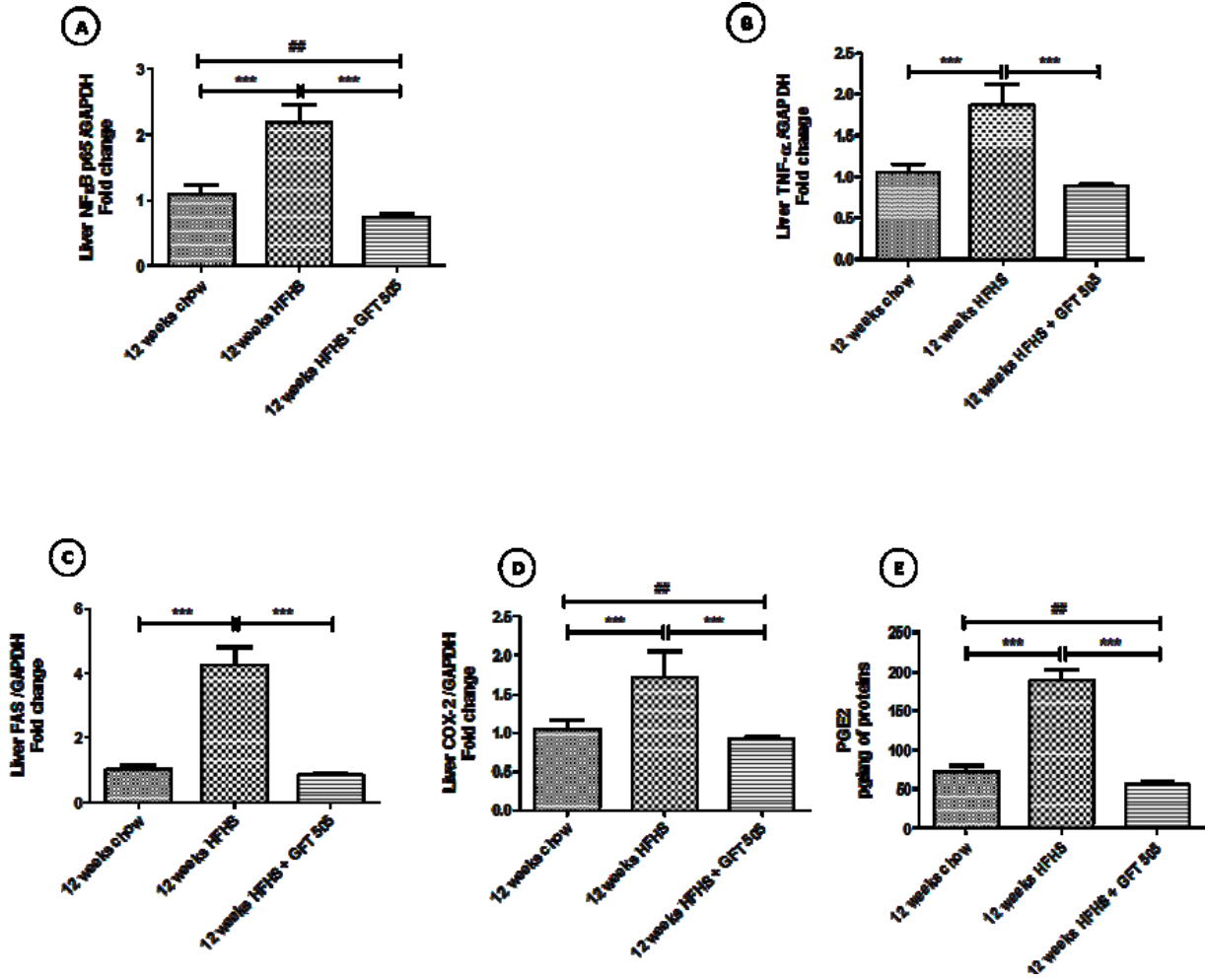


Figure 5

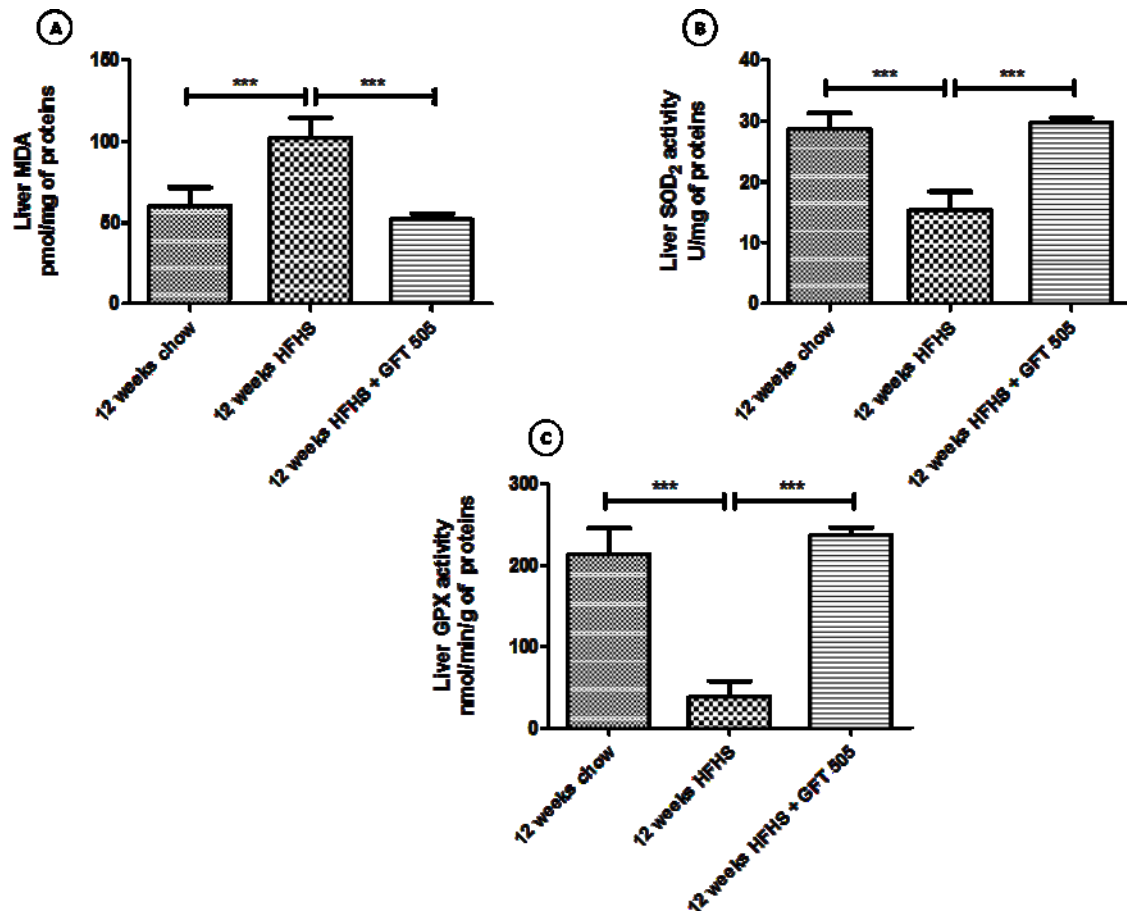
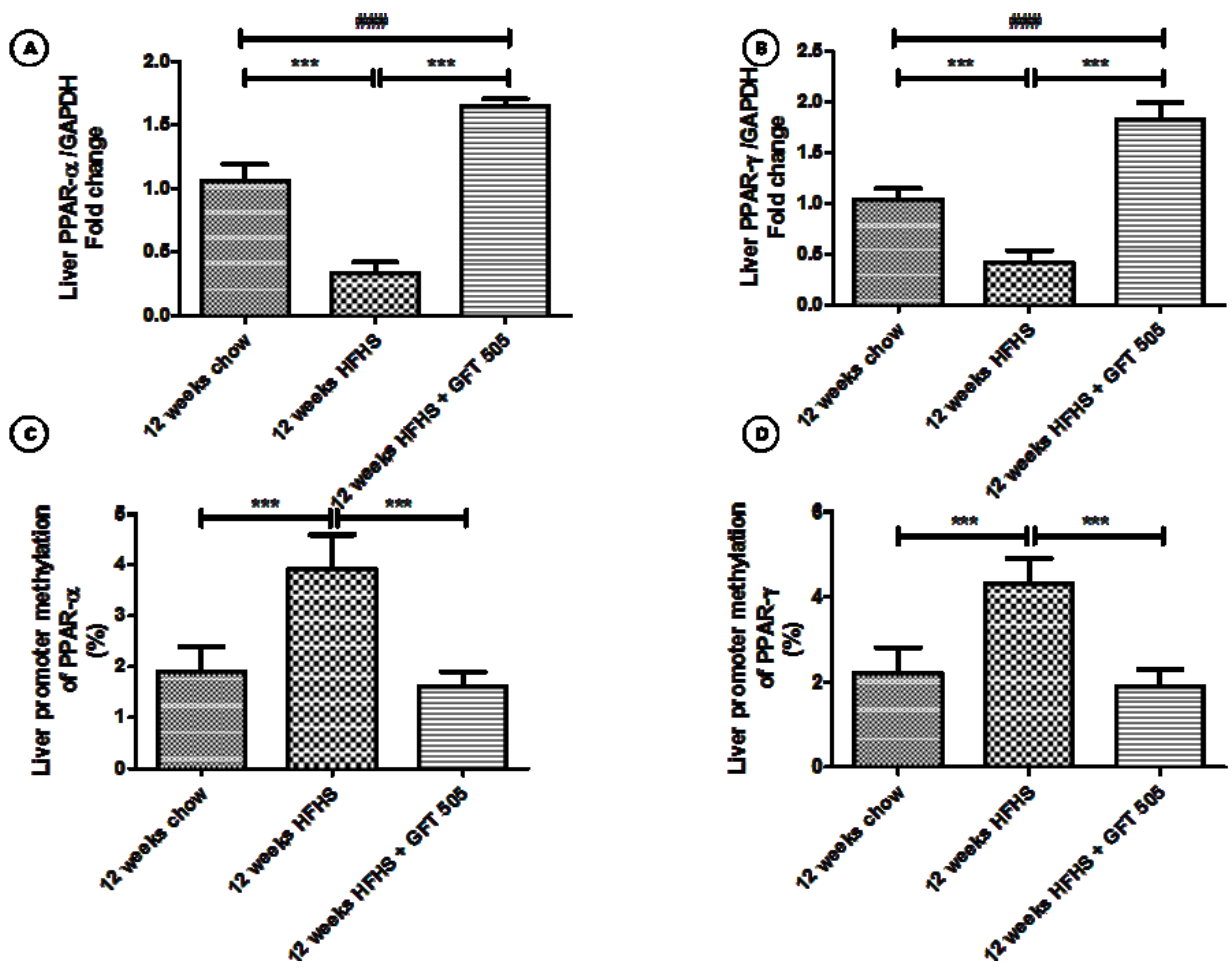


Figure 6



SUPPLEMENTARY DATA

- Figure 7** **Effects of dietary regimens on body and liver weights.** The effects of dietary regimens on body (A) and liver weights (B) are expressed as means \pm SEM of five animals per group. *P<0.05 vs. 8 weeks chow group; #P<0.05 vs. chow group.
- Figure 8** **Effects of dietary regimens on fasting glycemia and insulin sensitivity.** Blood glucose concentrations (A) and plasma insulin levels (B) were measured as described in “Materials and methods”. To evaluate glucose/insulin homeostasis the HOMA-IR index was calculated (C). Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group. *P<0.05 vs. 8 weeks chow group.
- Figure 9** **Effects of dietary regimens on lipid accumulation in the liver and intestine of mice.** Hepatic (A) and intestinal (B) triglycerides as well as hepatic (C) and intestinal (D) cholesterol, and hepatic (E) and intestinal (F) phospholipids were measured. Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group. *P<0.05, **P<0.01 vs. 8 weeks chow group.
- Figure 10** **Effects of dietary regimens on hepatic and intestinal transcription factor NF- κ B.** The protein expression of hepatic (A) and intestinal (B) NF- κ B and hepatic (C) and intestinal (D) I κ B were determined by western blot. Then the NF- κ B/ I κ B was calculated (E, F). Values are expressed as means \pm SEM of

five animals per group. *P<0.05 vs. 8 weeks chow group; #P<0.05, ###P<0.001 vs. chow group.

Figure 11 Effects of dietary regimens on inflammatory markers. The protein expression of hepatic (A) and intestinal (B) COX-2 were determined by western blot. Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group. #P<0.05 vs. chow group.

Figure 12 Effects of dietary regimens on lipid peroxidation. Hepatic (A) and intestinal (B) lipid peroxidation reflected by malondialdehyde were measured as described in “Materials and methods”. Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group. \$P<0.05 vs. 6 weeks chow; *P<0.05 vs. 8 weeks chow; ##P<0.01 vs. chow group.

Figure 13 Effects of dietary regimens on total SOD and SOD2 activities. Hepatic (A) and intestinal (B) total SOD activities as well as hepatic (C) and intestinal (D) SOD2 activities were measured as described in “Materials and methods”. Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group. *P<0.05 vs. 8 weeks chow.

Figure 14 Effects of dietary regimens on peroxidase and reductase activities. Hepatic (A) and intestinal (B) peroxidase activities as well as hepatic (C) and intestinal (D) reductase activities were measured as described in “Materials and methods”. Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group.

Figure 15 Effects of dietary regimens on Bcl-2, Nrf2 and cytochrome C protein expressions. The protein expressions of hepatic (A) and intestinal (B) Bcl-2, hepatic (C) and intestinal (D) Nrf2, and hepatic (E) and intestinal (F) cytochrome C were determined by western blot. Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group. ***P<0.001 vs. 8 weeks chow.

Figure 16 Effects of dietary regimens on LINE-1 methylation. Hepatic (A) and intestinal (B) LINE-1 methylations were measured as described in “Materials and Methods”. Values are expressed as means \pm SEM of five animals per group. **P<0.01 vs. 8 weeks chow.

Figure 7

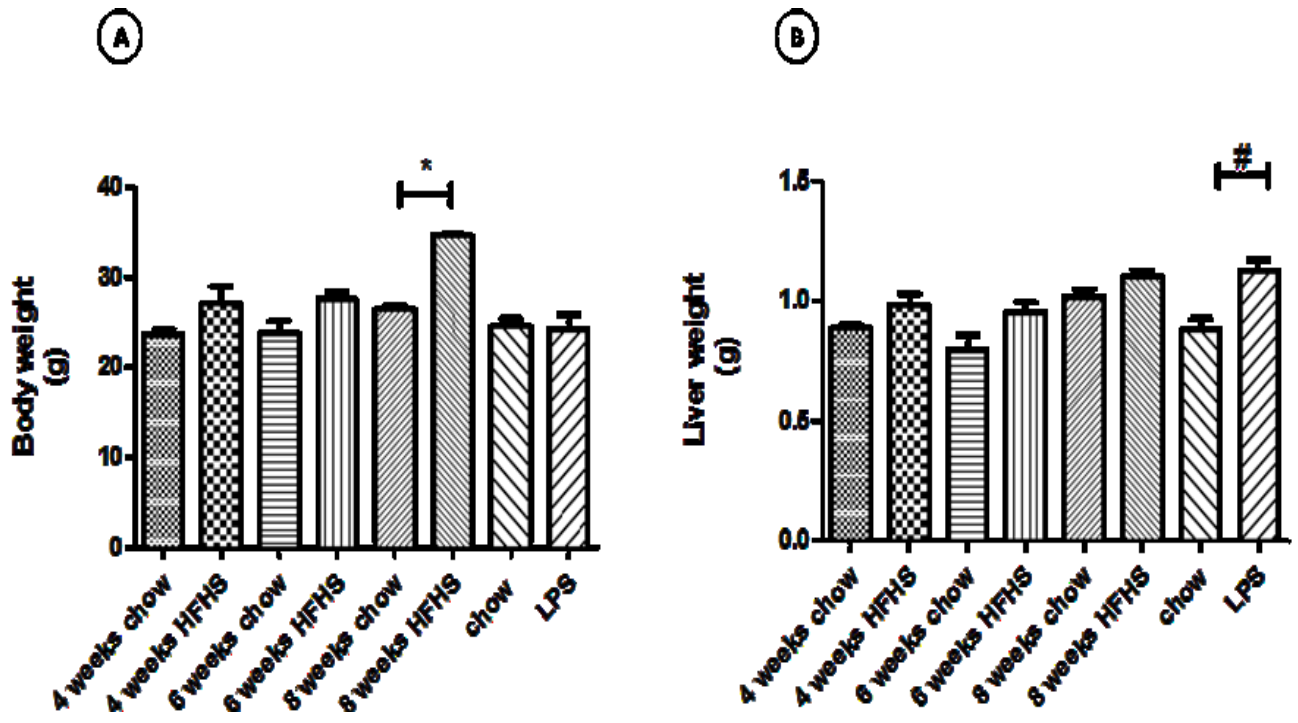


Figure 8

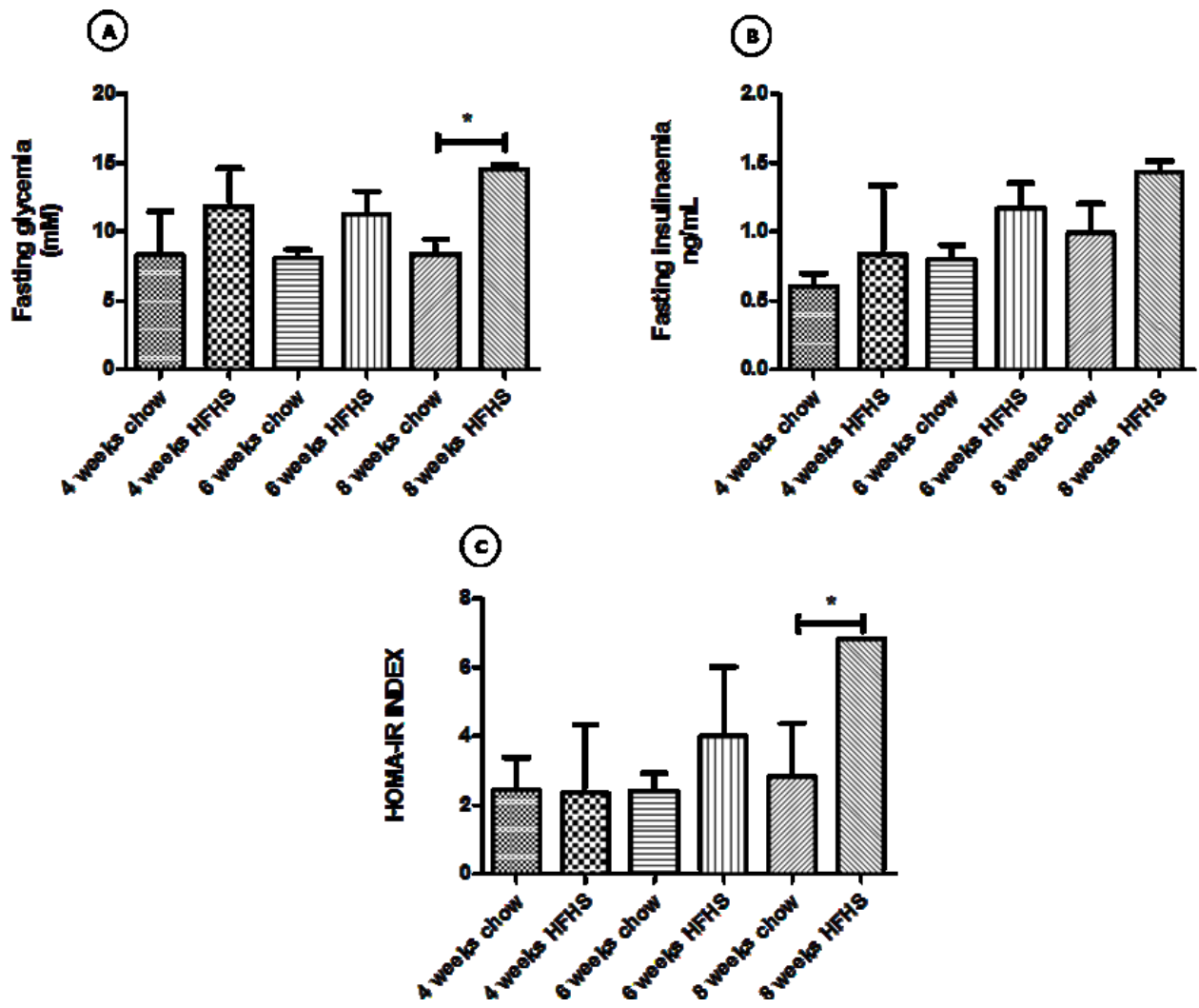


Figure 9

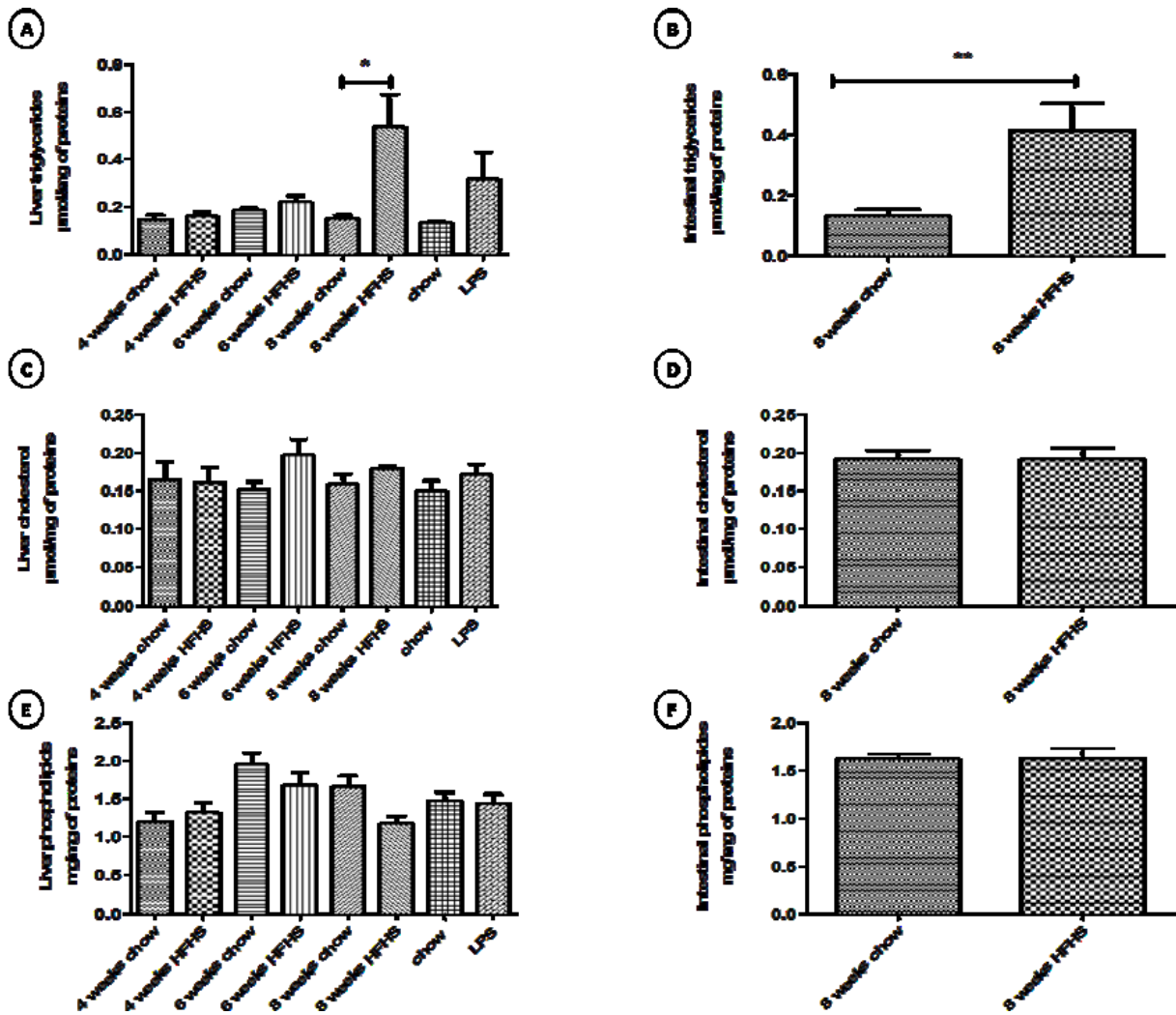


Figure 10

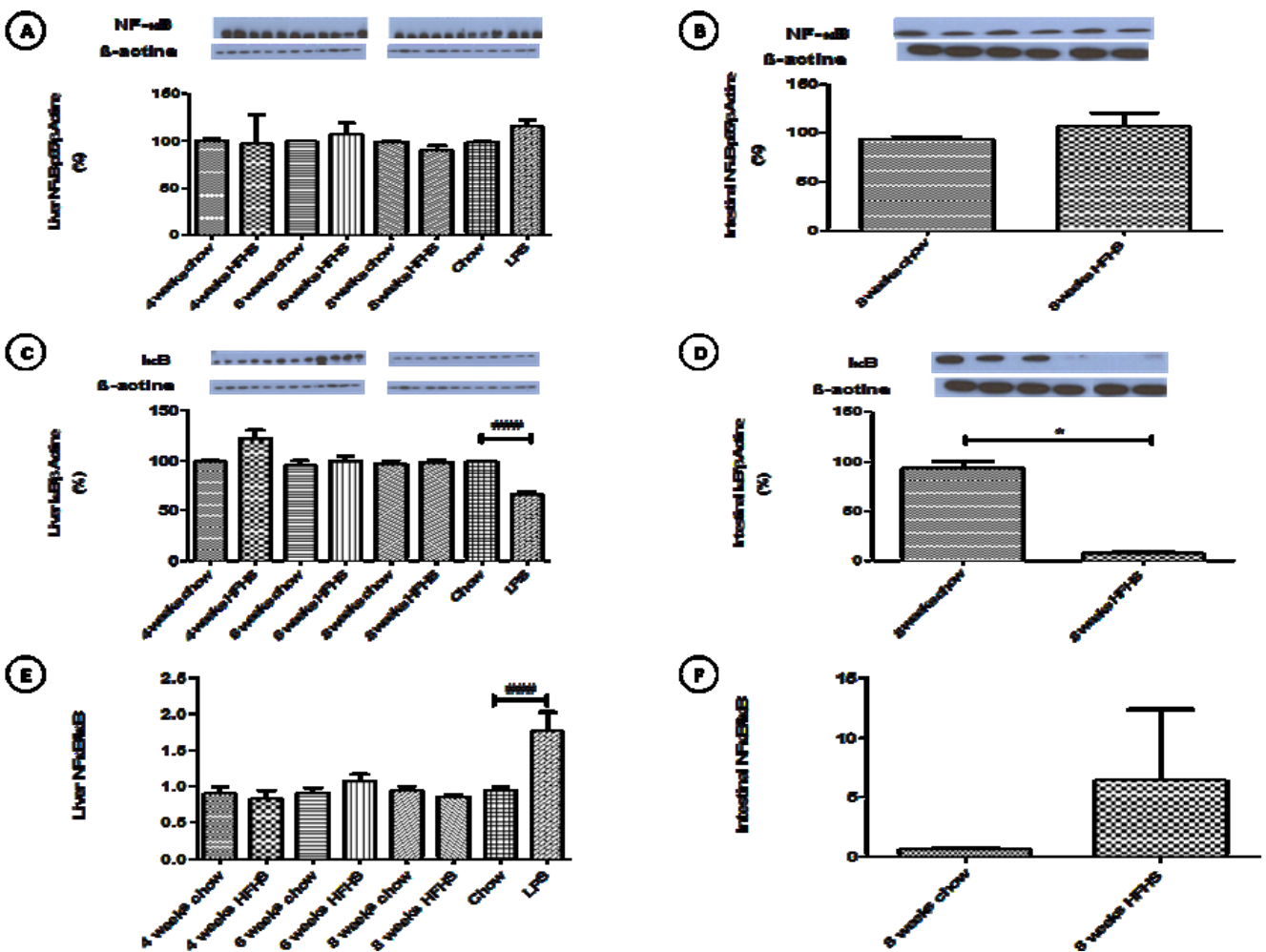
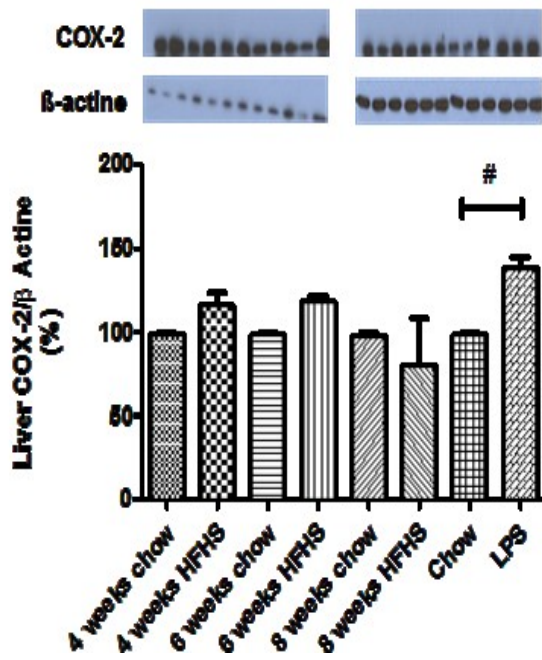


Figure 11

A



B

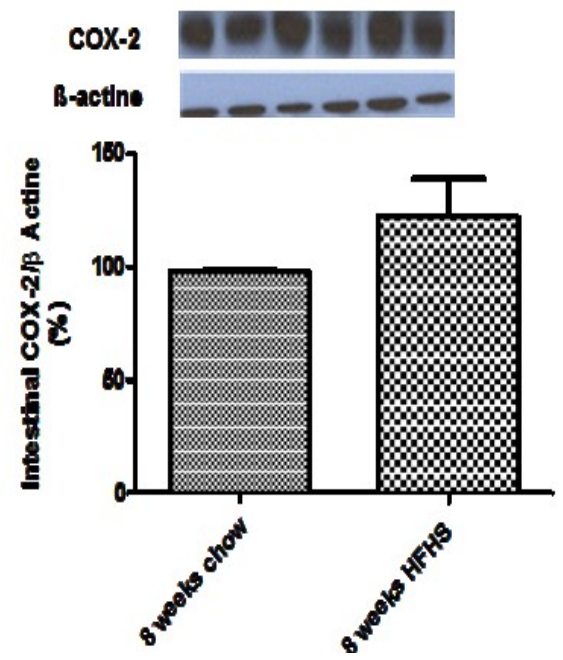


Figure 12

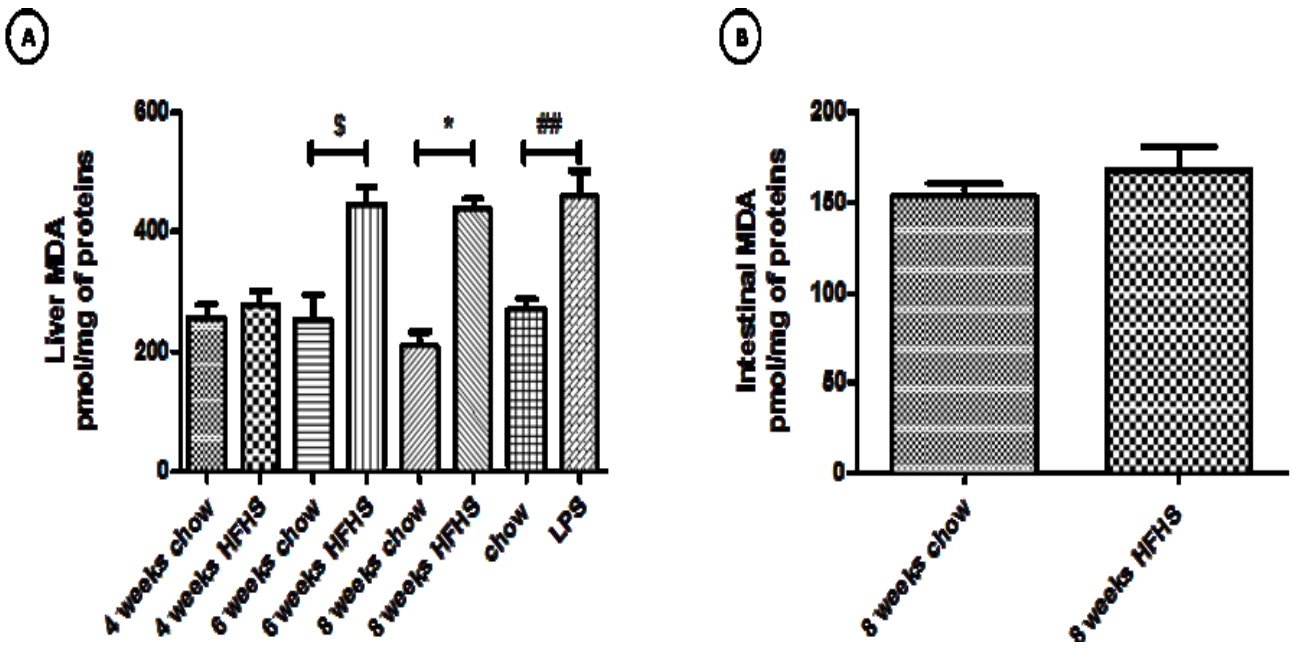


Figure 13

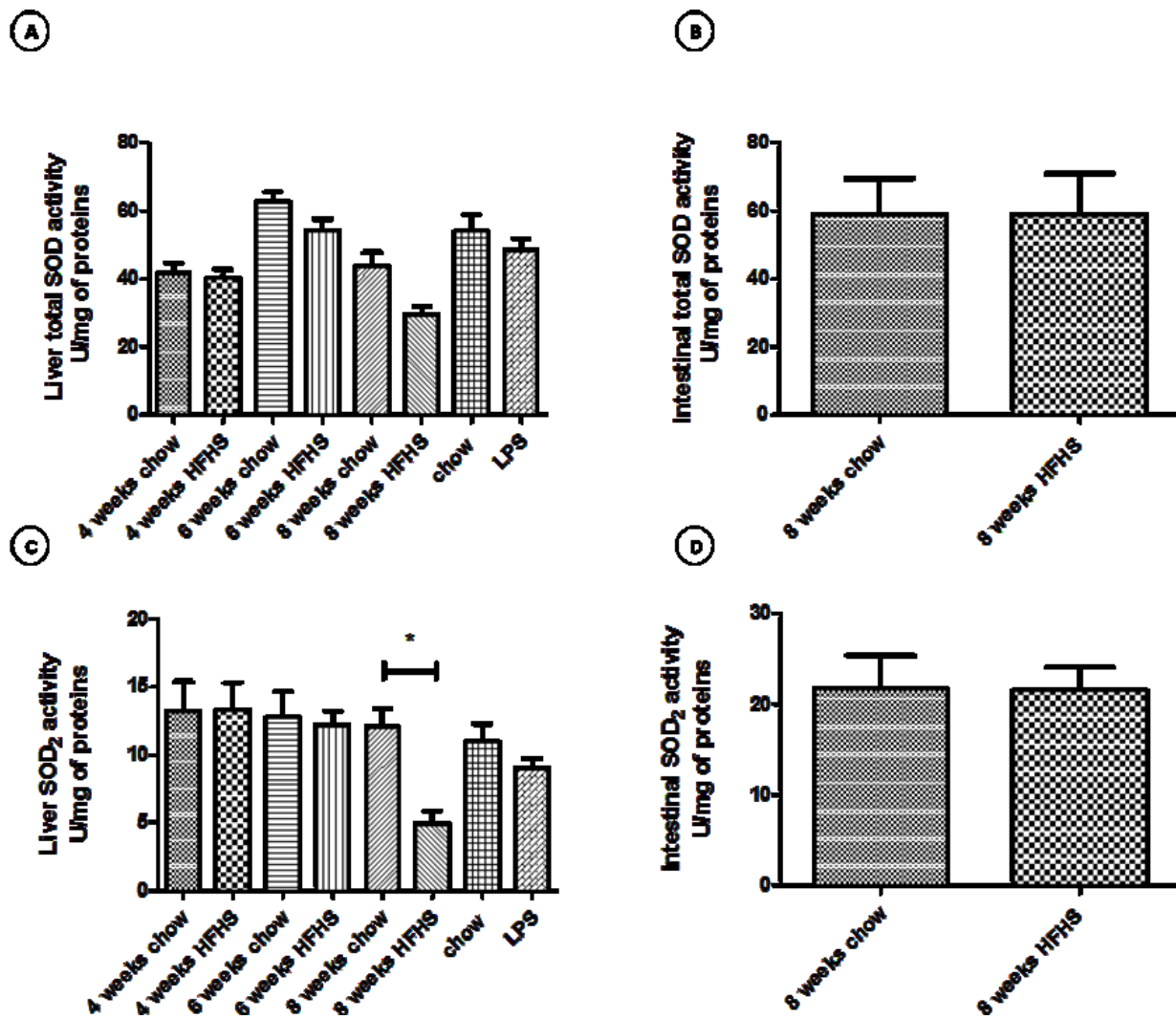


Figure 14

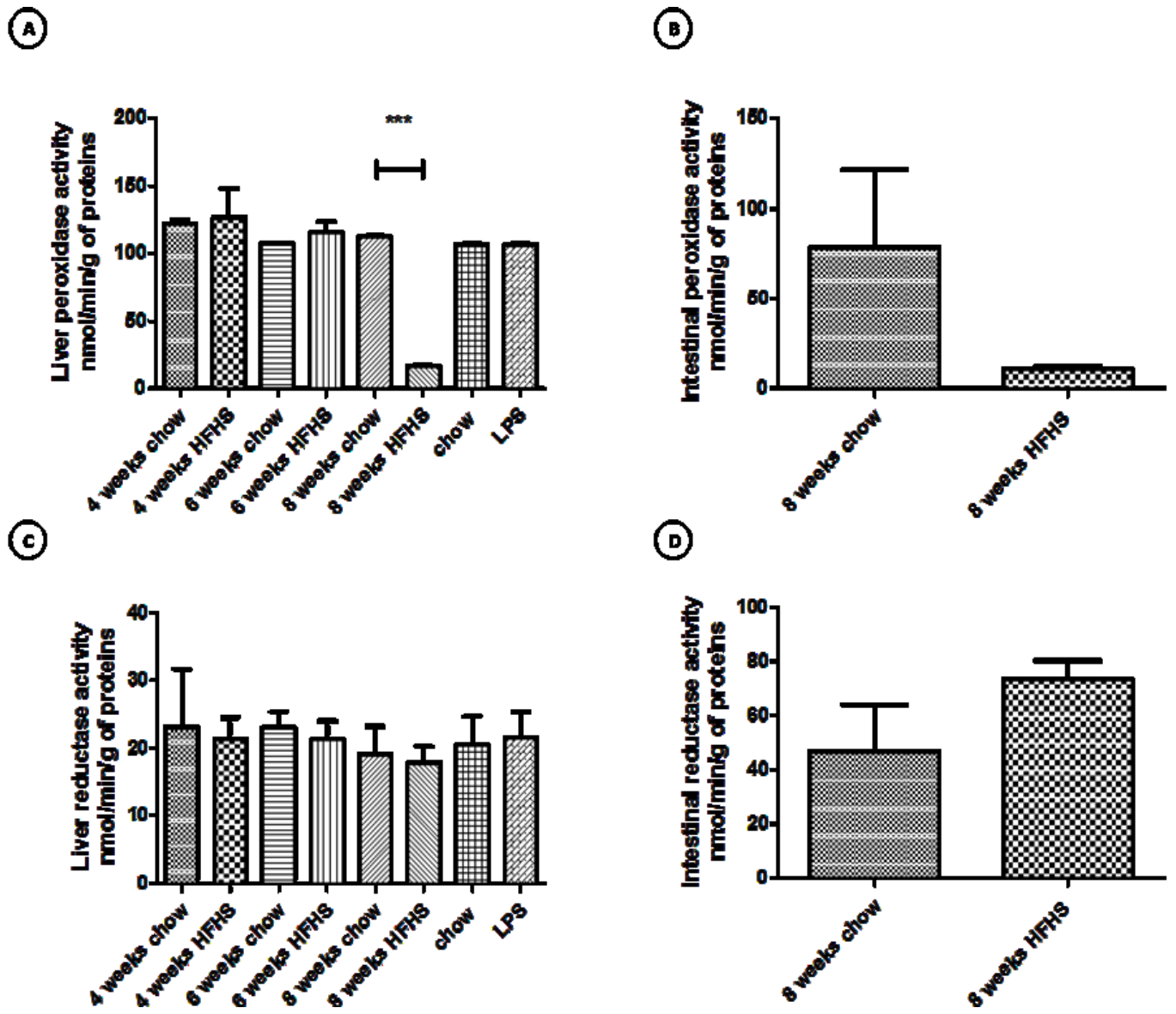


Figure 15

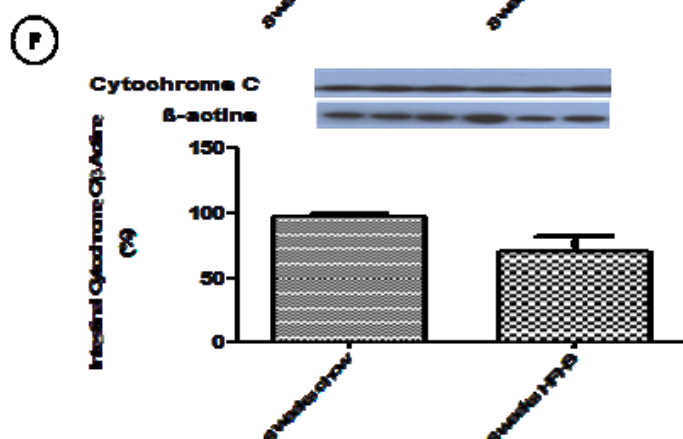
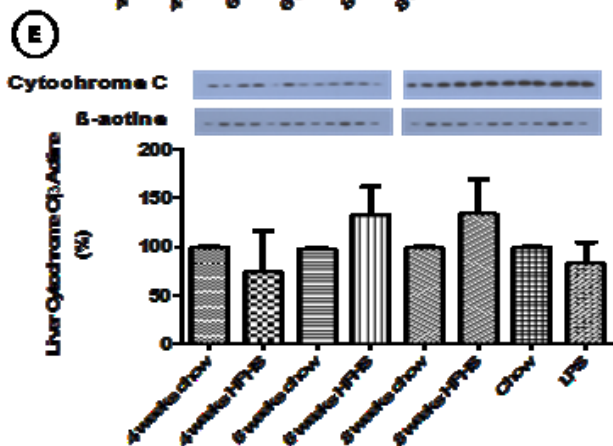
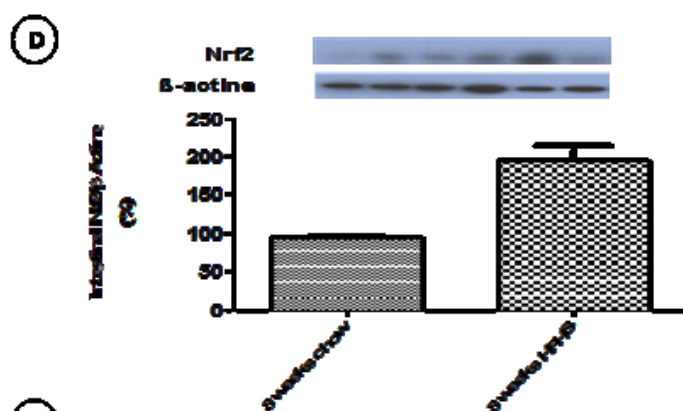
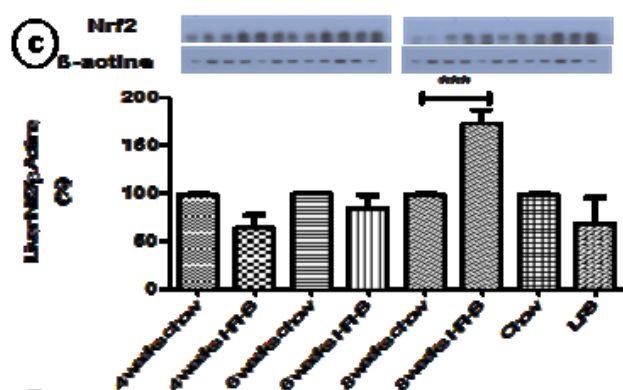
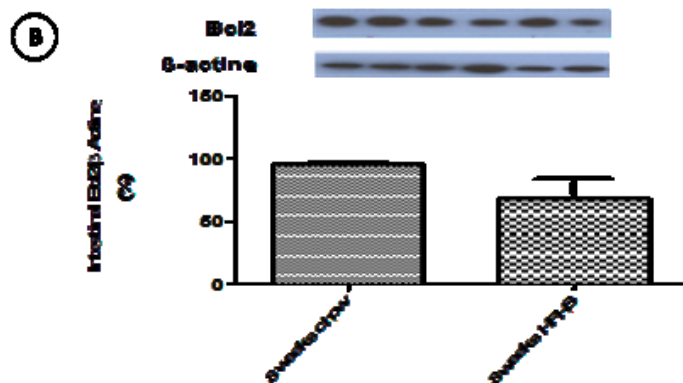
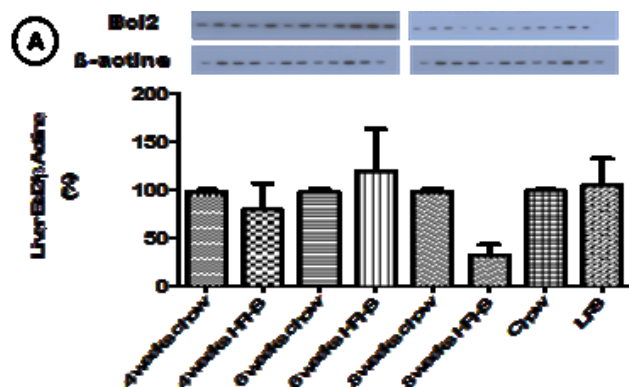
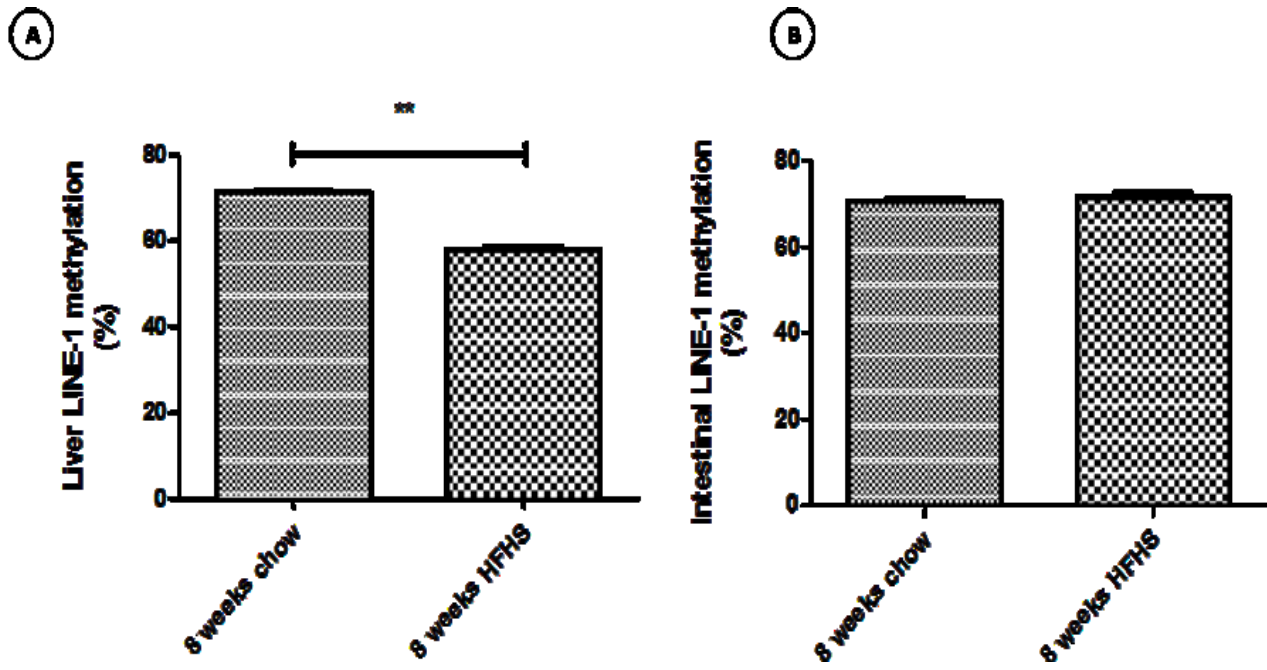


Figure 16



3.4. Article 4

Sabrina Yara, Jean Claude Lavoie and Emile Levy. Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome. Article accepté. Epigenomics 2015.

3.4.1. Apport original et contribution

L'objectif de ce document est essentiellement de revoir le contexte central du syndrome métabolique et d'analyser l'impact des modifications épigénétiques sur l'apparition du stress oxydant et des complications cardiométaboliques. En tant que premier auteur ma contribution a été majeure puisque j'ai rédigé cette revue la supervision du Dr Levy, qui s'est également chargé de sa traduction du français en anglais. Le Dr Lavoie a également participé à cette revue de part ses suggestions et ses commentaires.

Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome

Sabrina Yara¹, Jean-Claude Lavoie², and Emile Levy^{1,3}

Research Centre, CHU-Sainte-Justine, Departments of ¹Nutrition and ²Pediatrics, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

³Canadian Institutes for Health Research Team on the Digestive Epithelium, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

Keywords: DNA methylation, nutrition, oxidative stress, antioxidant defense, inflammation, metabolic syndrome, fetal programming.

Address of correspondence:

*Dr. Emile Levy
Research Center
CHU Sainte-Justine
3175 Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5*



LIST OF ABBREVIATION

ACE-1: enzyme 1 that converts angiotensin

AT1b: angiotensin II receptor

ATP III: adult treatment panel III

CpG: Cytosine phosphate Guanine

CRP: C-reactive protein

DNA: deoxyribonucleic acid

DNMT: DNA methyltransferase

DT2: type 2 diabetes

GPx: glutathionw peroxidase

GSH: glutathione

GSSG: glutathione disulfide

H₂O₂: hydrogen peroxide

HADHB: hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase

HDL: high density lipoprotein

HNF4A: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha

HO : hydroxyl radical

HO⁻: hydroxyl anion

HSL: hormone sensitive lipase

IDF: international diabetes federation

Igf2: insulin-like growth factor-2

Igf2r: insulin-like growth factor-2 receptor

IL-6: interleukin-6

IRS: insulin receptor substrate

LDL: low density lipoprotein

LXR: liver X receptor

MBD: methyl-CpG-binding domain protein

MCR4: melanocortin-4
MDA: malondialdehyde
MS: metabolic syndrome
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NKCC1: Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter 1
NOX: NADPH oxidase
 O_2^- : superoxide anion
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1
Pdx-1: pancreatic and duodenal homeobox 1
PGC-1 α : PPAR α coactivator 1
POMC: proopiomelanocortin
PPAR α : peroxisome proliferator activator receptor- α
PTPb1: protein-tyrosine phosphatase 1B
RG: glucocorticoid receptor
ROS: reactive oxygen species
RUNX3: runt-related transcription factor 3
SAM: S-adenosylmethionine
SERPINA3: serine protease inhibitor
SOD: superoxide dismutase
TBARS: thiobarbituric acid reactive substance
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
UCP: uncoupling protein
WHO: world health organisation

SUMMARY DNA methylation is implicated in tissue-specific gene expression and genomic imprinting. It is modulated by environmental factors, especially nutrition. Modified DNA methylation patterns may contribute to health problems and susceptibility to complex diseases. Current advances have suggested that the metabolic syndrome (MS) is a programmable disease, which is characterized by epigenetic modifications of vital genes when exposed to oxidative stress. Therefore, the main objective of this paper is to critically review the central context of MS while presenting the most recent knowledge related to epigenetic alterations that are promoted by oxidative stress. Potential pro-oxidant mechanisms that orchestrate changes in methylation profiling and are related to obesity, diabetes and hypertension are discussed. It is anticipated that the identification and understanding of the role of DNA methylation marks could be used to uncover early predictors and define drugs or diet-related treatments able to delay or reverse epigenetic changes, thereby combating MS burden.

DNA METHYLATION

In 1942, Conrad Hal Waddington designed a study of processes in which programmed changes to the genotype, during development, led to phenotypes. Subsequently, epigenetic was shown to be hereditary and implicated in gene expression and not due to nucleotide sequence impairment [1]. Currently, epigenetic is defined as being the study of stable genomic modifications that impact on gene expression and function without any alterations in the DNA sequence. Epigenetic mechanisms promote DNA methylation, histone posttranslational modifications and non-coding RNAs. This review focuses specifically on DNA methylation in relation to metabolic syndrome and oxidative stress. Most of the papers were found using the

PubMed database with the following keywords: DNA methylation, nutrition, oxidative stress, antioxidant defense, inflammation, metabolic syndrome and fetal programming.

DNA methylation is the most studied epigenetic post-replication modification and consists of the methylation of CpG dinucleotide cytosines [2]. This covalent biochemical modification to the cytosine base leads to 5-methylcytosine. In human somatic cells, methylated cytosines count for 1% of total DNA bases and affect 70% to 80% of all CpG dinucleotides in the genome [3]. CpG dinucleotides are asymmetrically represented in the genome with CpG-poor or -rich regions. The latter are called CpG islands and cover promoter regions up to the first exons of some genes [4]. They are usually non-methylated in normal cells [5].

The enzymes implicated in this reaction are DNA methyltransferases (DNMTs) that establish and maintain DNA methylation. DNMT1, DNMT3a and DNMT3b catalyze the transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine (SAM) to cytosine. Maintenance methylation between cell generations is very evident and carried out by DNMT1. This is the most abundant enzyme in somatic cells and it is responsible for the maintenance of DNA methylation. It is known to copy methylation patterns to the DNA strand after replicating it [6, 7], and is required for proper embryo development, heredity and chromosome X inactivation [8, 9]. It should also be stated that DNMT3a and DNMT3b are essential for embryo development, and *de novo* methylation in the genome [10-12] after embryo implantation [13, 14]. Studies show that these three enzymes not only cooperate, but they also participate in *de novo* methylation pattern and maintenance [15, 16].

Although DNA methylation prevents the fixation of some proteins, it is attractive for others. In fact, methyl groups protruding from the nucleotide skeleton prevent the linking of

transcription factors [17]. Consequently, exposed methylation sites attract “CpG methyl-binding protein” implicated in transcriptional repression [18]. Specifically, human proteins MBD1, MBD2, MBD3 and MBD4 are known to form a family of nuclear proteins related by the presence of a methyl-CpG-binding domain [19], specifically able to link to methylated DNA [19, 20] except for MBD3, which is implicated in recruiting DNMTs (Figure 1).

Methylation patterns are generally retained after DNA replication in order to pass the epigenetic pattern on to cell offspring, thus creating a link (communication) for the transmission of development or environmental pressures produced by preceding generations. DNA methylation is the best known epigenetic mechanism, and it is clearly implicated in regulating gene expression. In fact, DNA methylation suppresses the transcription process depending on the location and density of the promoter CpG islands [21-23]. The most eloquent examples include chromosome X inactivation [24-26] and retroviral inactivation [27], which are attenuated by the treatment of somatic cells with a demethylating agent; an action that explicitly demonstrates the implication of DNA methylation in the stable inactivation of genes. This inactivation mechanism has been validated following the reactivation of X transgenes of mouse embryo and somatic cells in culture when DNMT1 is absent or inhibited [28]. DNA methylation is also implicated in heredity, since for the same cell, one of the two alleles is stably suppressed by epigenetic modifications, whereas the other allele is maintained in an active state. Furthermore, a DNMT1 deletion leads to impairment of the monoallelic expression of a number of hereditary genes [8]. Noteworthy, this specific regulation is determined based on the parental origin of the allele. It has only been since 1991 that investigators have started to isolate a variety of genes whose expression depends on their parental origin such as *Igf2r* (insulin-like growth factor-2 receptor), *H19* and *Igf2* (insulin-like

growth factor-2). *Igf2r* and *H19* are active only when they are inherited from the mother, whereas *Igf2* is active when it is inherited from the father [29].

Overall, DNA methylation appears as a key mechanism for which a copy of a gene is preferentially suppressed according to parental origin and kept switched off during cell division by DNMT1 [11, 30]. Nevertheless, an epigenetic deregulation of gene footprints is associated with a number of human syndromes and pathologies [31].

DNA METHYLATION AND NUTRITIONAL ENVIRONMENT

Epigenetics is a process that responds to environment variations. In fact, impairment of DNA methylation status as a result of environmental stress has been documented. Tobi et al. [32] demonstrated that individuals who had been exposed to the Dutch Hunger Winter in 1944, during their prenatal period, showed a reduction in DNA methylation of the imprinted *Igf2* gene sixty years later, compared with their unexposed same-sex siblings. The study supports evidence that environmental conditions, very early in life, can lead to persistent epigenetic modifications later in life. This is a confirmation of Barker's hypothesis that intrauterine and postnatal malnutrition results in persistent fetal reprogramming during adulthood, and may contribute to the appearance of pathologies such as cardiovascular diseases and type 2 diabetes [33].

The best studies that show environmental conditions affecting offspring are those that study maternal diet. A good example is related to *Agouti* mice. *Agouti* alleles regulate the production of a pigment in hair follicles. Mice that express the viable yellow *Agouti* gene (*Avy*) are yellow, spotted, obese and prone to develop diabetes and cancer as opposed to Pseudoagouti mice, known as thin and non-diabetic. The *Agouti* mouse phenotype depends on the

expression of the Agouti-related peptide (AgRP), which is regulated by the DNA methylation status at the *Agouti* promoter level [34]. Supplementation of Agouti mice before and during gestation with folic acid (folate), vitamin B12, choline and betaine, which are known to be involved in generation of the methyl donors (S-adenosylmethionine) (Figure 2), has the potential of increasing metabolic pathways such as the synthesis of phospholipid and lipid metabolism. This supplementation leads to the substantial elevation of DNA methylation of the *Agouti* gene in target tissues, specifically in offspring, largely accompanied by a change in phenotypes [35-38]. This study clearly shows how nutrition can affect the epigenetic organization of genes while having long-term consequences on gene expression and specific phenotypes.

Furthermore, over the last few years, a number of studies have focused on the epigenetic impact of nutrition. In this context, a rodent study shows that dietary restriction in maternal protein can reduce the methylation of promoter regions of metabolic regulators such as peroxisome proliferator activator receptor- α (PPAR- α), glucocorticoid receptor (RG) and acyl-CoA oxidase in the liver of first and second generation offspring (F1 et F2) [39]. This is mainly attributed to the reduced DNMT1 expression. The same restriction in maternal protein produces the hypomethylation of RG, PPAR- α and acyl-CoA oxidase, which is reversed by folic acid supplementation [40]. These findings are also observed when offspring receive a protein-restricted diet, i.e., hypomethylation of the RG gene caused by a decrease in Dnmt1 (and not Dnmt3a or Dnmt3b) gene expression [41]. Although RG and PPAR- α hypomethylation is re-established by folate supplementation, hypomethylation of the promoters of other genes, such as that of the *insulin receptor*, weight increase and triglycerides, is maintained, meaning that the specificity of the epigenetic changes during

development does not reverse the phenotype induced by the maternal diet [42]. A recent study also showed that mouse offspring with protein restrictions exhibit hypomethylation of the *Lxr* transcription factor in the liver, and to a lesser extent, in the gut. This gene is implicated in cholesterol and fatty acid metabolism, which confirms the capacity of transgenerational epigenetic processes to modulate the homeostasis of hepatic lipids [44]. This suggests that perinatal nutrition has the capacity to influence lipid metabolism during adulthood via DNA methylation, thereby contributing to the development of adult pathologies. It is also worth mentioning that a protein-poor maternal diet leads to hypomethylation of the receptor gene *At1b* of angiotensin II in developing fetuses, which could lead to an overexpression of the gene in the adrenal glands with potential contribution to the development of hypertension during adulthood [43].

Precursors of SAM (the methyl donor substrate of DNMTs) such as folic acid, methionine and vitamin B12 seem to have a major impact on methylation status. In fact, in sheep, a restriction in folate, vitamin B12 and methionine, during the periconceptual period, is associated with heavier offspring characterized by epigenetic impairment, insulin resistance and hypertension [45]. Conversely, experiments performed on Wistar rats demonstrated the ability of low protein diet with folate supplementation to prevent an increase in blood pressure during offspring adulthood [46] while neonatal overfeeding leads to a hypermethylation of the promoter of the anorectic neurohormone gene called *proopiomelanocortin (POMC)* along with the development of the metabolic syndrome, i.e., obesity, hyperleptinemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia as well as [47].

Other examples of epigenetic modulations, in response to environmental factors, include those linked to pancreatic functions. In fact, female rats that are poorly nourished during their gestation and present offspring with growth restrictions, have given birth to litters characterized by a decrease in the number of α and β cells, perturbations of endocrine and pancreas functions and a decrease in the expression of Pdx-1 [51], whereas restriction of methionine, vitamin B12 and folate during sheep gestation, leads to a 4% impairment of the methylation status of the CpG islands in combination with offspring overweight, insulin resistance and hypertension [45].

Humans are no exception to this epigenetic regulation. Indeed, a population study (conducted on 468 men born in England between 1920 and 1930 with known birth weights) proves that growth restriction at birth and/or very early on in life is strongly associated with impaired glucose tolerance, non-insulin-dependent diabetes, β -cell dysfunction, high blood pressure and consequently hypertension [52].

Taken together, all these studies demonstrate that environmental conditions, such as diets, during gestation or very early in life, induce epigenetic changes that can persist later in life and with the potential lead to numerous pathologies such as cardiovascular diseases, insulin resistance, type 2 diabetes, hypertension and metabolic syndrome (Table 1). Nutrition, therefore, appears to be a trigger of metabolic syndrome. The purpose of the following is to

verify whether the metabolic syndrome is associated with specific epigenetic changes, more particularly DNA methylation.

DNA METHYLATION AND METABOLIC SYNDROME

Metabolic Syndrome

In 1988, Dr. Gerald Reaven used the expression “Syndrome X” to describe the grouping of several risk factors (dyslipidemia, hypertension and hyperglycemia) and its relation to insulin resistance. Currently, several organizations have defined clinical criteria for the diagnosis of the metabolic syndrome, which include obesity, hyperglycemia, hypertriglyceridemia, low HDL cholesterol and hypertension (Table 2).

DNA Methylation and Metabolic Syndrome

Over the last few years, a number of studies have focused on the genetics of metabolic syndrome. In fact, the genes of the *leptin receptor* and *leptin*, an anorectic hormone, have been found mutated in obese individuals [53]. Other candidate genes such as the genes of the *melanocortin 4 (MCR4)* and *proopiomelanocortin (POMC) receptors* are molecularly affected under conditions of morbid obesity [54, 55], and *$\beta 2$ adrenergic receptors* (implicated in lipolysis) appear to have done so as well [56]. Moreover, the *Hsl* (Hormone Sensitive Lipase) gene has a polymorphism associated with type 2 diabetes that characterizes the metabolic syndrome [57]. Finally, other genes associated with metabolic syndrome present mutations such as *Ucp-1* (Uncoupling Protein 1) [58], *Pc-1* [59], *PPAR- γ* [60] and *Irs-1* (Insulin Receptor Substrate) [61]. Subsequently, various have examined the epigenetics (i.e. DNA methylation) in association with the metabolic syndrome.

Obesity has been the focus of particular attention in epigenetic studies. In fact, cell studies show methylation variations in genes involved in energy metabolism such as *ppara*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase* and *Ucp1* [39, 62]. A study, on male Wistar rats receiving a high energy diet, claimed that the promoter of the *leptin* gene is much more methylated and coincides with a lower rate of leptin production [63]. Neonatal overfeeding of these rats leads to a rapid weight gain and results in a metabolic syndrome phenotype (obesity, hyperleptinemia, hyperglycemia and hyperinsulinemia) in link with promoter hypermethylation of *proopiomelanocortin (POMC)*, an anorectic neurohormone gene and the promoter hypomethylation of the *neuropeptide Y* gene [47]. Evidently, overfeeding appears as an epigenetic risk factor in programming obesity and diabetes and, consequently, the metabolic syndrome. Accordingly, a 2009 study shows that men who are successful in their energy-restricted diet had a low promoter methylation of the gene *TNF- α* in correlation with *TNF- α* circulating levels. One can conclude that the methylation status of the *TNF- α* promoter may serve as a good marker not only for inflammation, but also for various parameters accompanying the metabolic syndrome. In addition, weight loss induced by a hypocaloric diet constitutes a first step to a personalized nutrition based on epigenetic criteria [64].

Intra-uterine growth retardation, associated with diabetes development, reveals a *Pdx-1* expression turning off via the methylation of its promoter, which shows an influence on the β -cell differentiation and the *insulin* gene expression [65]. Furthermore, data collected from animals with type 2 diabetes showed hypermethylation of the *PGC-1 α* (PPAR gamma coactivator 1 alpha) gene promoter, and *PPARGC1 α* (Peroxisome proliferator activated

receptor gamma coactivator 1 α) with a consequent decrease in PGC-1 α and insulin production [66]. The *PPARGC1 α* promoter is also hypermethylated in the skeletal muscles of patients with type 2 diabetes. This hypermethylation, in the myotubes is induced by the presence of both TNF- α and saturated fatty acids (palmitate) in a way that is dependent on DNMT3B, whereas insulin and glucose have no effect [67]. Curiously, treatment of animals with a diet rich in fat and sucrose does not induce changes in the expression of *glucokinase* and *NAPDH oxidase* genes, but it rather rises the expression of *hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase (HADHB)*. Nevertheless, no change is observed in the status of the methylation of the *HADHB* and *glucokinase* genes in spite of increased lipid intake [68]. This is intriguing since these two genes are involved in β oxidation of fatty acids and glycolysis, respectively. Finally, the *HNF4A* gene, a candidate gene for diabetes, presents aberrant methylation levels in cells derived from the cord blood of babies with intra-uterine growth retardation [69]. This distinctly demonstrates the implication of DNA methylation in the fetal programming of adult pathologies. It would have been interesting to verify whether this deregulation of DNA methylation is present in the long term and could have an impact on adulthood, especially in link with the appearance of pathologies, which would help to adopt DNA methylation as an effective biomarker.

Hypertension, another component of the metabolic syndrome, shows variations in DNA methylation. In fact, studies with hypertense rats have demonstrated hypomethylation of the promoter of the *(pro)renin* gene [70], hypomethylation of the *adrenergic β 1* gene [71] and an increase in the expression of *NKCC1* (Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1), epigenetically regulated during the postnatal hypertension development [72]. Other genes appear to have variations in their DNA methylation; they include the *SERPINA3* (serine protease inhibitor) that is

hypomethylated in the placentas of preeclamptic pregnancy with growth restriction [73], the proximal promoter of the *AT* (1 b) that is hypomethylated [43] and the promoter of the *ACE-1* (enzyme 1 that converts angiotensin), a key regulator of hypertension in adults, that is also hypomethylated during maternal protein restriction [74].

It seems, therefore, that DNA methylation is closely implicated in the emergence of the metabolic syndrome components through the epigenetic regulation of numerous candidate genes (Table 3). If obesity seems to be associated with the hypomethylation of the neuropeptide Y gene and sensitive genes implicated in appetite regulation (e.g., *leptin* and *POMC*), numerous genes in diabetes, on the other hand, appear to be hypermethylated : *Pdx-1* implicated in the pancreatic development and maturation of β cells, *PGC-1 α* implicated in energy metabolism, *UNC13B* implicated in carbohydrate metabolism, and *HNF4A* implicated in the development of the liver, kidneys and the intestine. Meanwhile, hypertension is related to the hypomethylation of *prorenin*, *β adrenergic*, *NKCC1*, *SERPINA3*, *AT(1b)* and *ACE*. All these methylation variations cause alterations in genes that play a significant role in metabolic syndrome programming according the scrutiny of most available studies. We do not know so far whether these epigenetic modifications are the causes or consequences of the development of metabolic syndrome. Therefore, it would be important to tackle this issue in order to identify the biomarkers capable to predict the cardiometabolic defects before their occurrence. Among the above-mentioned genes, some seem to have been linked to oxidative stress such as *PGC-1 α* [75]. This phenomenon could thus have an influence on metabolic syndrome. In the future, other studies will be necessary to expand the list of genes implicated in this syndrome.

OXYDATIVE STRESS AND METABOLIC SYNDROME

A metabolic stress occurs when homeostasis is broken. Oxidative stress takes place in circumstance where the normal concentration of oxidants molecules is abnormally elevated. The intracellular generation of oxidants occurs mainly during mitochondrial reduction of oxygen into water, especially during the process leading to ATP formation. In mitochondria, about 1% of oxygen is partly reduced in superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) [76]. This free radical species of oxygen is spontaneously dismutated in hydrogen peroxide (H_2O_2) but, *in vivo*, the reaction is catalyzed by the superoxide dismutases (SOD). The cytosolic concentration of H_2O_2 is dependent of its production by the mitochondrial SOD (MnSOD or SOD2) [77] and its reduction by the glutathione peroxidase (GPx) (Figure 3). In exception of erythrocytes, catalase, which has a very high activity [78], is located in peroxisomes and in mitochondria [79]. Its affinity for H_2O_2 is about $10^5 - 10^6$, lower than for GPx [78, 80].

Superoxide anion is also produced by other enzymatic systems, for exemple NADPH oxidases (NOX). This enzyme is involved in several metabolic pathways and its perturbation leads to many pathologies. Here are three examples where the enzyme plays a crucial role. 1) In endothelial cells, the enzyme is located in the cellular membrane. Its activity is mainly in response to Angiotensin II [81] for the formation of superoxide anion that will quench the nitric oxide in circulation, thereby inducing vascular contraction [82]. 2) In neutrophiles, the activity of NOX is high and fast in order to produce a burst of radical species in reaction of invaders [83]. 3) NOX is also known to be activated following the stimulation of insulin receptor [84]. The formed superoxide anion is dismutated by cytosolic SOD (CuZnSOD or SOD1) leading to formation of H_2O_2 , which is important in inhibition of PTPb1 phosphatase

[85-87]. This inhibition by oxidation of thiol group allows to the insulin receptor to be phosphorylated for a longer time, allowing thus the signal transduction [86].

Hydrogen peroxide is an important intermediary in the intracellular signaling as it reacts with thiol functions of several proteins, which alters their functions. H_2O_2 is the famous substrate for the Fenton reaction leading to the no less notable hydroxyl radical (HO^\bullet). In this reaction, transition metals such Fe^{2+} or Cu^{1+} give an electron to the peroxide that will be splitted into hydroxyl anion (HO^-) and HO^\bullet (Figure 3). This last one is well known to induce oxidation of macromolecules such as proteins, lipids and DNA. GPx transfers two electrons from two glutathione (GSH) molecules to the peroxide for its reduction into water. During the reaction the disulfide form of glutathione (GSSG) is generated (Figure 3). A modification in intracellular concentration of GSH and GSSG is at the origin of the disruption of redox signaling [88, 89].

A rupture in the normal balance between oxidants and antioxidants in tissue can cause toxic effects through the production of peroxides and free radicals that lead to the deterioration of certain cell components. Numerous functional aberrations result such as gene mutations and organelle/membrane impairment, which can be the source of the aging process and chronic diseases (cancer, diabetes, cystic fibrosis and cardiovascular diseases). Indeed, superoxide anion and hydrogen peroxide are key players in several metabolic pathways whose perturbations may lead to the metabolic syndrome. The next paragraphs will demonstrate the relations between on one side, these molecules and the activity of MnSOD and GPx, enzymes regulating their concentrations, and in the other side, obesity, inflammation, type 2- diabetes and hypertension. The activity of MnSOD and GPx is dependent on the transcription level of

their related genes, which are themselves subject to regulation by methylation of their promoter region.

Obesity and Oxidative Stress

Obesity is the main factor that leads to the metabolic syndrome. Over the last few years, many studies have shown that visceral obesity is associated with systemic inflammation characterized by a rise in inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP) [90] and TNF- α [91], which leads to the production of interleukin-6. This last molecule is the major regulator of hepatic CRP synthesis [92]. Pro-inflammatory interleukins are induced by oxidative stress that is correlated with inflammation magnitude [93].

Many animal studies have investigated the association of oxidative stress with obesity. Obese non-diabetic and obese diabetic KKAy mice exhibit severe obesity compared with control mice. They present an increase in plasma lipid peroxidation, H₂O₂ concentration and gene expression of *PAI-1*, *TNF- α* and *NADPH oxidase* in white adipose tissue compared with control mice. The same mice experienced a decrease in expression of genes encoding for *Cu,Zn-SOD*, *GPx* and *catalase* in adipose tissue as well as a decrease in SOD and GPx activity in white adipose tissue compared with control mice [94]. Oxidative stress closely associated with obesity and represented by an increase in 8-isoprostane, plasma TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) and a decrease in the GSH/GSSG ratio in rats, is significantly reversed by the inhibition of cyclooxygenase 2, an enzyme implicated in the generation of pro-oxidant eicosanoids when activated [95].

Study with obese adult subjects reveals that the metabolic syndrome is accompanied by increased fasting glucose, malondialdehyde (MDA), lipoperoxidation, GSSG/GSH ratio, CRP and fibrinogen² and cholesterol in plasma [90]. Another investigation with obese subjects displays a significant correlation between Body Mass Index (BMI) and waist circumference with lipid peroxidation as indicated by plasma TBARS and urinary 8-epi-prostaglandin-F₂ α (8-epi-PGF₂ α). Moreover, adiponectin plasma levels are correlated inversely with BMI, waist circumference and pro-oxidants [94]. Further evidence for the occurrence of oxidative stress in the presence of the metabolic syndrome is provided in another group of obese diabetic subjects who exhibit a rise in urinary F₂-isoprostane, oxidated LDL and plasma TBARS as well as a decrease in plasma β -carotene and retinol either in fasting or after a high-fat meal [96]. In addition, high levels of polyamine (a nitric oxide precursor) in obese children are correlated with oxidative stress markers (plasma malondialdehyde) and nitrosative stress (plasma spermin) [97]. Finally, assigning 40 overweight and obese adults to a weight maintenance diet low or adequate in dairy products shows that adequate dairy products reduce MDA, oxidated LDL, TNF- α , interleukin-6 and waist circumference while increasing adiponectine [98].

These studies show that obesity and the metabolic syndrome are associated with oxidative stress. In particular, an excess of nutrients expose cells to dysregulation of carbohydrate and lipid metabolism. Nutrient abundance also leads to mitochondrial dysfunctions and generation of reactive species derived from oxygen. Inflammation, widely present in obesity, may also be a source of production of reactive species derived from oxygen, via macrophages in particular. Additional efforts are necessary to determine whether oxidative stress intervenes upstream or downstream during the development of obesity and metabolic syndrome.

Diabetes and Oxidative Stress

Type 2 diabetes (DT2) is not only associated with oxidative stress, but also with inflammation. In fact, human endothelial cells exposed to high glucose concentrations over five days showed a rise in the gene and protein expression of nitric oxidase synthase, resulting in an increase of nitric oxide and in an overproduction of superoxide anion [99]. These results demonstrate that chronic exposure to high glucose concentrations induces an imbalance between nitric oxide and superoxide anion, which could be at the origin of endothelial alterations found in diabetic patients.

Transgenic mice that overexpress aldose reductase, an enzyme that catalyzes the transformation of glucose into sorbitol, present an increment in glucose flux through the polyol pathway, a major source of oxidative stress as noted by glutathione reduction and MDA increase [100]. In fact, by transforming glucose into sorbitol, the overexpression of aldose reductase depletes the NADPH required for GSH regeneration. Accordingly, diabetic rats with high glucose autoxidation exhibit a rise in blood TBARS and reactive oxygen species (ROS) along with a decrease in SOD activity in the erythrocyte, liver, pancreas and muscle [101]. Similar findings are obtained in humans since DT2 remains associated with elevated levels of MDA in subretinal fluid [102], protein carbonyls in subretinal fluid [102], urinary 8-iso-PGF 2α excretion [103], plasma LDL-cholesterol [104], TNF- α [104], interleukin-1 α [104] and oxidative damage to apolipoprotein B100 [105]. Conversely, diabetic are characterized by low vitamin E concentrations [106] and defective antioxidant defense as demonstrated by the decline of cytosolic GPx in platelets [106] and SOD activity in plasma [104]. These observations indicate that the hyperglycemia in diabetic patients can induce the production of

superoxide anion through mitochondrial electron chain transport. Theoretically, the presence of small superoxide anion concentrations should activate superoxide dismutases and other antioxidant enzymes via the NRF2 transcription factor. However, the studies presented above demonstrate rather a decrease in the activity of antioxidant defenses probably because of the exaggerated levels of oxidative stress. Nevertheless, additional work is needed to elucidate the responsible mechanisms.

Hypertension and Oxidative Stress

Hypertension is also associated with oxidative stress, since hypertensive rats present a higher renal expression of p47phox and p67phox, two sub-units of NADPH oxidase [107]. This enzyme produces superoxide anion known to contribute to hypertension [108]. A study conducted with mice overexpressing NADPH oxidase in vascular smooth muscle cells shows that angiotensin II infusion increases hypertension. Hypertension induced by angiotensin II in rats is also accompanied by oxidative stress in blood vessels [110, 111]. On the other hand, administration of superoxide dismutase alleviates arterial pressure in this animal model, probably down-regulating NADPH oxidase that is proposed as the source of oxidative stress [112]. In line with this hypothesis, an increase in salt intake increases NADPH oxidase, affects SOD activity and elicits oxidative stress [113]. Finally, confirmation has been obtained by several groups that show that antioxidants are able to reduce blood pressure and inflammation in hypertensive animals [114-118].

At this time, it is clear that the components of the metabolic syndrome, i.e., obesity, type 2 diabetes and hypertension, are associated with oxidative stress and inflammation (Table 4), and that superoxide anion and hydrogen peroxide, controlled by SOD and GPX, are key players in this process, which can explain phenotypes of metabolic syndrome. In this context, the activity of protein kinase C is sensitive to ROS like H_2O_2 and $O^{\cdot-}$, which then increases the expression of TNF- α by regulated signal transduction [119]. For its part, H_2O_2 appears as an inducer of NF- κ B [120] being effective in up-regulating inflammatory genes, including those of TNF- α , IL-1 and IL-6 [121]. The eicosanoid 8 isoprostane is also produced from H_2O_2 [122] whereas HO^{\cdot} generates MDA and TBARS lipid peroxides particularly in the presence of ferrous iron. Consequently, there are disturbances in enzymatic defenses, including SOD and GPx. In the end, the imbalance between oxidative stress and antioxidant defense in combination with inflammation triggers the development of the metabolic syndrome. Nevertheless, the mechanisms leading to this marked deterioration has not been elucidated. In addition, little information is available on the regulation of antioxidant defenses by epigenetic modifications in the context of metabolic syndrome.

DNA METHYLATION AND OXIDATIVE STRESS

Several studies have demonstrated the involvement of ROS in the DNA methylation reaction under both physiologic and pathologic conditions [123]. In fact, ROS overproduction could affect epigenetic mechanisms [124, 125]. Superoxide anions participate in this process as nucleophilic agents since they deprotonate the cytosine molecule at C-5 position, thereby accelerating the reaction of DNA with the positive charged intermediate S-adenosyl-L-methionine (SAM) [126]. Accordingly, DNA methylation of *protein kinase C* promoter increases in response to norepinephrine-induced ROS production in rat fetal hearts [127]. The augmentation of superoxide anions also leads to global DNA hypermethylation and stimulates Dnmt1 expression following melanocyte anchorage blockade [124]. Moreover, DNA hypermethylation of a single CpG dinucleotide, close to the transcription start site, is associated with oxidative stress and low expression of *SOD* in adult individuals born preterm [128]. Definitely, H_2O_2 appears to play a significant role in epigenetic modifications in view especially of the increased methylation of *RUNX3* (runt-related transcription factor 3) in cells exposed to H_2O_2 [129] and the up-regulation of DNMT1 in colon cancer-derived cell lines [130].

As explained above, it is possible that disruption of the homeostasis of H_2O_2 and $O^{\cdot -}$, in the metabolic syndrome, could be caused by an epigenetic impairment of antioxidant defenses as is the case for cancer. Indeed, SOD2 transcriptional activity is controlled, in part, by an epigenetic mechanism at different stages of human cancer development [131]. On the other hand, loss of SOD activity may contribute to changes in epigenetic regulation, thereby establishing a vicious cycle that further drives epigenetic instability [131].

However, only few research groups have focused on these issues in relation with the metabolic syndrome state. Among the very few studies, one can note that hypertensive rats present hypermethylation of the *SOD2* gene promoter, a process prevented by the administration of 5-aza-2'-deoxycytidine [132]. This chemical agent is a nucleotide analogue that inhibits the methylation of newly DNA synthesis [133], favors the proteosomal degradation of DNMT1 [134], and it is associated with lower level of DNMT1 and DNMT3a protein expression [135].

By cons, numerous investigators have shown the impairment of antioxidant defenses by DNA methylation in cancer cases. To cite a few examples, the *SOD2* promoter appears hypermethylated in the human KAS6/cell line of multiple myeloma [136], in A549 human lung epithelial cells and in peripheral blood mononuclear cells [137], whereas the promoter of extracellular *SOD* displays a strong hypomethylation in fibroblasts of human embryo lung (MRC5) [138]. On its side, glutathione peroxidase exhibits hyper methylation in its different isoforms (e.g., GPx3 and GPx7) in cancers and this impairment is reversed by the administration of 5-aza-2'-deoxycytidine [139-142]. In line with these observations, a study conducted with double-knockout mice, deficient in both *GPx1* and *GPx2*, reveals aberrant methylation of polycomb target genes in intestinal cancer mediated by inflammation [140].

Nrf2, a transcription factor that activates the gene expression of antioxidant enzymes, has also been the focus of studies since it has been found to be hypermethylated in mice with prostate cancer, but the hypomethylating effect of curcumin allows it to be reexpressed [143].

Catalase has also been reported to be hypermethylated in the CpG II island of its promoter, with consequently low gene and protein expression, in particular when it is exposed for a long time to reactive oxygen species [144]. Finally, the *glutathione transferase I* gene can be

hypermethylated with repression of its transcript in the RAJI and MEG-01 cell lines. Treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine favors demethylation [145].

Overall, these findings indicate that epigenetics, more specifically DNA methylation, has the ability to impair the expression of antioxidant genes such as *SOD* and *GPx*, thereby worsening oxidative stress and inflammation, major processes in the metabolic syndrome. Fortunately, many nutrients, including methyl donor substrates for DNMTs (folates, methionine and vitamin B), polyphenols (like epigallocatechin 3-gallate from tea and soya genistein) [146-148], selenite [149] and curcumin [143] have the ability to prevent or reverse these phenomena.

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVE

All of these studies have provided evidence that the prenatal or early postnatal nutritional environment is critical in determining susceptibility to cardiometabolic disorders via epigenetic modifications. Although DNA methylation appears as a major process in the etiology of complex diseases, no studies have focused on its relationship with the development of the metabolic syndrome, even if the latter is closely associated with a an increase in oxidative stress and a decrease in antioxidant defenses that trigger inflammation (Figure 4). In this regard, a quite recent investigation demonstrates that female offspring generated from H₂O₂-treated sperm become glucose intolerant and markedly accumulate adipose tissue later in life, demonstrating that elevated ROS concentration could act as a mediator of metabolic syndrome and obesity programming [150]. This concept has further been emphasized in view of the epigenetic changes observed in the antioxidant defense system in response to various *in utero* stimuli/exposures, which could explain numerous adulthood diseases, including the

metabolic syndrome [151]. Surprisingly, very few studies are available in this crucial area, which requires significant efforts from the scientific community in order to better understand the oxidative stress-inflammation-DNA methylation-metabolic syndrome development relationship. Animal models may represent an effective and valuable tool in establishing this proof-of-concept. Results of this future research may be used in preventing and managing the disturbances of the metabolic syndrome.

EXECUTIVE SUMMARY

DNA methylation

- DNA methylation consists of cytosine methylation in carbon 5' of the CpG islands resulting in 5-methylcytosine. DNA methylation is implicated in gene inactivation and genetic footprint.

DNA methylation and nutrition

- DNA methylation is modulated by nutrition, particularly methyl donors and protein restriction.
- Environmental conditions, including inappropriate diets, during gestation or very early in life, can induce epigenetic changes that can persist later in life and lead to numerous pathologies such as insulin resistance, type 2 diabetes, hypertension, metabolic syndrome and cardiovascular diseases.

DNA methylation and metabolic syndrome

- Metabolic syndrome is a programmable disease that is characterized by epigenetic modifications of vital genes.
- No studies have focused on the relationship between gene methylation and the development of metabolic syndrome.

Oxidative stress, metabolic syndrome and DNA methylation

- The components of the metabolic syndrome, i.e., obesity, type 2 diabetes and hypertension, are associated with oxidative stress-antioxidant defense imbalance and inflammation.

- Superoxide anion and hydrogen peroxide, controlled by SOD and GPX, are key players in metabolic syndrome phenotypes.
- Alterations in ROS levels may affect epigenetic mechanisms and elicit metabolic syndrome components.
- Superoxide anions, as nucleophilic agents, and deficient SOD activity contribute to epigenetic instability and modifications, which may contribute to metabolic syndrome development.

Conclusion

- Further investigations are needed in the future to better understand whether DNA methylation may be at the origin of oxidative stress and even inflammation, two key players in the initiation of the metabolic syndrome development.

REFERENCES

1. Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238(4824), 163-170 (1987).
2. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16(1), 6-21 (2002).
3. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 10(8), 2709-2721 (1982).
4. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13(4), 1095-1107 (1992).
5. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293(5532), 1068-1070 (2001).
6. Bestor TH, Gundersen G, Kolsto AB, Prydz H. CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9(2), 48-53 (1992).
7. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* 274(46), 33002-33010 (1999).
8. **Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366(6453), 362-365 (1993). Normal level of DNA methylation is required controlling differential expression of the paternal and maternal alleles of imprinted genes.

9. Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev.* 9(19), 2325-2334 (1995).
10. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 19(3), 219-220 (1998).
11. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99(3), 247-257 (1999).
12. Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell Biol.* 19(12), 8211-8218 (1999).
13. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9(16), 2395-2402 (2000).
14. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No 1, R47-R58 (2005).
15. Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur. J. Biochem.* 269(20), 4981-4984 (2002).
16. **Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* 21(15), 4183-4195 (2002). Accessibility of the target bases is required for the methylation blueprint of the mammalian genome.

17. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405(6785), 486-489 (2000).
18. Loenen WA. S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?. *Biochem. Soc. Trans.* 34(Pt 2), 330-333 (2006).
19. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.* 18(11), 6538-6547 (1998).
20. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* 21(21), 4886-4892 (1993).
21. Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* 11(1), 327-333 (1992).
22. Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol. Cell Biol.* 14(8), 5487-5494 (1994).
23. Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.* 7(3), 157-165 (1997).
24. Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211(4480), 393-396 (1981).
25. Graves JA. 5-azacytidine-induced re-expression of alleles on the inactive X chromosome in a hybrid mouse cell line. *Exp. Cell Res.* 141(1), 99-105 (1982).

26. Venolia L, Gartler SM, Wassman ER, Yen P, Mohandas T, Shapiro LJ. Transformation with DNA from 5-azacytidine-reactivated X chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A* 79(7), 2352-2354 (1982).
27. Jaenisch R, Schnieke A, Harbers K. Treatment of mice with 5-azacytidine efficiently activates silent retroviral genomes in different tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A* 82(5), 1451-1455 (1985).
28. Sado T, Fenner MH, Tan SS, Tam P, Shioda T, Li E. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev. Biol.* 225(2), 294-303 (2000).
29. Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J. Dent. Res.* 88(5), 400-408 (2009).
30. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J.Cell Physiol* 213(2), 384-390 (2007).
31. Arnaud P, Feil R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 75(2), 81-97 (2005).
32. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP *et al.* DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet.* 18(21), 4046-4053 (2009).
33. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 60, 5-20 (2001).

34. **Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.* 23(3), 314-318 (1999). Agouti provides a good example of epigenetic variability and epigenetic inheritance.
35. Waterland RA. Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *J. Nutr.* 133(1), 238 (2003).
36. **Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J. Nutr.* 136(6 Suppl), 1706S-1710S (2006). Impact of methionine supplementation on CpG methylation and expression of epigenetically labile genes.
37. Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, Smith CA, Shi X, Tahiliani KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis.* 44(9), 401-406 (2006).
38. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* 132(8 Suppl), 2393S-2400S (2002).
39. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br. J. Nutr.* 97(3), 435-439 (2007).
40. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J. Nutr.* 135(6), 1382-1386 (2005).

41. Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br. J. Nutr.* 97(6), 1064-1073 (2007).
42. Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J. Nutr.* 139(6), 1054-1060 (2009).
43. Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ. Res.* 100(4), 520-526 (2007).
44. Van Straten EM, Bloks VW, Huijkman NC *et al.* The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 298(2), R275-R282 (2010).
45. Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R *et al.* DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104(49), 19351-19356 (2007).
46. Torrens C, Brawley L, Anthony FW *et al.* Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. *Hypertension* 47(5), 982-987 (2006).
47. Plagemann A, Harder T, Brunn M *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J. Physiol* 587(Pt 20), 4963-4976 (2009).

48. Godfrey KM, Redman CW, Barker DJ, Osmond C. The effect of maternal anaemia and iron deficiency on the ratio of fetal weight to placental weight. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 98(9), 886-891 (1991).
49. Gambling L, Dunford S, Wallace DI *et al.* Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. *J. Physiol* 552(Pt 2), 603-610 (2003).
50. Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 40 Suppl 2, 115-120 (1991).
51. Blondeau B, Avril I, Duchene B, Breant B. Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition. *Diabetologia* 45(3), 394-401 (2002).
52. Hales CN, Barker DJ, Clark PM *et al.* Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303(6809), 1019-1022 (1991).
53. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387(6636), 903-908 (1997).
54. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat. Genet.* 20(2), 113-114 (1998).
55. Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat. Genet.* 20(2), 111-112 (1998).

56. Large V, Reynisdottir S, Eleborg L, Van H, V, Strommer L, Arner P. Lipolysis in human fat cells obtained under local and general anesthesia. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 21(1), 78-82 (1997).
57. Klannemark M, Orho M, Langin D *et al.* The putative role of the hormone-sensitive lipase gene in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus and abdominal obesity. *Diabetologia* 41(12), 1516-1522 (1998).
58. Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM *et al.* Additive effect of A-->G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 20(12), 1062-1066 (1996).
59. Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S *et al.* Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 373(6513), 448-451 (1995).
60. Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.* 339(14), 953-959 (1998).
61. Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C *et al.* Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 346(8972), 397-402 (1995).
62. **Kiskinis E, Hallberg M, Christian M *et al.* RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO J.* 26(23), 4831-4840 (2007). Genes involved in energy metabolism are affected by methylation variations in response to high energy diet.

63. Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J. Physiol Biochem.* 65(1), 1-9 (2009).
64. Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Martinez JA. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity. (Silver. Spring)* 17(6), 1293-1297 (2009).
65. **Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest* 118(6), 2316-2324 (2008). Methylation of Pdx-1 promoter is implicated in β -cells differentiation and diabetes development.
66. Ling C, Del GS, Lupi R *et al.* Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* 51(4), 615-622 (2008).
67. Barres R, Osler ME, Yan J *et al.* Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab* 10(3), 189-198 (2009).
68. Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis.* 9, 60 (2010).
69. Einstein F, Thompson RF, Bhagat TD *et al.* Cytosine methylation dysregulation in neonates following intrauterine growth restriction. *PLoS. One.* 5(1), e8887 (2010).
70. Lee HA, Lee DY, Lee HJ, Han HS, Kim I. Enrichment of (pro)renin receptor promoter with activating histone codes in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.*, (2011).

71. Jiang Q, Yuan H, Xing X, Liu J, Huang Z, Du X. Methylation of adrenergic beta1 receptor is a potential epigenetic mechanism controlling antihypertensive response to metoprolol. *Indian J. Biochem. Biophys.* 48(5), 301-307 (2011).
72. Cho HM, Lee HA, Kim HY, Han HS, Kim IK. Expression of Na⁺-K⁺ -2Cl⁻ cotransporter 1 is epigenetically regulated during postnatal development of hypertension. *Am. J. Hypertens.* 24(12), 1286-1293 (2011).
73. Chelbi ST, Mondon F, Jammes H *et al.* Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension* 49(1), 76-83 (2007).
74. Goyal R, Goyal D, Leitzke A, Gheorghe CP, Longo LD. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. *Reprod. Sci.* 17(3), 227-238 (2010).
75. Lu Z, Xu X, Hu X *et al.* PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid. Redox. Signal.* 13(7), 1011-1022 (2010).
76. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78(2), 547-581 (1998).
77. Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VG, Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radic. Biol. Med.* 41(8), 1338-1350 (2006).
78. Jones P, Suggett A. The catalase-hydrogen peroxide system. Kinetics of catalatic action at high substrate concentrations. *Biochem. J.* 110(4), 617-620 (1968).

79. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 87(4), 1595-1599 (1996).
80. Flohe L, Brand I. Kinetics of glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 191(3), 541-549 (1969).
81. Fazeli G, Stopper H, Schinzel R, Ni CW, Jo H, Schupp N. Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4. *Mutagenesis*, (2012).
82. Davel AP, Ceravolo GS, Wenceslau CF, Carvalho MH, Brum PC, Rossoni LV. Increased vascular contractility and oxidative stress in beta(2)-adrenoceptor knockout mice: the role of NADPH oxidase. *J. Vasc. Res.* 49(4), 342-352 (2012).
83. Zielinska-Przyjemska M, Olejnik A, Dobrowolska-Zachwieja A, Grajek W. In vitro effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals. *Phytother. Res.* 23(1), 49-55 (2009).
84. Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F *et al.* Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 150(5), 2197-2201 (2009).
85. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10(2), 248-253 (1998).
86. Haase H, Maret W. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals* 18(4), 333-338 (2005).
87. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE.* 2000(53), e1 (2000).

88. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 295(4), C849-C868 (2008).
89. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30(11), 1191-1212 (2001).
90. Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin. Chem. Lab Med.* 46(4), 499-505 (2008).
91. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Bulmer K, Holly JM, Yudkin JS, Coppack SW. Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Am. J. Physiol* 277(6 Pt 1), E971-E975 (1999).
92. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol. Immunol.* 38(2-3), 189-197 (2001).
93. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int. J. Mol. Med.* 4(3), 223-230 (1999).
94. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest* 114(12), 1752-1761 (2004).
95. Tian YF, Hsia TL, Hsieh CH, Huang DW, Chen CH, Hsieh PS. The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. *Life Sci.* 89(3-4), 107-114 (2011).

96. D'archivio M, Annuzzi G, Vari R *et al.* Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. *Eur. J. Clin. Invest* 42(1), 70-78 (2012).
97. Codoner-Franch P, Tavaréz-Alonso S, Murria-Estal R, Herrera-Martin G, Alonso-Iglesias E. Polyamines are increased in obese children and are related to markers of oxidative/nitrosative stress and angiogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 96(9), 2821-2825 (2011).
98. Stancliffe RA, Thorpe T, Zemel MB. Dairy attenuates oxidative and inflammatory stress in metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 94(2), 422-430 (2011).
99. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 96(1), 25-28 (1997).
100. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13(1), 23-30 (1999).
101. Matsunami T, Sato Y, Sato T, Yukawa M. Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Physiol Res.* 59(1), 97-104 (2010).
102. Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F, Micelli-Ferrari T, Cardia L, Altomare E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. *Free Radic. Biol. Med.* 25(3), 369-372 (1998).
103. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A *et al.* In vivo formation of 8-iso-prostaglandin $f_2\alpha$ and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 99(2), 224-229 (1999).

104. Chao PC, Huang CN, Hsu CC, Yin MC, Guo YR. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycated LDL, IL-1 α and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Eur. J. Nutr.* 49(7), 429-434 (2010).
105. Rabbani N, Chittari MV, Bodmer CW, Zehnder D, Ceriello A, Thornalley PJ. Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes* 59(4), 1038-1045 (2010).
106. Vericel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, Lagarde M. Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 53(4), 1046-1051 (2004).
107. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML *et al.* Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 39(2), 269-274 (2002).
108. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 17(9), 852-860 (2004).
109. Weber DS, Rocic P, Mellis AM *et al.* Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288(1), H37-H42 (2005).
110. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S *et al.* p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ. Res.* 80(1), 45-51 (1997).
111. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T *et al.* Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase

- activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest* 97(8), 1916-1923 (1996).
112. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95(3), 588-593 (1997).
113. Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y *et al.* Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(11), 2775-2782 (2003).
114. Kitiyakara C, Wilcox CS. Antioxidants for hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7(5), 531-538 (1998).
115. Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10(2), 247-255 (2001).
116. Fukui T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 55(2), 239-249 (2002).
117. Griending KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108(17), 2034-2040 (2003).
118. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86(5), 494-501 (2000).
119. Wang HQ, Smart RC. Overexpression of protein kinase C- α in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF- α expression but not tumor promotion. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 20), 3497-3506 (1999).

120. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10(8), 2247-2258 (1991).
121. Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomed. Pharmacother.* 61(7), 412-422 (2007).
122. Hart CM, Karman RJ, Blackburn TL, Gupta MP, Garcia JG, Mohler ER, Iii. Role of 8-epi PGF2alpha, 8-isoprostane, in H2O2-induced derangements of pulmonary artery endothelial cell barrier function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 58(1), 9-16 (1998).
123. Hayes P, Knaus UG. Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator. *Antioxid. Redox. Signal.* 18(15), 1937-1945 (2013).
124. Campos AC, Molognoni F, Melo FH *et al.* Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia.* 9(12), 1111-1121 (2007).
125. Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic. Biol. Med.* 43(7), 1023-1036 (2007).
126. Afanas'ev I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. *Aging Dis.* 5(1), 52-62 (2014).
127. Xiong F, Xiao D, Zhang L. Norepinephrine causes epigenetic repression of PKCepsilon gene in rodent hearts by activating Nox1-dependent reactive oxygen species production. *FASEB J.* 26(7), 2753-2763 (2012).

128. Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD *et al.* Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 109(7), 2515-2520 (2012).
129. Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14(6), 3773-3778 (2013).
130. Zhang R, Kang KA, Kim KC *et al.* Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. *Gene* 524(2), 214-219 (2013).
131. **Cyr AR, Hitchler MJ, Domann FE. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics. *Antioxid. Redox. Signal.* 18(15), 1946-1955 (2013). Defects in antioxidant defense in response to oxidative stress contribute to changes in epigenetic regulation.
132. Archer SL, Marsboom G, Kim GH *et al.* Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 121(24), 2661-2671 (2010).
133. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20(1), 85-93 (1980).
134. Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D, Ramsahoye B. Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res.* 38(13), 4313-4324 (2010).
135. Kim HJ, Kim JH, Chie EK, Young PD, Kim IA, Kim IH. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. *Radiat. Oncol.* 7, 39 (2012).

136. Hodge DR, Peng B, Pompeia C *et al.* Epigenetic silencing of manganese superoxide dismutase (SOD-2) in KAS 6/1 human multiple myeloma cells increases cell proliferation. *Cancer Biol. Ther.* 4(5), 585-592 (2005).
137. Kamiya T, Machiura M, Makino J, Hara H, Hozumi I, Adachi T. Epigenetic regulation of extracellular-superoxide dismutase in human monocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 61C, 197-205 (2013).
138. Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. CpG methylation attenuates Sp1 and Sp3 binding to the human extracellular superoxide dismutase promoter and regulates its cell-specific expression. *Free Radic. Biol. Med.* 48(7), 895-904 (2010).
139. Chen B, Rao X, House MG, Nephew KP, Cullen KJ, Guo Z. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Lett.* 309(1), 37-45 (2011).
140. Hahn MA, Hahn T, Lee DH *et al.* Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res.* 68(24), 10280-10289 (2008).
141. Lee OJ, Schneider-Stock R, Mcchesney PA *et al.* Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis. *Neoplasia.* 7(9), 854-861 (2005).
142. Peng DF, Razvi M, Chen H *et al.* DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut* 58(1), 5-15 (2009).
143. Khor TO, Huang Y, Wu TY, Shu L, Lee J, Kong AN. Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem. Pharmacol.* 82(9), 1073-1078 (2011).

144. Min JY, Lim SO, Jung G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett.* 584(11), 2427-2432 (2010).
145. Karius T, Schnekenburger M, Ghelfi J, Walter J, Dicato M, Diederich M. Reversible epigenetic fingerprint-mediated glutathione-S-transferase P1 gene silencing in human leukemia cell lines. *Biochem. Pharmacol.* 81(11), 1329-1342 (2011).
146. Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J. Nutr.* 137(1 Suppl), 223S-228S (2007).
147. Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin. Cancer Res.* 11(19 Pt 1), 7033-7041 (2005).
148. Yang CS, Fang M, Lambert JD, Yan P, Huang TH. Reversal of hypermethylation and reactivation of genes by dietary polyphenolic compounds. *Nutr. Rev.* 66 Suppl 1, S18-S20 (2008).
149. Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 29(11), 2175-2181 (2008).
150. Lane M, Mcpherson NO, Fullston T *et al.* Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PLoS One* 9(7), e100832 (2014).
151. ** Strakovsky RS, Pan YX. In utero oxidative stress epigenetically programs antioxidant defense capacity and adulthood diseases. *Antioxid Redox Signal* 17(2), 237-253 (2012).

Oxidative stress process in utero epigenetically modulates antioxidant defense later in life.

REFERENCE ANNOTATIONS

8. **Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366(6453), 362-365 (1993). Normal level of DNA methylation is required controlling differential expression of the paternal and maternal alleles of imprinted genes.
16. **Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* 21(15), 4183-4195 (2002). Accessibility of the target bases is required for the methylation blueprint of the mammalian genome.
34. **Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat. Genet.* 23(3), 314-318 (1999). Agouti provides a good example of epigenetic variability and epigenetic inheritance.
36. **Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J. Nutr.* 136(6 Suppl), 1706S-1710S (2006). Impact of methionine supplementation on CpG methylation and expression of epigenetically labile genes.
62. **Kiskinis E, Hallberg M, Christian M *et al.* RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO J.* 26(23), 4831-4840 (2007). Genes involved in energy metabolism are affected by methylation variations in response to high energy diet.
65. **Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest* 118(6), 2316-2324 (2008). Methylation of Pdx-1 promoter is implicated in β -cells differentiation and diabetes development.

131. **Cyr AR, Hitchler MJ, Domann FE. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics. *Antioxid. Redox. Signal.* 18(15), 1946-1955 (2013). Defects in antioxidant defense in response to oxidative stress contribute to changes in epigenetic regulation.
151. ** Strakovsky RS, Pan YX. In utero oxidative stress epigenetically programs antioxidant defense capacity and adulthood diseases. *Antioxid Redox Signal* 17(2), 237-253 (2012). Oxidative stress process in utero epigenetically modulates antioxidant defense later in life.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the J.A. DeSève Research Chair in Nutrition.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. DNA methylation reaction by DNA methyltransferase (DNMT) and transcriptional inhibition.

The methylation reaction of DNA is carried out by DNMTs. Exposed methylation sites of CpG dinucleotide attract “CpG methyl-binding protein” (MBP) implicated in the transcription inhibition due to the prevention of transcription factors (TF) binding.

Figure 2. The methylation/transulfuration pathway.

Folate in the form of 5-methyltetrahydrofolate (5^{me}THF) is involved in the remethylation of homocysteine to methionine, which is the precursor of the S-adenosylmethionine (SAM), the methyl donor of DNA. The methionine adenosyltransferase (MAT) catalyzes SAM synthesis. S-adenosylhomocysteine (SAH), produced from demethylation of SAM, is usually quickly transformed into homocysteine by SAH hydrolase (SAHH). Homocysteine can irreversibly enter to the transsulfuration pathway to produce the amino acid cysteine, which can be used to form the glutathione, via the transsulfuration pathway that includes cystathionine beta synthase (CBS). Homocysteine can also be converted back to methionine by methionine synthase (MS). Betaine is also a source of methyl group transfers to homocysteine via betaine-homocysteine-methyltransferase (BHMT). MTHFR (methyl tetrahydrofolate reductase) catalyzes the conversion

of 5,10-methylenetetrahydrofolate ($^{5,10\text{me}}\text{THF}$) to 5-methyltetrahydrofolate ($^{5\text{me}}\text{THF}$).

Figure 3. Enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT).

SOD, GPX, GR and CAT provide protection by directly scavenging superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and by converting them to less reactive species. SOD catalyzes the dismutation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 that is neutralized by GPX using hydrogens from two glutathione (GSH) molecules, to form two H_2O . GR then regenerates GSH from GSSG. CAT (the important part of enzymatic defense) neutralizes H_2O_2 by converting it to H_2O . Although H_2O_2 is not a radical, it can be rapidly converted by Fenton reaction into $\cdot\text{OH}$ reactive radical.

Figure 4. DNA methylation via a mechanism involving superoxide anion.

Superoxide can deprotonate the cytosine molecule at C-5 position, which then accelerate the reaction of DNA with the positive charged intermediate S-adenosylmethionine (SAM).

Figure 5. Diagram of the relationship between nutrition and DNA methylation in the metabolic syndrome.

Nutritional environment influences the DNA methylation of vital genes and may lead to metabolic syndrome development. Oxidative stress and inflammation are two major components of metabolic syndrome, and it is possible that DNA methylation may be at the origin of their impairments. Reciprocal processes are also possible.

Figure 1

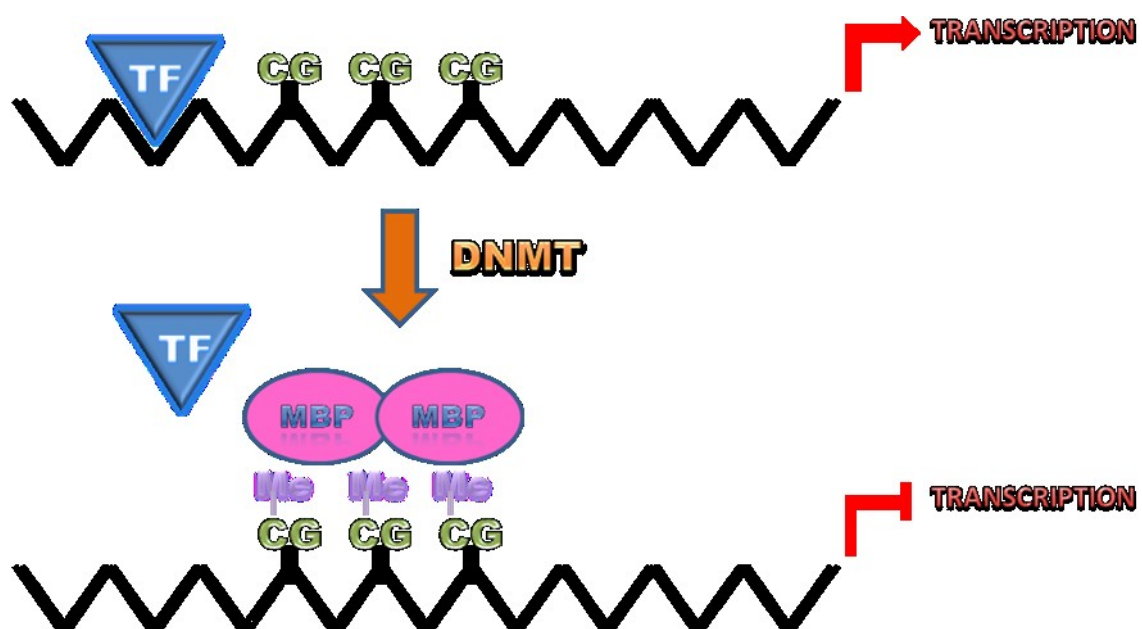


Figure 2

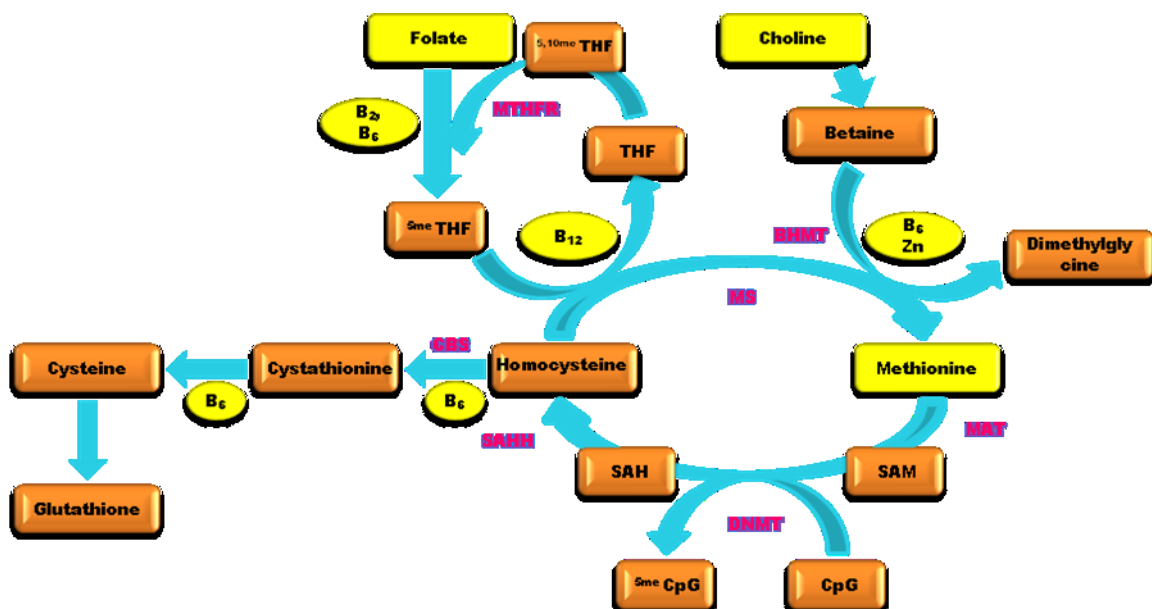


Figure 3

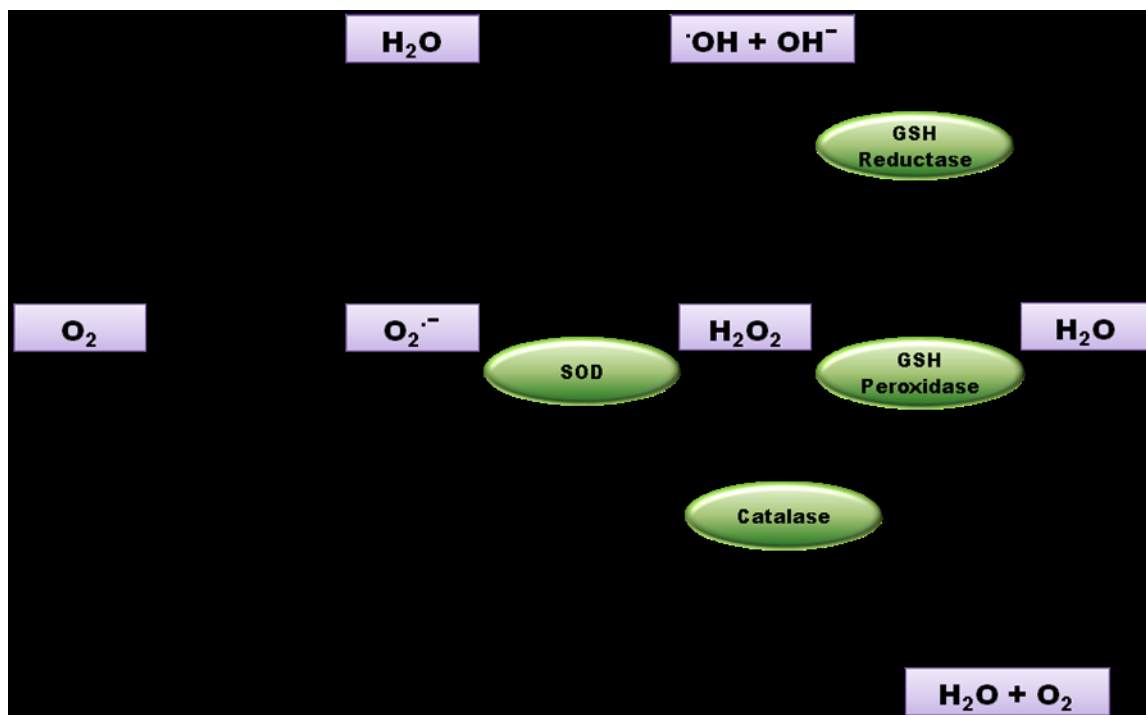
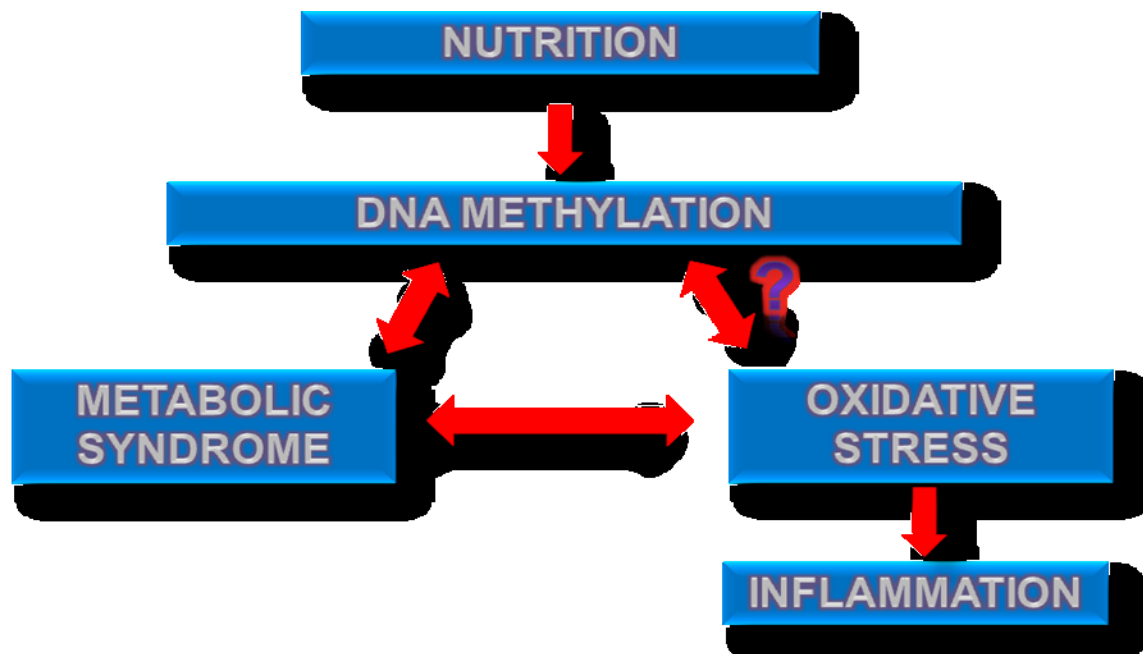


Figure 4



TABLE

Table 1: Impact of Nutritional Environment on DNA Methylation and Metabolic Syndrome

Nutrients	Models	Organs	Conclusion	Conclusion	References
Maternal Protein Restriction	Rodent offspring (F2)	Liver	Hypomethylation of PPAR α , RG and acyl-CoA oxidase Increase in gene expression of PPAR α , RG and acyl-CoA oxidase.	Change in gene methylation in F1 offspring through maternal protein restriction is transmitted to generation F2.	[39]
Maternal Protein Restriction	Rat offspring	Liver	Hypomethylation of PPAR α , RG and acyl-CoA oxidase. Folic acid supplementation prevents these changes	Unbalanced prenatal nutrition induces epigenetic changes in specific genes, which corresponds to a fetal reprogramming mechanism.	[40]
Protein Restriction of the Offspring	Rat offspring	Liver	Hypomethylation of RG. Reduction in DNMT1 but not DNMT3a and DNMT3b	Epigenetic change in RG gene in offspring is due to a drop in DNMT1 expression.	[41]
Maternal Protein Restriction	Folate supplementation of rat offspring	Liver Plasma Adipose Tissue	Weight gain, increase in hepatic and plasma triglycerides Restoration of methylation of PPAR α and RG in the liver. Hypomethylation of the insulin receptor in the liver and adipose tissue	Folate supplementation during juvenile period and puberty does not reverse the phenotype induced by maternal diet.	[42]
Low-Protein Maternal Diet	Wistar rats	Adrenal Gland	Hypomethylation of the AT(1b) promoter In vitro expression of the AT(1b) gene is dependent on the methylation of its promoter	Prenatal offenses induce epigenetic changes resulting in gene expression modifications and, consequently, hypertension during adulthood.	[43]
Low-Protein Maternal Diet	Mouse offspring	Liver Gut	Hypomethylation of LXR in the liver. Same effect in the gut, but less pronounced	Prenatal nutrition can influence adult lipid metabolism through DNA methylation and, consequently, contribute to the development of adult pathologies.	[44]
Folate, Methionine and Vitamin B12 Restrictions	Sheep, periconceptual period	Liver	Heavier and fatter adult offspring, epigenetic changes, insulin resistance and hypertension	Reduction in methyl donors during periconceptual period can lead to epigenetic changes and modify the phenotype of the offspring in relation to adult pathologies.	[45]
Iron Restriction, Anemia	8684 pregnant women	Placenta	Heavy weight placenta and high placenta weight/birth weight ratio	Maternal iron deficiency causes des discordance between placental and fetal growth.	[48]
Low-Protein Maternal Diet	Offspring	Pancreas	Pancreatic structure and function change Reduction in cell proliferation Decrease in island size and vascularization Change in insulin secretion Island apoptosis	An unbalanced diet results in a change in the development of the pancreas.	[50]
Bad Maternal Rat Diet	Rat offspring	Pancreas	Reduction in β and α cells Perturbations of endocrine and pancreas functions. Drop in Pdx-1 expression	Malnutrition very early in life induces a decrease in β and Pdx-1 cells.	[51]
Folate Supplementation of a Low-Protein Diet	Wistar rats	Arteries	Prevention of hypertension during offspring's adulthood	Fetal status during gestation can influence fetal development and therefore the risk of MCVs in the following generation.	[46]
Neonatal Overfeeding	Wistar rats	Hypothalamic Tissue	Development of metabolic syndrome, hyperleptinemia, hyperglycemia, hyperinsulinemia and hypermethylation of POMC	Overfeeding appears as an epigenetic risk factor in the programming of obesity and consecutively MCVs.	[47]
Growth Restriction	468 men born between 1920 and 1930	Plasma	Change in glucose tolerance. Development of diabetes, dysfunction of β cells and hypertension	Growth restriction very early in life is associated with glucose intolerance and hypertension.	[52]

Table 2: Criteria Used by Various Organizations for the Diagnosis of Metabolic Syndrome

WHO World Health Organisation	ATP III Adult Treatment Panel III	IDF International Diabetes Federation
<p>Insulin resistance identified by one of the following criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Type 2 diabetes • Abnormal fasting glycemia • Abnormal glucose tolerance • Or for those with normal levels of fasting glucose (110 mg/dL or 5.6 mmol/L), glucose absorption below lowest quartile for the background population under hyperinsulinemic and euglycemic conditions <p>Plus two of the following factors:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antihypertensive medication and/or high blood pressure (≥ 140 mm Hg systolic or ≥ 90 mm Hg diastolic) • Plasma triglycerides ≥ 1.7 mmol/L • HDL cholesterol < 0.9 mmol/L for men or < 1.0 mmol/L for women • IMC > 30 kg/m² and/or a height-to-hip ratio > 0.9 for men or > 0.85 for women • Urinary albumin excretion rate ≥ 20 μg/min or albumin-to-creatinine ratio ≥ 30 mg/g 	<p>Combination of 3 of the following 5 factors:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abdominal obesity measured by waist circumference (men > 102 cm, women > 88 cm) • Triglycerides ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) • HDL cholesterol (men < 40 mg/dL, women < 50 mg/dL) • Blood pressure $\geq 130/\geq 85$ mm Hg • Fasting glucose ≥ 110 mg/dL (5.6 mmol/L) 	<p>Central obesity defined by waist circumference and specific ethnic values plus two of the four following factors:</p> <ul style="list-style-type: none"> • High triglycerides: ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) or a specific treatment for lipid anomalies • Reduction in HDL cholesterol: men < 40 mg/dL or 1.03 mmol/L, women < 50 mg/dL or 1.29 mmol/L or a specific treatment for lipid anomalies • High blood pressure: systolic ≥ 130, diastolic ≥ 85 mm Hg or a treatment for diagnosed hypertension • Elevated fasting plasma glucose: ≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L) or diagnosed type 2 diabetes. If the value is below 100 mg/dL (5.6 mmol/L), an oral glucose tolerance test is highly recommended, but necessary for the definition of the syndrome.

Table 3: DNA methylation and metabolic syndrome

Pathologies	Models	Conclusion	References
Type 2 diabetes	Rodents	Hypermethylation of Pdx-1	[65]
Type 2 diabetes	48 non-diabetics 12 type 2 diabetics	Hypermethylation of PPARGC-1 α , reduction of PGC-1 α , inhibition of insulin production	[66]
Type 2 diabetes	Skeletal muscles of type 2 diabetic patients	Hypermethylation of PPARGC-1 α	[67]
Type 2 diabetes	Cord blood, intra-uterine growth retardation	Aberrant methylation of HNF4A	[69]
Obesity	Adipocytes	Variations in the methylation of PPAR α , phosphoenolpyruvate kinase and Ucp1	[39, 62]
Obesity	Wistar rats, diet rich in fat and energy	Hypermethylation of leptin	[63]
Obesity	Wistar rats, diet rich in fat and energy	Hypermethylation of POMC, hypomethylation of the Y neuropeptide	[47]
Obesity	Wistar rats, diet rich in fat and energy	No change in the level of HADHB and glucokinase methylation	[68]
Obesity	Men, energy restriction	Hypomethylation of TNF- α , weight loss marker	[64]
Hypertension	Hypertense rats	Hypomethylation of prorenin, the adrenergic β 1 gene and NKCC1	[70],[71], [72]
Hypertension	Pregnancy/placenta with preeclampsia	Hypomethylation of SERPINA3, AT1b, ACE-1	[73],[43], [74]

Table 4: Metabolic Syndrome, Oxidative Stress and Inflammation

Pathologies	Models	Conclusion	References
Obesity/ Type 2 diabetes	Diabetic/non-diabetic obese KKAY mice	Lipid peroxidation, increase in H ₂ O ₂ , gene expression of PAI-1, TNF- α and NADPH oxidase. Decrease in gene expression of Cu, Zn-SOD, GPx and catalase. Lowering of total SOD and GPx activity.	[94]
Obesity	Rats	Increase in 8-isoprostane and TBARS; decrease in GSH/GSSG reversed by COX-2 inhibition.	[95]
Obesity	40 obese adult subjects with metabolic syndrome	Increase in MDA, lipid peroxidation, GSSG/GSH ratio, CRP. Decrease in HDL-cholesterol	[90]
Obesity	Obese subjects	Correlation of BMI, waist circumference and lipid peroxidation (TBARS and 8-epi-PGF ₂ α)	[94]
Obesity/ Type 2 diabetes	Obese diabetics	Increase in F ₂ -isoprostane, oxidated LDL and TBARS. Decrease in β carotene and retinol	[96]
Obesity	Obese children	Increase in polyamine in correlation with oxidative and nitrosative stress markers.	[97]
Obesity	Overweight and obese adults	Adequate diet in dairy products diminishes MDA, oxidated LDL, TNF- α and IL-6.	[98]
Type 2 diabetes	Endothelial cells exposed to high [glucose] (22 mM)	Increase in the gene and protein expression of nitric oxidase synthase, nitric oxide and superoxide anion	[99]
Type 2 diabetes	Transgenic mice that overexpress aldose reductase	Decrease in GSH, increase in lipid peroxidation.	[100]
Type 2 diabetes	Diabetic rats	Increase in TBARS, glucose autoxidation and decrease in total SOD activity.	[101]
Type 2 diabetes	Diabetic patients	Increase in MDA, protein carbonyls	[102]
Type 2 diabetes	Diabetic patients	Increase in 8-iso-PGF ₂ α and lipid peroxidation	[103]
Type 2 diabetes	Diabetic patients	Increase in LDL-cholesterol, TNF- α , 8-isoprostane and IL-1 α . Decrease in plasma SOD activity.	[104]
Type 2 diabetes	Diabetic patients	Increase in apoB-100 oxidative damage	[105]
Type 2 diabetes	Diabetic patients	Decrease in cytosolic GPx activity and vitamin E.	[106]
Hypertension	Hypertense rats	Greater expression of p47phox and p67phox (NADPH oxidase)	[107]
Hypertension	Mice overexpressing NADPH oxidase (vascular smooth muscles)	Infusion of angiotensin increases hypertension	[109]
Hypertension	Rats infused with angiotensin II	Oxidative stress in blood vessels	[110, 111]
Hypertension	Rats infused with angiotensin II	Superoxide dismutase reduces arterial pressure	[112]
Hypertension	Hypertensive animals	Antioxidants can reduce blood pressure and inflammation. .	[114-118]

III DISCUSSION

Le syndrome métabolique est un problème majeur de santé publique qui se caractérise par le regroupement de plusieurs facteurs de risque tels que l'obésité, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hyperlipidémie et l'hypertension. Chacun de ces facteurs constitue un risque pour le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. La combinaison de 2 de ces facteurs ou plus constitue le syndrome métabolique. En plus de l'inactivité physique, de la génétique, du vieillissement et des changements hormonaux, le stress oxydant, l'inflammation ainsi que l'épigénétique apparaissent comme des facteurs responsables du syndrome métabolique.

L'implication de l'épigénétique, particulièrement la méthylation de l'ADN, dans le syndrome métabolique, est tout à fait récente. Elle provient du nouveau concept de «programmation fœtale» défini comme un processus adaptatif où la nutrition et d'autres facteurs environnementaux altèrent des voies développementales prénatales responsables des changements métaboliques postnataux et du développement de maladies chroniques durant la vie adulte. Les études moléculaires ont révélé que cette programmation fœtale pouvait être expliquée par l'épigénétique décrite comme des altérations stables et héréditaires de l'expression de gènes à travers des modifications covalentes de l'ADN sans aucun changement de la séquence. Dans ce contexte, plusieurs gènes en lien avec le syndrome métabolique ont été démontrés régulés par la méthylation de l'ADN (ex. Pdx-1, PGC1- α , POMC, la leptine et le neuropeptide Y), tel qu'évoqué dans l'introduction de cette thèse.

Le syndrome métabolique est aussi associé à un déséquilibre redox en raison de l'augmentation du H₂O₂, TBARS, MDA, 8-iso-PGF₂ α et de la diminution des défenses

antioxydantes SOD et GPX, ainsi qu'avec l'inflammation reflétée par l'augmentation de TNF- α et d'IL-6, tel qu'évoqué dans l'introduction de cette thèse.

Dans le cadre de ce doctorat, le stress oxydant et l'inflammation qui caractérisent le syndrome métabolique ont particulièrement été étudiés puisque les mécanismes sous-jacents à ces deux processus sont encore inconnus. Grâce à nos modèles expérimentaux de stress oxydant et d'inflammation (complexe Fer-Ascorbate dans les Caco-2/15, nutrition parentérale chez le cochon d'Inde et diète riche en gras et en sucre chez la souris), nous avons pu faire avancer significativement les connaissances sur les mécanismes responsables du stress oxydant, dans le foie et l'intestin, notamment la méthylation de l'ADN.

L'intestin est un organe particulièrement impliqué dans le syndrome métabolique puisqu'il participe au métabolisme des lipides et est donc d'une importance majeure dans les problèmes de dyslipidémie (315). De plus, il est en contact avec les nutriments pouvant induire un stress oxydant. Nous avons donc utilisé la lignée cellulaire intestinale Caco-2/15 pour notre première étude. Les cellules Caco-2/15 ont la particularité de se différencier spontanément en entérocytes matures, d'exprimer plusieurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de l'intestin grêle dans des conditions de culture standard et donc d'assurer la fonction de transport intestinal (316-320). Elles se prêtent parfaitement pour étudier *in vitro* les fonctions de l'intestin humain. Ces cellules ont aussi été très utilisées dans le cadre des études portant sur le stress oxydant et l'inflammation (316;321-323).

Pour induire un puissant stress oxydant au niveau des cellules Caco-2/15, nous avons utilisé le complexe fer-ascorbate. En effet, le fer libre joue un rôle important dans la production des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) en participant à réaction de Fenton où le

radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) est généré à partir du peroxyde d'hydrogène. La réaction d'Haber-Weiss, qui implique l'anion superoxyde, produit également la forme réduite du fer (Fe^{2+}), qui par la suite, participe à la réaction de Fenton pour générer le radical hydroxyle. La présence de fer est donc nécessaire pour la génération du radical hydroxyle, mais celui-ci est peu disponible dans les systèmes biologiques. Néanmoins, l'anion superoxyde et certains antioxydants, comme l'ascorbate, réduisent le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) le rendant ainsi disponible pour la réaction de Fenton (324). C'est ainsi que le fer induit un stress oxydant en causant des dommages aux macromolécules biologiques telles que les lipides, et altère l'environnement redox comme c'est le cas pour de nombreuses pathologies (316;325-329). La concentration de fer utilisée pour cette étude est comparable à celle de l'intestin dans des conditions normales (330). Le complexe fer-ascorbate a aussi été combiné avec l'antioxydant Trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E non toxique pour les cellules. Le début de cette étude consistait à vérifier l'efficacité du complexe fer-ascorbate à induire un stress oxydant via la mesure de la peroxydation lipidique. Nos résultats ont démontré une augmentation significative de la peroxydation lipidique reflétée par le MDA lorsque les cellules sont incubées avec du fer-ascorbate, et une diminution de celui-ci lorsque le Trolox est ajouté à ce complexe. Puisque le stress oxydant et l'inflammation sont deux phénomènes étroitement liés, plusieurs marqueurs de l'inflammation ont été mesurés tels que le facteur de transcription NF- κ B et son inhibiteur I κ B. En effet, dans les cellules épithéliales de l'intestin, la réponse inflammatoire est en grande partie contrôlée par le facteur de transcription NF- κ B, qui existe dans le cytosol comme un hétérodimère p50/p65 complexé avec sa protéine inhibitrice I κ B. L'activation des kinases d'I κ B, par de nombreux stimuli, conduit à sa phosphorylation, provoquant ainsi sa dissociation du NF- κ B et sa dégradation par le

protéasome. La Perte d'IκB permet une translocation rapide du NF-κB vers le noyau pour la transcription des protéines pro-inflammatoires. Nos expériences ont démontré que le complexe fer-ascorbate est capable d'augmenter l'expression de la protéine NF-κB et de diminuer celle de la protéine IκB. Dans le même sens, nous observons une augmentation de la cyclooxygénase-2 qui catalyse la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique et de l'interleukine-6.

L'augmentation de la peroxydation lipidique en réponse à l'incubation des cellules avec du Fer-ascorbate laisse supposer une dérégulation de la défense antioxydante. Effectivement, nous avons observé une augmentation de l'activité superoxyde dismutase 2 (SOD2) qui catalyse la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, une diminution de l'activité glutathion peroxydase (GPx) qui convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et aucun changement pour la glutathion réductase (GR). Ces résultats étaient en accord avec ceux des expressions géniques laissant suggérer une régulation transcriptionnelle.

Les résultats des activités antioxydantes laissent supposer une accumulation de H₂O₂ démontrée pour inhiber GPx (331), activer les kinases d'IκB et promouvoir la translocation du NF-κB vers le noyau où il déclenche la transcription de gènes (332) tels que celui de la SOD (333). La GR reste inchangée probablement en raison de la diminution du glutathion oxydé généré par la GPx (334). Notre étude a aussi révélé une hypométhylation du gène SOD2 et une hyperméthylation du gène GPx, une situation identique à celle des cancers caractérisés par une hypométhylation globale et par des hyperméthylations localisées (335). Certains suggèrent que cette situation serait due à des changements de la chromatine lors de l'oncogenèse, qui prédisposent la déméthylation et la méthylation *de novo* (336).

Dans la présente étude, la 5-aza-2'-desoxycytidine (5-aza), un analogue nucléotidique qui inhibe la méthylation de l'ADN nouvellement synthétisé (337;338), favorise la dégradation protéosomale de la l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1) (297) responsable de la méthylation de l'ADN, et qui est associée avec de faibles expressions des protéines DNMT1 et DNMT3a (339), a été utilisé. L'incubation des cellules Caco-2/15 avec de la 5-aza a conduit à une réduction partielle du taux de MDA mais suffisamment pour empêcher l'augmentation des expressions protéiniques du NF- κ B, de COX-2 et d'IL-6. Elle a augmenté l'expression protéique d'I κ B et a rétabli les activités enzymatiques ainsi que les expressions des gènes SOD2 et GPX2, via la restauration de leurs niveaux de méthylation. D'autres études vont dans le même sens en démontrant que la 5-aza a la capacité de normalisé Keap1, l'inhibiteur du Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) impliqué dans l'activation des enzymes antioxydantes (340) et d'inhiber les marqueurs inflammatoires COX-2 (341), IL-6 (342) et NF- κ B (343).

Cette première étude a démontré, pour la première fois, que le stress oxydant induit par le complexe fer-ascorbate conduit à de l'inflammation ainsi qu'à des changements dans les méthylations et les activités SOD2 et GPx.

Bien que cette première étude ait démontré le rôle important du stress oxydant dans la survenue de changements épigénétique, une étude *in vivo* était nécessaire pour valider les résultats.

Nous avons donc choisi la nutrition parentérale comme modèle *in vivo* de stress oxydant induit par la nutrition pour notre deuxième étude. La nutrition parentérale est en générale administrée durant les deux à trois premières semaines de vie des prématurés et est spécifique à chaque enfant. Elle est composée d'acides aminés, de lipides, de glucose, d'oligo-éléments et d'un

complexe multivitaminique. Comme évoqué ci-dessus, la NP est génératrice de stress oxydant. Lorsqu'elle est exposée à la lumière, la riboflavine, une vitamine hydrosoluble du groupe des vitamines B, est photo-excitée et catalyse un transfert d'électrons entre l'acide ascorbique et l'oxygène (344;345). Il en résulte la formation de H_2O_2 . Il est maintenant bien connu que la NP exposée à la lumière crée un environnement néfaste pour le prématuré en raison de la perte des vitamines antioxydantes et de la génération de peroxydes (346). Dans cette seconde étude, des cochons d'Inde âgés de 3 jours avaient reçu une alimentation régulière, la nutrition parentérale ou une alimentation régulière combinée à une solution contenant $350 \mu M H_2O_2$. Quatre jours plus tard, à 1 semaine de vie, la moitié des animaux de chaque groupe a été sacrifiée pour la collection des foies. Pour les autres animaux, les infusions intraveineuses ont été stoppées. Ils ont eu accès à une alimentation régulière ainsi qu'à de l'eau jusqu'à la fin de l'étude, soit 8 semaines plus tard, où ils ont été sacrifiés pour la collecte des foies.

La principale découverte de cette étude est que l'administration de la NP, tôt dans la vie, induit une hypométhylation de l'ADN persistante dans le temps, en raison d'une inhibition de l'activité DNMT. Les effets de la NP ont été reproduits avec l'infusion de H_2O_2 . C'est la première fois, à notre connaissance, qu'un lien est effectué entre une exposition à court terme (quatre jours) à la NP et une modification de la méthylation de l'ADN, un changement qui semble se maintenir à l'âge adulte.

L'activité DNMT est dépendante de l'intégrité des groupements thiols (R-SH) (314) connus pour réagir avec le H_2O_2 et le 4-hydroxynoneal (HNE), deux molécules présentes dans la NP (347). Il s'ensuit la génération de R-SOH et de R-S-HNE. Il est donc clair que la qualité des défenses antioxydantes et/ou la capacité de détoxification des peroxydes ont un rôle significatif dans le processus de méthylation de l'ADN dépendante de la DNMT. Par

conséquent, le niveau de glutathion qui est le cofacteur de la GPX détoxifiant les peroxydes et de la glutathion-S-transférase détoxifiant le HNE, devrait être un joueur clé dans les réactions de méthylation de l'ADN. Les enfants prématurés sont donc à risque d'une hypométhylation de l'ADN en raison de leur dispositif antioxydant immature et de leur faible niveau de glutathion. Une autre observation intéressante est que le niveau de méthylation augmente en fonction de l'âge (3 à 4 fois entre 1 et 9 semaines de vie), indépendamment du traitement reçu. Ceci suggère que le développement normal pourrait nécessiter l'inhibition de l'expression de certains gènes. Si le niveau de méthylation est important pour l'évolution de certaines voies métaboliques, au cours de la vie, il n'est donc pas surprenant que l'administration néonatale de NP cause des perturbations métaboliques plus tard dans la vie. Cette étude *in vivo* souligne la nécessité d'une étude clinique pour comprendre les effets à long terme de la NP administré tôt dans la vie, et l'urgence du développement de nouvelles solutions de NP dépourvues de molécules oxydantes.

Jusqu'ici les 2 premiers volets de ce doctorat se sont intéressés au stress oxydant caractérisant le syndrome métabolique et ont démontré son impact sur l'épigénétique. Il était alors devenu indispensable d'obtenir un modèle *in vivo* du syndrome métabolique conduisant ou non au stress oxydant, et d'étudier son impact sur la méthylation de l'ADN.

Le dernier volet de ce doctorat a donc porté sur l'étude du syndrome métabolique induit chez des souris par une diète riche en gras et en sucre (HFHS), pendant 12 semaines. Ces animaux provenaient d'une collaboration avec le Dr Marette (348). D'autres études ont démontré que le syndrome métabolique pouvait être induit par une HFHS (67;349;350). De plus, il a été illustré que les sucres simples réduisent la sensibilité à l'insuline (351). Un autre groupe de souris

s'est vu administré une diète HFHS en combinaison avec du GFT505, un double agoniste de PPAR α/δ . Le GFT505 est un agent attractif ayant un potentiel thérapeutique pour le diabète de type 2, le syndrome métabolique et la dyslipidémie. GFT505, avec son principal métabolite circulant GFT1007, montre une activité préférentielle pour le PPAR α avec une activité supplémentaire sur PPAR δ (352). Les deux subissent un cycle entéro-hépatique et sont les cibles du foie (353). GFT505 a été démontré comme un médicament candidat pour le traitement des troubles lipidiques et glucidique associés au syndrome métabolique (353). Les résultats de cette étude démontrent que les promoteurs des PPARs subissent une modification de leurs méthylations en réponse à des influences environnementales telles que la diète HFHS. Nos données démontrent également que la normalisation des méthylations des promoteurs des PPARs, par GFT505, a permis d'éliminer plusieurs aberrations pathologiques du syndrome métabolique.

Les PPARs sont des récepteurs nucléaires qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus notamment l'homéostasie énergétique, la réponse inflammatoire ainsi que le métabolisme lipidique et glucidique (354). Plusieurs études animales et épidémiologiques ont montré qu'un environnement néfaste en période fœtale et postnatale comme l'obésité et le diabète maternels, est associée à un risque accru d'obésité et de complications métaboliques plus tardivement (355;356). Ces complications tardives peuvent être expliquées par l'épigénétique, plus particulièrement par des modifications de méthylation de gènes clés tels que les PPARs, en raison d'une exposition à des facteurs nutritionnels physiques et chimiques (357;358). Les PPARs sont décrits comme régulés par la méthylation de l'ADN puisqu'il a démontré que l'expression du gène PPAR γ , régulée par la méthylation de l'ADN et diminuée dans les adipocytes, peut contribuer à la pathogenèse du syndrome

métabolique (359). De plus, la méthylation du promoteur du PPAR α hépatique était significativement plus basse pour les générations F1 et F2 ayant reçu une diète restreinte en protéine (360). Nos données sont non seulement conformes à ces observations, mais elles démontrent également le rôle de la méthylation dans la régulation de PPAR α et de PPAR γ , avec un impact évident sur la résistance à l'insuline, l'hyperlipidémie, le stress oxydant et l'inflammation. Ce mécanisme épigénétique cellulaire clé, mis en évidence par l'activation des PPAR α et PPAR γ par GFT505, semble être pleinement opérationnel dans le syndrome métabolique.

Nous avons examiné l'inflammation, un facteur majeur entrant dans l'étiologie du syndrome métabolique (361). Nos expériences ont démontré que la diète HFHS, pendant 12 semaines, a induit une augmentation de l'expression génique du NF- κ B et du TNF- α hépatiques, et que l'hyperméthylation de PPAR α et PPAR γ pourrait expliquer ces observations. En effet, la méthylation de l'ADN était responsable d'une diminution des niveaux d'ARNm de PPAR γ , d'une inflammation et d'une fibrose, chez les patients atteints d'hépatite B chronique (362). De plus, une faible expression maternelle de PPAR α , éventuellement par l'intermédiaire d'une hyperméthylation de son promoteur, a induit une augmentation de l'interféron- γ et une diminution des niveaux d'IL-10 (363). Une régulation à la hausse de l'ARNm et de la protéine PPAR- γ a induit une inhibition de la voie NF- κ B, qui à son tour a réduit la surexpression du TNF- α et de l'IL-6 (364). L'expression du gène COX-2 était augmentée dans les foies des souris ayant reçu la diète HFHS et ceci qui pourrait s'expliquer par l'inhibition des PPARs. En effet, un milieu hyperosmolaire, dans des cellules épithéliales de rein, a diminué la protéine PPAR γ ce qui a conduit à l'expression de COX-2 (365). Il a également été démontré que l'induction de l'expression de PPAR γ a entraîné l'inhibition de COX-2 dans les cellules MC-

3T3 E1 (366). L'expression de la protéine COX-2 a également été diminuée par une régulation à la hausse de l'ARNm et de la protéine PPAR γ (364).

Nous avons, par la suite, examiné le stress oxydant puisqu'il est étroitement lié à l'inflammation par différentes voies de signalisation. Les souris traitées avec la diète HFHS pendant 12 semaines, présentaient un stress oxydant hépatique en raison de l'augmentation du MDA et de l'inhibition des activités antioxydantes SOD2 et GPx, pouvant être expliqué par l'inhibition des PPAR α et des PPAR γ . En effet, l'administration de cyclophosphamide à des rats a provoqué une régulation négative du PPAR γ , qui a été associée à des activités SOD et GPx réduites ainsi qu'avec une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique (367). L'administration d'urolithine et d'acide ellagique a augmenté l'expression de la protéine PPAR γ ce qui a été associé avec une diminution des taux de ROS et de MDA intracellulaires ainsi qu'avec une augmentation de l'activité SOD, dans des cellules T24 traitées au H₂O₂ (368). Il est important de préciser que le stress oxydant retrouvé chez les souris nourries avec la diète HFHS pourrait participer aux modifications épigénétiques des promoteurs PPARs puisque des niveaux de ROS modifiés peuvent affecter les mécanismes épigénétiques (287;288). Il a été suggéré que les ROS, plus précisément, l'anion superoxyde, participe à ce processus comme un agent nucléophile en déprotonant la molécule de cytosine en position C-5, ce qui accélère la réaction de l'ADN avec le S-adénosyl-L-méthionine (SAM) chargé positivement (289).

En utilisant le double agoniste GFT505, toutes les caractéristiques du syndrome métabolique, y compris le stress oxydant et l'inflammation induits par la diète HFHS, ont été éliminées. Collectivement, nos données montrent que, en plus de lutter contre les troubles

cardiométaboliques, GFT505 atténue sensiblement l'inflammation. Dans une étude récente de phase II, un traitement de 1 mois avec du GFT505 avait considérablement amélioré l'homéostasie lipidique et glucidique chez des patients obèses souffrant de dyslipidémie combinée à un prédiabète (369). Une amélioration des marqueurs de la fonction hépatique gamma-glutamyl transpeptidase, alanine aminotransférase et phosphatase alcaline (ALP) a également été observée chez des patients traités avec GFT505 (369). L'efficacité du GFT505 dans des modèles de souris de NAFLD/NASH a été proposée par la première étude préclinique de Staël et al. (370). Les effets du GFT505 corrélaient également avec une diminution de l'expression des gènes hépatiques pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 β et le TNF- α (370-372). L'impact du GFT505 sur le stress oxydant pourrait s'expliquer par ses effets sur l'inflammation étant donné que ces deux phénomènes sont étroitement liés, mais aussi parce que les agonistes de PPAR γ ont réussi à réduire la production de superoxyde dans les cellules endothéliales (373) et la génération de ROS (374).

En conclusion, ce troisième volet a démontré que la diète HFHS a induit une hyperméthylation de gènes métaboliques clés tels que PPAR α et PPAR γ favorisant les caractéristiques du syndrome métabolique, y compris l'inflammation et le stress oxydant. Le double agoniste PPAR α / δ , GFT505, a neutralisé plusieurs aberrations pathologiques du syndrome métabolique dans ce modèle syndrome métabolique en normalisant la méthylation des promoteurs PPARs.

Les travaux de cette thèse ont démontré que le redox a la capacité d'induire des changements épigénétiques (hyperméthylation de PGx et hypométhylation de SOD2 dans les cellules Caco-2/15, hypométhylation globale de l'ADN induite par le stress oxydant de la nutrition

parentérale et hyperméthylation des PPAR α et PPAR γ induit par le stress oxydant d'une diète riche en gras et en sucre). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'impact du redox sur l'épigénétique (Figure 12):

- La S-adénosylméthionine (SAM) est générée par la méthionine adénosyltransférase (MAT) et représente un donneur de groupes méthyles. La MAT contient une cystéine sensible au redox au niveau de son site actif la rendant ainsi sensible à l'environnement redox. Un environnement oxydé inhibera son activité tandis qu'un environnement réducteur augmentera sa production (375-377). D'ailleurs, il a été suggéré que les cellules cancéreuses, qui contiennent un environnement plus oxydé, doivent avoir une diminution de l'activité MAT, et par conséquent, une diminution des niveaux de SAM (378).

- L'enzyme méthionine synthase (MS) qui utilise un mécanisme folate/cobalamine, produit de la méthionine à partir de l'homocystéine (379). Elle permet le transfert d'un groupement méthyle provenant du SAM vers l'homocystéine. Il a été démontré que l'oxydation de la cobalamine de la MS la rend inactive ce qui inactive le cycle de la méthionine (380;381). La MS peut être recyclée par l'enzyme méthionine synthase réductase à partir de SAM. Par conséquent, les ROS peuvent influencer l'épigénétique via l'inactivation de l'enzyme MS.

- Le stress oxydant a un impact sur la production de glutathion. Il a la capacité d'augmenter la sortie de l'homocystéine du cycle de la méthionine vers la production de glutathion en augmentant l'activité de la cystathion β -synthase (382). Il a été proposé que les défauts métaboliques, dus au stress oxydant et très présents dans les cancers, exercent une influence sur l'épigénétique en dirigeant les métabolites vers la voie de production du glutathion plutôt que vers la production de SAM. En effet, une diminution de glutathion

diminuera les niveaux de SAM, augmentera la production de glutathion et conduira à une hypométhylation du génome (383;384).

- La 8-oxoguanine représente le dommage oxydant de l'ADN et est susceptible d'induire des changements épigénétique si les dommages oxydants ont lieu au niveau des îlots CpGs. En effet, la présence de 8-OG au niveau des îlots CpG inhibe la DNMT ce qui conduira à une hypométhylation (385;386).

- Une oxydation des groupes méthyles des cytosines méthylées est également possible et produira de la 5-hydroxyméthyle-cytosine. La reconnaissance des CpGs par les protéines liant les groupes méthyles sera compromise et aboutira à une hypométhylation (387;388).

- Il a été démontré qu'une oxydation au niveau d'une guanine ou au niveau d'une cytosine méthylée appartenant à un îlot CpG empêche la fixation des MBD (methyl-binding-proteins) ce qui a altère la structure de la chromatine (389) et favorise la déméthylation ainsi que la méthylation de novo (390). Ce profil est également retrouvé au niveau des tumeurs caractérisées par une hypométhylation globale du génome ainsi que par des hyperméthylations localisées de certains gènes (391).

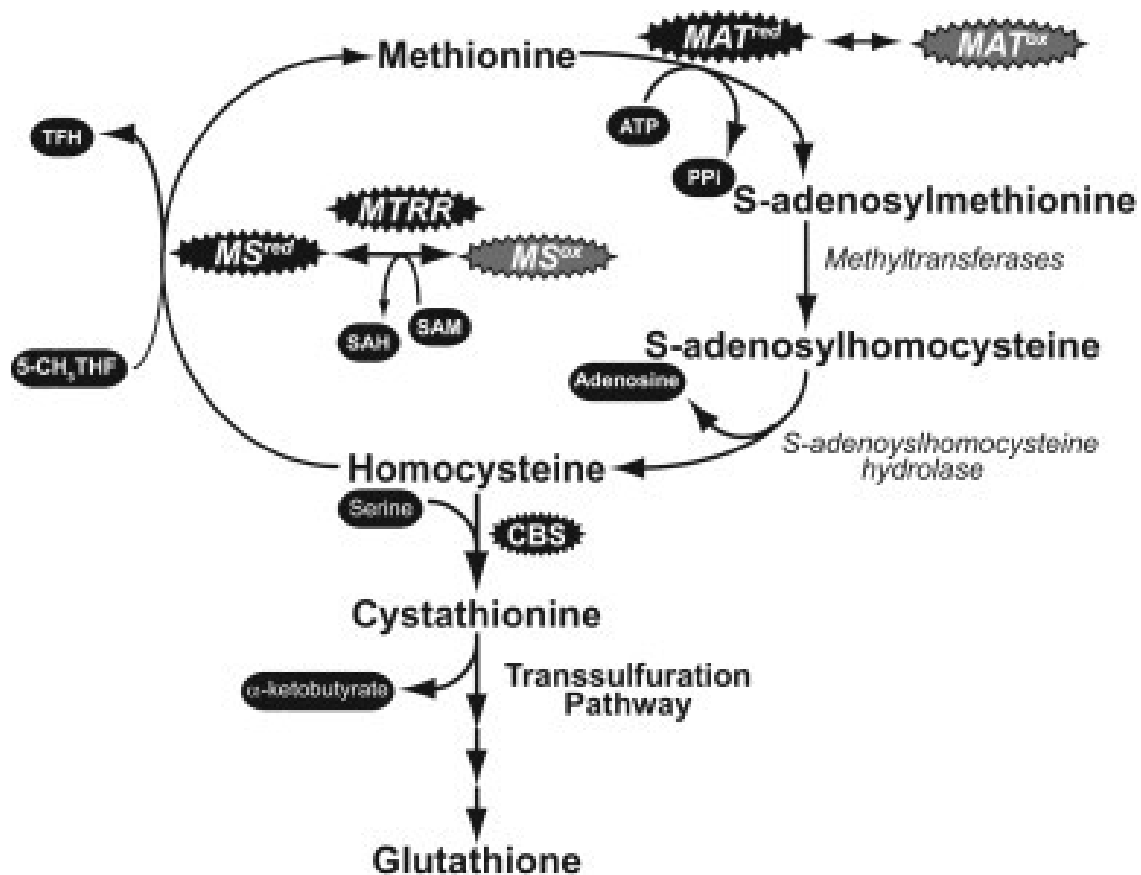


Figure 12 : Inhibition du cycle de la méthionine par le redox. L'oxydation des enzymes clés (représentée dans des bulles grise) limite leurs activités et arrête la production des intermédiaires métaboliques du cycle de la méthionine.

IV CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSION

Les connaissances sur les modifications épigénétiques des gènes dans le syndrome métabolique sont limitées. Nous sommes les premiers à démontrer que l'induction d'un stress oxydant *in vitro* (cellules Caco-2/15) cause une augmentation de l'inflammation et une altération des principales défenses antioxydantes telles que la SOD et la GPx via une modulation de leurs niveaux de méthylation. Nous sommes également les premiers à démontrer *in vivo* (chez le cochon d'Inde) que le stress oxydant de la nutrition parentérale induit une hypométhylation de l'ADN persistante dans le temps en raison d'une inhibition de l'activité de la DNMT très tôt dans la vie. Finalement, nous sommes les premiers à démontrer *in vivo* (chez la souris) que le syndrome métabolique induit par une diète riche en gras et en sucre est associé à des altérations épigénétiques de gènes métaboliques clés tels que les PPARs ce qui favorise le stress oxydant et l'inflammation puisque le double agoniste GFT505 a pu neutraliser les effets induits par la diète HFHS.

Le stress oxydant induit par la nutrition a induit d'importants changements épigénétiques pouvant conduire au développement du syndrome métabolique.

La nutrition apparaît donc comme un facteur crucial dans la prévention de la reprogrammation fœtale et du développement du syndrome métabolique. Puisque les mécanismes suggèrent que le stress oxydant agit principalement sur les métabolites du cycle de la méthionine pour altérer l'épigénétique, une supplémentation en ces molécules ainsi qu'en antioxydants permettrait de restaurer l'équilibre redox et épigénétique.

2. PERSPECTIVES

Il serait intéressant d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'impact d'une supplémentation en folate, vitamine B12, choline, et bétaïne sur les niveaux de méthylation des gènes des défenses antioxydantes en présence d'un stress oxydant. Au niveau *in vitro*, une étude pourrait s'intéresser à l'impact du LPS sur la méthylation des gènes antioxydants et anti/pro-inflammatoires. Au niveau de notre étude *in vivo*, une photoprotection de la nutrition parentérale pourrait être réalisée afin de diminuer le stress oxydant et par la suite examiner la méthylation des gènes des défenses antioxydantes. En effet, une photoprotection de la nutrition parentérale permettait de diminuer les peroxydes (392) générés à partir de la riboflavine (393). L'addition d'hexapeptides dérivés du lait humain semblerait également une bonne solution pour réduire le stress oxydant de la nutrition parentérale (réduction des peroxydes de moitié) (394) et représenterait un excellent modèle pour des études épigénétiques. Il apparaît crucial que les résultats des études de nutrition parentérale soient pris en considération afin de réduire les complications associées au stress oxydant de ce mode de nutrition. Cette étude souligne la nécessité d'une étude clinique pour comprendre les effets à long terme de la NP administré tôt dans la vie.

Il serait intéressant d'analyser, *in vivo*, l'impact d'antioxydants tels que les polyphénols sur les effets épigénétiques induit par la diète HFHS. Finalement, l'utilisation de la technique « Illumina » permettrait de mesurer la méthylation de 450 000 sites CpG couvrant 14 000 gènes et ainsi de cartographier des familles de gènes modifiées épigénétiquement dans le syndrome métabolique.

BILIOGRAPHIE

- 1 Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987; **238/4824**: 163-170.
- 2 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; **16/1**: 6-21.
- 3 Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982; **10/8**: 2709-2721.
- 4 Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 1992; **13/4**: 1095-1107.
- 5 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; **293/5532**: 1068-1070.
- 6 Bestor TH, Gundersen G, Kolsto AB, Prydz H. CpG islands in mammalian gene promoters are inherently resistant to de novo methylation. *Genet Anal Tech Appl* 1992; **9/2**: 48-53.
- 7 Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 1999; **274/46**: 33002-33010.
- 8 Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; **366/6453**: 362-365.
- 9 Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 1995; **9/19**: 2325-2334.

- 10 Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; **19/3**: 219-220.
- 11 Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; **99/3**: 247-257.
- 12 Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 1999; **19/12**: 8211-8218.
- 13 Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; **9/16**: 2395-2402.
- 14 Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; **14 Spec No 1**: R47-R58.
- 15 Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur J Biochem* 2002; **269/20**: 4981-4984.
- 16 Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J* 2002; **21/15**: 4183-4195.
- 17 Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, LeVorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 2000; **405/6785**: 486-489.
- 18 Loenen WA. S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?. *Biochem Soc Trans* 2006; **34/Pt 2**: 330-333.

- 19 Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; **18/11**: 6538-6547.

- 20 Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 1993; **21/21**: 4886-4892.

- 21 Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 1992; **11/1**: 327-333.

- 22 Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 1994; **14/8**: 5487-5494.

- 23 Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 1997; **7/3**: 157-165.

- 24 Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 1981; **211/4480**: 393-396.

- 25 Graves JA. 5-azacytidine-induced re-expression of alleles on the inactive X chromosome in a hybrid mouse cell line. *Exp Cell Res* 1982; **141/1**: 99-105.

- 26 Venolia L, Gartler SM, Wassman ER, Yen P, Mohandas T, Shapiro LJ. Transformation with DNA from 5-azacytidine-reactivated X chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79/7**: 2352-2354.

- 27 Jaenisch R, Schnieke A, Harbers K. Treatment of mice with 5-azacytidine efficiently activates silent retroviral genomes in different tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82/5**: 1451-1455.

- 28 Sado T, Fenner MH, Tan SS, Tam P, Shioda T, Li E. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol* 2000; **225/2**: 294-303.
- 29 Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res* 2009; **88/5**: 400-408.
- 30 Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 2007; **213/2**: 384-390.
- 31 Arnaud P, Feil R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; **75/2**: 81-97.
- 32 Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD et al. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 2009; **18/21**: 4046-4053.
- 33 Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001; **60**: 5-20.
- 34 Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 1999; **23/3**: 314-318.
- 35 Waterland RA. Do maternal methyl supplements in mice affect DNA methylation of offspring? *J Nutr* 2003; **133/1**: 238.
- 36 Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J Nutr* 2006; **136/6 Suppl**: 1706S-1710S.

- 37 Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, Smith CA, Shi X, Tahiliani KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 2006; **44/9**: 401-406.
- 38 Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 2002; **132/8 Suppl**: 2393S-2400S.
- 39 Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007; **97/3**: 435-439.
- 40 Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005; **135/6**: 1382-1386.
- 41 Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br J Nutr* 2007; **97/6**: 1064-1073.
- 42 Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009; **139/6**: 1054-1060.
- 43 Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ Res* 2007; **100/4**: 520-526.
- 44 van Straten EM, Bloks VW, Huijkman NC, Baller JF, van MH, Lutjohann D et al. The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; **298/2**: R275-R282.

- 45 Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104/49**: 19351-19356.
- 46 Godfrey KM, Redman CW, Barker DJ, Osmond C. The effect of maternal anaemia and iron deficiency on the ratio of fetal weight to placental weight. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; **98/9**: 886-891.
- 47 Gambling L, Dunford S, Wallace DI, Zuur G, Solanky N, Srai SK et al. Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. *J Physiol* 2003; **552/Pt 2**: 603-610.
- 48 Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 1991; **40 Suppl 2**: 115-120.
- 49 Blondeau B, Avril I, Duchene B, Breant B. Endocrine pancreas development is altered in foetuses from rats previously showing intra-uterine growth retardation in response to malnutrition. *Diabetologia* 2002; **45/3**: 394-401.
- 50 Torrens C, Brawley L, Anthony FW, Dance CS, Dunn R, Jackson AA et al. Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. *Hypertension* 2006; **47/5**: 982-987.
- 51 Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 2009; **587/Pt 20**: 4963-4976.
- 52 Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991; **303/6809**: 1019-1022.

- 53 Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; **387/6636**: 903-908.
- 54 Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 1998; **20/2**: 113-114.
- 55 Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 1998; **20/2**: 111-112.
- 56 Large V, Reynisdottir S, Eleborg L, Van H, V, Strommer L, Arner P. Lipolysis in human fat cells obtained under local and general anesthesia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; **21/1**: 78-82.
- 57 Klannemark M, Orho M, Langin D, Laurell H, Holm C, Reynisdottir S et al. The putative role of the hormone-sensitive lipase gene in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus and abdominal obesity. *Diabetologia* 1998; **41/12**: 1516-1522.
- 58 Clement K, Ruiz J, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D, Basdevant A et al. Additive effect of A-->G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the beta 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; **20/12**: 1062-1066.
- 59 Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, Sasson S, Youngren J, Fisher A et al. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1995; **373/6513**: 448-451.
- 60 Ristow M, Muller-Wieland D, Pfeiffer A, Krone W, Kahn CR. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N Engl J Med* 1998; **339/14**: 953-959.

- 61 Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, Echwald SM, Urhammer SA, Rasmussen S et al. Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet* 1995; **346/8972**: 397-402.
- 62 Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 2008; **118/6**: 2316-2324.
- 63 Ling C, DeI GS, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* 2008; **51/4**: 615-622.
- 64 Einstein F, Thompson RF, Bhagat TD, Fazzari MJ, Verma A, Barzilai N et al. Cytosine methylation dysregulation in neonates following intrauterine growth restriction. *PLoS One* 2010; **5/1**: e8887.
- 65 Kiskinis E, Hallberg M, Christian M, Olofsson M, Dilworth SM, White R et al. RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *EMBO J* 2007; **26/23**: 4831-4840.
- 66 Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009; **65/1**: 1-9.
- 67 Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis* 2010; **9**: 60.
- 68 Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Martinez JA. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity (Silver Spring)* 2009; **17/6**: 1293-1297.

- 69 Lee HA, Lee DY, Lee HJ, Han HS, Kim I. Enrichment of (pro)renin receptor promoter with activating histone codes in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011.
- 70 Jiang Q, Yuan H, Xing X, Liu J, Huang Z, Du X. Methylation of adrenergic beta1 receptor is a potential epigenetic mechanism controlling antihypertensive response to metoprolol. *Indian J Biochem Biophys* 2011; **48/5**: 301-307.
- 71 Cho HM, Lee HA, Kim HY, Han HS, Kim IK. Expression of Na⁺-K⁺ -2Cl⁻ cotransporter 1 is epigenetically regulated during postnatal development of hypertension. *Am J Hypertens* 2011; **24/12**: 1286-1293.
- 72 Chelbi ST, Mondon F, Jammes H, Buffat C, Mignot TM, Tost J et al. Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension* 2007; **49/1**: 76-83.
- 73 Goyal R, Goyal D, Leitzke A, Gheorghe CP, Longo LD. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. *Reprod Sci* 2010; **17/3**: 227-238.
- 74 Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y et al. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 2010; **13/7**: 1011-1022.
- 75 Barres R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K et al. Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab* 2009; **10/3**: 189-198.
- 76 Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; **78/2**: 547-581.

- 77 Buettner GR, Ng CF, Wang M, Rodgers VG, Schafer FQ. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radic Biol Med* 2006; **41/8**: 1338-1350.
- 78 Jones P, Suggett A. The catalase-hydrogen peroxide system. Kinetics of catalatic action at high substrate concentrations. *Biochem J* 1968; **110/4**: 617-620.
- 79 Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1996; **87/4**: 1595-1599.
- 80 Flohe L, Brand I. Kinetics of glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1969; **191/3**: 541-549.
- 81 Jones P, Suggett A. The catalase-hydrogen peroxide system. Kinetics of catalatic action at high substrate concentrations. *Biochem J* 1968; **110/4**: 617-620.
- 82 Fazeli G, Stopper H, Schinzel R, Ni CW, Jo H, Schupp N. Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4. *Mutagenesis* 2012.
- 83 Davel AP, Ceravolo GS, Wenceslau CF, Carvalho MH, Brum PC, Rossoni LV. Increased vascular contractility and oxidative stress in beta(2)-adrenoceptor knockout mice: the role of NADPH oxidase. *J Vasc Res* 2012; **49/4**: 342-352.
- 84 Zielinska-Przyjemska M, Olejnik A, Dobrowolska-Zachwieja A, Grajek W. In vitro effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals. *Phytother Res* 2009; **23/1**: 49-55.

- 85 Morgan D, Rebelato E, Abdulkader F, Graciano MF, Oliveira-Emilio HR, Hirata AE et al. Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2009; **150/5**: 2197-2201.
- 86 Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989; **264/14**: 7761-7764.
- 87 Babior BM, Woodman RC. Chronic granulomatous disease. *Semin Hematol* 1990; **27/3**: 247-259.
- 88 Maly FE. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radic Res Commun* 1990; **8/3**: 143-148.
- 89 Babbs CF, Cregor MD, Turek JJ, Badylak SF. Endothelial superoxide production in buffer perfused rat lungs, demonstrated by a new histochemical technique. *Lab Invest* 1991; **65/4**: 484-496.
- 90 Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990; **265/3**: 659-665.
- 91 Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol* 2000; **304/1**: 55-68.
- 92 Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000; **149/1**: 43-50.
- 93 Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* 2002; **33/8**: 1037-1046.

- 94 Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; **12/10**: 1161-1208.
- 95 Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr Med Chem* 2003; **10/17**: 1723-1740.
- 96 Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; **84/4**: 1381-1478.
- 97 Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **295/4**: C849-C868.
- 98 Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; **30/11**: 1191-1212.
- 99 Jezek P, Plecita-Hlavata L. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41/10**: 1790-1804.
- 100 Lambert AJ, Brand MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol* 2009; **554**: 165-181.
- 101 Murphy E, Bers D, Rizzuto R. Mitochondria: from basic biology to cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **46/6**: 765-766.
- 102 Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 2009; **122/Pt 4**: 437-441.
- 103 Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; **88/2**: 386-401.

- 104 Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; **18/1**: 44-51.
- 105 Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 1999; **66**: 17-25.
- 106 Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; **86/5**: 494-501.
- 107 Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med* 2002; **33/6**: 774-797.
- 108 Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; **58/1**: 87-114.
- 109 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; **160/1**: 1-40.
- 110 Siems WG, Grune T, Esterbauer H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci* 1995; **57/8**: 785-789.
- 111 Fedtke N, Boucheron JA, Walker VE, Swenberg JA. Vinyl chloride-induced DNA adducts. II: Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and N2,3-ethenoguanine in rat tissue DNA. *Carcinogenesis* 1990; **11/8**: 1287-1292.
- 112 Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 2004; **11/9**: 1105-1112.

- 113 Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994; **14/10**: 1521-1528.
- 114 Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; **46**: 223-234.
- 115 Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11/2**: 98-107.
- 116 Khaper N, Bryan S, Dhingra S, Singal R, Bajaj A, Pathak CM et al. Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure. *Antioxid Redox Signal* 2010; **13/7**: 1033-1049.
- 117 Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 2012; **18/3**: 363-374.
- 118 Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; **94/12**: 1543-1553.
- 119 Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11/2**: 85-97.
- 120 Styskal J, Van RH, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?. *Free Radic Biol Med* 2012; **52/1**: 46-58.
- 121 Ley K, Deem TL. Oxidative modification of leukocyte adhesion. *Immunity* 2005; **22/1**: 5-7.

- 122 Wagener FA, Feldman E, de WT, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; **216/3**: 456-463.
- 123 Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?. *FASEB J* 1999; **13/10**: 1137-1143.
- 124 Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int J Mol Med* 1999; **4/3**: 223-230.
- 125 Bryan S, Baregazy B, Spicer D, Singal PK, Khaper N. Redox-inflammatory synergy in the metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol* 2013; **91/1**: 22-30.
- 126 Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; **52**: 711-760.
- 127 Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009; **390/3**: 191-214.
- 128 Masella R, Di BR, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; **16/10**: 577-586.
- 129 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39/1**: 44-84.
- 130 Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; **64/5-6**: 1019-1026.

- 131 Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003; **333/1**: 19-39.
- 132 Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci US A* 1988; **85/24**: 9748-9752.
- 133 Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci US A* 1989; **86/16**: 6377-6381.
- 134 Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *FASEB J* 1999; **13/9**: 1007-1024.
- 135 Hemila H, Roberts P, Wikstrom M. Activated polymorphonuclear leucocytes consume vitamin C. *FEBS Lett* 1984; **178/1**: 25-30.
- 136 May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1998; **273/36**: 23039-23045.
- 137 McGinley C, Shafat A, Donnelly AE. Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage?. *Sports Med* 2009; **39/12**: 1011-1032.
- 138 CHRISTINE I, THOMSON G, IGGO B, BROWNIE AC, STEWART CP. The reduction of dehydroascorbic acid by human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 1956; **1/6**: 557-569.
- 139 Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med* 1998; **24/5**: 789-797.

- 140 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of tocopherols and related compounds. Recommendations 1981. *Eur J Biochem* 1982; **123/3**: 473-475.
- 141 Traber MG, Ingold KU, Burton GW, Kayden HJ. Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8'R-alpha-tocopherol in human lipoproteins. *Lipids* 1988; **23/8**: 791-797.
- 142 Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 1995; **30/4**: 277-290.
- 143 Kaiser S, Di MP, Murphy ME, Sies H. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch Biochem Biophys* 1990; **277/1**: 101-108.
- 144 Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; **43/1**: 4-15.
- 145 Cooney RV, Harwood PJ, Franke AA, Narala K, Sundstrom AK, Berggren PO et al. Products of gamma-tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F) cells. *Free Radic Biol Med* 1995; **19/3**: 259-269.
- 146 Doba T, Burton GW, Ingold KU. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1985; **835/2**: 298-303.
- 147 Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 1999; **38/4**: 309-336.
- 148 El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 2004; **430/1**: 37-48.

- 149 Peto R, Doll R, Buckley JD, Sporn MB. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?. *Nature* 1981; **290/5803**: 201-208.
- 150 Tallman KA, Pratt DA, Porter NA. Kinetic products of linoleate peroxidation: rapid beta-fragmentation of nonconjugated peroxy radicals. *J Am Chem Soc* 2001; **123/47**: 11827-11828.
- 151 Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys* 2001; **385/1**: 13-19.
- 152 Burke M, Edge R, Land EJ, McGarvey DJ, Truscott TG. One-electron reduction potentials of dietary carotenoid radical cations in aqueous micellar environments. *FEBS Lett* 2001; **500/3**: 132-136.
- 153 Mortensen A, Skibsted LH. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Lett* 1997; **417/3**: 261-266.
- 154 Mortensen A, Skibsted LH. Real time detection of reactions between radicals of lycopene and tocopherol homologues. *Free Radic Res* 1997; **27/2**: 229-234.
- 155 Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 1979; **278/5706**: 737-738.
- 156 Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1988; **107/6 Pt 1**: 2169-2179.
- 157 Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci US A* 1991; **88/16**: 7381-7385.

- 158 Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, Slot JW. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic Biol Med* 1993; **14/2**: 201-207.
- 159 Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, Wigderson M, Sherman L, Bernstein Y et al. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J* 1985; **4/1**: 77-84.
- 160 Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; **362/6415**: 59-62.
- 161 Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; **248/13**: 4793-4796.
- 162 Barra D, Schinina ME, Simmaco M, Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G et al. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1984; **259/20**: 12595-12601.
- 163 St Clair DK, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Radic Biol Med* 1994; **16/2**: 275-282.
- 164 Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93/18**: 9782-9787.
- 165 Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2001; **22/5**: 827-829.

- 166 Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 1990; **265/5**: 2856-2864.
- 167 Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic Biol Med* 1997; **23/2**: 314-320.
- 168 Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79/24**: 7634-7638.
- 169 Marklund SL, Bjelle A, Elmqvist LG. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann Rheum Dis* 1986; **45/10**: 847-851.
- 170 Hendrickson DJ, Fisher JH, Jones C, Ho YS. Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21. *Genomics* 1990; **8/4**: 736-738.
- 171 Folz RJ, Peno-Green L, Crapo JD. Identification of a homozygous missense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatically increased serum enzyme levels. *Hum Mol Genet* 1994; **3/12**: 2251-2254.
- 172 Marklund SL, Nilsson P, Israelsson K, Schampi I, Peltonen M, Asplund K. Two variants of extracellular-superoxide dismutase: relationship to cardiovascular risk factors in an unselected middle-aged population. *J Intern Med* 1997; **242/1**: 5-14.
- 173 Adachi T, Wang XL. Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism. *FEBS Lett* 1998; **433/1-2**: 166-168.

- 174 Yamada H, Yamada Y, Adachi T, Goto H, Ogasawara N, Futenma A et al. Molecular analysis of extracellular-superoxide dismutase gene associated with high level in serum. *Jpn J Hum Genet* 1995; **40/2**: 177-184.
- 175 Yamada H, Yamada Y, Adachi T, Goto H, Ogasawara N, Futenma A et al. Polymorphism of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene: relation to the mutation responsible for high EC-SOD level in serum. *Jpn J Hum Genet* 1997; **42/2**: 353-356.
- 176 Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 1996; **87/4**: 1595-1599.
- 177 Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez dC, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; **32/8**: 595-603.
- 178 Turrens JF, Crapo JD, Freeman BA. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1984; **73/1**: 87-95.
- 179 Speranza MJ, Bagley AC, Lynch RE. Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin, and paraquat. *J Biol Chem* 1993; **268/25**: 19039-19043.
- 180 Tsan MF, White JE, Treanor C, Shaffer JB. Molecular basis for tumor necrosis factor-induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities. *Am J Physiol* 1990; **259/6 Pt 1**: L506-L512.
- 181 Jorrot L, Junod AF. Response of human endothelial cell antioxidant enzymes to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; **6/1**: 107-115.

- 182 Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **19/2**: 286-292.
- 183 Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; **27/9-10**: 951-965.
- 184 Sunde RA. Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 1990; **10**: 451-474.
- 185 Grossmann A, Wendel A. Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur J Biochem* 1983; **135/3**: 549-552.
- 186 Burk RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 1991; **5/9**: 2274-2279.
- 187 Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; **268/4**: 2571-2576.
- 188 Wingler K, Muller C, Schmehl K, Florian S, Brigelius-Flohe R. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* 2000; **119/2**: 420-430.
- 189 Esworthy RS, Mann JR, Sam M, Chu FF. Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **279/2**: G426-G436.
- 190 Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S et al. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res* 2004; **64/3**: 962-968.

- 191 Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **281/3**: G848-G855.
- 192 Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987; **256/2**: 677-686.
- 193 Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto Y, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J Biochem* 1990; **108/2**: 145-148.
- 194 Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA et al. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol* 1994; **266/2 Pt 1**: C367-C375.
- 195 Avissar N, Eisenmann C, Breen JG, Horowitz S, Miller RK, Cohen HJ. Human placenta makes extracellular glutathione peroxidase and secretes it into maternal circulation. *Am J Physiol* 1994; **267/1 Pt 1**: E68-E76.
- 196 Howie AF, Walker SW, Akesson B, Arthur JR, Beckett GJ. Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: a potential regulator of thyroid-hormone synthesis. *Biochem J* 1995; **308 (Pt 3)**: 713-717.
- 197 Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 1994; **269/43**: 27066-27073.
- 198 Tham DM, Whitin JC, Kim KK, Zhu SX, Cohen HJ. Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1998; **275/6 Pt 1**: G1463-G1471.

- 199 Avissar N, Whitin JC, Allen PZ, Wagner DD, Liegey P, Cohen HJ. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. *J Biol Chem* 1989; **264/27**: 15850-15855.
- 200 Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys* 1994; **309/2**: 239-246.
- 201 Schuckelt R, Brigelius-Flohe R, Maiorino M, Roveri A, Reumkens J, Strassburger W et al. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Radic Res Commun* 1991; **14/5-6**: 343-361.
- 202 Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem* 1992; **267/9**: 6142-6146.
- 203 Roveri A, Maiorino M, Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1994; **233**: 202-212.
- 204 Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2003; **34/2**: 145-169.
- 205 Sakamoto H, Imai H, Nakagawa Y. Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis. *J Biol Chem* 2000; **275/51**: 40028-40035.
- 206 Nomura K, Imai H, Koumura T, Nakagawa Y. Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Biol Signals Recept* 2001; **10/1-2**: 81-92.

- 207 Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; **47/9**: 1304-1309.
- 208 Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 2004; **36/10**: 1199-1207.
- 209 Dhakshinamoorthy S, Long DJ, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul* 2000; **36**: 201-216.
- 210 Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 2006; **46**: 113-140.
- 211 Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 2000; **29/3-4**: 254-262.
- 212 Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 1991; **266/18**: 11632-11639.
- 213 Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* 2008; **246/1**: 24-33.
- 214 Zipper LM, Mulcahy RT. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem* 2002; **277/39**: 36544-36552.
- 215 Bloom DA, Jaiswal AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-

- mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem* 2003; **278/45**: 44675-44682.
- 216 Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 2003; **23/22**: 8137-8151.
- 217 Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maebara K, Wang H et al. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem* 2002; **277/47**: 44765-44771.
- 218 Chan JY, Kwong M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1517/1**: 19-26.
- 219 Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol* 2007; **35/4**: 459-473.
- 220 Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohe R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 2005; **25/12**: 4914-4923.
- 221 Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohe R et al. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; **35/6**: 639-650.
- 222 Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; **46/4**: 443-453.

- 223 Na HK, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol* 2008; **46/4**: 1271-1278.
- 224 Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 2006; **40/2**: 341-347.
- 225 Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994; **135/2**: 798-800.
- 226 Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999; **4/4**: 597-609.
- 227 Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* 2006; **30/4**: 145-151.
- 228 Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; **347/6294**: 645-650.
- 229 Dietz M, Mohr P, Kuhn B, Maerki HP, Hartman P, Ruf A et al. Comparative molecular profiling of the PPARalpha/gamma activator aleglitazar: PPAR selectivity, activity and interaction with cofactors. *ChemMedChem* 2012; **7/6**: 1101-1111.
- 230 Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; **10/3**: 245-257.

- 231 Fruchart JC, Staels B, Duriez P. PPARS, metabolic disease and atherosclerosis. *Pharmacol Res* 2001; **44/5**: 345-352.
- 232 Delerive P, De BK, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999; **274/45**: 32048-32054.
- 233 Fruchart JC. Selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulators (SPPARalpha): the next generation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-agonists. *Cardiovasc Diabetol* 2013; **12**: 82.
- 234 Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009; **205/1**: 1-8.
- 235 Roberts LD, Murray AJ, Menassa D, Ashmore T, Nicholls AW, Griffin JL. The contrasting roles of PPARdelta and PPARgamma in regulating the metabolic switch between oxidation and storage of fats in white adipose tissue. *Genome Biol* 2011; **12/8**: R75.
- 236 Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100/26**: 15924-15929.
- 237 Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM et al. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103/9**: 3444-3449.

- 238 Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 2012; **23/7**: 351-363.
- 239 Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; **19/3**: 257-267.
- 240 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; **320/14**: 915-924.
- 241 Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; **20/5**: 707-727.
- 242 Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV, Steinberg D, Witztum JL. Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; **110/5**: 637-641.
- 243 Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. *Arch Biochem Biophys* 2008; **476/2**: 107-112.
- 244 Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M et al. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst* 1996; **88/21**: 1560-1570.
- 245 Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008; **46/4**: 499-505.

- 246 Mohamed-Ali V, Goodrick S, Bulmer K, Holly JM, Yudkin JS, Coppack SW. Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Am J Physiol* 1999; **277/6 Pt 1**: E971-E975.
- 247 Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 2001; **38/2-3**: 189-197.
- 248 Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114/12**: 1752-1761.
- 249 Tian YF, Hsia TL, Hsieh CH, Huang DW, Chen CH, Hsieh PS. The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. *Life Sci* 2011; **89/3-4**: 107-114.
- 250 D'Archivio M, Annuzzi G, Vari R, Filesi C, Giacco R, Scazzocchio B et al. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. *Eur J Clin Invest* 2012; **42/1**: 70-78.
- 251 Codoner-Franch P, Tavares-Alonso S, Murria-Estal R, Herrera-Martin G, Alonso-Iglesias E. Polyamines are increased in obese children and are related to markers of oxidative/nitrosative stress and angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96/9**: 2821-2825.
- 252 Stancliffé RA, Thorpe T, Zemel MB. Dairy attenuates oxidative and inflammatory stress in metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2011; **94/2**: 422-430.
- 253 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 1987; **76/3**: 504-507.

- 254 Turpeinen AM, Alfthan G, Valsta L, Hietanen E, Salonen JT, Schunk H et al. Plasma and lipoprotein lipid peroxidation in humans on sunflower and rapeseed oil diets. *Lipids* 1995; **30/6**: 485-492.
- 255 Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25/1**: 29-38.
- 256 Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005; **135/5**: 969-972.
- 257 Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; **96/1**: 25-28.
- 258 Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999; **13/1**: 23-30.
- 259 Matsunami T, Sato Y, Sato T, Yukawa M. Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Physiol Res* 2010; **59/1**: 97-104.
- 260 Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F, Micelli-Ferrari T, Cardia L, Altomare E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 1998; **25/3**: 369-372.
- 261 Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f₂alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999; **99/2**: 224-229.
- 262 Chao PC, Huang CN, Hsu CC, Yin MC, Guo YR. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycated LDL, IL-1alpha and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Eur J Nutr* 2010; **49/7**: 429-434.

- 263 Rabbani N, Chittari MV, Bodmer CW, Zehnder D, Ceriello A, Thornalley PJ. Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes* 2010; **59/4**: 1038-1045.
- 264 Vericel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, Lagarde M. Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 2004; **53/4**: 1046-1051.
- 265 Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T et al. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 2002; **39/2**: 269-274.
- 266 Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 2004; **17/9**: 852-860.
- 267 Weber DS, Rocic P, Mellis AM, Laude K, Lyle AN, Harrison DG et al. Angiotensin II-induced hypertrophy is potentiated in mice overexpressing p22phox in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **288/1**: H37-H42.
- 268 Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR et al. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997; **80/1**: 45-51.
- 269 Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; **97/8**: 1916-1923.

- 270 Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; **95/3**: 588-593.
- 271 Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S et al. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14/11**: 2775-2782.
- 272 Kitiyakara C, Wilcox CS. Antioxidants for hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; **7/5**: 531-538.
- 273 Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; **10/2**: 247-255.
- 274 Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002; **55/2**: 239-249.
- 275 Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 2003; **108/17**: 2034-2040.
- 276 Edlund J, Fasching A, Liss P, Hansell P, Palm F. The roles of NADPH-oxidase and nNOS for the increased oxidative stress and the oxygen consumption in the diabetic kidney. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; **26/5**: 349-356.
- 277 Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension?. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **289/4**: R913-R935.
- 278 Wilcox CS. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand* 2003; **179/3**: 217-223.

- 279 Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR et al. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 2002; **91/11**: 1038-1045.
- 280 Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma RV, Engelhardt JF et al. Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res* 2004; **95/5**: 532-539.
- 281 Wang HQ, Smart RC. Overexpression of protein kinase C-alpha in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF-alpha expression but not tumor promotion. *J Cell Sci* 1999; **112 (Pt 20)**: 3497-3506.
- 282 Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; **10/8**: 2247-2258.
- 283 Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; **10/7**: 709-720.
- 284 Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomed Pharmacother* 2007; **61/7**: 412-422.
- 285 Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87/23**: 9383-9387.
- 286 Hayes P, Knaus UG. Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18/15**: 1937-1945.

- 287 Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V et al. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia* 2007; **9/12**: 1111-1121.
- 288 Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 2007; **43/7**: 1023-1036.
- 289 Afanas'ev I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. *Aging Dis* 2014; **5/1**: 52-62.
- 290 Xiong F, Xiao D, Zhang L. Norepinephrine causes epigenetic repression of PKCepsilon gene in rodent hearts by activating Nox1-dependent reactive oxygen species production. *FASEB J* 2012; **26/7**: 2753-2763.
- 291 Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N et al. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci US A* 2012; **109/7**: 2515-2520.
- 292 Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14/6**: 3773-3778.
- 293 Zhang R, Kang KA, Kim KC, Na SY, Chang WY, Kim GY et al. Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. *Gene* 2013; **524/2**: 214-219.
- 294 Cyr AR, Hitchler MJ, Domann FE. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18/15**: 1946-1955.

- 295 Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010; **121/24**: 2661-2671.
- 296 Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980; **20/1**: 85-93.
- 297 Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D, Ramsahoye B. Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res* 2010; **38/13**: 4313-4324.
- 298 Kim HJ, Kim JH, Chie EK, Young PD, Kim IA, Kim IH. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. *Radiat Oncol* 2012; **7**: 39.
- 299 Hodge DR, Peng B, Pompeia C, Thomas S, Cho E, Clausen PA et al. Epigenetic silencing of manganese superoxide dismutase (SOD-2) in KAS 6/1 human multiple myeloma cells increases cell proliferation. *Cancer Biol Ther* 2005; **4/5**: 585-592.
- 300 Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. CpG methylation attenuates Sp1 and Sp3 binding to the human extracellular superoxide dismutase promoter and regulates its cell-specific expression. *Free Radic Biol Med* 2010; **48/7**: 895-904.
- 301 Chen B, Rao X, House MG, Nephew KP, Cullen KJ, Guo Z. GPx3 promoter hypermethylation is a frequent event in human cancer and is associated with tumorigenesis and chemotherapy response. *Cancer Lett* 2011; **309/1**: 37-45.
- 302 Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD et al. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res* 2008; **68/24**: 10280-10289.

- 303 Lee OJ, Schneider-Stock R, McChesney PA, Kuester D, Roessner A, Vieth M et al. Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis. *Neoplasia* 2005; **7/9**: 854-861.
- 304 Peng DF, Razvi M, Chen H, Washington K, Roessner A, Schneider-Stock R et al. DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut* 2009; **58/1**: 5-15.
- 305 Khor TO, Huang Y, Wu TY, Shu L, Lee J, Kong AN. Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem Pharmacol* 2011; **82/9**: 1073-1078.
- 306 Min JY, Lim SO, Jung G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett* 2010; **584/11**: 2427-2432.
- 307 Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr* 2007; **137/1 Suppl**: 223S-228S.
- 308 Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res* 2005; **11/19 Pt 1**: 7033-7041.
- 309 Yang CS, Fang M, Lambert JD, Yan P, Huang TH. Reversal of hypermethylation and reactivation of genes by dietary polyphenolic compounds. *Nutr Rev* 2008; **66 Suppl 1**: S18-S20.
- 310 Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; **29/11**: 2175-2181.

- 311 Wang LG, Beklemisheva A, Liu XM, Ferrari AC, Feng J, Chiao JW. Dual action on promoter demethylation and chromatin by an isothiocyanate restored GSTP1 silenced in prostate cancer. *Mol Carcinog* 2007; **46/1**: 24-31.
- 312 Lavoie JC, Belanger S, Spalinger M, Chessex P. Admixture of a multivitamin preparation to parenteral nutrition: the major contributor to in vitro generation of peroxides. *Pediatrics* 1997; **99/3**: E6.
- 313 Frauer C, Rottach A, Meilinger D, Bultmann S, Fellingner K, Hasenoder S et al. Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1. *PLoS One* 2011; **6/2**: e16627.
- 314 Pradhan M, Esteve PO, Chin HG, Samaranayke M, Kim GD, Pradhan S. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry* 2008; **47/38**: 10000-10009.
- 315 Levy E, Lavoie MA, Delvin E, Seidman E, Lambert M, Sinnott D et al. [Teasing out the various factors associated with the digestive and absorptive phases of intestinal transport]. *Med Sci (Paris)* 2007; **23/11**: 1014-1019.
- 316 Marcil V, Seidman E, Sinnott D, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF et al. Modification in oxidative stress, inflammation, and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2010; **285/52**: 40448-40460.
- 317 Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 1995; **9/8**: 626-635.
- 318 Grenier E, Maupas FS, Beaulieu JF, Seidman E, Delvin E, Sane A et al. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; **293/6**: G1178-G1189.

- 319 Sane AT, Sinnett D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D et al. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* 2006; **47/10**: 2112-2120.
- 320 Levy E, Harmel E, Laville M, Sanchez R, Emonnot L, Sinnett D et al. Expression of Sar1b enhances chylomicron assembly and key components of the coat protein complex II system driving vesicle budding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; **31/11**: 2692-2699.
- 321 Denis MC, Furtos A, Dudonne S, Montoudis A, Garofalo C, Desjardins Y et al. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS One* 2013; **8/1**: e53725.
- 322 Precourt LP, Marcil V, Ntimbane T, Taha R, Lavoie JC, Delvin E et al. Antioxidative properties of paraoxonase 2 in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; **303/5**: G623-G634.
- 323 Taha R, Seidman E, Mailhot G, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF et al. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *PLoS One* 2010; **5/7**: e11817.
- 324 Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **279/1**: G12-G19.
- 325 Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* 2002; **32/7**: 577-583.
- 326 Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med* 1997; **22/6**: 1115-1126.

- 327 Zhang WJ, Wei H, Frei B. The iron chelator, desferrioxamine, reduces inflammation and atherosclerotic lesion development in experimental mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; **235/5**: 633-641.
- 328 Ahluwalia N, Genoux A, Ferrieres J, Perret B, Carayol M, Drouet L et al. Iron status is associated with carotid atherosclerotic plaques in middle-aged adults. *J Nutr* 2010; **140/4**: 812-816.
- 329 Stevens RG, Graubard BI, Micozzi MS, Neriishi K, Blumberg BS. Moderate elevation of body iron level and increased risk of cancer occurrence and death. *Int J Cancer* 1994; **56/3**: 364-369.
- 330 Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 1992; **13/2**: 169-181.
- 331 Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990; **51/3**: 283-297.
- 332 Kretz-Remy C, Mehlen P, Mirault ME, Arrigo AP. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol* 1996; **133/5**: 1083-1093.
- 333 Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 2008; **44/2**: 126-131.
- 334 Ziegler DM. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 1985; **54**: 305-329.
- 335 Cartron PF, Hervouet E, Debien E, Olivier C, Pouliquen D, Menanteau J et al. Folate supplementation limits the tumorigenesis in rodent models of gliomagenesis. *Eur J Cancer* 2012; **48/15**: 2431-2441.

- 336 Nishiyama R, Qi L, Lacey M, Ehrlich M. Both hypomethylation and hypermethylation in a 0.2-kb region of a DNA repeat in cancer. *Mol Cancer Res* 2005; **3/11**: 617-626.
- 337 Zhao XM, Ren JJ, Du WH, Hao HS, Wang D, Liu Y et al. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on methylation of the putative imprinted control region of H19 during the in vitro development of vitrified bovine two-cell embryos. *Fertil Steril* 2012; **98/1**: 222-227.
- 338 Singh KP, Treas J, Tyagi T, Gao W. DNA demethylation by 5-aza-2-deoxycytidine treatment abrogates 17 beta-estradiol-induced cell growth and restores expression of DNA repair genes in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2012; **316/1**: 62-69.
- 339 Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck A, Foltzer-Jourdainne C, Boltze C, Hartig R et al. 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **312/2**: 525-536.
- 340 Hanada N, Takahata T, Zhou Q, Ye X, Sun R, Itoh J et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012; **12**: 66.
- 341 Ryan JL, Jones RJ, Kenney SC, Rivenbark AG, Tang W, Knight ER et al. Epstein-Barr virus-specific methylation of human genes in gastric cancer cells. *Infect Agent Cancer* 2010; **5**: 27.
- 342 Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, de HC, van der Woude CJ. IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2012; **33/10**: 1889-1896.
- 343 Jiang M, Xiang Y, Wang D, Gao J, Liu D, Liu Y et al. Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages. *Aging Cell* 2012; **11/1**: 29-40.

- 344 Kim H, Kirschenbaum LJ, Rosenthal I, Riesz P. Photosensitized formation of ascorbate radicals by riboflavin: an ESR study. *Photochem Photobiol* 1993; **57/5**: 777-784.
- 345 Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 1998; **43/5**: 601-606.
- 346 Chessex P, Harrison A, Khashu M, Lavoie JC. In preterm neonates, is the risk of developing bronchopulmonary dysplasia influenced by the failure to protect total parenteral nutrition from exposure to ambient light?. *J Pediatr* 2007; **151/2**: 213-214.
- 347 Miloudi K, Comte B, Rouleau T, Montoudis A, Levy E, Lavoie JC. The mode of administration of total parenteral nutrition and nature of lipid content influence the generation of peroxides and aldehydes. *Clin Nutr* 2012.
- 348 Samane S, Christon R, Dombrowski L, Turcotte S, Charrouf Z, Lavigne C et al. Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism* 2009; **58/7**: 909-919.
- 349 Barnard RJ, Faria DJ, Menges JE, Martin DA. Effects of a high-fat, sucrose diet on serum insulin and related atherosclerotic risk factors in rats. *Atherosclerosis* 1993; **100/2**: 229-236.
- 350 Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol (1985)* 1998; **84/4**: 1311-1315.
- 351 Hulman S, Falkner B. The effect of excess dietary sucrose on growth, blood pressure, and metabolism in developing Sprague-Dawley rats. *Pediatr Res* 1994; **36/1 Pt 1**: 95-101.

- 352 Cariou B, Hanf R, Lambert-Porcheron S, Zair Y, Sauvinet V, Noel B et al. Dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist GFT505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects. *Diabetes Care* 2013; **36/10**: 2923-2930.
- 353 Cariou B, Zair Y, Staels B, Bruckert E. Effects of the new dual PPAR alpha/delta agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 2011; **34/9**: 2008-2014.
- 354 Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005; **51/2**: 85-94.
- 355 McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; **85/2**: 571-633.
- 356 Delisle H. [Foetal programming of nutrition-related chronic diseases]. *Sante* 2002; **12/1**: 56-63.
- 357 Bruce KD, Cagampang FR. Epigenetic priming of the metabolic syndrome. *Toxicol Mech Methods* 2011; **21/4**: 353-361.
- 358 Champion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009; **10/4**: 383-392.
- 359 Fujiki K, Kano F, Shiota K, Murata M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biol* 2009; **7**: 38.

- 360 Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007; **97/3**: 435-439.
- 361 Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol* 2013; **231/3**: 290-300.
- 362 Zhao Q, Fan YC, Zhao J, Gao S, Zhao ZH, Wang K. DNA methylation patterns of peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene associated with liver fibrosis and inflammation in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2013; **20/6**: 430-437.
- 363 Mikael LG, Pancer J, Wu Q, Rozen R. Disturbed one-carbon metabolism causing adverse reproductive outcomes in mice is associated with altered expression of apolipoprotein AI and inflammatory mediators PPARalpha, interferon-gamma, and interleukin-10. *J Nutr* 2012; **142/3**: 411-418.
- 364 Zeng C, Xiao JH, Chang MJ, Wang JL. Beneficial effects of THSG on acetic acid-induced experimental colitis: involvement of upregulation of PPAR-gamma and inhibition of the Nf-Kappab inflammatory pathway. *Molecules* 2011; **16/10**: 8552-8568.
- 365 Casali CI, Weber K, Faggionato D, Gomez EM, Tome MC. Coordinate regulation between the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and cyclooxygenase-2 in renal epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2014; **90/4**: 432-439.
- 366 Kim TG, Lee YH, Bhattari G, Lee NH, Lee KW, Yi HK et al. PPARgamma inhibits inflammation and RANKL expression in epoxy resin-based sealer-induced osteoblast precursor cells E1 cells. *Arch Oral Biol* 2013; **58/1**: 28-34.

- 367 Mahmoud AM. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPARgamma and abrogation of oxidative stress and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 2014; 1-8.
- 368 Qiu Z, Zhou B, Jin L, Yu H, Liu L, Liu Y et al. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food Chem Toxicol* 2013; **59**: 428-437.
- 369 Cariou B, Zair Y, Staels B, Bruckert E. Effects of the new dual PPAR alpha/delta agonist GFT505 on lipid and glucose homeostasis in abdominally obese patients with combined dyslipidemia or impaired glucose metabolism. *Diabetes Care* 2011; **34/9**: 2008-2014.
- 370 Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2013; **58/6**: 1941-1952.
- 371 Quintero P, Arrese M. Nuclear control of inflammation and fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: therapeutic potential of dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonism. *Hepatology* 2013; **58/6**: 1881-1884.
- 372 Cariou B, Staels B. GFT505 for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis and type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* 2014; 1-8. ,
- 373 Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23/12**: 2203-2208.

- 374 Aljada A, Garg R, Ghanim H, Mohanty P, Hamouda W, Assian E et al. Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor-kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action?. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86/7**: 3250-3256.
- 375 Corrales F, Gimenez A, Alvarez L, Caballeria J, Pajares MA, Andreu H et al. S-adenosylmethionine treatment prevents carbon tetrachloride-induced S-adenosylmethionine synthetase inactivation and attenuates liver injury. *Hepatology* 1992; **16/4**: 1022-1027.
- 376 Pajares MA, Duran C, Corrales F, Pliego MM, Mato JM. Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *J Biol Chem* 1992; **267/25**: 17598-17605.
- 377 Corrales F, Ochoa P, Rivas C, Martin-Lomas M, Mato JM, Pajares MA. Inhibition of glutathione synthesis in the liver leads to S-adenosyl-L-methionine synthetase reduction. *Hepatology* 1991; **14/3**: 528-533.
- 378 Hitchler MJ, Domann FE. Redox regulation of the epigenetic landscape in cancer: a role for metabolic reprogramming in remodeling the epigenome. *Free Radic Biol Med* 2012; **53/11**: 2178-2187.
- 379 Yamada K, Gravel RA, Toraya T, Matthews RG. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103/25**: 9476-9481.
- 380 Elmore CL, Wu X, Leclerc D, Watson ED, Bottiglieri T, Krupenko NI et al. Metabolic derangement of methionine and folate metabolism in mice deficient in methionine synthase reductase. *Mol Genet Metab* 2007; **91/1**: 85-97.
- 381 Banerjee RV, Harder SR, Ragsdale SW, Matthews RG. Mechanism of reductive activation of cobalamin-dependent methionine synthase: an electron paramagnetic resonance spectroelectrochemical study. *Biochemistry* 1990; **29/5**: 1129-1135.

- 382 Prudova A, Bauman Z, Braun A, Vitvitsky V, Lu SC, Banerjee R. S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103/17**: 6489-6494.
- 383 Lertratanangkoon K, Savaraj N, Scimeca JM, Thomas ML. Glutathione depletion-induced thymidylate insufficiency for DNA repair synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234/2**: 470-475.
- 384 Lertratanangkoon K, Orkiszewski RS, Scimeca JM. Methyl-donor deficiency due to chemically induced glutathione depletion. *Cancer Res* 1996; **56/5**: 995-1005.
- 385 Weitzman SA, Turk PW, Milkowski DH, Kozlowski K. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91/4**: 1261-1264.
- 386 Turk PW, Laayoun A, Smith SS, Weitzman SA. DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* 1995; **16/5**: 1253-1255.
- 387 Gong Z, Zhu JK. Active DNA demethylation by oxidation and repair. *Cell Res* 2011; **21/12**: 1649-1651.
- 388 Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982; **10/8**: 2709-2721.
- 389 Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 2004; **32/14**: 4100-4108.

- 390 Nishiyama R, Qi L, Lacey M, Ehrlich M. Both hypomethylation and hypermethylation in a 0.2-kb region of a DNA repeat in cancer. *Mol Cancer Res* 2005; **3/11**: 617-626.
- 391 Cartron PF, Hervouet E, Debien E, Olivier C, Pouliquen D, Menanteau J et al. Folate supplementation limits the tumorigenesis in rodent models of gliomagenesis. *Eur J Cancer* 2012; **48/15**: 2431-2441.
- 392 Stritzke A, Turcot V, Rouleau T, Lavoie JC, Chessex P. Influence of Shielding Total Parenteral Nutrition From Photooxidation On The Number of Early Blood Transfusions In Extremely Low Birthweight Premature Neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012.
- 393 Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 1998; **43/5**: 601-606.
- 394 Miloudi K, Tsopmo A, Friel JK, Rouleau T, Comte B, Lavoie JC. Hexapeptides from human milk prevent the induction of oxidative stress from parenteral nutrition in the newborn guinea pig. *Pediatr Res* 2012; **71/6**: 675-681.

V ANNEXES

1. Liste des présentations

Yara S, Lavoie JC, Beaulieu, Delvin E, Amre D, Seidman E and Levy, *Changements épigénétiques des défenses antioxydantes au niveau des cellules intestinales*, 14^e réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Métabolisme et Nutrition, Québec, Mai 2013.

Yara S, Lavoie JC, Beaulieu, Delvin E, Amre D, Seidman E and Levy, *Le stress oxydant induit des changements epigenetiques des defenses antioxydantes et de l'inflammation au niveau des cellules intestinales*, XXVIII^{ème} Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, CHU Ste-Justine, Montréal, Mai 2013.

Sabrina Yara, Jean-Claude Lavoie, Carole Garofalo et Emile Levy, *Modifications épigénétiques des défenses antioxydantes dans le syndrome métabolique*, XXVII^{ème} Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, CHU Ste-Justine, Montréal, Mai 2012. **(Distinction)**

Ali Bendjoudi, Mounib Elchebly, Lea Emonnot, **Sabrina Yara**, Ehud Ziv, Nabil G. Seidah, Patrick Couture, Ernest G. Seidman, Emile Levy, *PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells*, Digestive Disease Week , San Diego, May 2012. **(Distinction)**

Jean-Claude Lavoie, Wesam Elremaly, **Sabrina Yara**, Emile Levy et Thérèse Rouleau, *Peroxides contaminating neonatal parenteral nutrition interfere with the metabolism of DNA methylation*, Thunder Bay, Ontario, may 2012.

Sabrina Yara, Wesam Elremaly, Thérèse Rouleau, Emile Levy et Jean-Claude Lavoie, *Inhibition de la DNA méthyltransférase hépatique par les peroxydes contenus dans les nutriments parentéraux néonatale*, Journée de la recherche du département nutrition, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2011. **(Distinction)**

Sabrina YARA, Rame Taha, Valérie Marcil, Jean-Francois Beaulieu, Francois Boudreau, Fernand-Pierre Gendron, Jean-Claude Lavoie, Ernie Seidman and Emile Levy, *Nrf2 silencing induces oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunctions in the intestine*, Society For Free Radical Biology and Medicine, 18th Annual Meeting, Atlanta, November 2011.

Sabrina Yara, Wesam Elremaly, Thérèse Rouleau, Emile Levy, and Jean-Claude Lavoie, *Inhibition of the hepatic DNA methyltransferase by peroxides contaminating the neonatal parenteral nutrition*, Society For Free Radical Biology and Medicine, 18th Annual Meeting, Atlanta, November 2011.

Sabrina YARA, Frédéric Bequet, *Quantification par μ SPE- μ LC-MS/MS de biomarqueurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes, cysteinyls leucotriènes, tryptophane, kynurenine,*

acide kynurenique), Congrès annuel des étudiants de SANOFI-AVENTIS, Toulouse, FRANCE, 2010.

Sabrina YARA, Frédéric Bequet, *Quantification par μ SPE- μ LC-MS/MS de biomarqueurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes, cysteinyls leucotriènes, tryptophane, kynurenine, acide kynurenique)*, Institut Pharmacologique de Biologie Structurale, Université Paul Sabatier, Toulouse, FRANCE, 2010.

Sabrina YARA, Yves Durocher, Olivier Henry, *Détermination du métabolisme des clones D9 et F5 par LC-MS/MS*, Institut de Recherche en Biotechnologie de Montréal, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, CANADA, 2009.

Sabrina YARA, Yves Durocher, Olivier Henry, *Métabolisme des clones D9 et F5 par LC-MS/MS*, Institut Pharmacologique de Biologie Structurale, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 2009.

2. Liste des bourses obtenues

- 2013 Bourse de fin d'études doctorales : 3^{ème} année dépôt avant la 4^{ème} année Faculté des Études Supérieures, (Université de Montréal)
- 2012 Bourse de formation octroyée par le département de Nutrition, Faculté de Médecine, (Université de Montréal)
- 2012 Bourse de doctorat octroyée par la Fondation des Étoiles du CHU Ste-Justine
- 2012 Prix présentation niveau doctorat, XXVIIème Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, CHU Ste-Justine, Montréal
- 2011 Prix «meilleure présentation de la journée niveau doctorat », journée de la recherche du département de Nutrition, Faculté de Médecine, (Université de Montréal)
- 2011 Prix «meilleure présentation niveau doctorat », journée de la recherche du département de Nutrition, Faculté de Médecine, (Université de Montréal)
- 2011-2012 Bourse de voyage octroyée par le département de Nutrition, Faculté de Médecine, (Université de Montréal)
- 2011-2012 Bourse de formation octroyée par le département de Nutrition, Faculté de Médecine, (Université de Montréal)
- 2010-2011 Bourse de formation octroyée par le département de Nutrition, Faculté de Médecine, (Université de Montréal)
- 2009-2010 Bourse de formation octroyée par le département de Nutrition, Faculté de Médecine, (Université de Montréal)

