

**Université de Montréal**

**Régulation épigénétique de la défense antioxydante et de l'Angiotensin-like 2 dans le  
contexte du vieillissement et des maladies cardiovasculaires**

**par Albert Nguyen**

**Département de pharmacologie  
Faculté de médecine**

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat en Pharmacologie

Avril 2016

© Albert Nguyen, 2016

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Régulation épigénétique de la défense antioxydante et de l'Angiopoietin-like 2 dans le  
contexte du vieillissement et des maladies cardiovasculaires**

Présentée par :  
Albert Nguyen

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr René Cardinal, président-rapporteur

Dr Eric Thorin, directeur de recherche

Dr Emile Levy, membre du jury

Dre Jacquetta Trasler, examinatrice externe

À être nommé(e) plus tard, représentant(e) du doyen de la FES

## RÉSUMÉ

Suite à l'exposition à des facteurs de risque incluant la malnutrition, la dyslipidémie, la sédentarité et les désordres métaboliques, les maladies cardiovasculaires (MCV) sont caractérisées par un état pro-oxydant et pro-inflammatoire, et une dérégulation de l'expression de divers facteurs responsables de l'homéostasie de l'environnement rédox et inflammatoire. L'implication d'enzymes antioxydantes telles que les superoxyde dismutases (SOD) et les glutathion peroxydases (Gpx), ainsi que la contribution de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'angiopoïétin-like 2 (Angptl2) ont été rapportées dans le cadre des MCV. Toutefois, les mécanismes moléculaires sensibles aux facteurs de risque et menant au développement des MCV sont peu connus. L'épigénétique est un mécanisme de régulation de l'expression génique sensible aux stimuli extracellulaires et pourrait donc contribuer au développement des MCV. La méthylation de l'ADN est un des mécanismes épigénétiques pouvant varier tant de manière gène-spécifique qu'à l'échelle génomique, et la conséquence de tels changements sur l'expression des gènes ciblés dépend du site de méthylation. Puisqu'il a été démontré que des variations au niveau de la méthylation de l'ADN peuvent être associées à divers contextes pathologiques incluant les MCV, le but de nos travaux était d'étudier le lien entre la méthylation de gènes antioxydants et pro-inflammatoires avec leurs répercussions fonctionnelles biologiques en présence de facteurs de risques associés aux MCV, tels que le vieillissement, la dyslipidémie et la sédentarité.

Dans la première étude, nous avons observé que dans l'artère fémorale de souris vieillissantes, la méthylation au niveau du promoteur du gène *Sod2*, codant pour l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase de type 2 (SOD2 ou MnSOD), diminue avec l'âge. Ceci serait associé à l'induction de l'expression de MnSOD, renforçant ainsi la défense antioxydante endogène. Le vieillissement étant associé à une accumulation de la production de radicaux libres, nous avons étudié la vasodilatation dépendante de l'endothélium qui est sensible au stress oxydant. Nous avons observé que la capacité vasodilatatrice globale a été maintenue chez les souris âgées, aux dépens d'une diminution des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) et d'une contribution accentuée de la voie du monoxyde d'azote (NO). Nous avons ensuite utilisé deux approches visant à réduire les niveaux de stress oxydant *in vivo*, soit la supplémentation avec un antioxydant, la catéchine, et l'exposition chronique à de l'exercice physique volontaire. Ces interventions ont permis de prévenir à la fois les changements au niveau de la fonction endothéliale

et de l'hypométhylation de *Sod2*. Cette première étude démontre donc la sensibilité de la méthylation de l'ADN à l'environnement rédox.

Dans la deuxième étude, nous avons démontré une régulation de l'expression de l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase 1 (*Gpx1*) en lien avec la méthylation de son gène codant, *Gpx1*, dans un contexte de dyslipidémie sévère. Nos résultats démontrent que dans le muscle squelettique de souris transgéniques sévèrement dyslipidémiques (*LDLr<sup>-/-</sup>*; *hApoB<sup>+/+</sup>*), *Gpx1* est hyperméthylé, ce qui diminue l'expression de *Gpx1* et affaiblit la défense antioxydante endogène. Chez ces souris, l'exercice physique chronique a permis d'augmenter l'expression de *Gpx1* en lien avec une hypométhylation transitoire de son gène. Cette étude démontre que le stress oxydant associé à la dyslipidémie sévère altère les mécanismes de défense antioxydante, en partie via un mécanisme épigénétique. De plus, on observe également que l'exercice physique permet de renverser ces effets et peut induire des changements épigénétiques, mais de manière transitoire.

La troisième étude avait pour but d'étudier la régulation de l'Angptl2, une protéine circulante pro-inflammatoire, dans le contexte des MCV. Nous avons observé que chez des patients coronariens, la concentration circulante d'Angptl2 est significativement plus élevée que chez des sujets sains et ce, en lien avec une hypométhylation de son gène, *ANGPTL2*, mesurée dans les leucocytes circulants. Nous sommes les premiers à démontrer qu'en réponse à l'environnement pro-inflammatoire associé à une MCV, l'expression de l'Angptl2 est stimulée par un mécanisme épigénétique.

Nos études ont permis d'identifier des nouvelles régions régulatrices différentiellement méthylées situées dans les gènes impliqués dans la défense antioxydante, soit *Sod2* en lien avec le vieillissement et *Gpx1* en lien avec la dyslipidémie et l'exercice. Nous avons également démontré un mécanisme de régulation de l'Angptl2 dépendant de la méthylation d'*ANGPTL2* et ce, pour la première fois dans un contexte de MCV. Ces observations illustrent la nature dynamique de la régulation épigénétique par la méthylation de l'ADN en réponse aux stimuli environnementaux. Nos études contribuent ainsi à la compréhension et l'identification de mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du phénotype pathologique suite à l'exposition aux facteurs de risque, ce qui ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques.

Mots clés : épigénétique, méthylation de l'ADN, antioxydants, dérivés réactifs de l'oxygène, exercice physique, Angiopoietin-like 2 (Angptl2), maladies cardiovasculaires

## ABSTRACT

Following exposure to risk factors including malnutrition, dyslipidemia, physical inactivity and metabolic disorders, cardiovascular diseases (CVD) are characterized by a pro-oxidative and pro-inflammatory state, and a dysregulation in the expression of various factors responsible for the redox and inflammatory environment homeostasis. The implication of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutases (SOD) and glutathione peroxidases (Gpx), as well as the contribution of pro-inflammatory mediators such as angiotensin-like 2 (Angptl2) are well characterized in the context of CVD. However, little is known about the molecular mechanisms sensitive to environmental cues leading to the development of CVD. Epigenetics are mechanisms regulating gene expression that are sensitive to extracellular stimuli and could therefore contribute to the pathogenesis of CVD. DNA methylation is an epigenetic mechanism that can vary both at gene and genomic levels; the consequence of these epigenetic changes on the expression of targeted genes is dependent on the methylation site. Since it has been reported that DNA methylation variations can be associated with diverse pathological conditions including CVD, the goal of our work was to study the link between the methylation of antioxidant and pro-inflammatory genes, and their consequences on biological functions in the context of risk factors associated with CVD, such as aging, dyslipidemia and physical inactivity.

In the first study, we observed that in the femoral artery of aging mice, the methylation at the promoter of the *Sod2* gene, which codes for the antioxidant enzyme superoxide dismutase, type 2 (SOD2 or MnSOD), decreases with age. This suggests an induction of MnSOD expression and thus a strengthening of the endogenous antioxidant defense. Since aging is associated with an accumulation of free radicals, we studied the endothelium-dependant vasodilation, known to be sensitive to oxidative stress. We observed that, overall, vasodilatory capacity was preserved in aging mice, due to a concomitant decrease in endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) and an increased contribution of the nitric oxide (NO) pathway. We then used two *in vivo* oxidative stress-reducing approaches, namely the supplementation with the antioxidant catechin and chronic exposure to voluntary physical exercise. These interventions prevented the changes in endothelial function and the *Sod2* hypomethylation-dependent induction of MnSOD expression. Hence, this first study demonstrates the sensitivity of DNA methylation to the redox environment.

In the second study, we demonstrated that the antioxidant enzyme glutathione peroxidase 1 (Gpx1) expression was regulated through the methylation of its coding gene, *Gpx1*, in the context of severe dyslipidemia. Our results show that in the skeletal muscle of severely dyslipidemic transgenic mice (LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup>), *Gpx1* is hypermethylated, which in turn decreased Gpx1 expression and weakened the endogenous antioxidant defense. In these mice, chronic physical exercise managed to increase Gpx1 expression, an effect linked with a transient gene hypomethylation. This study demonstrates that oxidative stress associated with severe dyslipidemia alters antioxidant defense mechanisms, partially through an epigenetic mechanism. Moreover, we also observed that physical exercise can revert these changes and can induce epigenetic changes, at least transiently.

The goal of the third project was to study Angptl2 regulation, a circulating pro-inflammatory protein, in the context of CVD. We observed that, in coronary patients, circulating Angptl2 concentration is significantly increased in conjunction with hypomethylation of its gene, *ANGPTL2*, measured in circulating leukocytes. We are the first to show that in response to the pro-inflammatory environment associated with a CVD, Angptl2 expression is stimulated by an epigenetic mechanism.

In conclusion, our studies allowed the identification of novel regulatory differentially methylated regions located in genes involved in antioxidant defense, namely *Sod2*, in the context of aging, and *Gpx1* in the context of dyslipidemia and exercise. We also revealed, for the first time, an Angptl2 regulating mechanism dependent on *ANGPTL2* methylation in a context of CVD. These observations illustrate the dynamic nature of epigenetic regulation through DNA methylation in response to environmental cues. Our studies therefore contribute to the understanding and identification of molecular mechanisms involved in the development of pathological phenotypes following exposure to risk factors, which opens the way to novel therapeutic strategies.

Keywords: epigenetics, DNA methylation, antioxidants, reactive oxygen species, physical exercise, Angiotensin-like 2 (Angptl2), cardiovascular diseases

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	i
ABSTRACT .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xvii
1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Les maladies cardiovasculaires.....	1
1.1.1 Environnement pro-oxydant associé aux MCV.....	3
1.1.1.1 Sources de stress oxydant .....	4
1.1.1.1.1 NADPH oxydase.....	5
1.1.1.1.1.1 Nox1 .....	7
1.1.1.1.1.2 Nox2.....	7
1.1.1.1.1.3 Nox4.....	9
1.1.1.1.1.4 Nox5.....	10
1.1.1.1.2 Découplage de eNOS.....	10
1.1.1.1.3 Chaîne respiratoire mitochondriale.....	12
1.1.1.2 Antioxydants enzymatiques endogènes .....	14
1.1.1.2.1 Superoxyde dismutase (SOD).....	14
1.1.1.2.2 Thiorédoxines (Trx).....	16
1.1.1.2.3 Peroxyrédoxine (Prx).....	17
1.1.1.2.4 Glutathion peroxydase (Gpx).....	18
1.1.1.2.5 Catalase .....	19
1.1.2 Environnement pro-inflammatoire associé aux MCV .....	22
1.1.2.1 Facteur nucléaire $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) .....	22

1.1.2.2	Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	25
1.1.2.3	Protéine C réactive (CRP).....	25
1.1.2.4	Angiopoietin-like 2 (Angptl2) .....	28
1.1.2.4.1	Rôles physiologiques de l'Angptl2 .....	29
1.1.2.4.2	Rôles pathologiques de l'Angptl2.....	31
1.1.2.4.2.1	Rôle de l'Angptl2 dans l'obésité et les maladies métaboliques associées .....	31
1.1.2.4.2.2	Rôle de l'Angptl2 dans le cancer .....	32
1.1.2.4.2.3	Rôle de l'Angptl2 dans les maladies cardiovasculaires .....	36
1.1.2.4.2.4	L'Angptl2, un biomarqueur? .....	39
1.1.3	La prévention primaire et secondaire des MCV par l'exercice physique .....	41
1.1.3.1	L'exercice physique dans les modèles animaux de MCV .....	42
1.1.3.2	Les bienfaits de l'activité physique sur la santé humaine.....	44
1.1.3.3	L'exercice physique comme approche thérapeutique.....	46
1.1.3.3.1	L'exercice physique : les paramètres à considérer .....	46
1.1.3.3.2	L'exercice physique améliore la fonction endothéliale .....	48
1.1.3.3.3	Les effets anti-inflammatoires de l'exercice physique .....	49
1.1.3.3.4	Les effets antioxydants de l'exercice physique .....	51
1.2	L'épigénétique des MCV .....	53
1.2.1	Définition de l'épigénétique .....	53
1.2.1.1	La modification post-traductionnelle des histones .....	54
1.2.1.1.1	L'acétylation des histones.....	55
1.2.1.1.2	La méthylation des histones.....	56
1.2.1.2	Les longs ARN non-codants .....	58
1.2.1.3	Méthylation de l'ADN .....	60
1.2.1.3.1	La déméthylation de l'ADN.....	63
1.2.1.3.2	La méthylation non-CpG de l'ADN .....	64
1.2.1.3.3	Fonctions biologiques de la méthylation de l'ADN .....	65



1.2.1.3.3.1 Méthylation entourant la région 5' du gène.....	66
1.2.1.3.3.2 Méthylation dans le corps du gène.....	68
1.2.1.3.4 Sensibilité de la méthylation de l'ADN à l'environnement.....	69
1.2.1.3.4.1 La méthylation de l'ADN et l'alimentation.....	70
1.2.1.3.4.2 La méthylation de l'ADN et l'exercice.....	72
1.2.1.3.5 Méthylation de l'ADN dans un contexte pathologique.....	74
1.2.1.3.5.1 La méthylation de l'ADN et le cancer.....	75
1.2.1.3.5.2 La méthylation de l'ADN et les MCV.....	76
1.2.1.3.6 L'hérédité des modifications épigénétiques.....	78
2. OBJECTIFS DES ÉTUDES.....	82
2.1 Mise en contexte.....	82
2.2 Étude 1.....	83
2.2.1 Hypothèse.....	83
2.2.2 Objectifs spécifiques.....	83
2.3 Étude 2.....	84
2.3.1 Hypothèse.....	84
2.3.2 Objectifs spécifiques.....	84
2.4 Étude 3.....	85
2.4.1 Hypothèse.....	85
2.4.2 Objectifs spécifiques.....	85
3. ARTICLES.....	86
3.1 Article 1.....	86
3.1.1 Apport original et contribution des coauteurs.....	86
3.2 Article 2.....	93
3.2.1 Apport original et contribution des coauteurs.....	93
3.3 Article 3.....	115
3.3.1 Apport original et contribution des coauteurs.....	115

4. DISCUSSION.....	133
4.1 Quelles sont les conséquences biologiques de la régulation épigénétique par la méthylation de l'ADN ?.....	136
4.2 Quel est le médiateur moléculaire pouvant déclencher une réponse épigénétique suite à une stimulation environnementale? .....	144
4.3 Les modifications épigénétiques en réponse aux stimuli environnementaux sont-elles stables ?.....	146
4.4 Quels sont les effets des stimuli environnementaux sur la régulation épigénétique de l' <i>ANGPTL2</i> ? .....	149
5. LIMITES DES ÉTUDES.....	154
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	157
RÉFÉRENCES .....	161

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Directives canadiennes en matière d'activité physique fournies par la Société canadienne de physiologie de l'exercice (SCPE). .....	41
<b>Tableau 2.</b> Changements observés sur la méthylation des gènes ciblés en réponse aux conditions expérimentales dans le cadre de nos études.....	136

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Fardeau économique des MCV. ....	2
<b>Figure 2.</b> Sous-unités de la NADPH oxydase. ....	6
<b>Figure 3.</b> Découplage de eNOS en présence de stress oxydant. ....	12
<b>Figure 4.</b> Neutralisation de l'anion superoxyde par les superoxyde dismutases (SOD) .....	14
<b>Figure 5.</b> Cascade redox du système thiorédoxine (Trx). ....	16
<b>Figure 6.</b> Réduction du peroxyde d'hydrogène par la peroxyrédoxine (Prx). ....	18
<b>Figure 7.</b> Réduction du peroxyde d'hydrogène par la glutathion peroxydase (Gpx).....	18
<b>Figure 8.</b> Réduction du peroxyde d'hydrogène par la catalase .....	20
<b>Figure 9.</b> Récapitulatif des réactions enzymatiques impliquées dans la production et le métabolisme des principaux dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans les maladies cardiovasculaires (MCV). ....	21
<b>Figure 10.</b> Activation du facteur nucléaire $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). ....	24
<b>Figure 11.</b> Signalisation de l'Angptl2 dans le cancer. ....	35
<b>Figure 12.</b> Signalisation de l'Angptl2 en lien avec les MCV. ....	38
<b>Figure 13.</b> Composition d'un nucléosome : 146 bp d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones avec une histone de liaison (H1) permettant de lier les nucléosomes entre eux. ....	54
<b>Figure 14.</b> Mécanisme d'action proposé de l'ARN long non codant (lncRNA; long non coding RNA) HOX Antisense Intergenic RNA (HOTAIR) impliqué dans la formation de tumeurs. ....	59
<b>Figure 15.</b> Modèle de la méthylation de l'ADN par les enzymes de novo et de maintenance par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT; DNA methyltransferase).....	62
<b>Figure 16.</b> Étapes de déméthylation active et passive.....	64
<b>Figure 17.</b> La méthylation du promoteur durant la maturation et la différenciation cellulaire dans a) le cadre physiologique du développement et b) dans le cadre pathologique du cancer. ....	68
<b>Figure 18.</b> Localisation des régions ciblées pour analyses de méthylation. ....	135
<b>Figure 19.</b> Impact fonctionnel de la déméthylation de Sod2 sur la fonction endothéliale.....	138
<b>Figure 20.</b> Impact de la déméthylation de l'ANGPTL2 sur l'exacerbation du phénotype inflammatoire.....	139
<b>Figure 21.</b> La fonction endothéliale est altérée chez les souris ATX. ....	142

<b>Figure 22.</b> L'implication partielle de Gpx1 dans la régulation du stress oxydant. ....	143
<b>Figure 23.</b> L'effet de l'exercice sur le profil inflammatoire et la méthylation de l'ANGPTL2 chez des patients coronariens. ....	152
<b>Figure 24.</b> Méthylation du gène ANGPTL2 au niveau des sites CpG5 et CpG6. ....	153

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-HNE: 4-Hydroxynonenal

5caC: 5-carboxylcytosine

5fC: 5-formylcytosine

5hmC: 5-hydroxymethylcytosine

5hmU: 5-hydroxymethyluracil

5mC: méthylcytosine sur le carbone en position 5

6mA: adénosine sur l'azote en position

ACS: syndrome coronarien aigu, *acute coronary syndrome*

AID/APOBEC: *activation-induced deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*

Ang II: angiotensine II

Angptl2: *angiopoietin-like 2*

AP-1: protéine activatrice-1, *activator protein-1*

APC: *adenomatous polyposis coli*

ApoE: apolipoprotéine E

ARNi: ARN interférent

AT1: récepteur à l'angiotensine de type 1

ATP: adénosine triphosphate

BDNF: facteur neurotrophique dérivé du cerveau, *brain-derived neurotrophic factor*

BER: mécanisme d'excision de base, *base excision repair*

BH<sub>2</sub>: dihydrobioptérine

BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine

CGD: granulomatose septique chronique, *chronic granulomatous disease*

CH<sub>3</sub>: groupement méthyle

CHST8: *carbohydrate sulfotransferase 8*

COX: cyclooxygénases

CpGi: îlots CpG

CR1: *cannabinoid receptor type 1*

CRP: protéine C réactive, *C-reactive protein*

CSH: cellules souches hématopoïétiques

CVD: *cardiovascular diseases*

DNMT: *DNA methyltransferase*

EDHF: facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium, *endothelium-derived hyperpolarizing factor*

eNOS: monoxyde d'azote synthase endothéliale, *endothelial nitric oxide synthase*

ER  $\alpha$ : récepteur à l'estrogène alpha

ET-1: endothéline-1

FDA: *Food and Drug Administration*

FMD: dilatation induite par le flux, *flow mediated dilation*

FTO: *fat mass and obesity associated*

GDP: guanosine diphosphate

Gpx: glutathion peroxydases

GR: glutathion réductase

GSH: glutathion réduite

GSSG: glutathion oxydé

GSTP1: Glutathion S-transferase Pi 1

GTP: guanosine triphosphate

H1: histone de liaison H1

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène

HAT: histone acetyltransférases

HDAC: histone déacétylases

HKMT: histone lysine méthyltransférases

HOMA: modèle d'homéostasie de la résistance à l'insuline, *homeostasis model assessment of insulin resistance*

HOTAIR: ARN anti-sens intergénique de HOX, *HOX Antisense Intergenic RNA*

hs-CRP: CRP-haute sensibilité, *high-sensitivity CRP*

HSVEC: cellules endothéliales humaines de la veine saphène, *human saphenous vein endothelial cells*

HUVEC: cellules endothéliales humaines de la veine du cordon ombilical, *human umbilical vein endothelial cells*

ICAM-1: molécules d'adhésion intercellulaires, *intercellular adhesion molecule*

IFN $\gamma$ : interféron- $\gamma$   
IGF2: facteur de croissance insulin-like 2, *insulin-like growth factor II*  
IKK: I $\kappa$ B $\alpha$  kinase  
IL: interleukine  
IMC: indice de masse corporelle  
INDO: indométacine  
ING: inhibiteurs de croissance, *inhibitor of growth*  
I $\kappa$ B $\alpha$ : inhibiteur de  $\kappa$ B  
K: Lysine  
LDL: lipoprotéines de basse densité  
LILRB2: *leukocyte immunoglobulin-like receptor B2*  
lncRNA: longs ARN non-codants, *long non-coding RNA*  
L-NNA: N-nitro-L-arginine  
LSD1: déméthylase spécifique à la lysine 1A, *lysine (K)-specific demethylase 1A*  
MAPK: MAP kinases, *mitogen-activated protein kinases*  
MBD: *methylated CpG binding proteins*  
MC4R: *melanocortin-4 receptor*  
MCV: maladies cardiovasculaires  
MDR1: *multidrug resistance protein 1*  
MeCP2 : *methyl CpG binding protein 2*  
MMP: métalloprotéinase  
MnSOD: superoxyde dismutase, manganèse  
NAC: N-acétylcystéine  
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphates  
NF- $\kappa$ B: facteur de transcription facteur nucléaire  $\kappa$ B, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
NO: monoxyde d'azote, *nitric oxide*  
Nox: NADPH oxydase  
NPY: neuropeptide Y  
Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor*  
O $_2^{\cdot-}$ : anion superoxyde



ONOO<sup>-</sup>: peroxyinitrite

PGC-1 $\alpha$ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PGI<sub>2</sub>: prostacycline

PIRB: *paired immunoglobulin-like receptor B*

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

PPAR: récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes, *peroxisome proliferator-activated receptor*

PRC: *polycomb repressive complex*

Prx: peroxyrédoxines

PTGS2: *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*

Rac1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RASSF1: *Ras association domain-containing protein 1*

ROS: dérivés réactifs de l'oxygène, *reactive oxygen species*

SAHA: acide suberanilohydroxamique

SAM: S-adenyl methionine

SCPE: Société canadienne de physiologie de l'exercice

SH2B1: *SH2 binding domain-containing protein 1*

sncRNA: petits ARN non-codants, *small non-coding RNA*

SOD: superoxyde dismutase

TBARS: substances réactives à l'acide thiobarbiturique, *Thiobarbituric acid reactive substances*

TDG: thymine glycosylase de l'ADN, *thymine DNA glycosylase*

TET: *Ten-eleven translocation*

TGF- $\beta$ : facteur de croissance transformant bêta, *transforming growth factor beta*

TLR: récepteurs de type Toll, Toll-like receptors

TNFR: récepteur du TNF

TNF- $\alpha$ : facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ , *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*

Trx: thiorédoxines

TrxR: thiorédoxine réductase

TSS: site d'initiation de la transcription, *transcription start site*

VCAM-1: molécules d'adhésion cellulaire vasculaires-1, *vascular cell adhesion molecule-1*

VEGF: facteur de croissance endothélial vasculaire, *vascular endothelial growth factor*

VO<sub>2</sub>max: indice de consommation d'oxygène maximale

## REMERCIEMENTS

Certains comparent le doctorat à une aventure, durant laquelle, on surmonte des obstacles et relève des défis, non sans quelques détours et petits pas de recul. Une fois proche de la fin, une fois plus sages et aguerris, on se retourne et jette un regard sur ce qu'on a traversé, fier de nos exploits et accomplissements. C'est également durant ce moment qu'on ne peut s'empêcher d'apprécier tous ceux et celles avec qui on a partagé ce parcours et on se rappelle comment grâce à eux, ce cheminement a été possible.

À Dr Cardinal, À Dr Levy et À Dre Trasler,

Je vous remercie, membres du jury, d'avoir accepté de réviser cette thèse. Je suis reconnaissant du temps que vous accordez à cette tâche, vos commentaires sont grandement appréciés.

À Eric,

J'ai encore du mal à concevoir que notre première rencontre remonte à octobre 2006, lorsque tu m'as accueilli dans le laboratoire. Ça paraît loin, mais pour tout ce que j'ai appris et comment j'ai grandi, ça en a valu grandement la peine. J'ai vite remarqué que ta porte était toujours ouverte, littéralement et figurativement, et tu n'as jamais ménagé les efforts pour nous pousser à réussir. J'ai grandement stimulé et développé mon esprit scientifique grâce à tes séances de *Guyton*, aux congrès auxquels tu nous as invités, aux réunions de labo un peu trop tôt le matin et j'en passe. Durant mes études, tu as été un mentor incroyable et je ne serai jamais assez reconnaissant pour ta générosité et ta confiance. Merci d'être embarqué dans cette aventure avec moi et surtout, d'avoir cru en moi. Merci pour tout.

À Nath,

En regardant mon mémoire de maîtrise, j'ai remarqué qu'à cette époque, étant encore tout jeune et beaucoup moins mature, j'ai utilisé les mots « maman de laboratoire » pour te décrire. À ce jour, je peux dire que ces mots sont toujours aussi appropriés. Bien honnêtement, je ne peux m'imaginer à quoi pourrait ressembler le labo sans toi. Tu as toujours été présente pour t'assurer que j'aie toutes les ressources nécessaires et j'ai toujours su que si j'avais besoin d'un coup de main, je n'avais même pas à demander. Tes qualités de pédagogue sont à la fois impressionnantes et inspirantes ; tu m'as toujours stimulé à intégrer mes connaissances et voir la *bigger picture*. Tu as été une personne indispensable dans ma réussite, tout comme celle de tant d'autres avant moi. Je ne suis certainement pas le dernier à te dire que tu vas beaucoup me manquer et je ne parle même pas des bons gâteaux que tu fais. Merci pour tout.

À Nada,

Bien honnêtement, j'attends le jour où tu vas nous dévoiler que tu as en réalité 3 sœurs jumelles ou encore des clones. J'ai toujours du mal à croire comment tu as pu gérer autant de choses dans ta vie avec autant d'assurance et surtout, de succès. En plus, tu trouvais quand même le temps de prendre des pauses avec moi avant de partir, pauses durant lesquelles j'avais un réel plaisir à discuter avec toi.

À François,

Tu es certainement une légende lorsqu'il est question d'organisation. Il arrive encore qu'on consulte tes cahiers de laboratoire pour facilement y trouver de l'information. Tu es un modèle à suivre et en quelque sorte, tu m'as motivé à mieux entretenir mes propres cahiers de lab. Merci aussi d'avoir été un bon public, tu étais une des rares personnes à réagir à mes plaisanteries.

À Virginie,

Ton assiduité au travail m'a toujours impressionné. On pourrait s'imaginer que tu étais une personne très sérieuse, mais je me rappelle plutôt de quelqu'un avec qui j'ai passé de bons moments à discuter de choses anodines et avec qui je partage quelques anecdotes lors de congrès.

À Nour,

Je t'ai connu comme étant une personne très débrouillarde et avec énormément de potentiel. Merci pour les bons moments partagés à l'intérieur comme à l'extérieur du contexte scientifique.

To Carol,

It's true that it's much quieter without you around. However, the food by the door also stays around longer. Thanks for all the fun stuff that sort of became traditions and even the few episodes of bickering. It was really entertaining to have you around; you were the little spark that would bring people together.

To Xiaoyan,

It was very uplifting to work with someone as sweet and kind as you. You were also very hard working and always ready to help. Thank you for always being thoughtful.

À Youri,

Les bons temps qu'on a passé ensemble et la découverte de points en commun me font regretter qu'on n'ait pas pu se côtoyer plus longtemps au travail. Dans un labo rempli de filles, j'ai bien apprécié la complicité qu'on a développé.

À Cécile,

Merci pour ta générosité, tu as souvent offert de l'aide dans le besoin (sans compter la belle écharpe). Tu es quelqu'un qui a un excellent esprit d'équipe et j'ai découvert en toi une manière de réfléchir semblable à la mienne. Bien que ça ne garantisse pas que l'on soit d'accord sur tout, ça permet des discussions fort enrichissantes.

À Adeline,

Grâce à ton sourire contagieux, ta présence au labo est très rafraîchissante. J'ai toujours apprécié nos conversations autour d'un « K-fée », car elles m'ont toujours permis de décrocher un peu du travail. Merci pour ta simplicité.

À Olivia,

J'ai bien apprécié travailler avec toi grâce à ta détermination. Regarder quelqu'un persévérer comme tu l'as fait démontre une belle force de caractère. Merci pour ta motivation. Merci également pour ton côté un peu plus fou. J'ignore ce qui me fait le plus rire entre tes grimaces et tes jeux de mots.

À Laurie,

Bien que nous n'avions travaillé que quelques mois ensemble, je peux déjà dire que tu t'intègres à merveille. Merci de ne pas être une personne bizarre.

Merci aux anciens étudiants du laboratoire Annick, Guillaume, Stéphanie et Marie-Eve, vous m'avez reçu au tout début et intégré au laboratoire.

Merci aux employés du Centre de Recherche de l'ICM qui ont permis l'avancement des divers projets. Merci à Maya et ton expertise moléculaire, tu as toujours été très gentille avec moi et toujours prête à m'accorder le temps qu'il fallait. J'ai énormément appris sous ta tutelle. Merci à Louis pour ton aide en microscopie. Merci à Steve, tu as été un élément essentiel lors du tout début. J'apprécie énormément l'aide technique que tu as apportée sur l'aspect génétique et également le temps que tu as consacré après les heures de travail.

Merci aux employés de l'animalerie Natacha et Robert pour la gestion des colonies de souris et des expériences à l'animalerie.

Merci aux différents collaborateurs, provenant du laboratoire de Dr Lettre et le personnel du centre EPIC pour votre contribution dans les différents projets.

Thanks to our friends from the 4th floor Sirirat, Yolanda and Eric, it was a pleasure to spend time with you, in the cafeteria or elsewhere.

Merci à ma famille, mes parents Anh Kha et Soya, et ma sœur Annie. Merci à ma copilote Patricia. Merci à mes amis dont j'ai la chance de dire qu'ils sont trop nombreux pour être nommés. Vos encouragements au quotidien m'ont toujours poussé à me dépasser. J'ai une chance inestimable d'avoir autant de support dans mon entourage.

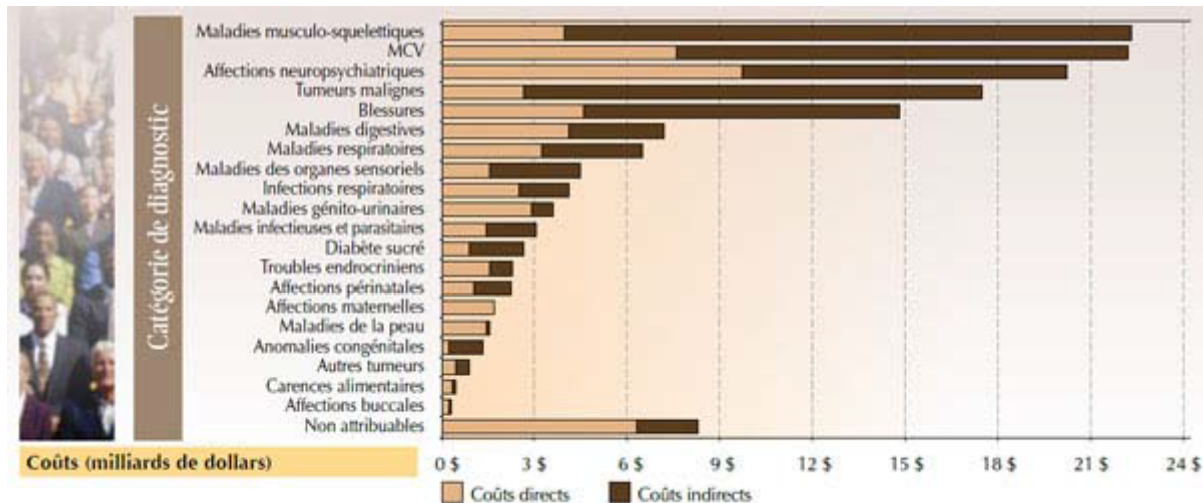
## **1. INTRODUCTION**

Cette section couvre les principaux sujets sur lesquels se basent nos travaux de recherche : les maladies cardiovasculaires (MCV) et les mécanismes moléculaires qui les caractérisent, l'exercice physique, avec une attention particulière de ses bienfaits sur la santé cardiovasculaire et son potentiel thérapeutique dans le cadre des MCV. La dernière partie est consacrée à l'épigénétique, les mécanismes moléculaires permettant la régulation de l'expression avec un intérêt particulier sur la méthylation de l'ADN, le sujet central de notre travail, et la sensibilité de ce mécanisme à des stimuli environnementaux tels que les MCV et l'exercice physique.

### **1.1 Les maladies cardiovasculaires**

Au Canada, les MCV représentent un lourd fardeau pour son système de santé : selon le plus récent bilan (2009) émis par l'agence de la santé publique du Canada, 1,6 millions de Canadiens souffriraient d'une MCV, soit 5% de la population âgée de 12 ans ou plus et 23% des personnes de 75 ans et plus. Cette estimation qualifiée de conservatrice va inévitablement s'aggraver avec une population vieillissante. Au niveau économique, les MCV ont une incidence majeure; en 2000, on lui attribuait des coûts de 22,2 milliards de dollars. Ceux-ci incluent les consultations chez le médecin (10% des consultations en 2007) ainsi que les hospitalisations (17% des cas d'hospitalisation en 2005-2006). Au 21<sup>e</sup> siècle, ce fardeau économique se classe au 2<sup>e</sup> rang à l'échelle nationale des coûts directs et indirects (Figure 1).





**Figure 1.** Fardeau économique des MCV. Pour l'année 2000, des coûts totalisant 22,2 milliards \$ placent les MCV au deuxième rang des maladies les plus coûteuses au Canada.

Réimprimé à partir du site web de l'Agence de la santé publique du Canada ([http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/cvd-mcv/mcv\\_femc-cvd\\_ebic-fra.php](http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/cvd-mcv/mcv_femc-cvd_ebic-fra.php))

Le terme de MCV englobe une variété de maladies distinctes qui se définissent par un éventail complexe de symptômes et de mécanismes parfois propres à chacune de ces pathologies. Celles-ci sont d'ailleurs classifiées en 6 catégories par Santé Canada : la cardiopathie ischémique, la maladie cérébrovasculaire, la maladie vasculaire périphérique, l'insuffisance cardiaque, la cardite rhumatismale et la cardiopathie congénitale. On parvient néanmoins à discerner des facteurs communs qui peuvent causer le développement des MCV ou du moins en augmenter le risque, en d'autres mots, les facteurs de risque. Ces facteurs de risque incluent l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'obésité, le diabète et l'inactivité physique (Lloyd-Jones *et al.* 2006). On constate donc que la plupart des MCV sont causées par des habitudes de vie néfastes à la santé cardiovasculaire ainsi que par des facteurs métaboliques et physiologiques. La causalité de ces facteurs de risque est confirmée par diverses études observationnelles qui démontrent que limiter l'exposition aux facteurs de risque sur une longue durée de plusieurs décennies permet de diminuer le risque de MCV jusqu'à 90% chez les hommes et 69% chez les femmes (Stamler *et al.* 1999; Lloyd-Jones *et al.* 2006).

Au-delà de la prévention, le traitement des MCV et la découverte de nouvelles avenues thérapeutiques nécessitent la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans le développement et le maintien des MCV, en ciblant les facteurs de risque par exemple. L'incidence de MCV peut être réduite par le ciblage pharmacologique de l'hypercholestérolémie (Gutierrez *et al.* 2012) et l'hypertension (Ogden *et al.* 2000). Une modification dans les habitudes de vie, telles qu'une meilleure alimentation (Dayton & Pearce 1969), l'arrêt de fumer (Critchley & Capewell 2003) et l'activité physique régulière (section 1.1.3), contribuent à réduire l'incidence des MCV.

Les MCV, définies par des dommages aux vaisseaux sanguins et au cœur, sont caractérisées par un état pro-inflammatoire et pro-oxydant (Siti *et al.* 2015). L'un active l'autre et cette synergie déclenche un cercle vicieux contribuant au développement initial des MCV et à leur progression (Touyz 2005; Hajjar & Gotto 2013; Ishibashi 2013). Un tel contexte conduit à la dysfonction endothéliale, un signe précurseur d'événements cardiovasculaires (Lerman & Zeiher 2005; Thorin & Thorin-Trescases 2009; Siti *et al.* 2015). Par la détection de marqueurs inflammatoires, des études épidémiologiques ont pu associer l'état inflammatoire chronique au risque de MCV (Vazzana *et al.* 2011). Les médiateurs inflammatoires sont initialement stimulés par le déséquilibre de la production de radicaux libres appelé stress oxydant. Ce stress peut être généré par divers tissus suite à l'exposition aux facteurs de risque. À titre d'exemple, un excès de gras peut surcharger le métabolisme mitochondrial des cellules adipeuses, causant un excès de production de radicaux libres. Le stress oxydant ainsi engendré active des facteurs de transcription pro-inflammatoires (Hajjar & Gotto 2013).

### ***1.1.1 Environnement pro-oxydant associé aux MCV***

Bien que la célèbre théorie sur le vieillissement impliquant les radicaux libres ait été proposée par Harman au milieu des années 1950 (Harman 1956), ce n'est qu'en 1985 que l'on fait mention de « stress oxydant » (Jones & Radi 2014). On parle de stress oxydant lorsqu'il y a un déséquilibre favorisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) aux dépens de leur élimination, ce qui endommage les protéines, les lipides, les hydrates de carbone et l'ADN (Montezano *et al.*

2015; Mohamed *et al.* 2016). D'ailleurs, les produits de la peroxydation lipidique, les F2-isoprostanes, peuvent être mesurés dans divers fluides biologiques et être utilisés comme biomarqueurs de maladies inflammatoires et reliées au stress oxydant (Basu 2010). Lorsque maintenus à des concentrations appropriées et bien ciblées, les ROS orchestrent une variété de mécanismes physiologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la régulation du tonus vasculaire et la réponse immunitaire et inflammatoire (Montezano *et al.* 2015). En contexte pathologique, on observe une production abondante de ROS excédant la capacité antioxydante endogène (Montezano *et al.* 2015) et pour bien comprendre le stress oxydant et son lien avec les MCV, il est important de définir les sources de ROS ainsi que la nature des mécanismes de défenses antioxydantes endogènes.

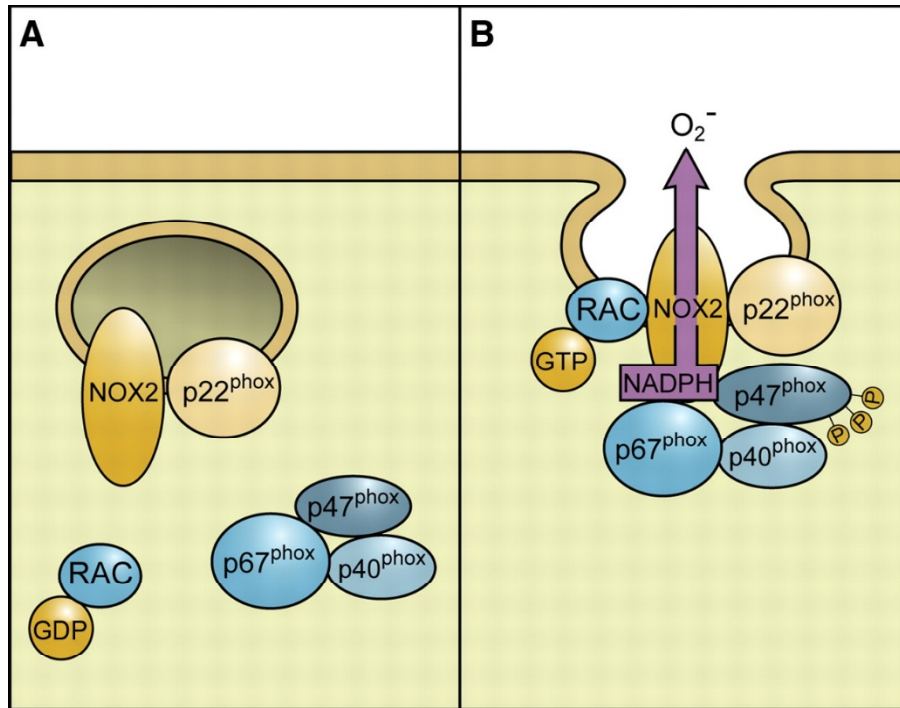
#### *1.1.1.1 Sources de stress oxydant*

Les ROS sont produits par le métabolisme cellulaire aérobie suite à la réduction d'une molécule d'oxygène. Ces molécules oxydantes sont produites par une variété d'enzymes telles que les nicotinamide adénine dinucléotide phosphates (NADPH; *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) oxydases (Nox) et la monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS; *endothelial nitric oxide synthase*), mais la principale source est la chaîne respiratoire mitochondriale (Chen *et al.* 2015; Indo *et al.* 2015). Les principaux ROS impliqués dans la biologie cardiovasculaire et les MCV sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'azote ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Montezano *et al.* 2015). Une fois que l'équilibre est rompu en faveur de la production et l'accumulation de radicaux libres, le stress oxydant généré peut conduire au développement des MCV. Des autres sources potentielles de stress oxydant, il faut noter certains métaux tels que le fer en présence d'ascorbate (Trudel *et al.* 2005; Yara *et al.* 2013). En effet, il a notamment été démontré que le complexe pro-oxydant fer-ascorbate cause une augmentation de la peroxydation lipidique accompagnée d'une perturbation de l'expression et de l'activité des enzymes anti-oxydantes Sod2 et Gpx2 dans une lignée de cellules d'adénocarcinome colorectal épithélial humain (Caco-2/15) (Yara *et al.* 2013). Certains éléments diététiques peuvent également induire du stress oxydant. Une étude clinique randomisée en double aveugle sur 60 sujets souffrant du syndrome métabolique a démontré que la supplémentation de l'isomère *n-7* de l'acide linoléique augmente la présence de marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation

comparativement à un mélange d'isomères ou un placebo (Riserus *et al.* 2002). De plus, il y est suggéré que le stress oxydant soit relié à une induction de la résistance à l'insuline et cette observation est d'autant plus importante considérant que cet acide gras soit retrouvé comme supplément alimentaire et dont l'un des deux isomères majeurs est l'isomère *t10c12* (Riserus *et al.* 2002).

#### 1.1.1.1.1 NADPH oxydase

Chez les mammifères, il existe 7 isoformes de NADPH oxydases: Nox1-5 et Duox1&2 (Konior *et al.* 2014). Ces enzymes ont d'abord été largement étudiées dans les cellules phagocytaires où elles génèrent les ROS nécessaires à l'élimination des organismes étrangers (Van Heerebeek *et al.* 2002). Les complexes membranaires formés par ces enzymes et leurs sous-unités (p22phox, p40phox, p47phox et p67phox) ont par la suite été détectées dans les cellules vasculaires (Van Heerebeek *et al.* 2002). Seules Nox1, Nox2, Nox4 et Nox5 sont exprimées dans les cellules vasculaires; les autres isoformes ne sont pas détectables ou exprimées à de très faibles niveaux (Konior *et al.* 2014), et elles ne seront pas discutées. Les mécanismes d'activation diffèrent également entre les quatre isoformes vasculaires : Nox1 et Nox2 nécessitent l'assemblage de sous-unités cytosoliques pour former un complexe protéique actif (Figure 2) (Bedard & Krause 2007), Nox4 est constitutivement active (Konior *et al.* 2014) et Nox5 est activée par une élévation intracellulaire de calcium (Banfi *et al.* 2001; Guzik *et al.* 2008). Chacune de ces isoformes et leurs contributions respectives au développement des MCV seront abordées dans les prochains paragraphes.



**Figure 2.** Sous-unités de la NADPH oxydase. (A) Nox2 est retrouvée dans la membrane de vésicules intracellulaires formant un complexe stabilisateur avec p22. (B) L'activation de Nox2 est initiée par la GTPase Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) suite à l'échange d'une molécule de guanosine diphosphate (GDP) pour une molécule de guanosine triphosphate (GTP). La phosphorylation de p47 lui permet de se lier à p22, et d'organiser le recrutement de la sous-unité modulatrice p40 et la sous-unité activatrice p67. Suite à la fusion de la vésicule à la membrane cellulaire, ce complexe enzymatique nouvellement formé libère du superoxyde à partir de la NADPH cytoplasmique dans l'espace extracellulaire.

Réimprimé de The American Physiological Society : Physiological Reviews, Bedard, K., Krause, KH., The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. 87(1):245-313, Copyright (2007).

#### 1.1.1.1.1.1 Nox1

Nox1 joue un rôle important dans la signalisation rédox à l'intérieur des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC, *vascular smooth muscle cell*); une étude sur des VSMC en culture a en effet démontré que l'expression de Nox1 est augmentée suite à une production de ROS induite par l'angiotensine II (Ang II) (Lassegue *et al.* 2001). De plus, l'inhibition de l'expression de Nox1 à l'aide d'un anti-sens abolit complètement la relâche initiale de ROS induite par Ang II (Lassegue *et al.* 2001). Conjointement à la production de ROS suite à la liaison à son récepteur, l'Ang II favorise le développement de l'hypertension, suggérant un rôle de Nox1 dans le développement de MCV en lien avec la production de radicaux libres et la signalisation induite par l'Ang II (Madamanchi *et al.* 2005). L'inhibition de la production de radicaux libres dans des modèles de souris permet de réduire à la fois l'hypertension et la production de radicaux libres dépendants de l'Ang II (Rey *et al.* 2001; Landmesser *et al.* 2002), confirmant ainsi le lien entre le stress oxydant et l'hypertension. De plus, l'expression de Nox1, conjointement à celle de Nox2, est augmentée dans l'aorte de rats hypertendus (Wind *et al.* 2010). Un des mécanismes responsables des effets délétères de Nox1 passe par le découplage de eNOS (section 1.1.1.1.2), ce qui altère la fonction de l'enzyme responsable de la production du NO. En effet, lorsque des souris transgéniques sur-exprimant Nox1 dans leurs cellules musculaires lisses ont été chroniquement traitées avec de l'Ang II pour induire une hypertension, on observe une production de ROS et une dysfonction endothéliale accrues en lien avec un découplage de eNOS et une perte dans la biodisponibilité du NO au niveau de l'aorte, comparativement à des souris non-transgéniques soumises aux mêmes conditions (Dikalova *et al.* 2010). Ces études démontrent que le stress oxydant, engendré par les radicaux libres produits par Nox1, contribue au développement de l'hypertension.

#### 1.1.1.1.1.2 Nox2

Selon certaines études, l'implication précoce de Nox2 dans la production de ROS contribuant au développement initial des MCV n'est pas clairement définie et semble être limitée. En effet, il a été montré que l'état inflammatoire induit par une angioplastie carotidienne chez le rat se traduit par l'induction de l'expression de Nox2 seulement 7 jours après la procédure, alors que l'expression de Nox1 est augmentée de 2,7 fois après 3 jours (Szocs *et al.* 2002), démontrant que Nox2 ne serait pas impliquée dans la réponse initiale à ce type de stress. Dans le modèle de souris

transgéniques pro-athérosclérotiques déficientes en apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) soumises à une alimentation riche en gras, l'expression de Nox2 et la production de ROS augmentent dans l'endothélium de l'aorte, avant même l'apparition de lésions (Judkins *et al.* 2010). Ceci suggère à première vue que Nox2 serait impliquée dans la phase précoce du développement de l'athérosclérose. Cependant, cette même étude démontre que les souris double-*knockout* (KO) pour Nox2 et ApoE ne semblent pas être totalement protégées contre le développement initial de la plaque, bien qu'elles aient une plus faible surface de lésion, moins de ROS et une meilleure biodisponibilité du NO au niveau de l'aorte comparativement aux souris ApoE<sup>-/-</sup> (Judkins *et al.* 2010). Ainsi, Nox2 serait impliquée, sans toutefois être nécessaire au développement initial de l'athérosclérose. Toujours dans les souris ApoE<sup>-/-</sup>, la surexpression localisée de Nox2 dans les cellules endothéliales induit des marqueurs classiques d'un environnement pro-athérosclérotique, soit une production accrue de ROS et un recrutement plus important de macrophages (Madamanchi *et al.* 2005). Malgré tout, cette surexpression de Nox2 dans les cellules endothéliales de souris ApoE<sup>-/-</sup> n'a aucun effet dans l'initiation ou la progression de l'athérosclérose, puisque les lésions dans l'aorte sont similaires à celles observées dans des souris uniquement ApoE<sup>-/-</sup> (Douglas *et al.* 2012). Une autre étude n'a pu démontrer de différences dans les lésions athérosclérotiques au niveau du sinus aortique entre des souris déficientes en Nox2 et des souris de type sauvage ou encore entre des Nox2/ApoE double-KO et des ApoE KO (Kirk *et al.* 2000). Un modèle de la délétion de Nox2 existe chez l'humain : la cause la plus répandue de granulomatose septique chronique (CGD; *chronic granulomatous disease*), une maladie touchant le système immunitaire, est une mutation dans le gène de Nox2. Dans le système vasculaire de ces patients, on observe une meilleure fonction endothéliale associée à une diminution de marqueurs de stress oxydant (Violi *et al.* 2009) ainsi qu'une réduction des marqueurs de l'athérosclérose (Violi *et al.* 2013), ce qui suggère que Nox2 contribue à l'athérosclérose en général. L'ensemble de ses études démontre que la production de ROS dépendante de Nox2 aurait un rôle limité durant le stade précoce de l'athérosclérose, mais que Nox2 pourrait également contribuer au développement à long terme de la maladie.

#### 1.1.1.1.1.3 Nox4

La contribution de Nox4 dans les MCV est controversée puisque son expression n'est pas toujours augmentée en contexte pathologique et lorsque c'est le cas, il n'est pas clairement établi si l'induction de Nox4 conduit au développement des MCV. Dans les artères, particulièrement au niveau des embranchements, la présence d'un flux sanguin turbulent induit la production de stress oxydant vasculaire et favoriserait ainsi la formation de plaque athérosclérotiques (Hwang *et al.* 2003). Dans les cellules endothéliales, Nox4 semble être sensible aux perturbations du flux sanguin dans les régions propices au développement de lésions athérosclérotiques (Hwang *et al.* 2003). En effet, dans des cellules endothéliales aortiques en culture exposées à un flux turbulent, la production de superoxyde et l'expression de Nox2 et Nox4 ont augmenté de 2,9 et 3,9 fois respectivement (Hwang *et al.* 2003). À l'opposé, un flux pulsatile a diminué la production de ROS et l'expression de Nox2 et Nox4 de 1,8 et 3 fois, respectivement (Hwang *et al.* 2003). Cependant, cette étude ne démontre pas un lien direct entre Nox4 et l'athérosclérose. De même, aucune différence dans l'expression de Nox4 n'a été détectée dans l'aorte provenant de souris pro-athérosclérotiques ApoE<sup>-/-</sup>, alors que Nox2 est sur-exprimée (Judkins *et al.* 2010). L'expression de Nox4 ne varie également pas dans l'aorte de rats hypertendus alors que celle de Nox1 et Nox2 augmente (Wind *et al.* 2010). À l'opposé du rôle délétère potentiel de Nox1 et Nox2, de plus en plus d'études suggèrent que Nox4 pourrait avoir un rôle protecteur de la fonction vasculaire (Brandes *et al.* 2011). En effet, la surexpression de Nox4 dans l'endothélium de souris augmente la vasodilatation dépendante de l'endothélium et favorise la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans affecter la biodisponibilité du NO (Ray *et al.* 2011). Ces souris transgéniques ont également une pression systémique inférieure aux souris contrôles (Ray *et al.* 2011). À l'opposé, les souris n'exprimant pas Nox4 (Nox4<sup>-/-</sup>) sont plus vulnérables aux effets des ROS engendrés par l'Ang II; l'aorte de ces souris Nox4<sup>-/-</sup> présente plus d'inflammation et de dysfonction endothéliale, en lien avec une diminution de l'expression de eNOS et de la production de NO (Schroder *et al.* 2012). Il faut cependant éviter de généraliser les vertus de Nox4, puisqu'une étude a démontré les effets délétères d'un stress oxydant généré par Nox4 au niveau du cerveau suite à un accident vasculaire cérébral, proposant même l'inhibition de Nox4 comme une avenue thérapeutique potentielle (Kleinschnitz *et al.* 2010). Le rôle de Nox4 dans les MCV est donc très variable selon les études.



#### 1.1.1.1.4 Nox5

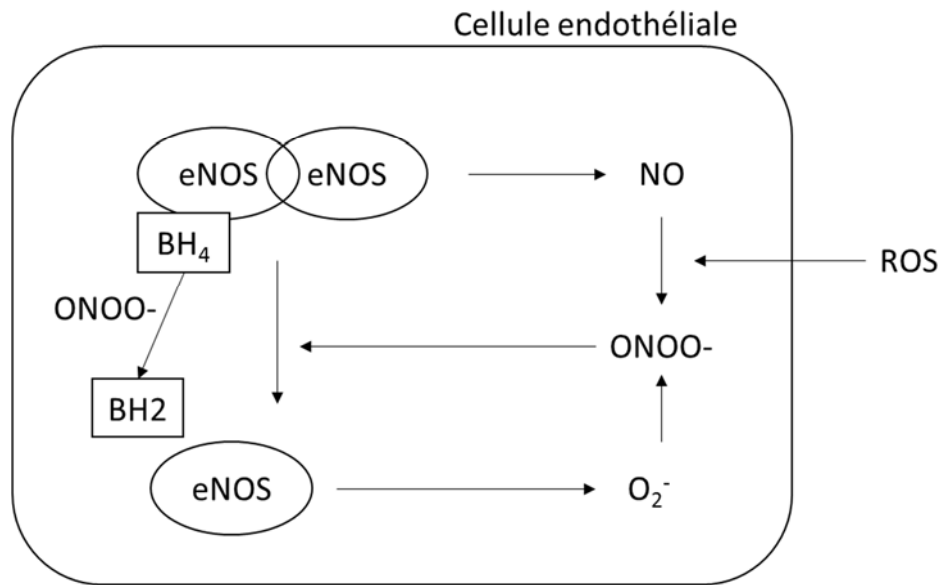
Nox5 est exprimée chez l'humain, notamment au niveau des cellules endothéliales (BelAiba *et al.* 2007). Nox5 n'est cependant pas exprimée chez les rongeurs ce qui limite les études à son sujet (Takac *et al.* 2012). Une étude sur des artères coronaires isolées chez des patients à la suite d'une transplantation cardiaque a comparé les niveaux d'expression de Nox5 entre des patients coronariens et des patients non-coronariens souffrant de cardiomyopathie d'origine extrinsèque ou intrinsèque (Guzik *et al.* 2008). Les patients coronariens ont été diagnostiqués comme tels s'il y avait un historique d'infarctus du myocarde ou d'angiographie coronaire. Les résultats démontrent que dans les artères provenant de patients coronariens, l'expression de Nox5 est augmentée en parallèle avec une production 7 fois supérieure de ROS (Guzik *et al.* 2008). Cette étude ne permet pas de dire si Nox5 contribue à la maladie coronarienne ou si c'est la maladie qui induit l'expression de Nox5.

#### 1.1.1.1.2 Découplage de eNOS

Un excès de ROS exerce des effets délétères sur le réseau sanguin et conduit à la dysfonction endothéliale, un signe précurseur des MCV (Chen *et al.* 2015). Le maintien de la fonction endothéliale dépend largement du NO. Parmi les mécanismes permettant de conserver l'homéostasie vasculaire, le NO joue un rôle prépondérant puisque c'est principalement un agent vasodilatateur (Furchgott & Zawadzki 1980) en plus d'avoir des propriétés antioxydantes (Hogg *et al.* 1993) et antiagrégantes (Khan *et al.* 1996). La signalisation du NO est une des principales voies affectées par le stress oxydant dans les vaisseaux, avec une perte de la biodisponibilité du NO via sa conversion en peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) par l'anion superoxyde (Beckman *et al.* 1990). En ce sens, eNOS est aussi considérée comme un générateur de radicaux libres par sa production de NO et, indirectement, de ONOO<sup>-</sup> (Figure 3).

En situation de stress oxydant, l'expression de la eNOS est parfois paradoxalement augmentée, mais elle est sous une forme découplée (Rochette *et al.* 2013). La principale cause du découplage de eNOS est la perte de son cofacteur BH<sub>4</sub> (tétrahydrobioptérine), soit par l'oxydation de ce dernier par l'anion superoxyde ou par l'interruption de la voie du recyclage du BH<sub>4</sub> (Alp & Channon 2004; Roe & Ren 2012). Le peroxynitrite peut également directement causer le découplage de eNOS

(Zou *et al.* 2002) et oxyder le BH<sub>4</sub> (Roe & Ren 2012). À l'état découplé, eNOS produit du superoxide (Rochette *et al.* 2013). Plusieurs études ont observé un découplage de eNOS dans l'aorte de souris athérosclérotiques ApoE<sup>-/-</sup> associé à une dysfonction endothéliale (Alp *et al.* 2004; Wohlfart *et al.* 2008; Xia *et al.* 2010). Chez l'humain, l'amélioration de la fonction endothéliale en réponse à un traitement au BH<sub>4</sub> indique la présence potentielle d'un découplage de eNOS dans diverses conditions pathologiques telles que l'hypercholestérolémie (Stroes *et al.* 1997), le diabète de type II (Heitzer *et al.* 2000) et les MCV (Maier *et al.* 2000), ainsi que chez des fumeurs (Ueda *et al.* 2000). Dans un contexte pro-oxydant, le découplage de eNOS est donc associé aux MCV.



**Figure 3.** Découplage de eNOS en présence de stress oxydant. À l'état normal, eNOS sous forme de dimère produit du NO en présence du cofacteur BH<sub>4</sub>. La perte de NO par sa conversion en ONOO<sup>-</sup> par les ROS favorise le découplage des dimères de eNOS en formes monomériques. ONOO<sup>-</sup> transforme également le cofacteur BH<sub>4</sub> en BH<sub>2</sub>, forme inutilisable dans la formation du NO par eNOS. La forme découplée de eNOS produit davantage de ROS, ce qui contribue à diminuer de nouveau la biodisponibilité du NO. eNOS, monoxyde d'azote synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*); BH<sub>4</sub>, tétrahydrobioptérine; NO, monoxyde d'azote; ONOO<sup>-</sup>, peroxydinitrite; ROS, dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*), BH<sub>2</sub>, dihydrobioptérine.

Adapté avec la permission de Wolters Kluwer Health, Inc. : ATVB, Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A, Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. 25(8):1551-7, Copyright (2005).

### 1.1.1.1.3 Chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie produit de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) par le processus de phosphorylation oxydative. Brièvement, la phosphorylation oxydative consiste au transfert d'électrons de donneurs d'électrons vers des accepteurs d'électrons. Ces réactions génèrent de

l'énergie qui est ensuite utilisée pour produire de l'ATP et sont engendrées par une série de complexes protéiques situés dans la membrane interne de la mitochondrie, complexes formant la chaîne respiratoire de transport d'électrons (complexe I à V) (DiMauro & Schon 2003). Il arrive que certains électrons s'échappent prématurément à différentes étapes de cette chaîne, ce que l'on nomme la fuite d'électrons. Ces derniers produisent alors du stress oxydant sous forme de superoxyde suite à la réaction avec l'oxygène (Boveris 1984; Doroshov & Davies 1986). Bien que la concentration de superoxyde dans la matrice mitochondriale soit de 5 à 10 fois supérieure à la concentration cytosolique ou nucléaire (Mikhed *et al.* 2015), la production de superoxyde (autrement dit, la fuite d'électrons) par la chaîne respiratoire n'équivaut qu'à 1% du transport d'électrons (Raha & Robinson 2000), illustrant l'efficacité de ce système. La mitochondrie possède également un réseau efficace d'enzymes antioxydantes permettant de neutraliser les ROS produits, d'abord par la conversion du superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les superoxide dismutases, suivie par la conversion du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau par la glutathion peroxydase (Raha & Robinson 2000). Un défaut dans cette régulation cause une accumulation de dommages dans l'ADN mitochondrial et une dysfonction de la mitochondrie favorisant une plus grande production de ROS, tel qu'observé lors du vieillissement (Mikhed *et al.* 2015). En utilisant des modèles de souris transgéniques prédisposées à des dysfonctions mitochondriales, une équipe de chercheurs a démontré une corrélation entre le niveau de stress oxydant mitochondrial et la dysfonction endothéliale dans le cadre du vieillissement (Wenzel *et al.* 2008). Un désordre dans la machinerie mitochondriale peut également engendrer des problèmes dans la fonction cardiaque, compte tenu du fait que le cœur est l'organe consommant le plus d'oxygène au repos, reflétant la forte demande du métabolisme énergétique (Schwarz *et al.* 2014). Dans le cœur, un excès dans la production de ROS induit des cascades signalétiques, dont les voies MAP kinases (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*), conduisant à l'hypertrophie, ce qui entraîne la défaillance cardiaque (Giordano 2005). Une étude a voulu illustrer la pertinence physiologique du stress oxydant mitochondrial en établissant un lien entre la durée de vie maximale d'une espèce animale et le niveau de stress oxydant mitochondrial; les animaux vivant le moins longtemps (souris, rats) ont un marquage de dommage oxydant mitochondrial plus élevé au niveau du cœur et du cerveau que ceux avec une plus grande longévité (chevaux, vaches, cochons) (Barja & Herrero 2000). La régulation des radicaux libres générés par la mitochondrie semble donc dépendante d'une variété d'enzymes antioxydantes. Comment une dérégulation dans ces défenses antioxydantes peut-elle être liée au développement des MCV?

### 1.1.1.2 Antioxydants enzymatiques endogènes

#### 1.1.1.2.1 Superoxyde dismutase (SOD)

Les enzymes superoxyde dismutases (SOD) agissent comme la première ligne de défense contre les actions délétères de l'anion superoxyde, principalement en empêchant la formation de ONOO<sup>-</sup> à partir du NO (Thomson *et al.* 1995; Fukai & Ushio-Fukai 2011) (Figure 4).



**Figure 4.** Neutralisation de l'anion superoxyde par les superoxyde dismutases (SOD)

Dans les cellules de mammifères, on a identifié 3 types de SOD : CuZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2) et ECSOD (SOD3), contenant dans leur site actif du zinc et du cuivre dans le cas des SOD1 et SOD3 et du manganèse pour la SOD2 (Indo *et al.* 2015). CuZnSOD est principalement localisée dans le cytosol, mais peut également être retrouvée dans l'espace inter-membranaire des mitochondries (Okado-Matsumoto & Fridovich 2001). Lorsque déficientes en SOD1, les souris développent un phénotype de vieillissement accéléré (Kostrominova 2010). L'identification de mutations dans le gène SOD1 chez l'humain a permis l'établissement d'un lien avec les maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique (Oladzad Abbasabadi *et al.* 2013) et la maladie d'Alzheimer (Spisak *et al.* 2014). L'importance de CuZnSOD dans la régulation du tonus vasculaire a été mise en évidence chez des souris transgéniques; tout d'abord, la surexpression de SOD1 prévient l'augmentation de la pression systolique, réduit la production de superoxyde et prévient la perte de NO induits par une infusion d'Ang II (Wang *et al.* 2002). À l'inverse, une répression du gène SOD1 chez la souris induit une augmentation du superoxyde au niveau vasculaire accompagnée d'une dysfonction endothéliale (Didion *et al.* 2002). L'implication des SOD dans la régulation du tonus vasculaire illustre leur importance dans le développement des MCV lorsqu'il y a un dysfonctionnement à ce niveau.

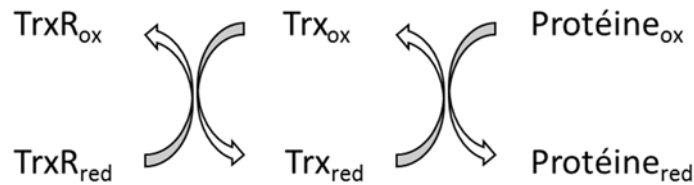
MnSOD est localisée dans la mitochondrie où elle joue un rôle vital dans le maintien de la fonction mitochondriale. En effet, contrairement aux deux autres SOD, une délétion complète du gène SOD2 induit la mort des souris dans le mois suivant leur naissance (Jang & Van Remmen 2009). À l'inverse, un groupe de chercheurs a réussi à prolonger la durée de vie de souris en sur-exprimant la forme humaine du gène SOD2 (Hu *et al.* 2007). Cependant, ces effets n'ont pu être reproduits par d'autres groupes de chercheurs: Pérez et al. ont démontré que la surexpression de SOD2 en combinaison avec SOD1 ne prolonge pas la survie des souris (Perez *et al.* 2009). Néanmoins selon une autre équipe de chercheurs, en dépit d'une absence d'effets sur la survie, une diminution de la production de superoxyde chez les souris transgéniques SOD2<sup>+/+</sup> a tout de même été observée (Jang *et al.* 2009; Jang & Van Remmen 2009), suggérant un rôle de la MnSOD dans le contrôle du stress oxydant avec l'âge, mais que notre compréhension de l'implication de ROS dans le vieillissement est limitée. Dans les stades précoces du cancer, tel que le cancer des ovaires et dans certaines formes de leucémie, les niveaux de MnSOD sont sur-exprimés dans le tissu affecté pour tenter de contrer les dommages induits par les niveaux croissants de stress oxydant; à mesure que ceux-ci s'accumulent et que le cancer progresse, l'expression de MnSOD continue d'augmenter (Miao & St Clair 2009). La surexpression de MnSOD en lien avec le cancer a notamment été confirmée dans une étude sur le cancer ovarien (Hu *et al.* 2005); l'expression protéique de MnSOD est plus élevée dans des cellules cancéreuses comparativement à des cellules saines, alors que l'inhibition de l'expression de MnSOD augmente la production de superoxyde et favorise un phénotype prolifératif des cellules cancéreuses (Hu *et al.* 2005). En lien avec les MCV, la délétion partielle du gène de MnSOD (SOD2<sup>+/-</sup>) dans un modèle de souris transgénique pro-athérosclérotique (ApoE<sup>-/-</sup>) augmente le nombre de lésions athérosclérotiques au niveau de l'aorte suite à une alimentation riche en gras (Ballinger *et al.* 2002). Une autre étude chez la souris a également démontré le rôle protecteur de MnSOD dans la pathogénèse de l'athérosclérose: le génotype SOD2<sup>+/-</sup>, supprimant partiellement l'expression de SOD2, favorise l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et l'apoptose induite par les LDL oxydés (Guo *et al.* 2001). Ces deux études illustrent l'importance de MnSOD dans la défense antioxydante en démontrant qu'une diminution de son expression favorise le développement du phénotype athérosclérotique.

ECSOD est sécrétée dans l'espace extracellulaire, majoritairement (90-99%) liée aux tissus ou sous forme circulante (Marklund 1984). Une étude sur 9 188 participants du *Copenhagen City*

*Heart Study* dévoile que la présence d'une mutation (EC-SOD-R213G) hétérozygote dans le gène d'ECSOD est associée avec un plus haut risque de maladie ischémique cardiaque (Juul *et al.* 2004). Bien que les porteurs de cette mutation aient un taux circulant d'ECSOD 9 fois supérieur, les auteurs de cette étude proposent que ceci limite la localisation de l'enzyme au niveau de la paroi vasculaire, ce qui diminuerait les capacités antioxydantes de manière localisée et favoriserait l'oxydation lipidique et donc l'athérogénèse (Juul *et al.* 2004). Par ailleurs, une étude a démontré que chez des individus ayant souffert d'un infarctus du myocarde, la concentration plasmatique d'ECSOD était d'environ 30% inférieure, suggérant un rôle cardioprotecteur pour la forme circulante de cette enzyme (Wang *et al.* 1998). En lien avec ces études, un des mécanismes à l'origine des capacités cardioprotectrices d'ECSOD serait une meilleure biodisponibilité du NO vasculaire, puisque chez des souris n'exprimant pas le gène de cette enzyme, on observe une augmentation du superoxyde couplée à une diminution du NO (Lob *et al.* 2011).

#### 1.1.1.2.2 Thiorédoxines (Trx)

Deux formes de thiorédoxines (Trx) ont été identifiées chez l'humain : Trx1 est cytosolique et Trx2 est mitochondriale (Cunningham *et al.* 2015). Trx participe au maintien de la balance rédox cellulaire principalement par son action sur les protéines. En effet, Trx se lie aux protéines oxydées par les ROS et les réduit. Cette réaction dépend d'une cascade d'événements rédox impliquant une autre enzyme, la thiorédoxine réductase (TrxR) (Lee *et al.* 2013) (Figure 5). Les peroxyrédoxines (Prx) font partie des protéines réduites par le système Trx (Rhee *et al.* 2005).



**Figure 5.** Cascade redox du système thiorédoxine (Trx). La thiorédoxine réductase (TrxR) est responsable de la production de la forme réduite et active de la thiorédoxine ( $\text{Trx}_{\text{red}}$ ). Trx réduit à son tour une protéine cible oxydée.

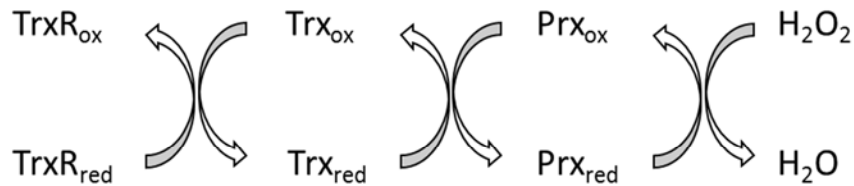
En réponse à un stress oxydant généré, par exemple, par l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'expression de Trx1 est stimulée pour protéger la cellule contre les dommages oxydants (Kondo *et al.* 2004). Dans le cas de diverses MCV, on observe ainsi une augmentation de Trx1 dans le plasma de patients souffrant d'infarctus du myocarde (Miyamoto *et al.* 2003), d'angine instable (Hokamaki *et al.* 2005), de défaillance cardiaque (Jekell *et al.* 2004) et d'athérosclérose (Madrigal-Matute *et al.* 2015). Concernant la forme mitochondriale, Trx2 est essentielle dans la protection contre les ROS dérivées de la mitochondrie (Yoshida *et al.* 2003). L'ampleur de cette protection a été illustrée par la génération de modèles de souris transgéniques déficientes (Trx2<sup>-/-</sup>) ou partiellement déficientes (Trx2<sup>+/-</sup>) en Trx2. Les souris Trx2<sup>-/-</sup> ne sont pas viables et meurent à l'état embryonnaire (Jang & Van Remmen 2009). La délétion partielle Trx2<sup>+/-</sup> est accompagnée d'une perte de fonction mitochondriale, illustrée par une diminution de la production d'ATP et une augmentation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces défauts entraînent des dommages oxydants au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN (Perez *et al.* 2008).

#### 1.1.1.2.3 Peroxyrédoxine (Prx)

Il existe 6 peroxyrédoxines dans les cellules de mammifères portant la nomenclature Prx1 à 6 (Wood *et al.* 2003). Ces enzymes possèdent la capacité de réduire à la fois le peroxy-nitrite (Hattori *et al.* 2003; Peng *et al.* 2004) et le peroxyde d'hydrogène (Jin *et al.* 1997; Kang *et al.* 1998). L'activité réductrice de Prx dépend d'une cascade enzymatique impliquant le transfert d'hydrogène de la part de Trx (Figure 6) (Go & Jones 2010; Lee *et al.* 2013). Les Prx sont retrouvées dans divers compartiments cellulaires : Prx1, 2 et 4 sont principalement des protéines cytoplasmiques, mais également nucléaires (Go & Jones 2010). Prx3 est exclusivement mitochondriale, elle contient un signal de localisation mitochondriale et en concert avec Trx2, y convertit le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par le métabolisme mitochondrial (Yoshioka 2015). Cette régulation est notamment importante dans les cardiomyocytes, puisque c'est le principal mécanisme responsable du contrôle du flux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenant de la mitochondrie dans le cœur (Stanley *et al.* 2011). Prx5 est retrouvée dans la mitochondrie, le cytoplasme, le noyau et les peroxysomes où elle participe au maintien de l'équilibre rédox (Go & Jones 2010). Une étude récente a rapporté que chez des patients diabétiques, la concentration plasmatique de Prx1, 2, 4 et 6 est supérieure comparativement à des sujets sains (El Eter & Al-Masri 2015). La concentration de chacune de



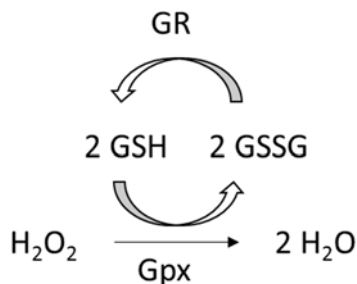
ces isoformes semble également corrélérer avec divers facteurs de risque cardiovasculaires tels que la pression diastolique et le profil lipidique (El Eter & Al-Masri 2015). Selon une étude basée sur 1 161 patients diabétiques avec un âge moyen de 67 ans, la concentration de Prx4 dans le sérum est associée avec la mortalité cardiovasculaire (Gerrits *et al.* 2014). Ces données suggèrent globalement qu'en conditions pathologiques, l'expression de Prx est augmentée afin de compenser pour la génération croissante de stress oxydant.



**Figure 6.** Réduction du peroxyde d'hydrogène par la peroxyrédoxine (Prx). Prx réduit le peroxyde d'hydrogène en utilisant la forme réduite de la thiorédoxine (Trx) comme un donneur d'hydrogène.

#### 1.1.1.2.4 Glutathion peroxydase (Gpx)

La glutathion peroxydase (Gpx) convertit le peroxyde d'hydrogène en eau en transformant une molécule de glutathion réduite (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Ce dernier est par la suite recyclé par une glutathion réductase (GR) (Figure 7) (Go & Jones 2010).



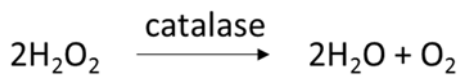
**Figure 7.** Réduction du peroxyde d'hydrogène par la glutathion peroxydase (Gpx). Deux molécules de glutathion (GSH) sont recyclées par la glutathion réductase (GR) pour permettre la réaction de réduction par la Gpx.

Il existe 4 isoformes de Gpx chez les mammifères qui se démarquent par leur localisation tissulaire et subcellulaire : Gpx1, un des membres les plus abondants de cette famille d'enzymes, est exprimée de manière ubiquitaire et est localisée dans les compartiments cytosolique, mitochondrial et nucléaire (Lubos *et al.* 2011). Gpx2 est exprimée dans le cytosol et le noyau des cellules gastro-intestinales (Margis *et al.* 2008). Gpx3 est une protéine sécrétée et également cytosolique, on la retrouve dans une grande variété de tissus tels que les reins, le poumon, le placenta, le cœur et le muscle (Margis *et al.* 2008). Gpx4 est principalement liée aux membranes et est également exprimée dans divers tissus (Margis *et al.* 2008). Les souris transgéniques déficientes en Gpx1 (Gpx1<sup>-/-</sup>) ont un taux plus élevé de LDL oxydées et davantage d'apoptose dans des segments aortiques (Guo *et al.* 2001). De plus, les souris Gpx1<sup>-/-</sup> affichent une diminution de la biodisponibilité du NO causée par le découplage de eNOS, conduisant à la dysfonction endothéliale, dans des segments d'aorte isolés (Oelze *et al.* 2014). La délétion de Gpx1 chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> accentue le développement de la plaque athérosclérotique en réponse à une alimentation de type *Western* (Torzewski *et al.* 2007). Chez l'humain, une baisse de l'activité de Gpx3 dans le plasma est associée avec une plus forte mortalité associée avec les MCV (Buijsse *et al.* 2012). De même, une plus faible activité de Gpx1 dans les cellules sanguines de patients atteints de MCV est associée avec une incidence plus élevée d'événements cardiovasculaires (Blankenberg *et al.* 2003). Ces données suggèrent donc un rôle cardio-protecteur des Gpx.

#### 1.1.1.2.5 Catalase

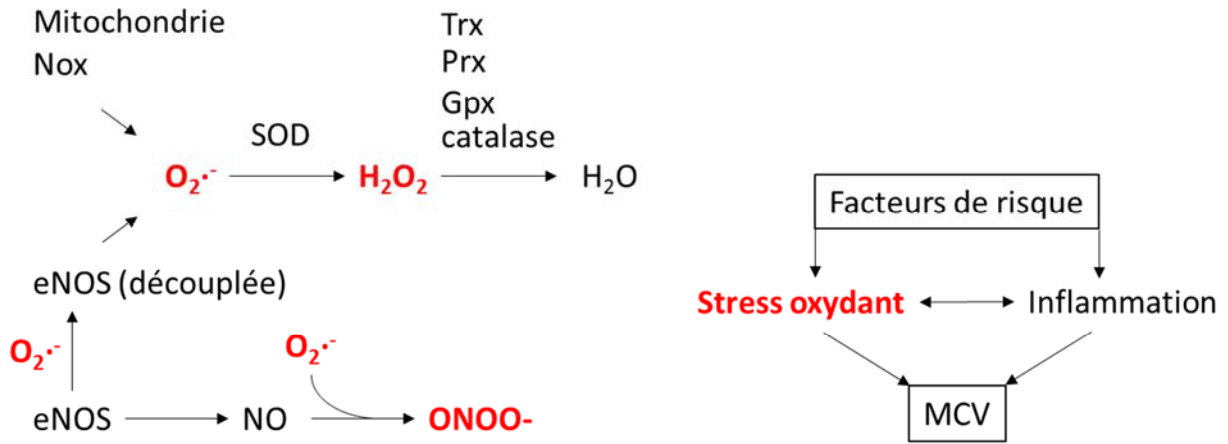
Pour compléter la liste des enzymes convertissant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène, mentionnons la catalase qui est une enzyme principalement localisée dans les peroxysomes, mais a également été détectée dans les mitochondries du cœur de rat (Radi *et al.* 1991). La catalase semble limiter les niveaux de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lorsque ce dernier est présent en grande quantité (Schriner & Linford 2006) (Figure 8). La présence de catalase ne semble pas être essentielle en situation physiologique, puisque des souris déficientes en catalase se développent normalement (Ho *et al.* 2004). Le rôle de la catalase dans le vieillissement est mitigé par des études à première vue contradictoires : la surexpression de la catalase ciblée dans les mitochondries de la souris permet de prolonger la survie, démontrant l'impact positif de cette enzyme dans le métabolisme du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schriner &

Linford 2006), alors qu'un autre groupe a par la suite démontré que la surexpression de catalase seule ou combinée avec une surexpression de SOD1, au niveau des peroxysomes, n'a aucun effet sur la survie des souris (Perez *et al.* 2009). Deux études utilisant le modèle de souris athérosclérotique ApoE<sup>-/-</sup> ont démontré que la surexpression de la catalase retarde le développement de plaques athérosclérotiques en parallèle avec une diminution de la peroxydation lipidique dans le plasma et l'aorte (Yang *et al.* 2004) ainsi qu'une diminution de l'expression de molécules d'adhésion dans l'aorte de ces souris (Yang *et al.* 2009). Ceci démontre un rôle protecteur de la catalase dans un contexte pathologique.



**Figure 8.** Réduction du peroxyde d'hydrogène par la catalase en H<sub>2</sub>O et oxygène.

En résumé, les enzymes antioxydantes constituent une défense endogène cruciale dans le contrôle du stress oxydant généré par les radicaux libres produits lors de fonctions physiologiques normales, telle que la génération d'énergie par la mitochondrie, ou en contexte pathologique, tel que le découplage de eNOS (Figure 9). L'accumulation de stress oxydant cause des dommages cellulaires pouvant mener au développement et à la progression des MCV. La situation est en fait encore plus complexe, puisqu'en synergie avec le stress oxydant, le contexte inflammatoire contribue à l'état pathologique.



**Figure 9.** Récapitulatif des réactions enzymatiques impliquées dans la production et le métabolisme des principaux dérivés réactifs de l’oxygène (ROS) dans les maladies cardiovasculaires (MCV). L’anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est produit par la machinerie mitochondriale et des enzymes telles que les NADPH oxydases (Nox) et la forme découplée de la synthase du monoxyde d’azote endothéliale (eNOS). La neutralisation du  $O_2^{\cdot-}$  est d’abord régie par les superoxyde dismutases (SOD) qui génèrent du peroxyde d’hydrogène ( $H_2O_2$ ). Le  $H_2O_2$  est par la suite converti en  $H_2O$  par diverses enzymes en fonction de la localisation tissulaire et cellulaire. Ces enzymes sont les thiorédoxines (Trx), les peroxyrédoxines (Prx), les glutathion peroxydases (Gpx) et la catalase. Le  $O_2^{\cdot-}$  accentue la génération de ROS en découplant eNOS et en transformant le monoxyde d’azote (NO) en peroxynitrite (ONOO-). Suite à l’exposition aux facteurs de risque cardiovasculaires, le stress oxydant généré avec l’accumulation de ROS et la diminution des défenses antioxydantes, conjointement à l’environnement inflammatoire, mène au développement des MCV.

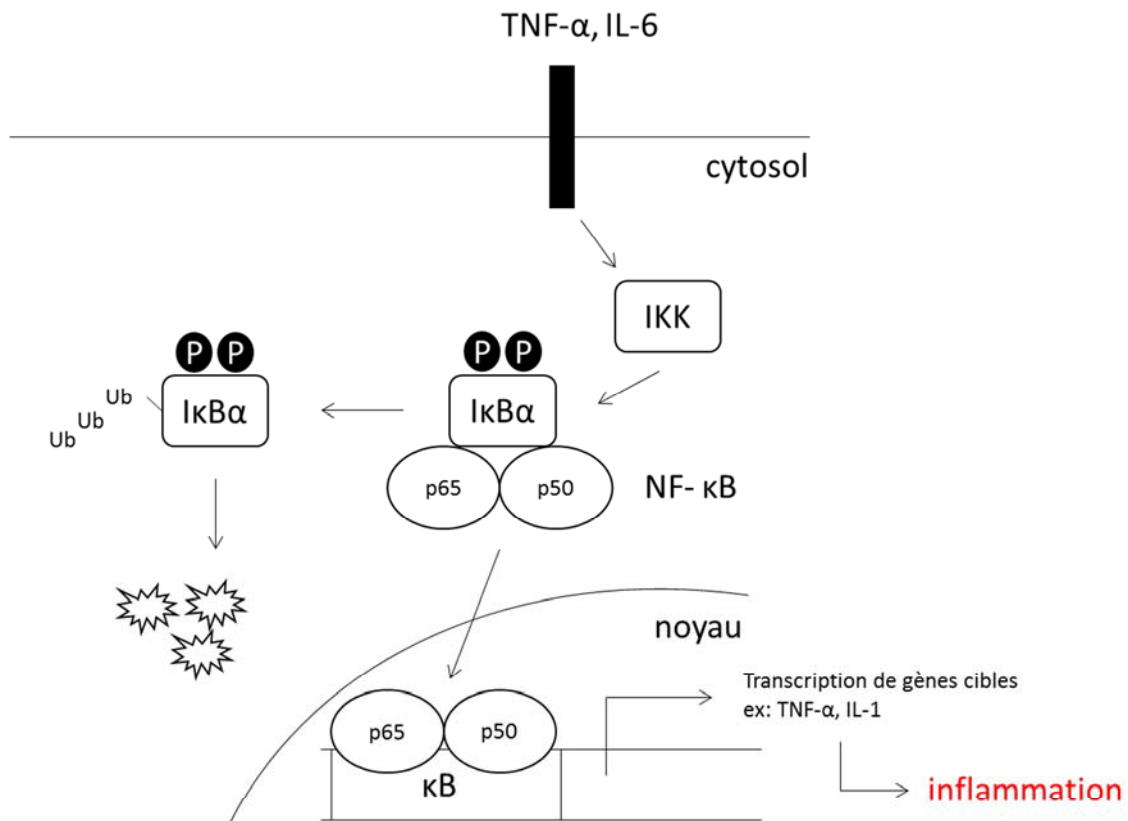
### ***1.1.2 Environnement pro-inflammatoire associé aux MCV***

L'environnement pro-inflammatoire, de concert avec la présence de stress oxydant, promeut la pathogénèse des MCV (Savoia & Schiffrin 2006), notamment par sa contribution à la dysfonction endothéliale (Siti *et al.* 2015). La dysfonction endothéliale résultant de multiples dommages est un marqueur précoce d'événements cardiovasculaires tels que l'hypertension (Savoia *et al.* 2011) et l'athérogénèse (Steyers & Miller 2014). Les cascades de signalisation pro-inflammatoires sont orchestrées par une grande variété de médiateurs incluant les facteurs de transcription et les cytokines, pouvant à la fois activer et exacerber la réponse inflammatoire (Fang *et al.* 2015; Viola & Soehnlein 2015). Ces médiateurs inflammatoires participent ainsi à la pathogénèse des MCV et certains sont considérés comme des marqueurs reflétant la progression et la sévérité de la maladie (Alagona & Ahmad 2015; Tehrani & Wong 2015).

#### ***1.1.2.1 Facteur nucléaire $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)***

Le facteur de transcription facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) est un hétérodimère composé des deux sous-unités p65 (aussi connu sous le nom de RelA) et p50 (Baeuerle & Baltimore 1996). Son activité est régulée par sa liaison à l'inhibiteur de  $\kappa$ B ( $I\kappa B\alpha$ ) qui le séquestre au niveau du cytoplasme en couvrant le signal de localisation nucléaire et en interférant avec les domaines de liaison à l'ADN (Gilmore 2006). Ainsi, en formant un complexe avec  $I\kappa B\alpha$ , NF- $\kappa$ B est majoritairement inactif et situé dans le cytoplasme, mais prêt à être activé en réponse à un stimulus approprié, ce qui le classe parmi les facteurs de transcription à action rapide (Lawrence 2009). C'est seulement suite à la dégradation de  $I\kappa B\alpha$ , induit par la phosphorylation de ce dernier par le complexe  $I\kappa B\alpha$  kinase (IKK), que NF- $\kappa$ B migre vers le noyau pour se lier et activer les promoteurs des gènes inflammatoires cibles en se liant sur des sites de reconnaissance dans l'ADN de 9 ou 10 paires de bases appelés sites  $\kappa$ B (Chandel *et al.* 2000; Gilmore 2006). Parmi les activateurs de NF- $\kappa$ B, on retrouve des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) et l'interleukine 1 (IL-1) (Lawrence 2009) (Figure 10). D'autre part, l'implication de la production de cytokines par NF- $\kappa$ B a notamment été rapportée dans l'athérosclérose (Monaco *et al.* 2004). En effet, dans des cellules humaines isolées de plaques d'athéromes par endartériectomie de l'artère fémorale et carotidienne, la surexpression de  $I\kappa B\alpha$  dans ces cellules diminue la

production des cytokines TNF- $\alpha$  de 66-99% et d'interleukine-6 (IL-6) de 46-92% (Monaco *et al.* 2004). Ces données démontrent non seulement l'implication de NF- $\kappa$ B dans la signalisation inflammatoire en général, mais également dans le contexte pathologique de l'athérosclérose.



**Figure 10.** Activation du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). La signalisation induite par les cytokines inflammatoires facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et interleukine 6 (IL-6) active la kinase de  $\kappa$ B (IKK). Cette dernière phosphoryle l'inhibiteur de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) qui, jusqu'à cette étape, forme un complexe avec les deux sous-unités p65 et p50 de NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme. Cette modification de I $\kappa$ B $\alpha$  le dissocie du complexe et le dirige dans une voie d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome. L'autre partie du complexe cytoplasmique, NF- $\kappa$ B, peut alors migrer dans le noyau pour s'associer à l'ADN aux sites de liaison  $\kappa$ B et ainsi activer la transcription des gènes cibles tels que le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-1 (IL-1). Cette cascade mène à l'inflammation.

Adapté avec la permission de Nature Publishing Group : Oncogene, Gilmore, T.D., Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. 25(51):6680-4, Copyright (2006).

### 1.1.2.2 Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Le TNF- $\alpha$  a été caractérisé pour la première fois en 1968 par deux différents groupes (Kolb & Granger 1968; Ruddle & Waksman 1968) comme étant un facteur cytotoxique sécrété par les lymphocytes. Produit principalement par les cellules immunitaires, TNF- $\alpha$  forme un complexe hétérotrimérique transmembranaire (Tang *et al.* 1996). Cette forme de 51 kDa peut ensuite être clivée par une métalloprotéase, l'enzyme de conversion de TNF- $\alpha$  (TACE; *TNF- $\alpha$  converting enzyme*), libérant ainsi une forme soluble de 17 kDa (Black *et al.* 1997). Les cascades de signalisation activées par TNF- $\alpha$  sont déclenchées par la liaison au récepteur du TNF de type 1 (TNFR1) et de type 2 (TNFR2), cependant, le rôle de TNFR1 est le mieux caractérisé puisque ce dernier peut reconnaître à la fois la forme soluble et la forme transmembranaire de TNF- $\alpha$ , en plus d'être exprimé de manière constitutive dans la plupart des tissus (Wajant *et al.* 2003). Quant à lui, TNFR2 ne reconnaît que la forme transmembranaire de TNF- $\alpha$  et est majoritairement exprimé dans les cellules immunitaires (Wajant *et al.* 2003). La signalisation cellulaire suite à la liaison de TNF- $\alpha$  à son récepteur TNFR1 implique le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, puisque tel que mentionné précédemment, TNF- $\alpha$  active NF- $\kappa$ B (Wajant *et al.* 2003). De plus, TNF- $\alpha$  est une des cibles sous la régulation de NF- $\kappa$ B (Steyers & Miller 2014). Par ses propriétés pro-inflammatoires caractéristiques aux cytokines, TNF- $\alpha$  participe à la pathogénèse de diverses maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde (Taylor *et al.* 2000) et la maladie inflammatoire chronique de l'intestin (Blam *et al.* 2001). L'inhibition pharmacologique de TNF- $\alpha$  chez les patients souffrant de ces maladies diminue l'inflammation et les symptômes cliniques associés (Taylor *et al.* 2000; Blam *et al.* 2001). Dans le contexte cardiovasculaire, il a été démontré que l'injection de TNF- $\alpha$  dans la circulation inhibe la vasodilatation dépendante de l'endothélium tant chez le rat (Wang *et al.* 1994) que chez l'humain (Chia *et al.* 2003). D'ailleurs, la délétion de son gène réduit la taille des lésions athérosclérotiques chez des souris dyslipidémiques déficientes en ApoE (Ohta *et al.* 2005). Ainsi, le TNF- $\alpha$  pourrait contribuer à la pathogénèse des MCV via l'induction de la dysfonction endothéliale et d'un état pro-inflammatoire délétère.

### 1.1.2.3 Protéine C réactive (CRP)

La protéine C réactive (CRP; *C-reactive protein*) est une protéine circulante qui se trouve sous forme pentamérique (Thompson *et al.* 1999). Majoritairement synthétisé par le foie, le CRP est



produit durant la réponse inflammatoire suite à une stimulation par des cytokines telles que l'IL-6 (Blake *et al.* 2003; Lau *et al.* 2005) et plusieurs études témoignent de la robustesse de la corrélation entre la concentration circulante de CRP et la sévérité de l'état inflammatoire (Blake *et al.* 2003). Puisque la production de CRP est sensible à la présence des médiateurs inflammatoires produits par le tissu adipeux, appelés adipocytokines, le CRP est couramment étudié en lien avec le syndrome métabolique (Lau *et al.* 2005). En effet, selon une étude portant sur 16 616 hommes et femmes adultes, la concentration plasmatique de CRP est plus élevée chez les sujets avec un surplus de poids et les sujets obèses comparativement aux sujets avec un indice de masse corporelle (IMC) normal (Visser *et al.* 1999). Une autre étude chez 14 719 femmes conclut que la mesure de la concentration circulante de CRP est une mesure importante dans le pronostic clinique du syndrome métabolique et corrèle avec l'incidence d'événements cardiovasculaires sur un suivi de 8 ans (Ridker *et al.* 2003). Des observations similaires ont également été rapportées dans une étude sur l'obésité chez les enfants : à partir de données mesurées chez 5 305 enfants âgés entre 6 et 18 ans, il a été démontré que la concentration circulante de CRP corrèle avec l'IMC (Ford *et al.* 2001). Ces études montrent que la concentration de CRP est un marqueur robuste de l'état inflammatoire associé au surplus de poids et aux maladies métaboliques chez l'Homme. Selon cet énoncé, il est pertinent d'étudier l'effet d'une perte de poids sur la production de CRP. La perte de poids chez des sujets obèses, tant chez les femmes (Heilbronn *et al.* 2001; Esposito *et al.* 2003) que chez les hommes (Kopp *et al.* 2003), est associée à une diminution du niveau circulant de CRP.

Dans le contexte des MCV, le CRP est un facteur prédictif d'événements cardiovasculaires indépendant des autres marqueurs de risque classiques tel que la mesure du cholestérol LDL (Ridker 2003). En effet, la mesure de la concentration de CRP est un indice des événements cardiovasculaires à venir tels qu'un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (Sakkinen *et al.* 2002; Curb *et al.* 2003; Savoia & Schiffrin 2007) et ce, même chez des individus asymptomatiques (Ridker *et al.* 1997; Koenig *et al.* 1999; Sakkinen *et al.* 2002). Ceci fait du CRP un marqueur de choix en clinique pour les MCV (Pearson *et al.* 2003; Pepys & Hirschfield 2003). L'évaluation du pronostic d'événements cardiovasculaires se base sur une classification en trois catégories selon la mesure de la concentration circulante de CRP : faible risque (<1 mg/L), risque modéré (1 à 3 mg/L) et risque élevé (>3 mg/L) (Ridker 2003). Il faut noter que la mesure du CRP à des faibles concentrations nécessite l'application d'une méthode à haute sensibilité et

conséquemment, les données sont exprimées par concentration de CRP-haute sensibilité (hs-CRP, *high-sensitivity CRP*), mais la molécule mesurée, le CRP, est la même, haute sensibilité ou non (Pepys & Hirschfield 2003). De par la forte corrélation entre la production de CRP et l'état inflammatoire, le CRP contribue activement à la pathogénèse des MCV. Le CRP participe à l'athérogenèse en perturbant l'homéostasie vasculaire (Lau *et al.* 2005). Ainsi, lorsque des cultures de cellules endothéliales humaines provenant de l'artère coronaire ou de la veine du cordon ombilical (HUVEC; *human umbilical vein endothelial cells*) sont exposées à une forme recombinante du CRP pour une période de 24h, l'expression des molécules d'adhésion cellulaire vasculaires (VCAM-1; *vascular cell adhesion molecule*) et intercellulaires (ICAM-1; *intercellular adhesion molecule*) augmente significativement (Pasceri *et al.* 2000). Ceci démontre un effet inflammatoire direct du CRP, puisque l'expression de molécules d'adhésion permet le recrutement de monocytes et de lymphocytes causant ainsi une inflammation locale propice au développement de la plaque athérosclérotique (Pasceri *et al.* 2000). Une autre étude réalisée sur de cellules endothéliales humaines de la veine saphène (HSVEC; *human saphenous vein endothelial cells*) démontre que les effets du CRP sur l'activation des molécules d'adhésion est dépendante de la production de l'endothéline-1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur, et de la cytokine inflammatoire IL-6; ces deux médiateurs sont en effet sur-exprimés en présence de CRP et de plus, l'inhibition de ET-1 et d'IL-6 diminue ces effets inflammatoires et pro-athérosclérotiques (Verma *et al.* 2002a). Un autre mécanisme par lequel le CRP altère la fonction endothéliale implique la biodisponibilité du NO. En effet, dans des cultures de HUVEC et de HSVEC exposées à une forme recombinante du CRP, la synthèse du NO est réduite via une diminution de l'expression génique et protéique de la eNOS (Verma *et al.* 2002b). Le CRP induit également l'expression du récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT1; *angiotensin type 1 receptor*), augmente la production de ROS et potentialise les effets de l'Ang II dans des VSMC humaines en culture et dans l'artère carotidienne de rat (Wang *et al.* 2003). Cette dernière étude met en évidence un autre mécanisme par lequel le CRP peut promouvoir le développement de l'athérosclérose, puisque le rôle du récepteur AT1 dans la production de ROS est clairement établi dans cette pathologie (Nickenig & Harrison 2002). En conclusion, le CRP participe activement au développement des MCV en activant directement diverses voies moléculaires menant à l'inflammation. De plus, puisque la production de CRP est corrélée à la sévérité de l'état inflammatoire, le CRP est un marqueur clinique robuste non seulement pour le diagnostic, mais également pour le pronostic des MCV.

#### 1.1.2.4 Angiopoietin-like 2 (Angptl2)

L'Angiopoietin-like 2 (Angptl2) est une protéine circulante et sécrétée par différents types cellulaires et a des propriétés pro-inflammatoires; elle a été clonée pour la première fois en 1999 (Kim et al. 1999). C'est une protéine de 493 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 57 kDa (Kim *et al.* 1999). La caractérisation de l'Angptl2 a connu un essor ces dernières années par l'identification de ses récepteurs potentiels et de nouvelles voies de signalisation et de régulation (Kadomatsu *et al.* 2014; Thorin-Trescases & Thorin 2014). Notre intérêt pour cette molécule dans le cadre des MCV se justifie par l'identification des propriétés inflammatoires de cette protéine à la fois par notre groupe (Farhat *et al.* 2008; Farhat *et al.* 2013) et par d'autres (Tabata *et al.* 2009). Nous avons d'ailleurs été les premiers à associer l'Angptl2 avec la sénescence endothéliale, le stress oxydant et les MCV (Farhat *et al.* 2008). Puisque les connaissances sur l'Angptl2 se limitent à un peu plus d'une centaine d'articles, dont la grande majorité a été publiée ces 5 dernières années (pas moins de 80 publications depuis 2011), les paragraphes suivants porteront sur la panoplie des fonctions physiologiques et pathologiques caractérisées jusqu'à ce jour pour cette « nouvelle » protéine.

L'Angptl2 fait partie de la famille des *angiopoietin-like* (angptl) comprenant 8 membres nommées ainsi dû à la similarité de leur structure par rapport aux angiopoietines : les angptl possèdent également un domaine superhélice (ou *coiled-coil*) en N-terminal et un domaine *fibrinogen-like* en C-terminal, sauf l'Angiopoietin-like 8 qui est dépourvue du domaine superhélice (Quagliarini *et al.* 2012). Contrairement aux angiopoietines, les angptl ne lient pas les récepteurs Tie1 et Tie2 (Kim et al. 1999) et sont donc caractérisées comme des ligands orphelins, du moins jusqu'à tout récemment. En effet, plusieurs récepteurs potentiels ont été identifiés pour l'Angptl2, qui incluent les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (Kim et al. 1999; Odagiri et al. 2014), le *leukocyte immunoglobulin-like receptor B2* (LILRB2) et son homologue murin, le *paired immunoglobulin-like receptor B* (PIRB) (Zheng et al. 2012). De plus, l'Angptl2 peut interagir avec un domaine cytosolique du récepteur AT1 : cette interaction ne mène pas à une signalisation cellulaire classique propre aux liaisons ligand-récepteur, mais régule plutôt le recyclage du récepteur AT1 (Guo et al. 2003). Ces interactions Angptl2-récepteur et la signalisation subséquente sont importantes dans la compréhension des effets biologiques de l'Angptl2. La signalisation de l'Angptl2 peut être

bénéfique dans un contexte physiologique, ou néfaste dans un contexte pathophysiologique et cette dichotomie dépend largement de la concentration d'Angptl2 et de la signalisation induite par l'Angptl2 (Kadomatsu et al. 2014). En effet, à concentration normale, l'Angptl2 participe à des processus physiologiques tels que l'angiogénèse (Kim et al. 1999; Tabata et al. 2009) et la réparation tissulaire (Kubota et al. 2005). À l'opposé, des concentrations élevées et une surstimulation par l'Angptl2 favorise l'inflammation en lien avec l'obésité (Tabata et al. 2009) et contribue au développement de maladies inflammatoires chroniques telles que le syndrome métabolique (Oike & Tabata 2009), le diabète de type 2 (Doi et al. 2013), l'athérosclérose (Horio et al. 2014), l'anévrisme aortique (Tazume *et al.* 2012), l'hyperplasie néointimale suite à des dommages endovasculaires (Tian *et al.* 2013) et une variété de cancers dont la liste ne cesse de s'allonger (Aoi *et al.* 2011; Endo *et al.* 2012; Aoi *et al.* 2014; Toiyama *et al.* 2015b).

#### 1.1.2.4.1 Rôles physiologiques de l'Angptl2

Les propriétés pro-angiogéniques de l'Angptl2 ont initialement été révélées par des expériences *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines en culture (Kim *et al.* 1999; Tabata *et al.* 2009). Chez la souris, une surexpression de l'Angptl2 dans les kératinocytes augmente le nombre de vaisseaux sanguins dans la peau (Hato *et al.* 2008) alors que l'implantation de pastilles libérant de l'Angptl2 dans la cornée induit de la néovascularisation (Tabata *et al.* 2009). Les propriétés bénéfiques angiogéniques de l'Angptl2 ont été rapportées dans l'organogénèse (Niki *et al.* 2009) ou la grossesse (Haddad *et al.* 2008), mais également après un accident vasculaire cérébral dans un modèle de rat (Buga *et al.* 2014). Il est important de noter que l'angiogénèse joue un rôle délétère dans la tumorigénèse : il a été démontré que la vascularisation des tumeurs est accélérée par la surexpression d'Angptl2 alors qu'elle est ralentie par la délétion ou la suppression d'Angptl2 (Aoi *et al.* 2011). Les effets de l'Angptl2 sur la motilité cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire seraient dépendants de l'interaction avec l'intégrin  $\alpha 5 \beta 1$  (Tabata *et al.* 2009), notamment par l'activation de Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) dans les cellules endothéliales (Tabata *et al.* 2009) et l'activation de métalloprotéinases (MMP) via la voie p38 MAPK dans des cellules d'ostéosarcome (Odagiri *et al.* 2014). L'Angptl2 serait donc un facteur de croissance et de survie.

L'Angptl2 joue un rôle important dans la biologie des cellules souches hématopoïétiques (CSH). En effet, elle permet la survie et l'expansion des CSH dérivées de la moelle osseuse (Zhang *et al.* 2006) et du sang de cordon (Broxmeyer *et al.* 2012). Cette fonction serait régulée par la liaison de l'Angptl2 aux récepteurs LILRB2 et PIRB présents à la surface des CSH humains et murins, respectivement (Zheng *et al.* 2012).

L'Angptl2 possède également un rôle cytoplasmique en participant au recyclage du récepteur AT1 en s'y liant (Guo *et al.* 2003). Des expériences sur des cellules HEK-293 ont effectivement démontré la co-localisation AT1/Angptl2 suite à une stimulation à l'Ang II, favorisant l'activation et le recyclage du récepteur AT1 vers la membrane plasmique (Guo *et al.* 2003). Prenant en considération le rôle du système rénine-angiotensine, une telle régulation pourrait avoir un impact sur la régulation de la pression artérielle. En effet, on observe une augmentation de la pression systolique de 20 à 25 mm Hg chez des souris transgéniques sur-exprimant l'Angptl2 dans le rein (Guo *et al.* 2006). Cette hypertension est abolie par un traitement avec des inhibiteurs de la voie de l'Ang II, soit le losartan, un antagoniste AT1 ou le perindopril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'Ang II (Guo *et al.* 2006). D'autre part, une diminution de l'expression de l'Angptl2 est observée lors d'un choc septique, contribuant à l'hypotension (Mederle *et al.* 2013). Cependant, le rôle physiologique de l'Angptl2 dans la régulation de la pression artérielle demeure à être clairement démontré.

Un autre rôle physiologique de l'Angptl2 a récemment été caractérisé dans les plaquettes humaines et de souris où elle est exprimée et sécrétée (Fan *et al.* 2014). L'Angptl2 possède des propriétés anti-thrombotiques : elle inhibe l'activation des plaquettes en réponse au CRP et cette fonction semble être dépendante des récepteurs LILRB2 ou PIRB (Fan *et al.* 2014). En effet, la liaison de l'Angptl2 aux plaquettes humaines est bloquée en présence d'anticorps anti-LILRB2 et la prévention de l'activation des plaquettes en réponse au CRP est atténuée dans des plaquettes provenant de souris mutantes pour le gène PIRB (Fan *et al.* 2014).

En résumé, l'Angptl2 possède des propriétés pro-angiogéniques, est importante pour le développement des CSH, pourrait participer à la régulation de la pression sanguine via le recyclage du récepteur AT1 et inhibe l'agrégation plaquettaire (Kadomatsu *et al.* 2014; Thorin-Trescases &

Thorin 2014). Cependant, une sur-activation de ces mécanismes physiologiques, principalement en ce qui concerne la motilité et la survie cellulaire, est associée au développement de maladies.

#### 1.1.2.4.2 Rôles pathologiques de l'Angptl2

##### 1.1.2.4.2.1 Rôle de l'Angptl2 dans l'obésité et les maladies métaboliques associées

Le tissu adipeux semble être l'une des sources principales d'Angptl2 circulante (Tabata *et al.* 2009). Les adipocytes font l'objet de diverses modifications physiologiques pour leur permettre de stocker l'excès de lipides lors des stades précoces de l'obésité. Ces modifications incluent l'hypertrophie des adipocytes, d'adipogénèse, l'angiogénèse et la restructuration de la matrice extracellulaire (Sun *et al.* 2011). À mesure que l'obésité progresse, ce remodelage du tissu adipeux s'intensifie, de manière pathologique et irréversible, conduisant à l'inflammation du tissu adipeux et à la résistance à l'insuline via l'inflammation vasculaire et l'infiltration de macrophages (Sun *et al.* 2011). L'Angptl2, principalement produit par le tissu adipeux, possède des propriétés pro-inflammatoires et pro-angiogéniques, favorise le recrutement de macrophages et son expression est associée à la résistance à l'insuline (Tabata *et al.* 2009). Ainsi, il a été proposé que l'Angptl2 soit un médiateur pro-inflammatoire dérivé du tissu adipeux liant l'obésité à la résistance à l'insuline, chez l'Homme (Tabata *et al.* 2009). Chez l'humain, la concentration circulante d'Angptl2 est augmentée chez des sujets obèses ou souffrant d'embonpoint (Tabata *et al.* 2009; Muramoto *et al.* 2011; Meng *et al.* 2013) et chez des sujets diabétiques (Tabata *et al.* 2009; Doi *et al.* 2013; Li *et al.* 2013). Selon une étude longitudinale réalisée chez des sujets sans diabète et suivis pendant plus de 7 ans, il a été clairement démontré que les niveaux circulants d'Angptl2 sont un facteur de risque indépendant pour développer le diabète de type 2 : le risque de développer le diabète de type 2 est significativement plus élevé dans le quartile d'Angptl2 le plus élevé ( $\geq 3,41$  ng/mL) par rapport au quartile le plus bas ( $< 2,15$  ng/mL) (Doi *et al.* 2013).

Chez la souris obèse soumise à une alimentation riche en gras, l'expression de l'ARNm de l'Angptl2 dans le tissu adipeux ainsi que la concentration circulante de la protéine sont augmentées (Tabata *et al.* 2009). De même, une surexpression d'Angptl2 spécifiquement dans le tissu adipeux augmente l'inflammation et le recrutement de macrophages aux adipocytes tout en induisant une

résistance à l'insuline dans le muscle squelettique et le foie de ces souris transgéniques (Tabata *et al.* 2009). À l'inverse, lorsque des souris déficientes en Angptl2 (Angptl2<sup>-/-</sup>) sont soumises à une alimentation riche en gras, on observe une diminution des marqueurs inflammatoires et de macrophages dans le tissu adipeux, ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline (Tabata *et al.* 2009). Cette étude a été la première à démontrer les propriétés pathologiques de l'Angptl2 (Tabata *et al.* 2009). Une étude de notre laboratoire a également démontré que les souris déficientes en Angptl2 répondent mieux au stress métabolique induit par une alimentation riche en gras, notamment par une préservation de la fonction endothéliale (Yu *et al.* 2014).

#### 1.1.2.4.2.2 Rôle de l'Angptl2 dans le cancer

À travers les multitudes étapes de la tumorigenèse, de l'initiation à la progression des métastases, l'implication de l'inflammation est maintenant reconnue comme étant un facteur contributif important dans le développement du cancer (Grivennikov *et al.* 2010). De ce fait, l'Angptl2 serait impliquée chez l'Homme dans divers types de cancers incluant le cancer de l'estomac (Shimura *et al.* 2015; Toiyama *et al.* 2015b; Yoshinaga *et al.* 2015), le cancer du sein (Endo *et al.* 2014; Masuda *et al.* 2015), le cancer du poumon (Liu *et al.* 2015), le cancer colorectal (Horiguchi *et al.* 2014; Toiyama *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2014), le cancer de l'œsophage (Ide *et al.* 2015), le cancer de la prostate (Sato *et al.* 2015), le cancer du pancréas (Carbone *et al.* 2015), le cancer de la peau (Aoi *et al.* 2011; Aoi *et al.* 2014) le sarcome osseux (Odagiri *et al.* 2014), la leucémie (Zheng *et al.* 2012) et le cancer du foie (Gao *et al.* 2015). Il est souvent proposé que le taux circulant d'Angptl2 représente un biomarqueur de diagnostic, mais aussi de pronostic, de différents types de cancers (section 1.1.2.4.2.4).

En utilisant un modèle murin de cancer chimiquement inductible dans des cellules de la peau (carcinome épidermoïde), l'équipe de Aoi *et al.* (Aoi *et al.* 2011) est parvenue à établir pour la première fois un lien entre l'Angptl2 et le cancer. Les auteurs ont d'abord observé que suite à l'induction chimique du cancer, l'expression de l'ARNm et de la protéine Angptl2 étaient tous deux plus abondants au niveau de la tumeur comparativement à des tissus sains (Aoi *et al.* 2011). De plus, chez des souris transgéniques sur-exprimant l'Angptl2 dans la peau à l'aide du promoteur K14 spécifique des kératinocytes (K14-Angptl2 Tg), ces chercheurs ont remarqué une

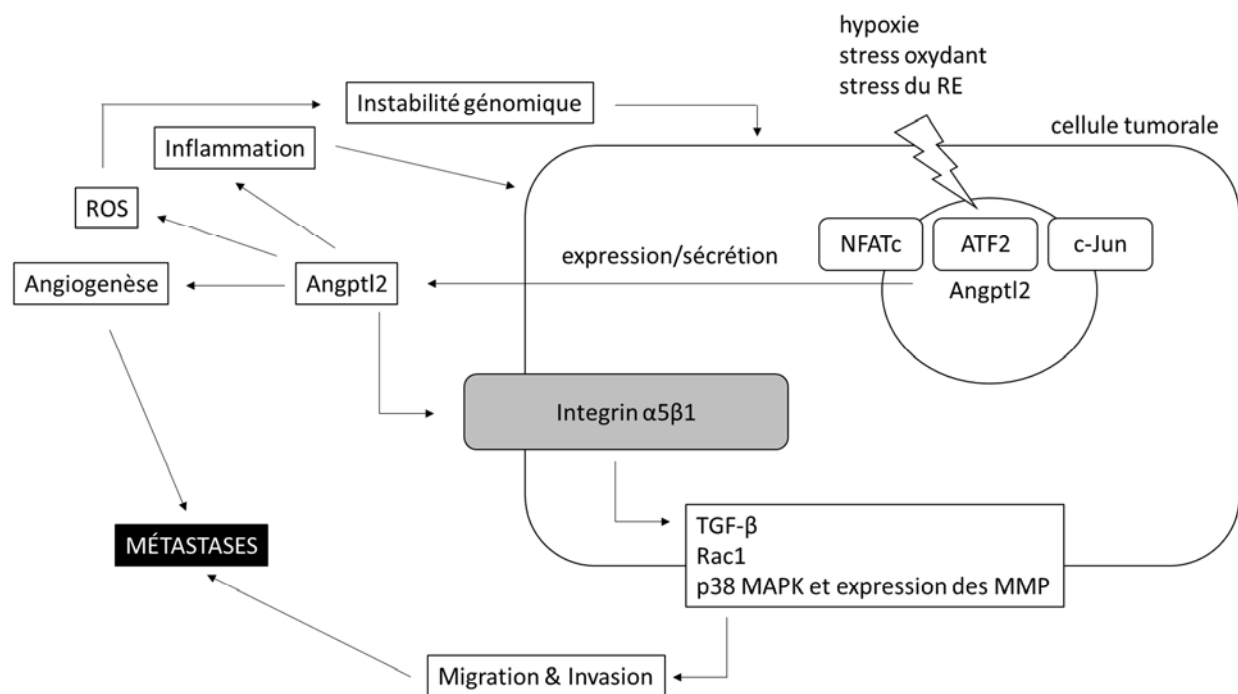
augmentation des marqueurs d'inflammation, notamment IL-6 et IL-8, sans qu'il n'y ait de développement de tumeurs (Aoi *et al.* 2011). Cependant, lorsque ces mêmes souris étaient chimiquement traitées avec l'agent carcinogène, des tumeurs se sont développées rapidement et en grand nombre, non seulement sur la peau, mais également sur d'autres organes, tels que le poumon, le foie, la rate et les ganglions lymphatiques (Aoi *et al.* 2011). L'acquisition de propriétés invasives, caractérisées par la transition épithélio-mésenchymateuse et impliquant la voie du facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ; *transforming growth factor beta*) et Smad, est une étape critique dans le développement des métastases (Ikushima & Miyazono 2010). L'Angptl2 semble activer cette voie, puisque que l'étude de Aoi et al. (Aoi *et al.* 2011) rapporte une augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et de leur récepteur respectif, TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R2, ainsi qu'une activation de son effecteur, Smad2 (Aoi *et al.* 2011). Les chercheurs concluent que bien qu'une surexpression d'Angptl2 ne peut elle-même induire l'apparition de cancer, elle crée un environnement inflammatoire favorable à la tumorigenèse, en plus de favoriser les métastases dans les tissus avoisinants via une activation accrue des médiateurs inflammatoires ainsi qu'une stimulation de la croissance des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Aoi *et al.* 2011).

En plus de l'inflammation, le développement de cancers est également intimement lié aux effets délétères d'une surproduction de radicaux libres, qui a comme conséquence l'endommagement direct de l'ADN ou l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN (Colotta *et al.* 2009; Montezano *et al.* 2015). L'Angptl2 pourrait faciliter la formation de tumeurs via l'induction de ROS (Aoi *et al.* 2011; Aoi *et al.* 2014). Les propriétés pro-oxydantes de l'Angptl2 ont d'abord été confirmées par une première étude sur le cancer de la peau, chez la souris. En effet, l'application d'un agent chimique carcinogène, le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) sur la peau augmente la production de ROS, quantifiée à l'aide d'un marqueur des dommages oxydatifs sur les protéines, le 4-Hydroxynonanal (4-HNE) et comparativement à des souris de type sauvage, le marquage au 4-HNE suite à l'application de PMA est exacerbé chez des souris transgéniques sur-exprimant l'Angptl2 dans la peau (K14-Angptl2 Tg) et est quasi indétectable chez des souris déficientes en Angptl2 (Aoi *et al.* 2011). Dans une deuxième étude menée par ce même groupe de chercheurs, l'induction du cancer de la peau dans les souris K14-Angptl2 Tg est significativement atténuée avec la supplémentation de l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) dans l'eau de boisson et ce, tout au long de l'expérience qui a duré 20 semaines (Aoi *et al.* 2014). Ces deux études se complètent



et démontrent que le développement de tumeurs est dépendant de la production de ROS, elle-même directement associée à l'expression de l'Angptl2. L'Angptl2 est donc une protéine pro-inflammatoire, mais également pro-oxydante.

Dans l'objectif de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'impact de l'Angptl2 sur le développement de cancers, l'équipe de Endo *et al.* (Endo *et al.* 2012) a utilisé des lignées cellulaires humaines de cancer du poumon. Ils ont observé que l'Angptl2 est sur-exprimée dans les cellules cancéreuses et que le *knockdown* de son expression via l'utilisation d'un ARN interférent (ARNi) inhibe la formation de métastases (Endo *et al.* 2012). De plus, les chercheurs ont identifié la formation d'un complexe de facteurs de transcriptions NFATc/ATF2/c-Jun, responsable de la transcription de l'Angptl2 (Endo *et al.* 2012). Ces facteurs sont généralement induits par divers stress tels que l'hypoxie, le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique, des conditions généralement présentes dans le microenvironnement du cancer (Hanahan & Weinberg 2011). De plus, l'activation de la voie intégrin  $\alpha 5\beta 1$ /Rac1 par l'Angptl2 produite par les cellules cancéreuses faciliterait la motilité cellulaire tumorale ainsi que l'angiogenèse et de ce fait, favoriserait la formation de métastases (Endo *et al.* 2012). Une récente étude par Odagiri *et al.* (Odagiri *et al.* 2014) rapporte que l'Angptl2, via l'activation de la voie intégrin  $\alpha 5\beta 1$ /p38 MAPK, induit l'expression et l'activité de métalloprotéinases (MMP-1, MMP-9 et MMP-13) nécessaires à la motilité cellulaire, favorisant la formation de métastases dans un modèle d'ostéosarcome (Odagiri *et al.* 2014). Ainsi, ces études démontrent que l'Angptl2 est surexprimée dans différents types de cancers et la signalisation induite par l'Angptl2 produit un environnement prédisposant la formation de métastases (Figure 11). Le rôle de l'Angptl2 est plus connu dans le cancer que dans les autres maladies inflammatoires chroniques telles que les MCV, malgré ses propriétés inflammatoires et oxydantes qui s'appliquent aussi aux cellules et tissus du système cardiovasculaire.



**Figure 11.** Signalisation de l'Angptl2 dans le cancer. L'Angptl2 favorise l'acquisition d'un phénotype métastatique agressif. Sous le stress de l'environnement tumoral et sous le contrôle des facteurs de transcription NFATc, ATF2 et c-Jun, les cellules cancéreuses sécrètent de l'Angptl2. L'Angptl2 induit l'inflammation et la production de ROS, ce qui augmente la susceptibilité des cellules avoisinantes à devenir cancéreuses. Via l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , l'Angptl2 active les voies du facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ; *transforming growth factor- $\beta$* ), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) et p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase*) nécessaires à la motilité cellulaire. L'Angptl2 induit la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS; *reactive oxygen species*), ce qui endommage l'ADN et cause une instabilité génomique et ultérieurement, le développement du cancer. Ainsi, l'Angptl2 favorise la formation de métastases via l'angiogenèse, la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Adapté avec la permission de Elsevier : Trends in Endocrinology & Metabolism, Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y, Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. 25(5):245-54, Copyright (2014).

#### 1.1.2.4.2.3 Rôle de l'Angptl2 dans les maladies cardiovasculaires

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été utilisés afin d'étudier l'implication de l'Angptl2 dans le développement de l'athérosclérose. Tout d'abord, la concentration tissulaire d'Angptl2 aux sites de lésions aortiques et la concentration circulante sont toutes deux augmentées de manière proportionnelle à la sévérité de la maladie dans deux lignées de souris sévèrement dyslipidémiques : les LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB100<sup>+/+</sup> (Farhat *et al.* 2013) ainsi que les ApoE<sup>-/-</sup> (Horio *et al.* 2014). En revanche, les souris double-*knockout* ApoE<sup>-/-</sup>/Angptl2<sup>-/-</sup> exhibent de plus faibles lésions athérosclérotiques et moins de marqueurs inflammatoires comparativement aux simple-*knockout* ApoE<sup>-/-</sup> (Horio *et al.* 2014), ce qui suggère qu'une baisse d'expression de l'Angptl2 prévient ou diminue la formation de plaques athérosclérotiques ainsi que l'environnement inflammatoire. Il est donc logique de prédire qu'une augmentation d'Angptl2 aura des effets délétères sur la maladie. Ceci a été confirmé avec le croisement des souris ApoE<sup>-/-</sup> avec des souris surexprimant l'Angptl2 dans les cellules endothéliales sous le promoteur Tie2 (Tie2-Angptl2 Tg) (Horio *et al.* 2014). En effet, les souris ApoE<sup>-/-</sup>/Tie2-Angptl2 Tg présentent des lésions ainsi qu'un environnement inflammatoire plus importants comparativement à des souris ApoE<sup>-/-</sup> (Horio *et al.* 2014). En accord avec ces observations, des travaux de notre laboratoire avaient simultanément révélé une importante production de facteurs inflammatoires, couplée à une accélération de la formation de plaques athérosclérotiques dans l'aorte de souris LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB100<sup>+/+</sup> à qui une dose d'environ 150 ng/mL d'Angptl2 recombinante était administrée par voie intraveineuse de manière chronique sur une période de 1 mois (Farhat *et al.* 2013). Ces études suggèrent donc que l'Angptl2 promeut l'athérosclérose chez la souris. Chez l'Homme, il a été rapporté que la concentration d'Angptl2 circulante augmente chez des patients coronariens (Tabata *et al.* 2009; Farhat *et al.* 2013; Larouche *et al.* 2015).

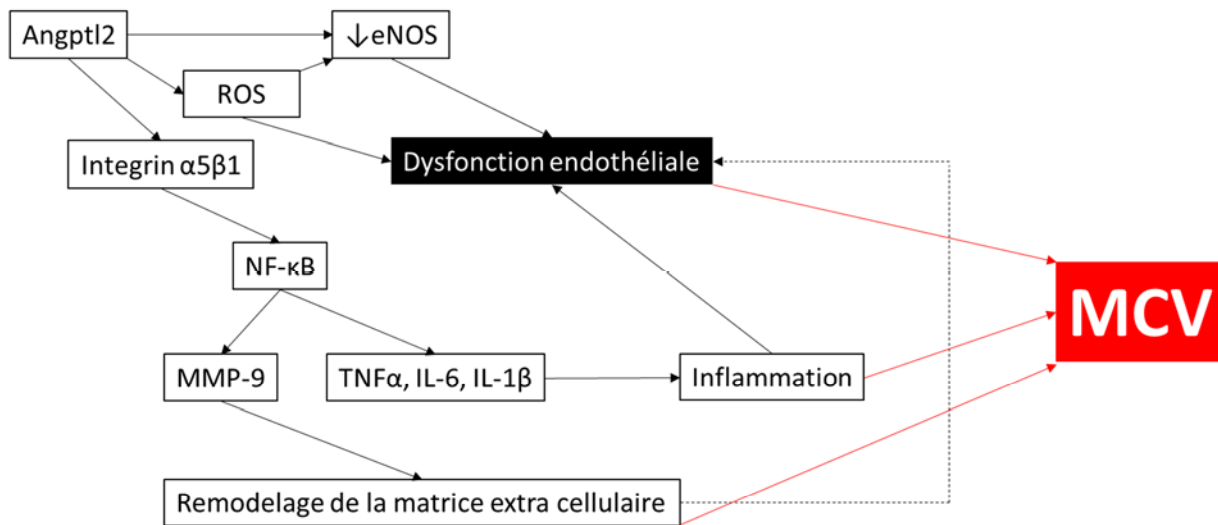
Puisqu'une dysfonction endothéliale et une inflammation vasculaire chronique sont des marqueurs prédictifs pour le développement de l'athérosclérose et autres MCV (Ross 1999), il est important de connaître l'impact de l'Angptl2 sur les cellules endothéliales. Un excès d'Angptl2 serait dommageable pour la fonction endothéliale, puisque d'une part, les souris Tie2-Angptl2 Tg souffrent d'une dysfonction endothéliale, probablement due à une diminution de la production de NO dans l'endothélium (Horio *et al.* 2014). D'autre part, les souris déficientes en Angptl2 sont

moins susceptibles de développer une dysfonction endothéliale suite à une période d'alimentation riche en gras (Horio *et al.* 2014; Yu *et al.* 2014). Finalement, la stimulation de l'artère fémorale de souris avec une dose aiguë d'Angptl2 recombinante (50 nM) induit une dysfonction endothéliale, réversible par la présence de NAC, ce qui est conforme avec les fonctions pro-oxydantes de l'Angptl2 (Yu *et al.* 2014). Une des voies de signalisation potentielles de l'Angptl2 menant à l'inflammation dans les cellules endothéliales serait dépendante du facteur de transcription NF- $\kappa$ B suite à la liaison de l'Angptl2 à l'intégrin  $\alpha 5\beta 1$  : l'activation de NF- $\kappa$ B suite à sa translocalisation dans le noyau a en effet été observée dans des cellules endothéliales en culture suite à une stimulation avec de l'Angptl2 (Tabata *et al.* 2009). Subséquemment, l'Angptl2 stimule l'expression de gènes inflammatoires tels que TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  et les molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et VCAM-1 dans les cellules endothéliales (Farhat *et al.* 2013; Horio *et al.* 2014).

L'inflammation, le stress oxydant et la dysfonction endothéliale engendrés par l'Angptl2 conduisent au développement des MCV (Figure 12). Dans le contexte de l'anévrisme de l'aorte abdominale, Tazume *et al.* (Tazume *et al.* 2012) sont parvenus à détecter l'expression d'Angptl2 dans les macrophages infiltrant les sites de lésion, tant dans des échantillons humains que dans un modèle de souris. Ils ont démontré que l'Angptl2 induit un état inflammatoire chronique, propice au développement de la maladie en plus de favoriser la dégradation de la matrice extracellulaire via la stimulation de MMP-9 (Tazume *et al.* 2012). Cette étude suggère un rôle de l'Angptl2 dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Figure 12).

Nous avons précédemment discuté de l'importance majeure du stress oxydant dans le développement des MCV (section 1.1.1). Des données provenant de notre laboratoire démontrent que l'Angptl2 est pro-oxydant : dans des HUVEC en culture, l'exposition à de l'Angptl2 induit de façon dose-dépendante une production massive et rapide de ROS (données non publiées). D'autre part, la dysfonction endothéliale observée dans les artères cérébrales de souris chroniquement traitées à l'Ang II et qui peut être renversée en présence de NAC, n'est pas observée chez les souris transgéniques Angptl2 *knockdown* (Angptl2 KD) : les souris Angptl2 KD ne développent pas de dysfonction endothéliale en présence d'Ang II (Yu *et al.* 2015). Selon des résultats obtenus dans notre laboratoire, l'Angptl2 simulerait donc directement la production de ROS dans les cellules

endothéliales et l'Angptl2 induirait des dommages oxydants, ce qui aurait comme conséquence la dysfonction endothéliale, état précurseur des MCV (Figure 12). Cependant, le mécanisme impliqué dans la production de ROS en réponse à l'Angptl2 est, à ce jour, inconnu (Aoi *et al.* 2014). La production de ROS en réponse à l'Angptl2 pourrait découler de l'activation de la voie pro-inflammatoire et pro-oxydante NF- $\kappa$ B dans plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales (Tabata *et al.* 2009), les fibroblastes de la membrane synoviale (Okada *et al.* 2010), les kératinocytes (Ogata *et al.* 2012) et les macrophages (Tazume *et al.* 2012). L'infiltration de tissus par des cellules inflammatoires telles que des macrophages et des neutrophiles serait également une source de ROS pro-oxydants facilitée par l'Angptl2 (Aoi *et al.* 2011; Aoi *et al.* 2014). En addition, des résultats provenant de notre laboratoire suggèrent que l'Angptl2 puisse inhiber la voie du *Nuclear factor erythroid 2-related factor* (Nrf2) qui est un facteur de transcription pouvant activer plusieurs gènes antioxydants (données non publiées). Bien que le mécanisme d'induction des ROS par l'Angptl2 ne soit pas clairement défini, une partie de l'explication se trouve certainement dans ces observations.



**Figure 12.** Signalisation de l'Angptl2 en lien avec les MCV. Voies de signalisation proposées pouvant mener à la dysfonction endothéliale et ultimement, au développement de MCV. NF- $\kappa$ B, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; MMP-9, métalloprotéinase matricielle 9 (*matrix metalloproteinase 9*); TNF $\alpha$ , facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ); IL-6, interleukine-

6; IL-1 $\beta$ , interleukine-1 $\beta$ ; eNOS, monoxyde d'azote synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*); ROS, dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*).

Adapté avec la permission de Cambridge University Press : Expert Reviews in Molecular Medicine, Thorin-Trescases N, Thorin E, Angiopoietin-like-2: a multifaceted protein with physiological and pathophysiological properties. 16:e17, Copyright (2014).

En résumé, la surexpression pathologique de l'Angptl2 induit une réponse principalement inflammatoire et oxydante, ce qui contribue au développement de maladies inflammatoires chroniques telles que le cancer, les maladies métaboliques et les MCV. De plus, si l'Angptl2 induit une réponse inflammatoire et produit des ROS, l'inflammation et le stress oxydant favorisent en retour la production d'Angptl2 dans un cercle vicieux qui augmente davantage les effets délétères de l'Angptl2. Plusieurs partenaires moléculaires tels que des récepteurs et des médiateurs en aval et en amont de la signalisation cellulaire de l'Angptl2 commencent à être identifiés, ce qui permet d'apprécier graduellement la complexité de la réponse à l'Angptl2.

#### 1.1.2.4.2.4 L'Angptl2, un biomarqueur?

Puisque l'Angptl2 est une protéine circulante, bon nombre de chercheurs, notre groupe y compris, ont jugé pertinent d'en mesurer la concentration dans le sang de sujets humains en présence de divers contextes pathologiques. La concentration circulante d'Angptl2 mesurée dans le plasma ou le sérum d'individus sains oscille entre environ 1 ng/mL et 3 ng/mL (Thorin-Trescases & Thorin 2014) alors qu'en conditions pathologiques, ces valeurs atteignent en moyenne 3,4 ng/mL chez des patients diabétiques (Tabata *et al.* 2009; Doi *et al.* 2013; Thorin-Trescases & Thorin 2014) et de 4 ng/mL à 6,4 ng/mL chez des patients souffrant de MCV (Oike & Tabata 2009; Farhat *et al.* 2013; Horio *et al.* 2014; Thorin-Trescases & Thorin 2014). Ainsi, plusieurs études rapportent une augmentation de la forme circulante de l'Angptl2 chez des sujets souffrant de diabète de type 2 (Tabata *et al.* 2009; Doi *et al.* 2013; Li *et al.* 2013), de divers cancers (Ide *et al.* 2015; Toiyama *et al.* 2015b; Yoshinaga *et al.* 2015), d'obésité (Muramoto *et al.* 2011) et de MCV (Tabata *et al.* 2009; Farhat *et al.* 2013; Horio *et al.* 2014; Larouche *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015). Bien que la différence de concentration observée entre les cohortes contrôles et les malades est relativement

faible, la concentration d'Angptl2 corrèle de façon robuste avec d'autres marqueurs classiques tels que l'albuminurie dans les pathologies rénales (Li *et al.* 2013; Usui *et al.* 2013), les indices de sévérité de la polyarthrite rhumatoïde DAS28-ESR et DAS28-CRP (Okada *et al.* 2010), le taux de lipoprotéines de haute densité (HDL) et l'évaluation du modèle d'homéostasie de la résistance à l'insuline (HOMA; *homeostasis model assessment of insulin resistance*) chez des individus obèses (Muramoto *et al.* 2011) ainsi que le CRP et HOMA dans une cohorte de japonais diabétiques (Tabata *et al.* 2009). Pour cette raison, l'Angptl2 se démarque comme un biomarqueur inflammatoire potentiel. L'Angptl2 a d'ailleurs été proposée comme marqueur de maladie dans la cohorte de l'*Hisayama Study*, une étude longitudinale d'environ 3 000 participants âgés entre 40 et 79 ans provenant de la population générale de la ville de Hisayama, au Japon (Doi *et al.* 2013; Usui *et al.* 2013). En effet, la concentration circulante d'Angptl2 serait un marqueur du risque de développer le diabète de type 2 (Doi *et al.* 2013), l'insuffisance rénale chronique (Usui *et al.* 2013) et différents types de cancer (Shimura *et al.* 2015; Toiyama *et al.* 2015a; Toiyama *et al.* 2015b; Yoshinaga *et al.* 2015).

Enfin, puisque l'Angptl2 contribue à la pathogénèse et semble être un marqueur robuste du risque et de la sévérité de la maladie, il devient intéressant de cibler l'Angptl2 dans le but de réduire sa concentration à fin thérapeutique. Seules 3 approches cliniques ont démontré une réduction dans la concentration circulante d'Angptl2 chez des patients. D'une part, le traitement de patients diabétiques avec le pioglitazone, un agent antidiabétique, a réduit la concentration plasmatique d'Angptl2 en lien avec une réduction du CRP et de l'indice HOMA (Tabata *et al.* 2009). D'autre part, l'exercice physique a également permis de réduire la concentration circulante d'Angptl2, tel que démontré suite à un programme de 3 mois chez des individus obèses (Muramoto *et al.* 2011) et de manière aiguë chez des patients coronariens (Larouche *et al.* 2015). Finalement, très récemment il a été rapporté qu'un traitement avec l'atorvastatine, une statine, initié juste après un événement d'infarctus cardiaque permettait de réduire d'environ 11% le taux d'Angptl2 circulante (Shimomura *et al.* 2015).

En résumé, l'Angptl2 semble être une cible particulièrement intéressante dans le cadre des MCV de par ses propriétés pro-inflammatoires et pro-oxydantes et sa sensibilité à des approches thérapeutiques simples telles que les statines ou l'exercice physique.

### 1.1.3 La prévention primaire et secondaire des MCV par l'exercice physique

Le lien étroit entre l'exercice physique et la santé a été observé bien avant l'ère de la médecine moderne actuelle; déjà à l'époque de la Grèce antique, les philosophes et physiciens tels qu'Hippocrate, Socrate et Platon louangeaient les bienfaits de l'activité physique (Conti et al. 2007; Tipton 2014). De nos jours, les organismes de santé gouvernementaux ont émis des lignes directrices et des recommandations visant à promouvoir l'activité physique dans la population générale qui est de plus en plus sédentaire. Aux États-Unis, on suggère au moins 150 minutes d'activité modérée ou 75 minutes d'exercice vigoureux par semaine, ou une combinaison des deux (Lavie et al. 2015). Au Canada, la Société canadienne de physiologie de l'exercice (SCPE), avec l'appui de l'Agence de santé publique du Canada, a émis des lignes directrices détaillées afin de promouvoir la santé en fonction de l'âge des individus (Tableau 1) (Tremblay *et al.* 2011; Tremblay *et al.* 2012).

**Tableau 1.** Directives canadiennes en matière d'activité physique fournies par la Société canadienne de physiologie de l'exercice (SCPE).

Âge (années)	Recommandation	Exemples d'activité
< 1	Physiquement actifs plusieurs fois par jour	Jeux interactifs au sol
1-4	180 minutes d'activité physique par jour	Toute activité qui permette de bouger
5-17	60 minutes d'activité physique d'intensité <b>modérée à élevée</b> par jour  Des activités d'intensité élevée au moins trois fois par semaine	Cyclisme, patinage, course, natation
>18	150 minutes d'activité physique d'intensité <b>modérée à élevée</b> par semaine, par séances d'au moins 10 minutes	Marche rapide, cyclisme, jogging, natation, ski de fond

Ces directives décrivent les activités favorisant la santé en fonction de l'âge des individus. L'intensité de l'activité est considérée comme étant modérée lorsque la personne transpire un peu et respire un peu plus fort (effort = 5/10 ou 6/10) alors que l'intensité est considérée élevée lorsqu'il y a essoufflement (effort = 7/10 ou 8/10).



Plus récemment au Québec, la Fédération des omnipraticiens du Québec s'est joint au Grand défi Pierre Lavoie en décembre 2014 dans le but de sensibiliser les Québécois à adopter un mode de vie plus actif. Ceci a donné naissance, en septembre 2015, à un nouveau type de « prescription », les cubes énergie. En effet, les médecins de famille du Québec pourront dorénavant, à l'aide d'ordonnances écrites, prescrire des blocs de 15 minutes d'exercice physique à des patients sédentaires, chez qui l'exercice ne pourrait être que bénéfique.

Les effets bénéfiques de l'exercice physique sur la santé en général sont maintenant indéniables. Un nombre imposant et constamment croissant d'études s'intéresse à des effets mécanistiques spécifiques, tel que l'amélioration de la fonction endothéliale et immunitaire, en lien avec des effets plus généraux, dans le cadre de la prévention et du traitement des MCV et métaboliques (voir section 1.1.3.3 plus bas). L'argument le plus convaincant est que chez l'Homme, l'exercice physique permet de vivre plus longtemps (Lee *et al.* 1995; Gremeaux *et al.* 2012). Les prochains paragraphes auront pour but de décrire les connaissances actuelles sur les bienfaits de l'exercice physique avec un intérêt particulier sur les mécanismes moléculaires, bien que ces derniers ne soient que partiellement compris et insuffisamment documentés.

#### *1.1.3.1 L'exercice physique dans les modèles animaux de MCV*

Les effets de l'exercice chez des animaux sains semble être un sujet de débat, puisque certaines études démontrent une amélioration de la longévité chez des rats mâles et femelles exposés de façon volontaire à une roue d'exercice tout au long de leur vie (Goodrick 1980; Holloszy 1993) contrairement à d'autres qui ne démontrent aucun effet sur la longévité (Holloszy *et al.* 1985). À l'inverse, l'exercice physique produit des effets bénéfiques évidents dans divers modèles animaux de MCV. Chez les souris dyslipidémiques, l'exercice physique pour une durée de 8 (Fukao *et al.* 2010) ou 12 (Meissner *et al.* 2011) semaines diminue significativement la progression de la plaque athérosclérotique sans changement (Fukao *et al.* 2010) ou avec une amélioration du profil lipidique, notamment par une diminution du taux de LDL plasmatique (Meissner *et al.* 2011). Parallèlement, la fonction endothéliale est améliorée (Fukao *et al.* 2010; Langbein *et al.* 2015). Des travaux de notre laboratoire ont pu démontrer que 3 mois de course volontaire permet

d'améliorer la fonction endothéliale des artères cérébrales de souris athérosclérotiques et ce, sans observer d'effets sur la progression de la plaque au niveau de l'aorte (Bolduc *et al.* 2011). Des nuances existent donc par rapport à l'exercice et de ses effets sur la fonction endothéliale et des lésions athéromateuses. L'exercice parvient également à atténuer l'insuffisance cardiaque induite par l'hypertension artérielle pulmonaire dans un modèle de rat, grâce à 2 km de course volontaire par jour en moyenne (Natali *et al.* 2015). Cependant, une autre étude utilisant un modèle de rats spontanément hypertendus et défaillants cardiaques n'a pu reproduire ces effets positifs (Schultz *et al.* 2013). Dans un modèle de défaillance cardiaque induite par une sténose aortique, l'ajout d'une roue d'exercice dans les cages de rats malades a eu pour effets d'améliorer la fonction mitochondriale et le métabolisme énergétique des cellules cardiaques (De Sousa *et al.* 2002).

Au niveau vasculaire, l'exercice améliore la fonction endothéliale en stimulant, via les forces de cisaillement, la relâche de NO (Laurindo *et al.* 1994). La biodisponibilité du NO peut aussi être préservée en diminuant le stress oxydant (Taddei *et al.* 1998). Un exercice volontaire de dix à 14 semaines réduit l'expression de la NADPH oxydase et augmente l'activité de l'antioxydant MnSOD dans l'aorte de souris actives comparativement à des souris sédentaires (Durrant *et al.* 2009). Une diminution dans la production de radicaux libres est également observée dans l'endothélium de souris C57BL6 et ApoE<sup>-/-</sup> lorsque ces souris ont accès à une roue d'exercice (Laufs *et al.* 2005). La défense antioxydante est également stimulée dans le muscle squelettique suite à un programme d'exercice; l'augmentation de l'expression de Gpx (Siu *et al.* 2011) et MnSOD (Geng *et al.* 2010) contribue à conserver l'intégrité du muscle squelettique (Morris *et al.* 2008). Une étude menée par notre laboratoire a tenté de comparer, sur une durée de 9 mois chez la souris, les effets de l'exercice volontaire à la prise d'un antioxydant face au stress métabolique induit par une diète riche en gras; l'ensemble des résultats suggère que l'exercice physique est plus efficace que l'antioxydant pour protéger l'organisme contre le stress métabolique (Leblond *et al.* 2013). Un des mécanismes mis en évidence est la défense antioxydante: les souris ayant fait de l'exercice ont une plus faible activité de la SOD2 comparativement aux souris sédentaires et aux souris supplémentées avec un antioxydant, ce qui suggère une meilleure défense antioxydante endogène puisque la production de O<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seraient inférieurs chez les souris à l'exercice (Leblond *et al.* 2013).

### 1.1.3.2 Les bienfaits de l'activité physique sur la santé humaine

Chez l'humain, l'inactivité physique ou une mauvaise forme physique est un facteur de risque pour le développement de MCV et la mortalité toutes causes confondues. Ceci a été mis en évidence par plusieurs études, notamment l'étude de Framingham, une étude amorcée au milieu du XX<sup>e</sup> siècle ayant pour objectif d'identifier les facteurs pouvant contribuer aux MCV par un suivi des participants sur une période de plusieurs années (Dawber *et al.* 1951). Une des publications issue de cette étude relate que chez des hommes âgés entre 45 et 64 ans, le niveau d'activité physique est directement et négativement corrélé au taux de mortalité non-cardiovasculaire et tend à diminuer la mortalité cardiovasculaire et coronaire (Kannel *et al.* 1986). Selon une étude répartissant 32 421 individus dans 3 catégories en fonction de leur état de santé, un gradient de mortalité est observé à travers les 3 catégories, établissant la faible forme physique comme étant un précurseur important de la mortalité (Blair *et al.* 1996). De même, un suivi de 32 677 sujets d'âge moyen (30-59 ans) sur une période d'environ 20 ans démontre que la participation à des activités physiques intenses (course, jogging, ski, natation) au moins 3 heures par semaine ou des activités modérées (marche, cyclisme, jardinage) au moins 4 heures par semaine est associée à une diminution des MCV et de la mortalité, peu importe le sexe (Barengo *et al.* 2004). L'évaluation longitudinale de la forme physique chez 11 049 hommes sur trois périodes, soit à 45, 55 et 65 ans, démontre également une association entre la forme physique et le risque de mort suite à une MCV (Berry *et al.* 2011). Cette association est accentuée lorsque des facteurs de risque sont présents, ce qui suggère que l'exercice physique est bénéfique chez des gens sains ou malades. Basé sur un suivi de 66 371 individus sans historique de MCV, un groupe de chercheurs du Texas démontre que prendre en compte la forme physique, en plus des facteurs de risque traditionnels (l'âge, le sexe, la pression systolique, la présence de diabète, le cholestérol total et le tabagisme), améliore l'estimation du risque de mortalité cardiovasculaire à court (10 ans) et long terme (25 ans) (Gupta *et al.* 2011). Selon une autre étude réalisée à Taiwan sur 416 175 individus suivis durant 8 ans, une moyenne d'exercice de 92 minutes par semaine ou 15 minutes par jour confère une réduction de 14% du taux de mortalité toutes causes confondues ainsi qu'une espérance de vie plus longue de 3 ans (Wen *et al.* 2011). Chaque période supplémentaire d'exercice de 15 minutes par jour réduit encore le taux de mortalité de 4%, jusqu'à un plateau de 100 minutes par jour au-delà duquel l'exercice additionnel n'apporte plus de bénéfices (Wen *et al.* 2011).

L'évaluation de la sédentarité, au lieu de l'évaluation du degré d'activité physique au quotidien serait une méthode intéressante pour illustrer les conséquences néfastes de l'inactivité physique. C'est l'approche qu'a empruntée l'équipe de Warren *et al* : ils ont suivi 7 744 hommes âgés entre 20 et 89 ans de 1982 à 2003 en recensant le nombre d'heures passées par semaine à regarder la télévision et à conduire une voiture. Les chercheurs rapportent que l'utilisation de la voiture pendant plus de 10 heures/semaine représente un risque de mort occasionné par une MCV 82% plus élevé par rapport à une utilisation de moins de 4 heures/semaine (Warren *et al.* 2010). Chez les individus avec plus de 23 heures/semaine d'activités sédentaires combinées (voiture + télévision), le risque est de 64% supérieur comparativement à ceux s'adonnant à ces activités pour moins de 11 heures/semaine (Warren *et al.* 2010). Ces études démontrent donc que suite à une évaluation de l'inactivité physique, qui reflète indirectement le niveau d'activité physique atteint quotidiennement, il est possible de prédire la santé cardiovasculaire et le risque de mort liée aux MCV.

Outre le système cardiovasculaire, les fonctions cognitives peuvent également être améliorées par la pratique quotidienne de l'activité physique (Gill *et al.* 2015). En effet, selon une étude sur 226 participants âgés de 66 ans en moyenne, le degré d'activité physique au quotidien est associé à une meilleure fonction cognitive en lien avec une meilleure fonction cérébrovasculaire et ce, en prenant en considération l'activité physique durant le jeune âge (entre 0 et 20 ans), l'âge adulte (entre 21 et 35 ans) ou l'ensemble de la vie (Gill *et al.* 2015). Cette étude démontre donc qu'une vie active se traduit par des bénéfices cognitifs à long terme possiblement associés à une meilleure fonction cérébrovasculaire (Gill *et al.* 2015). L'inactivité physique serait également un facteur important dans l'incidence de cancers (Lahart *et al.* 2015). C'est ce que démontre une méta-analyse regroupant 22 études et 123 574 sujets suivis sur une période de 4,3 à 12,7 ans : l'activité physique est inversement associée à l'incidence du cancer du sein, les décès liés au cancer et les décès toutes causes confondues (Lahart *et al.* 2015).

### *1.1.3.3 L'exercice physique comme approche thérapeutique*

Lorsqu'on a commencé à se rendre compte que l'inactivité physique pouvait être très néfaste pour la santé cardiovasculaire, la question du potentiel thérapeutique de l'exercice physique chez des patients atteints de MCV, pour qui l'exercice ou l'effort physique en général n'était autrefois pas conseillé, est devenue de plus en plus pertinente. De ce fait, on observe une amélioration rapide de la santé cardiovasculaire chez des patients souffrant de MCV après l'adoption d'un programme d'activité physique. Parmi les pionniers dans ce domaine, on peut noter les études de Kavanagh *et al.*, qui ont démontré, en 1973, que les patients coronariens suivant un programme d'exercice physique de réhabilitation récupéraient des fonctions cardiovasculaires normales et pouvaient résumer leur tâches habituelles plus rapidement que ceux n'ayant pas suivi le programme de réhabilitation (Kavanagh & Shephard 1973; Kavanagh *et al.* 1973). Plus récemment, des études à grande échelle permettent de caractériser avec plus de précision et de manière plus détaillée les bienfaits de l'exercice physique chez des individus malades, insuffisamment actifs ou inactifs. Une méta-analyse de 48 études, englobant 8 940 patients atteints de maladie coronaire et dont le suivi de rémission s'étale sur au moins 6 mois, confirme que l'inclusion de l'exercice physique dans le programme de réhabilitation est bénéfique si l'on considère le nombre de décès (Taylor *et al.* 2004). Des résultats similaires ont été observés chez des patients avec un syndrome coronarien aigu (Chow *et al.* 2010) ou une défaillance cardiaque chronique (Piepoli *et al.* 2004). Dans le contexte pathologique, l'exercice physique cause une panoplie de changements systémiques pouvant expliquer l'amélioration du pronostic des maladies. Au niveau des artères coronaires, l'exercice réduit l'athérosclérose (Ornish *et al.* 1990; Schuler *et al.* 1992) et améliore la fonction endothéliale (Laughlin *et al.* 2012). Un programme d'exercice atténue le remodelage du ventricule gauche chez des défailants cardiaques (Hambrecht *et al.* 2000; Haykowsky *et al.* 2007) ou suite à un infarctus du myocarde, surtout s'il est initié dans la semaine suivant l'événement (Haykowsky *et al.* 2011).

#### *1.1.3.3.1 L'exercice physique : les paramètres à considérer*

La comparaison des différentes études sur les effets de l'exercice physique est une tâche complexe compte tenu de la grande variété au niveau des divers paramètres à considérer tels que le type de sujets, le type d'exercice, la durée du programme d'exercice et l'intensité de l'effort physique. Par

exemple, une disparité dans les effets observés entre les différents types d'exercices serait explicable par la durée de l'exercice : l'exercice aigu induit une réponse inflammatoire aiguë similaire à une infection, alors que l'exercice pratiqué de manière chronique diminue les marqueurs inflammatoires (Gleeson 2007; Lara Fernandes *et al.* 2011). Une disparité existe également entre les effets bénéfiques engendrés en fonction de l'intensité de l'effort physique. Ceci est démontré par plusieurs études comparant un programme traditionnel d'exercice continu d'intensité modérée à un programme d'entraînement par intervalles à intensité élevée, où il semble que l'exercice à haute intensité soit plus efficace dans la prévention secondaire des MCV (Rognmo *et al.* 2004; Warburton *et al.* 2005; Wisloff *et al.* 2007). En effet, suite à un programme de 16 semaines, la capacité physique de patients coronariens, évaluée par le temps passé sur un tapis roulant avant d'atteindre l'épuisement, a été améliorée davantage suite à un entraînement à haute intensité que suite à un programme d'intensité modérée (Warburton *et al.* 2005). Une observation similaire a été rapportée sur des patients coronariens pour lesquels l'indice de consommation d'oxygène maximale ( $VO_2\text{max}$ ) a été augmentée de 17.9% suite à un programme d'entraînement de 10 semaines à intensité élevée comparativement à une augmentation de seulement 7.9% suite à un programme d'intensité modérée de même durée (Rognmo *et al.* 2004). Des différences importantes ont également été observées entre les deux types d'entraînement chez des patients souffrant de défaillance cardiaque : suite à 12 semaines d'entraînement, les sujets s'entraînant à haute intensité ont amélioré leur  $VO_2\text{max}$  de 46% comparativement à 14% (Wisloff *et al.* 2007). De plus, les volumes télédiastolique et télésystolique du ventricule gauche ont été réduits (de 18% et 25%, respectivement) uniquement suite à un entraînement à haute intensité, résultant en une augmentation de 35% du volume d'éjection, ce qui représente une amélioration significative de la fonction ventriculaire gauche (Wisloff *et al.* 2007). La fonction endothéliale de l'artère brachiale a également été améliorée par les deux types d'entraînement, mais de manière plus importante suite à l'exercice à intensité élevée (Wisloff *et al.* 2007). Des études plus approfondies seront nécessaires afin de comprendre les mécanismes associés aux effets bénéfiques de l'exercice physique.

#### 1.1.3.3.2 L'exercice physique améliore la fonction endothéliale

L'exercice physique permet la préservation de la fonction endothéliale en réponse à un stress. Deux études ont observé l'effet d'un événement hypertenseur aigu sur la fonction vasculaire chez des individus actifs et des individus sédentaires (Jurva *et al.* 2006; Phillips *et al.* 2011). Chez les individus physiquement actifs, haltérophiles et adeptes de course à pied, la dilatation induite par le flux (FMD; *flow mediated dilation*) de l'artère brachiale n'est pas affectée (Jurva *et al.* 2006) ou même améliorée (Phillips *et al.* 2011) en réponse à une hypertension aiguë induite par une séance de poids et haltères. En revanche, la FMD chez des individus sédentaires est diminuée en réponse à ce même stress (Jurva *et al.* 2006; Phillips *et al.* 2011). Ces études suggèrent que le conditionnement physique protège la fonction endothéliale, notamment face à l'hypertension, ce qui représente une approche thérapeutique intéressante dans la prévention primaire des MCV. En plus de protéger la fonction endothéliale, l'exercice physique permet également de l'améliorer : un programme chronique d'exercice d'une durée de 10 semaines a amélioré la dilatation de l'artère brachiale dépendante de l'endothélium de jeunes adultes de 17 à 24 ans avec une fonction cardiopulmonaire moyenne (Clarkson *et al.* 1999). Un programme de 3 mois d'exercice chez des sujets sédentaires et en santé âgés de 50 à 76 ans a permis de restaurer la fonction endothéliale à un niveau équivalent de jeunes adultes (22 à 35 ans) actifs et en santé (DeSouza *et al.* 2000). Il est également possible que la fonction endothéliale ne varie pas en réponse à l'exercice tel que démontré chez des sujets sédentaires, pour qui un programme d'exercice de 8 semaines a généré des bienfaits sur la santé tels qu'une diminution du rythme cardiaque et de la pression artérielle, une augmentation de la force musculaire et un amincissement du tour de taille, sans toutefois être accompagnés d'une amélioration de la fonction endothéliale (Maiorana *et al.* 2001).

En contexte pathologique, l'exercice contribue à la récupération de la fonction endothéliale. En effet, suite à un programme de 12 mois consistant en 3 séances hebdomadaires de vélo, une amélioration de la fonction endothéliale (jusqu'à 34%) a été observée chez 200 patients coronariens (Conraads *et al.* 2015). La dysfonction endothéliale liée à la hausse de pression peut également être renversée chez des patients hypertendus (Collier *et al.* 2008), un effet imputable à une meilleure biodisponibilité du NO (Maeda *et al.* 2004).

En résumé, ces études démontrent que les effets de l'exercice varient selon le groupe de sujets étudiés en fonction de leur condition physique et qu'il est possible d'améliorer la fonction endothéliale selon la mesure de la dilatation induite par le débit au repos. Ces bénéfices observés sur la fonction endothéliale seraient, du moins en partie, attribuables à des mécanismes anti-inflammatoires et antioxydants augmentant localement la bio-disponibilité du NO.

#### 1.1.3.3.3 Les effets anti-inflammatoires de l'exercice physique

L'exercice physique diminue les marqueurs inflammatoires classiques chez des patients atteints de MCV. Pour ne citer que quelques études, les marqueurs inflammatoires CRP et IL-6 sont diminués chez des patients coronariens suite à un programme d'entraînement de 12 semaines (Goldhammer *et al.* 2005) ou suite à 2 ans d'exercice régulier (Walther *et al.* 2008) et le CRP est diminué chez des hommes et femmes souffrant de maladie coronarienne suite à un programme de 12 semaines de réhabilitation cardiaque par l'exercice (Caulin-Glaser *et al.* 2005). Une étude, incluant 13 748 participants issus de la population générale des États-Unis, rapporte que la concentration de CRP diminue en lien avec le niveau d'activité physique durant le mois précédant la prise de l'échantillon de sang (Ford 2002). Alors que ces études s'intéressent à l'effet à long terme de l'exercice, un article de revue s'est penché à la fois sur les effets aigus et les effets chroniques de l'exercice physique (Kasapis & Thompson 2005). L'exercice physique chronique est associé à une diminution du CRP, tant dans les études observationnelles où le niveau d'activité physique des participants est évalué, que dans les études prospectives où un programme d'entraînement est initié et les participants sont suivis sur une période  $\geq 3$  mois (Kasapis & Thompson 2005). Une réponse aiguë à la fois inflammatoire et anti-inflammatoire est activée en réponse à un effort physique éprouvant tel qu'une course d'endurance : la production des marqueurs inflammatoires CRP, IL-1 et IL-6 augmente (Kasapis & Thompson 2005). Simultanément à cette réponse inflammatoire aiguë, une réponse opposée est également activée, caractérisée par une augmentation de divers médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-8 pro-inflammatoire, l'IL-10 et l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1ra), ainsi qu'une diminution des molécules d'adhésion leucocytaires, les intégrines beta-1 et 2 (Kasapis & Thompson 2005). Les voies signalétiques impliquées dans ces réponses pro- et anti-inflammatoires restent à être clairement définies.



Certains mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets anti-inflammatoires de l'exercice physique chronique. L'exercice physique peut induire une augmentation de la production et de la relâche d'IL-6 par le muscle squelettique de plus de 100 fois et contribue majoritairement à l'augmentation d'IL-6 circulante (Ostrowski *et al.* 1998; Ostrowski *et al.* 1999; Fischer 2006). Suite à cette augmentation transitoire, l'IL-6 induit la production des médiateurs anti-inflammatoires IL-10 et IL-1ra par les leucocytes, inhibant ainsi la cascade signalétique inflammatoire de TNF- $\alpha$  (You *et al.* 2013). Au niveau du tissu adipeux, l'exercice physique diminue la production de cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-12, en plus d'augmenter l'expression de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-10 (You *et al.* 2013). L'exercice diminue également l'hypoxie et l'état inflammatoire associé à celle-ci en favorisant la circulation sanguine dans le tissu adipeux via des mécanismes d'angiogenèse impliquant le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF; *vascular endothelial growth factor*) (You *et al.* 2013). Concernant les cellules endothéliales, il a été démontré que l'exercice augmente le nombre de cellules progénitrices endothéliales circulantes dérivées de la moelle osseuse qui sont capables de régénérer l'endothélium lorsqu'il est endommagé (You *et al.* 2013). De plus, l'exposition des cellules endothéliales à l'augmentation du flux sanguin induit par l'exercice diminue l'expression des molécules d'adhésion, telles que VCAM-1, ce qui diminue le recrutement et l'infiltration des leucocytes dans la paroi vasculaire, réduisant ainsi la réponse inflammatoire locale (You *et al.* 2013). Finalement, l'exercice diminue la production de cytokines pro-inflammatoires par divers mécanismes impliquant les cellules immunitaires : l'exercice réprime l'expression des récepteurs de type Toll (TLR; *Toll-like receptors*) dont l'activation est liée à la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes, réduit le nombre de monocytes pro-inflammatoires et augmente le nombre de lymphocytes T régulateurs qui libèrent des cytokines anti-inflammatoires et réduisent l'inflammation chronique (You *et al.* 2013). Ces mécanismes proposés démontrent des cibles spécifiques de l'exercice sur la réponse inflammatoire, mais il est important de noter que l'exercice induit également des effets sur un médiateur général de l'inflammation, le stress oxydant.

#### 1.1.3.3.4 Les effets antioxydants de l'exercice physique

Outre les bénéfices anti-inflammatoires d'un entraînement physique, l'exercice diminue également le stress oxydant. Le stress oxydant global, évalué par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS; *Thiobarbituric acid reactive substances*) formées par la peroxydation lipidique, diminue chez des individus obèses suite à un programme d'entraînement de 6 mois (Oh *et al.* 2013; Huang *et al.* 2015). Le stress oxydant localisé dans le muscle lisse et systémique, mesuré par les produits de la peroxydation lipidique 4-HNE et 8-isoprostane, a également été diminué suite à 3 mois d'exercice physique chez des individus obèses (Samjoo *et al.* 2013). Dans une étude chez des individus âgés ( $\geq 60$  ans), l'activité physique quotidienne, mesurée par un accéléromètre sur une période de 5 jours, est associée à une diminution de TBARS (Fraile-Bermudez *et al.* 2015). Ces études démontrent donc que l'exercice physique, pratiqué de façon chronique, permet de réduire le stress oxydant de manière globale. Cependant, l'effort physique induit également une réponse oxydative aiguë, causée par l'augmentation de l'activité métabolique, libérant des espèces radicalaires dérivées du métabolisme énergétique (Morales-Alamo & Calbet 2014). Par exemple, la mesure de l'état oxydatif total dans le plasma révèle une augmentation d'espèces radicalaires suite à un match de soccer, tant chez des joueurs masculins (Ascensao *et al.* 2008) que féminins (Gravina *et al.* 2011). Une réaction similaire est observée suite à une épreuve de sprint (Morales-Alamo & Calbet 2014). Il semblerait que cette relâche aiguë de radicaux libres puisse stimuler des défenses antioxydantes endogènes et ce mécanisme serait à la base d'une meilleure résistance au stress oxydant observée à long terme.

Les deux principales voies de signalisation considérées comme étant les plus importantes dans la réponse au stress oxydant sont celles du NF- $\kappa$ B et des MAPK qui, en réponse à une stimulation par les ROS, peuvent induire l'expression d'enzymes antioxydantes (Ji *et al.* 2006; Ji 2007; Ji 2008). Il est bien documenté que dans le muscle squelettique, l'expression des enzymes SOD et Gpx est augmentée par l'exercice physique de manière dépendante de l'intensité de l'effort physique, démontrant que ces enzymes antioxydantes sont impliquées dans la réponse adaptative du muscle suite à une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ji 2007; Ji 2008; Radak *et al.* 2008). Au niveau vasculaire, les cellules endothéliales prélevées à partir de l'artère brachiale de sujets âgés et sédentaires expriment de manière plus importante la sous-unité

p47 de la NOX, associée à la production de ROS, alors que l'expression de MnSOD dans les cellules endothéliales ainsi que son activité dans le plasma sont supérieures chez les sujets actifs (Pierce *et al.* 2011). La détoxification des ROS par une stimulation des SOD combinée à une diminution de la production de ROS par l'inhibition des sous-unités de la Nox représentent un mécanisme important du maintien de l'équilibre rédox dépendant de l'exercice dans les cellules vasculaires (Kojda & Hambrecht 2005). Les propriétés antioxydantes de l'exercice physique sont également observées dans la circulation sanguine dans diverses populations participant à un programme d'entraînement. Chez des femmes obèses, 6 mois d'entraînement induisent une augmentation de l'activité des enzymes SOD et Gpx (Shin *et al.* 2008). De plus, l'activité de la Gpx et de la catalase est corrélée avec le degré d'activité physique quotidien chez des personnes âgées (Fraile-Bermudez *et al.* 2015). L'exercice physique induit donc initialement une relâche de ROS qui stimule l'expression de diverses enzymes antioxydantes, ce qui favorise le maintien de l'équilibre rédox à long terme.

En conclusion, les MCV sont caractérisées par un environnement pro-inflammatoire et pro-oxydant causé par un déséquilibre dans l'expression de divers médiateurs parfois impliqués à la fois dans des voies de signalisation inflammatoires et oxydantes, ce qui démontre la synergie existant entre ces deux mécanismes pathogéniques. L'exercice physique est une approche thérapeutique efficace dans la prévention primaire et secondaire des MCV, dû à ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes à long terme.

## 1.2 L'épigénétique des MCV

L'environnement joue un rôle indéniable dans le développement et la progression des MCV : l'exposition à des facteurs de risque tels que la sédentarité, une nutrition hypercalorique, la dyslipidémie, le tabagisme, l'hypertension et le diabète sont directement liés à une plus grande incidence de MCV. Ces stimulations extracellulaires engendrent des changements moléculaires jusque dans l'ADN qui se traduisent par des changements fonctionnels et phénotypiques. L'épigénétique est ainsi impliquée dans l'orchestration des différents mécanismes moléculaires conduisant au phénotype observé.

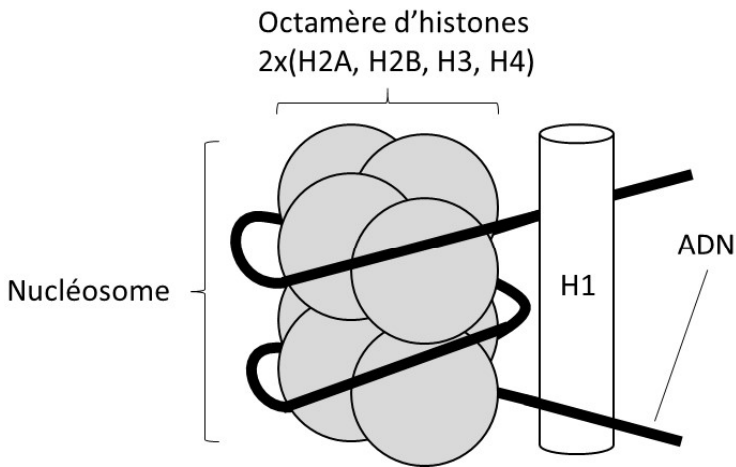
### 1.2.1 Définition de l'épigénétique

Durant le milieu du XX<sup>e</sup> siècle, le biologiste Conrad Hal Waddington étudiait l'apparition et la transmission de traits phénotypiques en réponse à des changements environnementaux (Waddington 1959), concept qu'il baptisa épigénétique, utilisant le préfixe grec épi- (επί-) signifiant par-dessus ou sur. Cette définition a évolué durant plusieurs décennies pour atteindre le consensus actuel qui définit un trait épigénétique comme un phénotype héréditaire résultant de changements dans le chromosome sans altération dans la séquence de nucléotides (Berger *et al.* 2009). Les mécanismes épigénétiques ont pour effet de moduler la conformation de l'ADN avec les protéines y interagissant, structure appelée chromatine. Lorsqu'on fait référence à la structure de la chromatine, il existe deux conformations : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine est la forme ouverte et transcriptionnellement active, favorable au recrutement des facteurs de transcription. À l'opposé, l'hétérochromatine est la forme répressive de la chromatine, dense et fermée, elle empêche la liaison des facteurs de transcription (Sexton *et al.* 2007; Fedorova & Zink 2008).

La transition entre les deux états de la chromatine est un processus dynamique orchestré par trois principaux mécanismes : la modification post-traductionnelle des histones, les longs ARN non-codants et la méthylation de l'ADN.

### 1.2.1.1 La modification post-traductionnelle des histones

Les histones sont les protéines autour desquelles s'enroule l'ADN par séquences de 146 pb pour former les nucléosomes, sous-unités de la chromatine. Plus précisément, le cœur des nucléosomes est constitué d'un octamère d'histones composé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 (Kornberg & Lorch 1999). L'histone de liaison H1 permet l'organisation de ces nucléosomes pour former les chromosomes (Figure 13). Structuellement parlant, les nucléosomes se caractérisent par une forme globulaire présentant à leur surface une chaîne flexible appelée « queue de l'histone » (Luger *et al.* 1997). Ces domaines font l'objet de diverses modifications post-traductionnelles ayant pour effet d'altérer l'affinité des histones envers l'ADN et divers complexes protéiques contrôlant ainsi l'activité transcriptionnelle (Allfrey & Mirsky 1964). Ces modifications incluent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation et autres (Strahl & Allis 2000; Biel *et al.* 2005; Tan *et al.* 2011). Cependant, seules l'acétylation et la méthylation des histones seront discutées, puisqu'elles sont les modifications les plus étudiées et les mieux caractérisées, particulièrement dans des contextes pathologiques.



**Figure 13.** Composition d'un nucléosome : 146 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones avec une histone de liaison (H1) permettant de lier les nucléosomes entre eux.

### 1.2.1.1.1 L'acétylation des histones

Les histone acetyltransférases (HAT) sont responsables de l'ajout d'un groupement acétyle sur les résidus lysine (K) situés dans l'extrémité N-terminale de la queue de l'histone (Kurdistani & Grunstein 2003). Inversement, les histone déacétylases (HDAC) se chargent du clivage de ce groupement acétyle (Kurdistani & Grunstein 2003). L'impact de l'acétylation des histones sur l'activité transcriptionnelle se fait par deux mécanismes. D'abord, l'ajout d'un groupement acétyle chargé négativement annule la charge positive des lysines et diminue donc l'affinité des histones avec l'ADN, ce qui favorise l'ouverture de l'ADN, un arrangement propre à l'euchromatine et favorable au recrutement et à la liaison des facteurs de transcription (Vidali *et al.* 1968). Ensuite, il a été postulé que l'acétylation de la queue de l'histone agit comme site d'ancrage facilitant les interactions protéine-protéine et, puisque ce domaine émerge du noyau de l'histone, il devient un site favorable au recrutement des facteurs de transcription (Dhalluin *et al.* 1999; Cheung *et al.* 2000).

L'expression de certains gènes inflammatoires peut être favorisée par l'acétylation des histones et un déséquilibre à ce niveau participerait au développement de maladies inflammatoires chroniques telles que les MCV (Gillette & Hill 2015; Yiew *et al.* 2015). À titre d'exemple, le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B peut être régulé par ce mécanisme d'acétylation. En effet, la perte d'expression de HDAC augmente le niveau d'acétylation du résidu lysine 9 de l'histone 3 (H3K9) situé au niveau du promoteur des gènes ciblés par NF- $\kappa$ B, ce qui augmente l'activité de ce dernier et déclenche la cascade de signalisation pro-inflammatoire subséquente. Cette cascade favorise *in vitro* la sénescence cellulaire prématurée dans différentes lignées cellulaires humaines dont des cellules embryonnaires rénales 293T et des cellules HeLa (Kawahara *et al.* 2009). Cette cascade favorise également le développement de la maladie pulmonaire obstructive chronique, une maladie inflammatoire du poumon (Barnes *et al.* 2005). Le gène de la eNOS est également soumis à un mécanisme d'acétylation des histones : en condition d'hypoxie, une diminution globale de l'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du promoteur de son gène *NOS3* a été observée (Fish *et al.* 2010), ce qui induit une diminution de l'expression de la eNOS et qui se traduit par une dysfonction endothéliale, un état précurseur au développement des MCV (McQuillan *et al.* 1994).

Les HAT et HDAC, enzymes respectivement responsables de l'acétylation et de la déacétylation des histones, font présentement l'objet d'études évaluant leur potentiel thérapeutique. Par exemple, l'inhibition des HAT par le curcumin, un polyphénol naturel, produit des effets prometteurs contre le cancer du sein en inhibant la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose via l'inactivation des voies des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et la protéine activatrice-1 (AP-1; *activator protein-1*) (Bachmeier *et al.* 2007). Le curcumin permet également de prévenir la défaillance cardiaque chez le rat en inhibant le recrutement du facteur de transcription GATA4 dans le cardiomyocyte, prévenant ainsi le déclenchement des voies de signalisation menant au remodelage du myocarde (Morimoto *et al.* 2008). D'autre part, l'inhibition des HDAC est une stratégie exploitée particulièrement dans le traitement de cancers, dans le but d'induire l'apoptose et de sensibiliser les cellules cancéreuses à d'autres médicaments, ce qui a valu une approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement du lymphome T cutané par l'acide suberanilohydroxamique (SAHA; Vorinostat®) (Mann *et al.* 2007). L'inhibition des HDAC produit également des effets anti-inflammatoires dans des modèles animaux de colite via la diminution de la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Felice *et al.* 2015). Finalement, de récents travaux soulignent le potentiel anti-athérogénique des inhibiteurs des HDAC via l'inhibition de l'activation des macrophages M1 reflétée par une diminution de la production de TNF- $\alpha$  et IL-6 (Van den Bossche *et al.* 2014).

#### 1.2.1.1.2 La méthylation des histones

La méthylation des histones se trouve sur les résidus lysines et bien qu'elle puisse être observée ailleurs (histidines, arginines), la méthylation sur les lysines (K) des histones H3 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 et H3K79) et H4 (H4K20) sont les plus couramment étudiées et les mieux caractérisées (Taverna *et al.* 2007). Au même titre que les autres modifications post-traductionnelles apportées aux histones, la méthylation permet de réguler l'état de condensation de la chromatine et l'expression de ses gènes (Taverna *et al.* 2007). Initialement considérée comme étant une marque permanente (Byvoet *et al.* 1972), la méthylation des histones est un processus réversible et dynamique (Zee *et al.* 2010). La méthylation des lysines est assurée par deux familles d'histone lysine méthyltransférases (HKMT) : les protéines comprenant un domaine SET (*SET-*

*domain-containing proteins*) (Rea *et al.* 2000) et les protéines DOT1-like (*DOT1-like proteins*) (Feng *et al.* 2002). Il est important de noter qu'il existe trois degrés de méthylation : les résidus lysines peuvent être soit mono-méthylés (me1), di-méthylés (me2) ou tri-méthylés (me3). Les histone déméthylases comportent également deux classes d'enzymes distinctes : les amine oxydases (Shi *et al.* 2004) et les dioxygénases comprenant un domaine JmjC (*jumonji C (JmjC)-domain-containing, iron-dependent dioxygenases*) (Tsukada *et al.* 2006). Les effets de la méthylation sur l'activité transcriptionnelle nécessitent le recrutement de diverses protéines liant le groupement méthyle et ce recrutement est favorisé par la charge positive et l'hydrophobicité apportées par le ou les groupements méthyles (Nielsen *et al.* 2002). De ce fait, il n'est pas possible, en regardant uniquement le type de méthylation, de prédire avec certitude si l'effet de la méthylation des histones sur la transcription sera une stimulation ou une inhibition; il est crucial d'identifier la nature des protéines recrutées, ce qui dépend du contexte. Prenons comme exemple la triméthylation du résidu lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) : cette empreinte est généralement associée avec des gènes constitutivement actifs (Santos-Rosa *et al.* 2002). Cependant, cette même empreinte peut également être inhibitrice après le recrutement d'un complexe protéique répresseur comprenant la famille des inhibiteurs de croissance ING (*inhibitor of growth*) en réponse aux dommages à l'ADN dans le but de bloquer l'expression de gènes de prolifération (Shi *et al.* 2006).

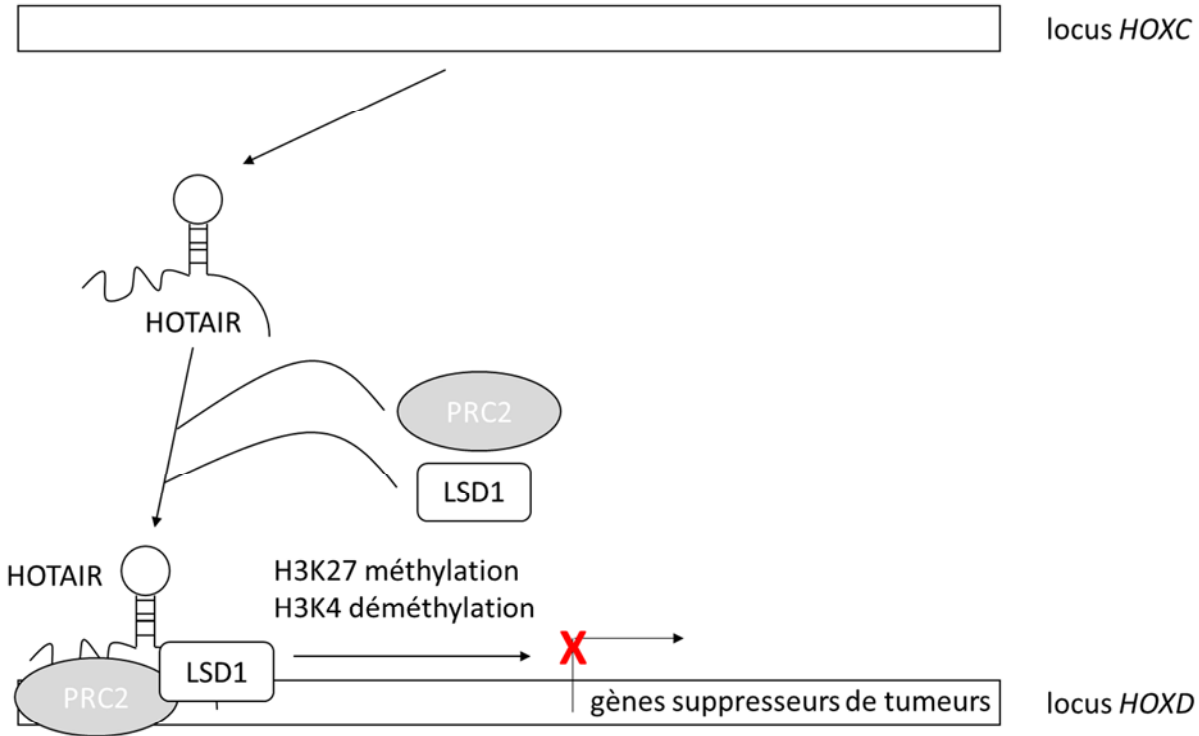
On observe l'implication de la méthylation des histones dans divers mécanismes physiologiques incluant la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, le développement et la différenciation cellulaire (Greer & Shi 2012). Il n'est donc pas surprenant de découvrir que lorsque ces mécanismes sont dérégulés dans des contextes pathologiques, on détecte en parallèle une altération dans la méthylation des histones. Bien que ce lien soit largement documenté dans diverses formes de cancer chez l'humain, telles que la leucémie et le cancer du sein et de la prostate (Chi *et al.* 2010), l'implication de la méthylation des histones dans le contexte inflammatoire des MCV est encore peu étudiée. Une étude récente démontre cependant que l'exposition de macrophages à des LDL oxydées promeut l'apparition de H3K4me3 au niveau du promoteur de gènes inflammatoires tels que TNF- $\alpha$  et IL-6 (Bekkering *et al.* 2014). De plus, il est possible de prévenir la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages à l'aide d'un inhibiteur des histones méthyltransférases (Van den Bossche *et al.* 2014).



### 1.2.1.2 Les longs ARN non-codants

Faisant partie de la grande famille des ARN non-codants, les longs ARN non-codants (lncRNA; *long non-coding RNA*) se définissent par leur taille; les ARN non-codants de moins de 200 nucléotides sont appelés petits ARN non-codants (sncRNA; *small non-coding RNA*) et ceux supérieurs à 200 nucléotides sont les lncRNA (Perkel 2013). À ce jour, la base de données lncRNADB (<http://www.lncrnadb.org/>) répertorie 293 lncRNA dont 181 ont été identifiés chez l'humain (Quek *et al.* 2015).

Le mode d'action des lncRNA n'est pas entièrement bien défini, mais selon les connaissances actuelles, le mécanisme postulé est que les lncRNA recrutent et ciblent les régions désirées des complexes protéiques eux-mêmes responsables du remodelage de la chromatine (Khalil *et al.* 2009). Un exemple du mode d'action de ce mécanisme est le lncRNA ARN anti-sens intergénique de *HOX* (HOTAIR; *HOX Antisense Intergenic RNA*) impliqué dans la formation de métastases, particulièrement dans le cancer du sein où son expression est jusqu'à 2 000 fois plus élevée que dans des cellules normales (Gupta *et al.* 2010). Cette surexpression de HOTAIR est corrélée avec l'incidence de métastases et un faible taux de survie, établissant un lien entre ce lncRNA et la progression du cancer (Gupta *et al.* 2010). Généré à partir du locus *HOXC* situé dans le chromosome 12, HOTAIR permet de définir les régions inactives de la chromatine, notamment le locus *HOXD* localisé dans le chromosome 2, via le recrutement du complexe protéique répresseur *polycomb repressive complex 2* (PRC2) et la déméthylase spécifique à la lysine 1A (LSD1; *lysine (K)-specific demethylase 1A*) permettant des modifications épigénétiques via la méthylation de H3K27 et la déméthylation de H3K4me2, respectivement (Tsai *et al.* 2010; Gibb *et al.* 2011). La région de 40 kb ciblée par ce mécanisme d'inhibition de l'expression (Gupta *et al.* 2010) code pour un ensemble de gènes suppresseurs de tumeurs appelés gènes Hox (Shah & Sukumar 2010; Gibb *et al.* 2011). Bien que les mécanismes responsables de l'activation de HOTAIR restent à être élucidés, il est évident que HOTAIR promeut la formation de métastases en régulant l'expression génique via une altération de la chromatine (Gibb *et al.* 2011) (Figure 14).



**Figure 14.** Mécanisme d'action proposé de l'ARN long non codant (lncRNA; *long non coding RNA*) *HOX Antisense Intergenic RNA* (HOTAIR) impliqué dans la formation de tumeurs. Synthétisé à partir du locus *HOXC*, HOTAIR recrute le complexe *polycomb repressive complex 2* (PRC2) et la déméthylase spécifique à la lysine (K) 1A (LSD1; *lysine (K)-specific demethylase 1A*) vers une région de 40 kb dans le locus *HOXD*. Les gènes suppresseurs de tumeurs localisés dans *HOXD* sont par la suite réprimés par la méthylation de H3K27 et la déméthylation de H3K4.

Adapté de BioMed Central Ltd : Molecular Cancer, Gibb EA, Brown CJ, Lam WL, The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. 10:38, Copyright (2011).

Bien que les mécanismes moléculaires restent à être clairement élucidés, des études récentes démontrent une corrélation entre l'expression de divers lncRNA avec les MCV telles que l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, la défaillance cardiaque, l'hypertension and les anévrismes (Jiang & Ning 2015; Rizki & Boyer 2015; Uchida & Dimmeler 2015). Parmi les lncRNA, notons l'implication du lncRNA ANRIL dans la progression de l'athérosclérose via la stimulation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes delta (PPAR $\delta$ ; *peroxisome proliferator-activated receptor*) et dans la réponse inflammatoire, tels que l'IL-1 $\alpha$  (Congrains *et al.* 2012). Un mécanisme similaire à celui

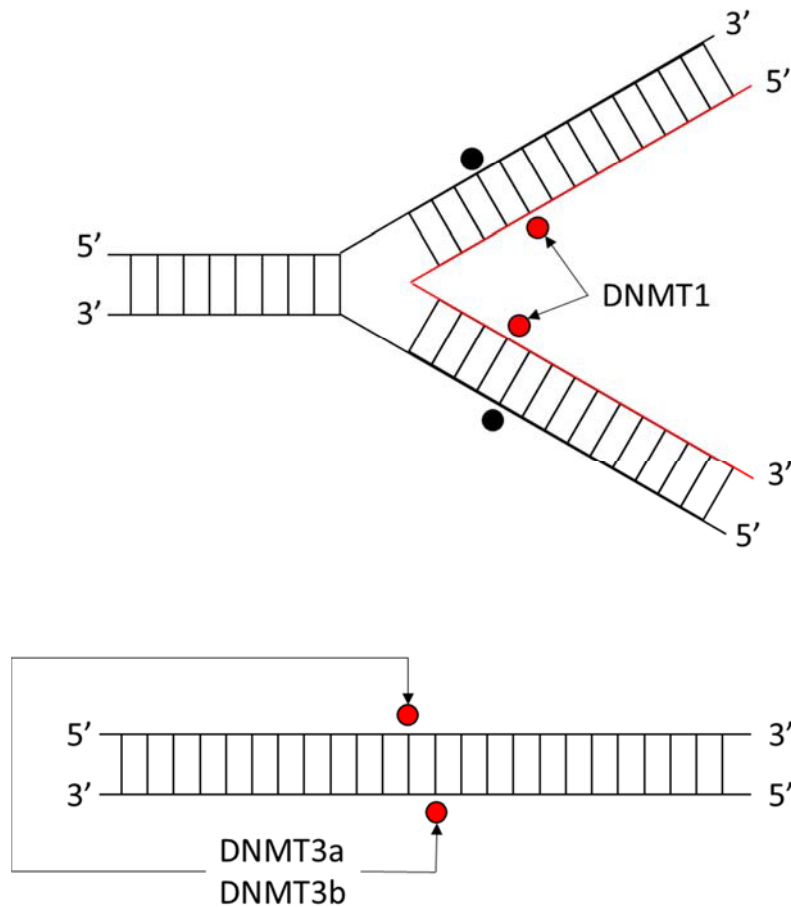
décrit pour HOTAIR (Figure 14) a été postulé pour ANRIL dans le contexte du cancer de la prostate, comprenant également une interaction entre le lncRNA avec le complexe PRC2 et réprimant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Yap *et al.* 2010).

### 1.2.1.3 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'addition d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) sur une base de l'ADN. Chez les mammifères, cette modification s'observe principalement au niveau d'une cytosine précédant une guanine (dinucléotide CpG) pour produire une méthylcytosine sur le carbone en position 5 (5mC) (Hotchkiss 1948; Miranda & Jones 2007). La distribution de ces CpG dans le génome caractérise deux types de régions, des régions riches en CpG ou des régions pauvres en CpG. Les régions riches en CpG sont nommées îlots CpG (CpGi) qui sont définis par une séquence inférieure à 500 paires de bases avec un contenu en GC supérieur à 55% et un ratio CpG observé/CpG attendu d'au moins 0.65 (Takai & Jones 2002). Selon les études, cette définition peut néanmoins varier au niveau des valeurs attribuées à ces paramètres (Bock *et al.* 2007; Illingworth & Bird 2009).

La majorité des gènes possèdent un îlot CpG dans leur région 5' qui inclue le promoteur et le premier exon; cette région est généralement non-méthylée dans des cellules saines (Jones & Baylin 2002). Bien que les 5mC ne constituent environ que 1% du génome (Ehrlich *et al.* 1982), on estime que plus de 50% (Illingworth & Bird 2009; Jones & Liang 2009), voire plus de 70% (Saxonov *et al.* 2006) des promoteurs possèdent une région riche en CpG. Le reste de génome comprenant les introns et les régions intergéniques sont plutôt pauvres en CpG et sont majoritairement méthylés (Jones & Baylin 2002). Depuis la découverte des 5mC en 1948 (Hotchkiss 1948), des efforts considérables ont été fournis pour comprendre la pertinence fonctionnelle de la méthylation de l'ADN. En 1975, deux groupes ont postulé un rôle régulateur de la méthylation de l'ADN via le recrutement de protéines pouvant lier l'ADN dans la répression de l'expression de certains gènes (Holliday & Pugh 1975; Riggs 1975). Encore aujourd'hui, nous ne pouvons qu'apprécier la complexité des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression génique par la méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est effectuée par le transfert d'un groupement méthyle à partir de la S-adenyl methionine (SAM) vers une cytosine par l'entremise des méthyltransférases de l'ADN (DNMT; *DNA methyltransferase*) (Moore *et al.* 2013). Initialement, ces enzymes étaient classées en deux catégories : premièrement, lors du développement et la différenciation des cellules embryonnaires, l'établissement du profil de méthylation dépend de l'action des méthyltransférases *de novo* DNMT3a et DNMT3b (Moore *et al.* 2013). Deuxièmement, ces traits étaient transmis vers les cellules filles lors de la réplication de l'ADN via l'action de la méthyltransférase de maintenance DNMT1 (Moore *et al.* 2013) (Figure 15). Toutefois, la capacité de méthylation *de novo* et de maintenance n'est pas exclusive à chacune de ces enzymes. En effet, la DNMT1 possède également la capacité de méthyler *de novo* (Li *et al.* 1992; Pradhan *et al.* 1999) et les DNMT3a et DNMT3b participent également au maintien du profil de méthylation (Liang *et al.* 2002). Toutefois, DNMT1 se lie préférentiellement aux sites hémiméthylés, c'est-à-dire aux sites de méthylation uniquement présents sur un seul des deux brins de l'ADN (Hermann *et al.* 2004), contrairement aux DNMT3a et DNMT3b qui n'ont pas de préférence pour les sites hémiméthylés (Okano *et al.* 1999). Bien qu'elles partagent une grande similarité dans leur structure et leurs fonctions, DNMT3a et DNMT3b se différencient par leur profil d'expression : DNMT3a est exprimée de manière ubiquitaire alors que DNMT3b est faiblement exprimée dans les tissus différenciés, ce qui suggère que le rôle de DNMT3b pourrait être limité à la différenciation cellulaire (Moore *et al.* 2013). Les effets biologiques de la méthylation de l'ADN seront abordés dans la section 1.2.1.3.3.



**Figure 15.** Modèle de la méthylation de l'ADN par les enzymes *de novo* et de maintenance par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT; *DNA methyltransferase*). Durant la réplication de l'ADN, DNMT1 est située à la fourche de réplication où elle méthyle le brin d'ADN nouvellement synthétisé (cercles rouges) pour répliquer le patron de méthylation original (cercles noirs). Il faut souligner que ces rôles ne sont pas exclusifs, mais plutôt préférentiels. DNMT3a et DNMT3b ajoutent des groupements méthyles *de novo* (cercles rouges) à des endroits initialement dépourvus de méthylation.

Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: *Neuropsychopharmacology*, Moore LD, Le T, Fan G, DNA methylation and its basic function, 38(1):23-38, Copyright (2013)

### 1.2.1.3.1 La déméthylation de l'ADN

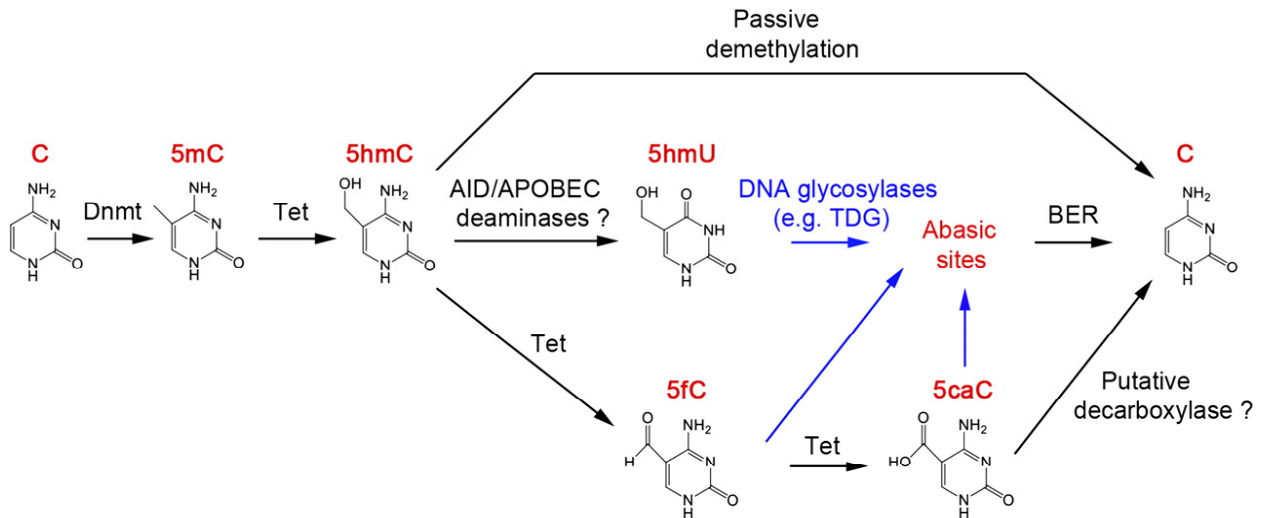
La déméthylation active de l'ADN nécessite une séquence de réactions d'hydroxylation et d'oxydation pour produire des produits intermédiaires dont les principaux constituants sont les protéines de translocation TET1-3 (TET1-3; *Ten-eleven translocation 1-3*) (Wu & Zhang 2011). La première étape est l'hydroxylation de 5mC par TET pour produire la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) (Ito *et al.* 2010). Ensuite, diverses voies peuvent être empruntées pour dénuder la cytosine de son groupement méthyle. La voie de déméthylation passive repose sur le fait que la DNMT1 ne reconnaît pas la 5hmC durant la réplication ce qui empêche le maintien et cause la perte de méthylation dans les cellules prolifératives (Valinluck & Sowers 2007) (Figure 16).

Alternativement, l'intermédiaire 5hmC peut être séquentiellement oxydé pour obtenir la 5-formylcytosine (5fC), puis la 5-carboxylcytosine (5caC) (Ito *et al.* 2010; He *et al.* 2011) qui serviront de substrats à diverses enzymes de clivage, ce qui constitue le mécanisme d'excision de base et de réparation de l'ADN, principes derrière la déméthylation active. 5fC et 5caC sont reconnues et dégradées par la thymine glycosylase de l'ADN (TDG; *thymine DNA glycosylase*) (He *et al.* 2011; Maiti & Drohat 2011). Ce site sera donc remplacé par une cytosine non-méthylée par le mécanisme de réparation par excision de base. Une délétion du gène codant pour TDG chez la souris induit la mort embryonnaire accompagnée d'un taux de méthylation anormalement élevé (Cortazar *et al.* 2011; Cortellino *et al.* 2011) (Figure 16).

Une autre voie active de déméthylation initiée par TET passe par la production de 5-hydroxyméthyluracil (5hmU) via la déamination de 5hmC par le complexe AID/APOBEC (*activation-induced deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*). Cette transformation induit un mésappariement 5hmU:G avec le nucléotide sur le brin opposé ce qui enclenche le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base (Cortellino *et al.* 2011; Guo *et al.* 2011) (Figure 16).

Finalement, une voie indépendante du mécanisme d'excision de base pourrait théoriquement être possible. Cette voie impliquerait l'action d'une enzyme qui couperait directement le groupement carboxyle de la cytosine en scindant le lien carbone-carbone (décarboxylation) suite à l'oxydation

par TET (Wu & Zhang 2010; Wu & Zhang 2011). Cette hypothèse reste à être prouvée, mais reste tout de même intéressante puisqu'elle ne dépend que de deux enzymes (TET et une carboxylase) et ne nécessite pas de bri du brin d'ADN (Wu & Zhang 2010; Wu & Zhang 2011) (Figure 16).



**Figure 16.** Étapes de déméthylation active et passive. L'ajout et le maintien de groupements méthyles sur l'ADN sont régulés par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT; *DNA methyltransferase*). Le résidu 5-méthylcytosine (5mC) est dans un premier temps hydroxylé en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) par la famille des protéines *ten-eleven translocation* (TET). 5-hmC peut être déméthylé de manière passive. 5-hmC peut être déaminé par AID (*activation-induced deaminase*)/APOBEC (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*) pour devenir du 5-hydroxyméthyluracil (5hmU). 5-hmC peut également être converti en 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxylcytosine (5caC) par TET. Les intermédiaires 5hmU, 5fC et 5caC complètent le processus de déméthylation par un mécanisme d'excision de base (BER; *base excision repair*).

Réimprimé de Cold Spring Harbor Laboratory Press : *Genes & Development*, Wu, H., Zhang, Y., Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. 25(23) : pp 2436-52, Copyright (2011).

### 1.2.1.3.2 La méthylation non-CpG de l'ADN

Outre la méthylation des CpG, des études récentes, mentionnées ci-dessous, répertorient la présence de groupements méthyles sur d'autres sites. Bien que la littérature sur ces sujets soit peu

abondante, ces découvertes innovantes doivent être mentionnées afin de souligner la diversité de la régulation de la méthylation de l'ADN et de ses effets biologiques.

La méthylation de l'adénosine sur l'azote en position 6 (6mA) a d'abord été détectée en 1962 (Arber & Dussoix 1962). Cette marque épigénétique a été observée dans l'ADN d'organismes moins complexes, tels que l'algue verte *Chlamydomonas*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et la mouche *Drosophila melanogaster*, où elle joue un rôle de régulation transcriptionnelle (Heyn & Esteller 2015). Indétectable dans l'ADN de mammifères (Ratel *et al.* 2006), 6mA est plutôt observée dans l'ARN (Narayan & Rottman 1988). Cette réaction est régulée par ses propres méthylases, MT-A70 (Wei & Moss 1977) et déméthylases, ALKBH5 (Zheng *et al.* 2013) et FTO (Jia *et al.* 2011), suggérant des propriétés réversibles et dynamiques. Une des fonctions proposées pour cette modification est la dégradation des ARN via le recrutement du complexe YTHDF2, ce qui représente un mécanisme potentiel de régulation de l'expression (Wang *et al.* 2014).

De récentes publications révèlent également que la méthylation n'est pas exclusive aux cytosines précédant une guanine (CpG), mais est également retrouvée sur les autres cytosines (CpH). La méthylation des CpH a initialement été détectée dans des cellules souches embryonniques (Lister *et al.* 2009), dans le cerveau (Lister *et al.* 2013) et dans le muscle squelettique (Barres *et al.* 2009). Une récente étude pan-génomique sur divers tissus différenciés fait état des taux importants (jusqu'à 40%) de CpH méthylés, variant d'un tissu à l'autre. Le taux de CpH méthylés est négativement corrélé à l'expression des gènes, ce qui suggère une fonction répressive pour ce type de méthylation (Schultz *et al.* 2015).

Néanmoins, il y a très peu de connaissances sur le sujet de la méthylation non-CpG. Dans le cadre de nos projets, seule la méthylation CpG a été étudiée.

#### 1.2.1.3.3 Fonctions biologiques de la méthylation de l'ADN

En théorie, la fonction de la méthylation de l'ADN est simple à énoncer : la méthylation de l'ADN régule des interactions protéine-ADN ce qui affecte l'activité transcriptionnelle. Cependant, cet énoncé se complique quand vient le temps de définir les types de protéines impliquées et les sites



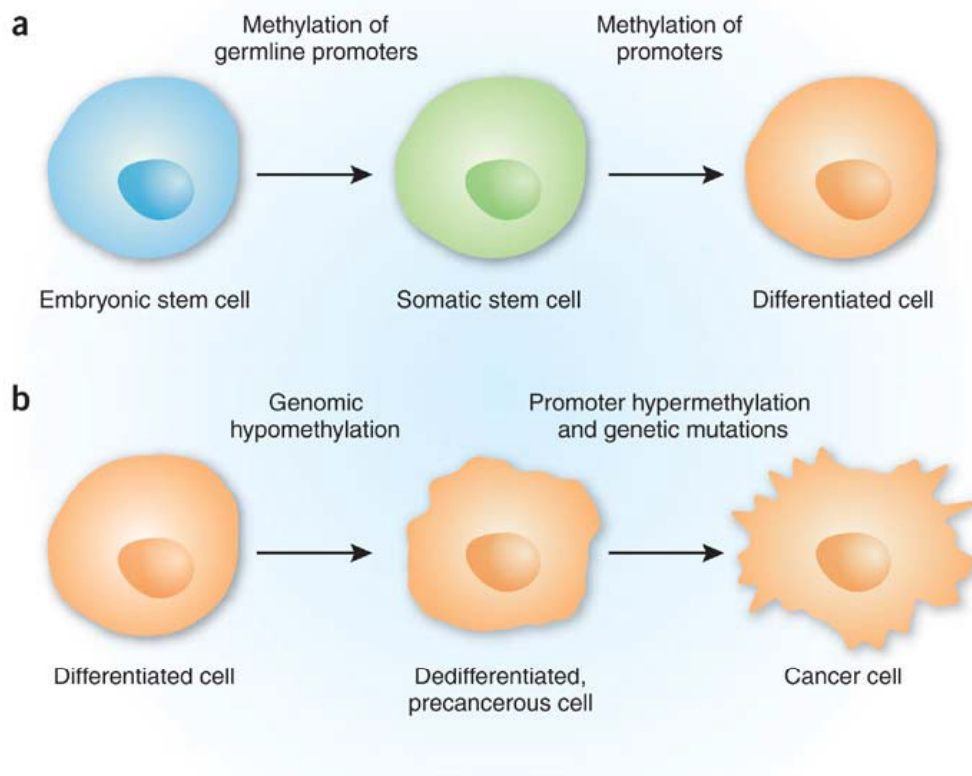
de méthylation dans l'ADN. Concernant l'activité transcriptionnelle, on sait maintenant que la méthylation de l'ADN peut autant inhiber que stimuler l'expression des gènes ciblés selon la nature des protéines affectées par cette méthylation et la localisation de la méthylation dans le gène. Ceci réfute donc le cliché « la méthylation inhibe la transcription », une vue simpliste encore communément acceptée jusqu'à récemment (Jones & Takai 2001). La localisation de la méthylation dans le gène est un facteur décisif dans la régulation de l'expression. En effet, chaque séquence de nucléotides recrute spécifiquement certaines protéines pouvant réguler la machinerie transcriptionnelle. Par exemple la méthylation au site d'initiation de la transcription (TSS; *transcription start site*) peut inhiber la liaison de la machinerie transcriptionnelle (Brenet *et al.* 2011) alors que la méthylation à l'intérieur du gène peut se produire à des sites activateurs (*enhancer*) ou répresseurs (*insulators*) normalement responsables de stimuler ou d'inhiber la transcription, respectivement (Peters *et al.* 2015). Finalement, alors que pour les facteurs de transcription la liaison à l'ADN est bloquée par la présence de 5mC (Moore *et al.* 2013), d'autres protéines possèdent une affinité pour les 5mC et sont préférentiellement recrutées aux régions méthylées de l'ADN (Jones *et al.* 1998). Ces nuances importantes seront maintenant discutées plus en détail en mettant les différents sites de méthylation possibles en avant-plan.

#### 1.2.1.3.3.1 Méthylation entourant la région 5' du gène

Tel que mentionné précédemment, la majorité des promoteurs possède une région CpGi. Ces régions sont généralement caractéristiques d'une transcription active, par la présence de CpG non-méthylés et de régions dépourvues de nucléosomes flanquées d'histones actives telles que H3K4me3 (Tazi & Bird 1990; Mikkelsen *et al.* 2007; Ramirez-Carrozzi *et al.* 2009; Choi 2010). Ceci définit une organisation de la chromatine permettant le recrutement de facteurs de transcription et de l'ARN polymérase pour initier la transcription (Gal-Yam *et al.* 2006; Oszolak *et al.* 2007). L'hypométhylation de ces régions est maintenue, puisqu'en plus d'être inhibée par H3K4me3, la méthylation *de novo* nécessite la présence de nucléosomes (Ooi *et al.* 2007). De plus, l'enzyme de déméthylation TET1 est abondante autour des TSS comprenant un ratio élevé de CpG, ce qui déméthylerait toute 5mC présente dans ses environs (Williams *et al.* 2012). Il existe toutefois des situations où ces régions riches en CpG sont méthylées dans le cadre de processus physiologiques définis, notamment afin de réprimer l'expression de gènes spécifiques lors du

développement et de la différenciation cellulaire (Shen *et al.* 2007; Weber *et al.* 2007; Mohn *et al.* 2008). Un exemple couramment utilisé pour illustrer ce mécanisme de régulation est l'inactivation du chromosome X, phénomène durant lequel un des deux chromosomes X est inactivé par méthylation de l'ADN, permettant l'expression d'une seule allèle (Mohandas *et al.* 1981). L'initiation de la transcription peut être bloquée par le co-recrutement d'histones déacétylases et de complexes protéiques possédant un domaine de liaison aux CpG méthylés tels que les protéines liant les CpG méthylés MBD (*methylated CpG binding proteins*) et MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*) (Jones *et al.* 1998; Nan *et al.* 1998a; Nan *et al.* 1998b; Nguyen *et al.* 2001). Au niveau du premier exon, la méthylation est également répressive (Brenet *et al.* 2011). Selon une étude sur la méthylation de l'ADN provenant de cellules immunitaires humaines, la méthylation du premier exon est le marqueur ayant le plus d'influence sur la répression de l'expression (Brenet *et al.* 2011). Le mécanisme proposé est que la méthylation à cet endroit bloque l'initiation de la transcription ou freine l'activité de la polymérase (Brenet *et al.* 2011).

Plusieurs études de détection pan-génomique de la méthylation sont parvenues à observer que la plupart des gènes spécifiquement exprimés par les cellules germinales finissent par être hyperméthylés au niveau du promoteur dans les cellules somatiques différenciées (Weber *et al.* 2007; Zilberman 2007; Smith & Meissner 2013). Ceci suggère que la méthylation *de novo* régule l'expression des gènes nécessaires à l'orchestration de la différenciation cellulaire durant le développement (Figure 17).



**Figure 17.** La méthylation du promoteur durant la maturation et la différenciation cellulaire dans a) le cadre physiologique du développement et b) dans le cadre pathologique du cancer.

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Genetics, Zilberman D, The human promoter methylome. 39(4):442-3, Copyright (2007).

#### 1.2.1.3.3.2 Méthylation dans le corps du gène

Contrairement au promoteur, le corps du gène possède généralement des CpG méthylés et parsemés, plutôt qu'agglomérés en CpGi et des CpG déméthylés (Jones 2012). La méthylation des CpG à l'intérieur du gène n'est pas toujours associée à une répression de l'expression, mais dans certains cas à une augmentation de l'expression (Hellman & Chess 2007; Ball *et al.* 2009; Aran *et al.* 2011). Cette observation est d'autant plus étonnante lorsqu'on note la présence de l'histone répressive H3K9me3 et du complexe protéique répresseur MeCP2 sur ces sites de méthylation, une marque épigénétique associée à l'inhibition de l'initiation de la transcription, mais qui dans ce

cas ne semble pas bloquer le processus d'élongation (Nguyen *et al.* 2001). De plus, l'observation que les exons sont plus riches en nucléosomes et en 5mC que les introns laisse présager un rôle dans l'épissage de l'ARN (Chodavarapu *et al.* 2010; Laurent *et al.* 2010). Premièrement, ce concept est supporté par l'observation qu'au niveau des jonctions exon-intron, un contraste important dans la méthylation est présent : le profil de méthylation est caractérisé par un taux élevé de méthylation vers la fin de l'exon, suivi d'une baisse subite de la méthylation au début de l'intron et l'inverse se produit dans la transition intron-exon par une augmentation franche dans la méthylation au début de l'exon (Laurent *et al.* 2010). Deuxièmement, le mécanisme d'épissage des transcrits d'ARN est dépendant de la structure de la chromatine, elle-même dépendante de la méthylation (Laurent *et al.* 2010). La combinaison de ces deux énoncés supporte un rôle de la méthylation dans l'épissage (Laurent *et al.* 2010).

En résumé, la méthylation des CpGi au niveau des promoteurs est bien caractérisée : lorsqu'on détecte de la méthylation dans cette région, c'est que le gène ciblé est réprimé et la méthylation est maintenue dans cette région par le recrutement de nucléosomes portant des histones modifiées répressives telles que H3K9me3. Dans le cas de la méthylation dans le corps du gène, l'effet n'est pas aussi unidimensionnel et dépend majoritairement du site où se trouve la méthylation.

#### 1.2.1.3.4 Sensibilité de la méthylation de l'ADN à l'environnement

L'épigénétique, et en particulier la méthylation de l'ADN, comporte des mécanismes qui répondent à des stimuli exogènes et qui engendrent un phénotype reflétant l'environnement dans lequel l'organisme se trouve. L'exemple probablement le plus éloquent est l'observation des différences phénotypiques entre deux jumeaux identiques : au cours de leur vie, chaque individu sera exposé de manière croissante et cumulative à divers facteurs environnementaux et bien qu'à la base leur matériel génétique soit identique, leur phénotype évoluera différemment. Comparer la rigidité de la génétique à la malléabilité de l'épigénétique est similaire à comparer l'inné et l'acquis. Les mots de la généticienne Dr Danielle Reed lors d'une entrevue conduite par le *National Geographic* ne pourrait mieux illustrer ce concept : « What I like to say is that Mother Nature writes some things in pencil and some things in pen. [...] Things written in pen you can't change. That's DNA. But things written in pencil you can. That's epigenetics. Now that we're actually able

to look at the DNA and see where the pencil writings are, it's sort of a whole new world. » Dans ce chapitre, nous allons discuter de l'impact que peuvent avoir divers stimuli environnementaux sur le profil de méthylation.

#### 1.2.1.3.4.1 La méthylation de l'ADN et l'alimentation

« Dis-moi ce que tu manges, je te dirai ce que tu es » est une phrase tirée d'un ouvrage culinaire publié en 1839 par le gastronome français Jean Anthelme Brillat-Savarin. Celui-ci ne pouvait se douter que son énoncé s'applique à merveille au domaine de l'épigénétique. En effet, il est reconnu que la composition de l'alimentation ou la déficience en celle-ci ont des effets majeurs sur le phénotype et le développement de maladies, où les mécanismes épigénétiques semblent impliqués.

L'environnement *in utero* est un exemple de stimulation environnementale sur le développement futur puisque la diète maternelle expose le fœtus à différents stress, ce qui peut causer des effets phénotypiques. Des études chez le rat ont démontré qu'une restriction protéique *in utero* induit des changements épigénétiques pouvant expliquer l'altération de la fonction métabolique après la naissance (Lillicrop *et al.* 2005; Burdge *et al.* 2007; Lillicrop *et al.* 2007; Lillicrop *et al.* 2008). En effet, en observant le foie et le cœur de la lignée de rats exposés *in utero* à la restriction protéique, les promoteurs de gènes du PPAR (*peroxisomal proliferator-activated receptor*) et des récepteurs glucocorticoïdes étaient hypométhylés par la restriction protéique (Lillicrop *et al.* 2005; Burdge *et al.* 2007; Lillicrop *et al.* 2008). Par conséquent, l'expression de PPAR et des récepteurs glucocorticoïdes ainsi que des gènes en aval était augmentée chez le rat jeune et adulte, conduisant à des désordres métaboliques caractérisés par un phénotype d'obésité. L'expression de la méthyltransférase DNMT1 était également diminuée, ce qui pourrait aussi contribuer à cette baisse des taux de méthylation (Lillicrop *et al.* 2007).

L'alimentation affecte également le profil de méthylation chez l'adulte. Selon une étude récente, la quantification pan-génomique de la méthylation dans le foie du rat adulte suite à une diète riche en gras démontre une variation dans plus de 18 000 régions, où 12 494 régions sont hypométhylées et 6 404 hyperméthylées (Zhang *et al.* 2015). Ces changements épigénétiques, en parallèle avec des changements d'expression ont été détectés au niveau de gènes impliqués dans plusieurs voies

métaboliques telles que le cycle cellulaire et la biosynthèse de triglycérides (Zhang *et al.* 2015). Les auteurs proposent que ces changements soient à l'origine du phénotype observé chez ces rats, soit une augmentation du poids et accumulation de lipides hépatiques (Zhang *et al.* 2015).

L'étude de l'impact d'un régime alimentaire sur la méthylation de l'ADN chez l'humain est difficile à réaliser pour des raisons éthiques évidentes. Cependant, certains événements historiques ont généré des conditions environnementales particulières, dans certaines populations, ce qui rend possible l'étude épigénétique de certains effets environnementaux chez l'humain. L'hiver Hollandais de 1944 est un exemple. Durant la 2<sup>e</sup> guerre mondiale, la population des Pays-Bas a souffert d'une famine désastreuse durant l'occupation Allemande: près de 22 000 personnes sont décédées durant le *Hongerwinter* (hiver de la faim, en néerlandais). L'effet de cette famine a eu des répercussions majeures sur les enfants issus des mères enceintes durant cette période : une intolérance au glucose (Ravelli *et al.* 1998), un IMC élevé, un taux de LDL élevé et une panoplie de désordres psychologiques (Neugebauer *et al.* 1999; Lumey *et al.* 2011) à l'âge adulte. Certaines études ont tenté de découvrir si des changements épigénétiques pourraient être à l'origine de ces phénotypes. Le gène du facteur de croissance insulino-like 2 (*IGF2*; *insulin-like growth factor II*) impliqué dans la croissance et le développement est effectivement hypométhylé chez les individus qui ont été exposés *in utero* à la famine comparativement à leurs frères et sœurs non-exposés (Heijmans *et al.* 2008). Cette hypométhylation pourrait être liée à des problèmes de croissance chez le nouveau-né, puisqu'il a été démontré que la méthylation de *IGF2* est positivement corrélée aux mesures anthropométriques de la croissance et du développement du fœtus : plus *IGF2* est méthylé dans le placenta, plus l'enfant est grand et lourd à la naissance (St-Pierre *et al.* 2012). De manière intéressante, lorsque la méthylation de *IGF2* est mesurée dans un contexte d'abondance de nutriments, les enfants obèses sont caractérisés par une hyperméthylation de *IGF2* en lien avec un taux de triglycérides plus élevé (Deodati *et al.* 2013). L'hyperméthylation d'autres gènes candidats (*IL10*, *LEP*, *ABCA1*, *GNASAS* et *MEG3*) impliqués dans le développement et les maladies métaboliques et cardiovasculaires a également été détectée chez des adultes exposés *in utero* à la famine, mais l'impact fonctionnel de ces changements reste à être déterminé (Tobi *et al.* 2009). Une autre étude pan-génomique à partir d'échantillons de sang obtenu dans cette même population d'adultes exposés *in utero* à la famine a identifié 181 régions différentielles de méthylation. De plus, les auteurs sont parvenus à mettre en évidence une corrélation significative

entre le poids à la naissance et la quantité de LDL versus le degré de méthylation des gènes *INSR* et *CPT1A*, respectivement impliqués dans la croissance et la voie d'oxydation des acides gras (Tobi *et al.* 2014).

En résumé, l'alimentation exerce une influence sur le profil de méthylation, ceci est particulièrement évident dans le contexte où l'apport alimentaire est insuffisant, tant dans les modèles animaux que chez l'humain. Cependant, un lien causal entre le phénotype observé et ces changements de méthylation reste à être déterminé.

#### 1.2.1.3.4.2 La méthylation de l'ADN et l'exercice

Si les effets bénéfiques de l'exercice sont bien caractérisés (section 1.1.3), les mécanismes moléculaires responsables de ces effets le sont moins. Durant l'effort physique, les cellules sont exposées à divers stimuli physiques, hormonaux et chimiques qui vont engendrer des changements dans l'expression de certains gènes et plusieurs études suggèrent que la méthylation de l'ADN pourrait être impliquée dans ces changements. En effet, chez des individus âgés entre 45 et 75 ans, ceux pratiquant 26-30 min d'exercice par jour ont un taux de méthylation globale dans le sang supérieur comparativement à ceux faisant de l'exercice moins de 10 min par jour (Zhang *et al.* 2011). Suite à 4 semaines d'exercice, 3 fois par semaine, une étude chez des jeunes volontaires sains (18-24 ans) a observé comment évoluait la méthylation dans le sang dans plus de 450 000 sites CpG à travers le génome : 2 909 CpG ont présenté des augmentations ou des diminutions de méthylation de plus de 5% (Denham *et al.* 2015). En utilisant cette même technique pour quantifier la présence de 5mC, une équipe a pu détecter des changements de méthylation dans le tissu adipeux d'hommes en santé d'âge moyen, mais présentant des antécédents familiaux de diabète, suite à un programme d'exercice de 6 mois : pour certains gènes, les changements de méthylation étaient corrélés avec l'expression de leurs gènes respectifs (Ronn *et al.* 2013). Un groupe de chercheurs a étudié la réponse épigénétique du muscle squelettique suite à une seule séance d'exercice (à temps 0 et 3h après l'exercice) (Barres *et al.* 2012). Ils ont observé qu'après une séance d'exercice, le taux de méthylation au niveau du promoteur des gènes candidats diminue, mais à des cinétiques variant d'un gène à l'autre (Barres *et al.* 2012). Effectivement, pour certains gènes (*PGC-1 $\alpha$* , *MEF2A* et *PDK4*) l'effet était observé immédiatement après l'effort physique ( $t = 0$ ) alors que

pour d'autres (*PPARD*) l'hypométhylation n'était détectée qu'après 3h (Barres *et al.* 2012). De manière intéressante, les modifications de méthylation observées tout de suite après l'effort physique étaient transitoires et n'étaient pas toujours détectables après 3h (Barres *et al.* 2012). Une autre découverte intéressante est qu'en quantifiant l'expression de l'ARNm correspondant à ces gènes, on réalise que l'augmentation de l'expression n'est pas toujours synchrone avec la diminution de méthylation; comme dans le cas des variations de méthylation, la variation de l'expression génique n'était pas toujours soutenue (Barres *et al.* 2012). Les gènes candidats de l'étude étaient des gènes dont l'expression varie suite à un effort physique aigu et choisis selon une étude précédente (*PGC-1 $\alpha$* , *TFAM*, *PPAR- $\gamma$* , *PDK4*, *CS*) (Barres *et al.* 2009), ainsi que des facteurs impliqués dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques au muscle (*MEF2A*, *MYOD1*). Cette étude phare montre donc des changements transitoires de méthylation en réponse à un exercice aigu, changements qui ne sont pas nécessairement synchronisés avec les variations d'expression (Barres *et al.* 2012). Chez l'humain, on peut donc détecter des changements de méthylation au niveau d'une variété importante de gènes et ce, à différents âges et dans différents tissus suite à un exercice physique.

Bien que ces études chez l'humain soient des plus pertinentes, les études des effets de l'exercice sur la méthylation de l'ADN qui utilisent un modèle animal permettent d'accéder à une plus grande variété de tissus. Ainsi, grâce à divers travaux effectués chez le rat (Gomez-Pinilla *et al.* 2011; Rodrigues *et al.* 2015) et la souris (Kanzleiter *et al.* 2015), on sait que certaines régions du cerveau sont différenciellement méthylées suite à l'exercice. Une étude démontre que suite à 20 sessions de 1h de nage à intervalles de 5 sessions par semaine, le taux global de méthylation tend à diminuer spécifiquement dans le cortex et dans la substance grise périaqueducule de rats adultes (Rodrigues *et al.* 2015). L'exercice peut aussi stimuler l'expression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF; *brain-derived neurotrophic factor*), une molécule impliquée dans la préservation des neurones, dans l'hippocampe de rat : suite à une semaine d'exercice, une région du promoteur de *BDNF* est déméthylée et l'expression de l'ARNm et de la protéine BDNF est augmentée (Gomez-Pinilla *et al.* 2011). Selon une étude exploratrice effectuée chez la souris suite à une période de 4 semaines d'exercice à une fréquence de 5 séances par semaine, il a été rapporté que l'expression et la méthylation de nombreux gènes pouvait varier dans le muscle squelettique (Kanzleiter *et al.* 2015). Plus précisément, cette étude rapporte une corrélation méthylation-



expression de 200 gènes et la plupart de ces gènes sont impliqués dans le métabolisme du glucose et de la mitochondrie (Kanzleiter *et al.* 2015). Une étude récente, également chez la souris, s'est penchée sur la régulation du facteur lié à la biogénèse mitochondriale, le co-activateur du PPAR $\gamma$ -1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ; *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), dans le muscle squelettique suite à une séance d'exercice aiguë (Lochmann *et al.* 2015). De manière intéressante, les auteurs démontrent un lien entre le taux de méthylation du promoteur du gène de PGC-1 $\alpha$  et le degré d'expression de l'ARNm à l'état basal, mais suite à l'unique séance d'exercice d'une durée de 1h, ils ne détectent pas de changements dans la méthylation malgré une augmentation de l'expression de l'ARNm. Ceci peut être expliqué de deux façons : (1) soit la stimulation n'est pas assez importante pour induire un changement épigénétique ou (2) le changement de méthylation était transitoire et le délai entre l'effort et le sacrifice effectué 1h après la séance d'exercice était suffisant pour rétablir les niveaux de méthylation à leur niveau basal (Lochmann *et al.* 2015). L'exercice physique est donc associé à des changements de méthylation dans le sang et dans différents organes sollicités lors de l'effort. Ces changements semblent être dynamiques puisqu'ils peuvent être détectés rapidement et dans certains cas, ne sont que transitoires.

#### 1.2.1.3.5 Méthylation de l'ADN dans un contexte pathologique

Puisque la méthylation de l'ADN peut contribuer à la régulation de l'expression des gènes dans une panoplie de mécanismes cellulaires importants et que ce mécanisme de régulation est sensible aux stimuli environnementaux, il est logique de penser que le développement de maladies sous l'influence de facteurs environnementaux puisse aussi impliquer des mécanismes épigénétiques. Une dérégulation de l'expression des gènes par des profils altérés de méthylation est en effet observée dans plusieurs maladies telles que le cancer et les MCV. De plus, il est intéressant de noter que l'âge et le vieillissement ont des effets sur la méthylation de l'ADN à l'échelle génomique. En effet, le vieillissement est associé à une diminution globale de méthylation de l'ADN (Bjornsson *et al.* 2004) tel que démontré par une étude comparant le méthylome entre des nouveaux-nés et des centenaires (Heyn *et al.* 2012). Dans ce même ordre d'idée, la méthylation de l'ADN détectée dans des échantillons de sang serait prédictif de la mortalité, toutes causes confondues (Marioni *et al.* 2015). Dans ce dernier article, les auteurs ont calculé l'âge biologique

des sujets, une mesure du vieillissement accéléré, différent de l'âge chronologique, en tenant compte de centaines de marqueurs de méthylation (Horvath 2013) dans le sang obtenu à partir de sujets âgés provenant de 4 cohortes différentes (Lothian Birth Cohort 1921 (âge moyen de 79 ans, n=446) et Lothian Birth Cohort 1936 (âge moyen de 70 ans, n=920) (Deary *et al.* 2012), The Framingham Offspring Heart Study (âge moyen de 66 ans, n=2 635) (Kannel *et al.* 1979) et Normative Aging Study (âge moyen de 73 ans, n=657) (Bell *et al.* 1966)) (Marioni *et al.* 2015). Ainsi, la différenciation de l'âge biologique de l'âge chronologique à l'aide de marqueurs de méthylation a permis de prédire la mortalité chez des personnes âgées (Marioni *et al.* 2015).

#### 1.2.1.3.5.1 La méthylation de l'ADN et le cancer

Le cancer est la maladie la plus étudiée lorsqu'il est question de méthylation de CpG et la découverte d'un lien entre les deux remonte à 1983 (Feinberg & Vogelstein 1983). L'épigénome des cellules cancéreuses est caractérisé par une hypométhylation globale (Riggs & Jones 1983) et une hyperméthylation au niveau des gènes suppresseurs de tumeur (Hansen *et al.* 2011; Berman *et al.* 2012; Jones 2012). La combinaison de ces deux effets dichotomiques pourrait favoriser la différenciation de cellules saines en cellules cancéreuses : l'hypométhylation globale induit une instabilité génomique qui favorise les mutations (Timp & Feinberg 2013) et le réarrangement chromosomal (Eden *et al.* 2003) d'une part, et l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur cause une perte des mécanismes de vérification et contrôle du cycle cellulaire, permettant la prolifération et la multiplication des cellules cancéreuses. La liste de gènes suppresseurs de tumeur hyperméthylés et subséquemment réprimés inclut les gènes de p53 (Rideout *et al.* 1990), de p16 (Belinsky *et al.* 1998; McDermott *et al.* 2006; Reynolds *et al.* 2006) et *adenomatous polyposis coli* (APC) (Esteller *et al.* 2000). Le profil de méthylation de ces gènes provenant directement de la tumeur (Heyn & Esteller 2012) ou même à partir du sang circulant (Li *et al.* 2012) pourrait avoir un potentiel diagnostique intéressant, puisque l'incidence de cancer est souvent corrélée avec le degré de méthylation d'un ou plusieurs gènes variant en fonction du type de cancer. La Glutathion S-transférase Pi 1 (GSTP1) impliquée dans la détoxification, a par exemple été évaluée pour son potentiel dans le diagnostic du cancer de la prostate puisque que l'expression de *GSTP1* est diminuée (Esteller *et al.* 1998). De plus, la mesure du degré de méthylation pour le gène *GSTP1*, combinée avec celle de 4 autres gènes (*APC*, *Ras association domain-containing*

*protein 1 (RASSF1), Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) et multidrug resistance protein 1 (MDR1)*), a permis de distinguer 73 spécimen de cancer de la prostate avec une sensibilité et une spécificité pouvant atteindre 100% (Yegnasubramanian *et al.* 2004). De même, un désordre général dans les mécanismes de méthylation causant un profil aberrant de méthylation dans les cellules leucémiques comparativement à des cellules normales de la moelle osseuse semble être caractéristique du syndrome myélodysplasique (Meldi & Figueroa 2015). Les répercussions de ces découvertes dans l'application thérapeutique ont permis la mise sur le marché, avec l'approbation de la FDA, de deux composés « épigénétiques » inhibant la méthylation de l'ADN pour traiter le syndrome myélodysplasique: l'azacitidine (Vidaza®, 2004) et la decitabine (Dacogen®, 2006) (Loiseau *et al.* 2015; Steensma 2015). L'efficacité de ce type de traitement a notamment été démontrée par une étude de phase III incluant 358 patients rapportant que l'administration d'azacitidine durant un suivi de 21 mois a prolongé l'espérance de vie moyenne de 9,5 mois chez les patients cancéreux traités avec le composé hypométhylant comparativement à ceux traités de manière conventionnelle (Fenaux *et al.* 2009). La caractérisation des profils aberrants de méthylation a permis de mieux comprendre la pathogénèse du cancer et constitue une nouvelle stratégie thérapeutique pour le syndrome myélodysplasique.

#### 1.2.1.3.5.2 La méthylation de l'ADN et les MCV

L'étude de la contribution de la composante épigénétique dans le développement des MCV n'a commencé à attirer de l'attention que récemment et reste limitée; à titre indicatif, en 2010, le nombre de publications sur l'épigénétique et les MCV ne représentait que 4,25% de toutes les publications sur l'épigénétique (280 sur un total de 6 586) (Baccarelli *et al.* 2010). Nous allons couvrir certains exemples en gardant en perspective la nature du gène impliqué, l'importance de ce gène dans le tissu auquel il appartient et comment la dysfonction de l'organe affecté conduit au développement de la MCV.

Il est reconnu que la diminution de l'expression de la eNOS associée à la dysfonction endothéliale peut mener au développement de plaques athérosclérotiques et de l'hypertension (Beckman *et al.* 1990; Dikalova *et al.* 2010). Le gène de la eNOS, *NOS3*, serait régulé par la méthylation au niveau de son promoteur; en effet, il a été décrit que le gène *NOS3* est hypométhylé dans les cellules

endothéliales pouvant exprimer eNOS, alors qu'il est hyperméthylé dans les cellules musculaires lisses (Chan *et al.* 2004). Il n'est cependant pas connu si cette régulation de méthylation de *NOS3* est présente dans un contexte de MCV. À l'échelle globale, l'hypométhylation semble être un marqueur de MCV (Zaina *et al.* 2005). En effet, le contenu en 5mC est diminué dans l'aorte d'un modèle d'athérosclérose chez le lapin (Laukkanen *et al.* 1999), dans des lésion athérosclérotiques provenant d'échantillons humains, murins et de lapin (Hiltunen *et al.* 2002) ainsi que dans les leucocytes circulants de patients athérosclérotiques ayant souffert d'un AVC ou d'un infarctus du myocarde (Castro *et al.* 2003). Une équipe de chercheurs a utilisé un modèle transgénique de souris athérosclérotiques déficientes en ApoE afin d'étudier les profils de méthylation à différents stades de la progression de la maladie (Lund *et al.* 2004). Ils ont observé que des changements de méthylation étaient détectables avant même l'apparition de lésions et ce, davantage dans les cellules impliquées dans l'athérogénèse (aorte et leucocytes circulants) que dans des tissus contrôles (foie, gras et muscle squelettique) (Lund *et al.* 2004). Une autre étude effectuée chez des patients atteints de MCV, dans différents lits vasculaires (artère mammaire, veine saphène, aorte) et des lésions athérosclérotiques, ainsi que sur des cellules endothéliales aortiques et musculaires lisses en culture, montre une hyperméthylation spécifique au niveau du promoteur du gène codant pour le récepteur à l'estrogène alpha (*ER α*) (Post *et al.* 1999). Puisque ce gène est sous-exprimé chez ces patients, les auteurs proposent que cette marque épigénétique serait associée à l'âge et à la progression de la maladie (Post *et al.* 1999). Ceci est également supporté par le fait que le récepteur à l'estrogène a des effets protecteurs contre l'athérosclérose et qu'une perte de l'expression de *ER α* accélère la progression de l'athérosclérose chez l'homme (Kim *et al.* 2013).

Diverses études dans des contextes inflammatoires chroniques rapportent des changements de méthylation au niveau de certains marqueurs d'inflammation couramment associés aux MCV. À partir d'un échantillon sanguin, la méthylation au niveau du promoteur du gène *IL6*, codant pour l'IL-6, est significativement augmentée chez des femmes Coréennes obèses (88,2%) comparativement à celles avec un poids normal (75,3%) ou un surplus de poids (74,1%) (Na *et al.* 2015). Le lien entre ce changement de méthylation et l'expression d'IL-6 reste à être élucidé puisque les taux d'IL-6 n'ont pas été mesurés dans cette étude (Na *et al.* 2015). La méthylation du promoteur du gène codant pour TNF- $\alpha$  a été comparée entre un groupe de Japonais souffrant de parodontite chronique, de polyarthrite rhumatoïde et un groupe contrôle (Kojima *et al.* 2016).

L'étude démontre que la méthylation de 6 CpG identiques augmente dans les deux groupes malades comparativement au groupe contrôle (Kojima *et al.* 2016). Toutefois, l'expression de TNF- $\alpha$  reste à être évaluée dans cette étude (Kojima *et al.* 2016). Des études ont également été effectuées sur la méthylation du gène codant pour l'Angptl2, *ANGPTL2*, dans le contexte inflammatoire chronique du cancer, mais les conséquences de l'environnement inflammatoire sur la régulation épigénétique de l'Angptl2 ne sont pas encore bien définies dû au faible nombre d'études à ce sujet. En effet, un mécanisme de méthylation inactivant *ANGPTL2* est proposé dans le cadre de lignées cellulaires de cancer ovarien (Kikuchi *et al.* 2008) et dans des cellules de la moelle osseuse de patients souffrant du syndrome myélodysplasique (Lee *et al.* 2012), alors que dans un modèle de sarcome osseux, *ANGPTL2* est hypométhylé et l'expression de l'Angptl2 augmente avec la progression de la maladie (Odagiri *et al.* 2014). Ces résultats à première vue conflictuels démontrent l'hétérogénéité de la régulation épigénétique selon le contexte pathologique. Les rôles physiologiques de l'Angptl2 (survie cellulaire, biologie des cellules hématopoïétiques, angiogenèse) et leur implication de manière spécifique à chacun de ces types de cancer est également à considérer.

En résumé, on remarque une tendance similaire entre les diverses maladies et le vieillissement : les deux sont caractérisés par une hypométhylation générale et globale, alors qu'une hyperméthylation peut être observée au niveau de certains des gènes connus pour avoir un effet causal de l'état pathologique. Ces données démontrent l'immense potentiel thérapeutique clinique que peut générer l'étude de l'épigénétique des maladies cancéreuses et cardiovasculaires.

#### 1.2.1.3.6 L'hérédité des modifications épigénétiques

Plus récemment, l'étude de la régulation épigénétique commence à aborder un thème fort intéressant, mais également controversé : la transmission transgénérationnelle des modifications de méthylation de l'ADN. Il est important de définir les effets héréditaires, car bien que la transmission de la mère à sa progéniture puisse être considérée transgénérationnelle, il est difficile de dissocier la transmission épigénétique héréditaire des effets de l'exposition *in utero*. Chez l'humain, des modifications dans la méthylation de l'ADN chez l'enfant peuvent être induits par l'exposition *in utero* à la malnutrition (section 1.2.1.3.4) et/ou au stress psychologique (Cao-Lei

*et al.* 2014). Effectivement, un groupe de chercheurs de l'Université McGill de Montréal s'est intéressé aux effets épigénétiques d'un stress psychologique prénatal chez les enfants de femmes québécoises enceintes durant l'hiver de 1998 (Cao-Lei *et al.* 2014). Durant cette période une sévère crise de verglas a frappé le sud du Québec, causant une coupure de l'électricité pour une période allant de quelques heures jusqu'à 6 semaines (Cao-Lei *et al.* 2014). L'analyse pan-génomique de l'ADN obtenu à partir de lymphocytes circulants prélevés chez les enfants démontre que le degré de stress prénatal est corrélé avec des différences de méthylation dans 1 675 CpG codant pour 957 gènes dont certains sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T (Cao-Lei *et al.* 2014). Ainsi, l'environnement *in utero* peut induire des changements de méthylation chez l'humain qui seront conservés après la naissance. Pour cette raison, afin d'étudier spécifiquement l'hérédité des modifications épigénétiques, il faut cibler les interactions père-progéniture, puisque la contribution du père, du moins dans un contexte expérimental, se limite au sperme durant la conception.

Un effet épigénétique transgénérationnel en lien avec l'alimentation a été observé chez des rates femelles issues d'un croisement entre des rats mâles nourris avec une alimentation riche en gras et des rates femelles nourries avec une alimentation normale (Ng *et al.* 2010). Bien que nourries avec une alimentation normale, les rates femelles adultes de la deuxième génération ont manifesté des désordres métaboliques similaires à ceux observés chez leurs pères exposés à un stress métabolique, c'est-à-dire une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (Ng *et al.* 2010). De plus, ce phénotype était associé avec une hypométhylation ainsi qu'une surexpression de 1,76 fois du gène *Il13ra2* impliqué dans la croissance et le pouvoir invasif de lignées cellulaires cancéreuses du pancréas et dont l'expression est stimulée par la cytokine TNF- $\alpha$  (Ng *et al.* 2010). Selon les auteurs, cette étude est la première à démontrer que l'exposition paternelle à une alimentation riche en gras transmet un phénotype de désordre métabolique à la progéniture en lien avec des changements de méthylation dont l'implication fonctionnelle reste à être élucidée (Ng *et al.* 2010). Dans une autre étude, chez des souris mâles exposées à une restriction protéique, l'ADN extrait du foie de leur progéniture démontre une augmentation de 30% dans la méthylation d'une région régulatrice du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes alpha (*PPAR- $\alpha$* ; *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), un gène impliqué dans le métabolisme des lipides, en lien avec une diminution de son expression et une augmentation de l'expression de différents gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des lipides (Carone *et al.* 2010).

Une étude récente rapporte que l'induction du prédiabète, un état précurseur du diabète, chez la souris prédispose sa progéniture au développement de la résistance à l'insuline et à l'intolérance au glucose (Wei *et al.* 2014). Cet état pathologique dans la deuxième génération est accompagné de changements d'expression de 402 gènes dans les cellules pancréatiques (Wei *et al.* 2014). Les auteurs de cette étude ont également mesuré et comparé les régions différenciellement méthylées dans le sperme des souris mâles progéniteurs prédiabétiques et les changements de méthylation induits dans les cellules pancréatiques de souris dont le père était prédiabétique (Wei *et al.* 2014). En analysant la méthylation des domaines intragéniques (introns, exons, 5'UTR et 3'UTR), les auteurs observent que 1 189 des 3 020 gènes hyperméthylés et 1 080 des 3 001 gènes hypométhylés dans le sperme de la première génération sont également hyperméthylés ou hypométhylés dans les cellules pancréatiques de la deuxième génération (Wei *et al.* 2014). Cette étude suggère que le profil de méthylation du sperme exerce une influence importante sur le profil de méthylation des cellules pancréatiques, ce qui représente un mécanisme potentiel responsable de la transmission transgénérationnelle des désordres métaboliques (Wei *et al.* 2014).

Une étude récente chez l'humain démontre que l'obésité, un désordre métabolique héréditaire, affecte le profil de méthylation dans le sperme, ce qui pourrait permettre de comprendre, du moins partiellement, les mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission transgénérationnelle de l'obésité (Donkin *et al.* 2016). Un échantillon de sperme a été recueilli dans un groupe de sujets non-obèses (IMC de 22,9, âge de 36 ans, n=13) et dans un groupe de sujets obèses (IMC de 31,8, âge de 34 ans, n=10) et suite à l'analyse du profil de méthylation, l'étude démontre que 9 081 gènes sont différenciellement méthylés entre les deux groupes avec enrichissement de gènes impliqués dans le développement du système nerveux central : ces gènes différenciellement méthylés incluent des régulateurs de l'appétit ainsi que des gènes métaboliques (Donkin *et al.* 2016). Ces données démontrent que la méthylation de l'ADN du sperme varie avec le stimulus environnemental de l'alimentation et propose un nouveau mécanisme par lequel un désordre métabolique pourrait être transmis dans la génération subséquente.

En résumé, l'épigénétique, et particulièrement la méthylation de l'ADN, est un mécanisme de régulation de l'expression transcriptionnelle dynamique et sensible à l'environnement. Ce mécanisme est impliqué dans la régulation aberrante des principaux médiateurs de la réponse

inflammatoire et oxydante dans un contexte pathologique et pourrait donc contribuer au développement et à la progression des MCV, ainsi qu'à leur transmission transgénérationnelle.



## 2. OBJECTIFS DES ÉTUDES

### 2.1 Mise en contexte

Les MCV sont caractérisées par un contexte inflammatoire et oxydant chronique : l'homéostasie inflammatoire est rompue par une augmentation de l'expression de divers médiateurs inflammatoires, incluant le TNF- $\alpha$  et certaines interleukines ainsi que l'Angptl2, récemment identifiée, alors que la perturbation de l'équilibre rédox se caractérise généralement par une augmentation de l'expression des sources de radicaux libres couplée à une diminution de l'expression des enzymes antioxydantes. Pour identifier des cibles pharmacologiques et thérapeutiques, il est nécessaire d'identifier les gènes dont l'expression est aberrante ainsi que le mécanisme moléculaire par lequel s'effectue cette dérégulation. L'exercice physique chronique est une approche efficace dans la prévention primaire et secondaire des MCV puisqu'il permet d'atténuer à la fois l'inflammation et le stress oxydant. Bien que des changements d'expression au niveau de plusieurs gènes ont été identifiés, les mécanismes moléculaires régissant les effets bénéfiques de l'exercice restent à être clairement caractérisés.

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique impliqué dans la régulation des gènes en réponse à l'environnement. Ce mécanisme de régulation de l'expression est hautement dynamique et spécifique par rapport au gène régulé, la localisation du site de méthylation et le type cellulaire. En lien avec sa sensibilité aux stress environnementaux, le mécanisme de régulation de l'expression par la méthylation de l'ADN semblerait être impliqué dans la pathogénèse des maladies environnementales telles que les MCV et dans la réponse aux stimuli extracellulaires, tels que ceux générés par l'exercice physique.

Dans le but d'établir un mécanisme moléculaire liant l'inflammation et le stress oxydant aux MCV, l'objectif général de nos travaux est de caractériser la régulation de l'expression, par la méthylation de l'ADN, de certains gènes impliqués dans la pathogénèse des MCV et qui sont sensibles à l'exercice, dont *Sod2*, *Gpx1* et *ANGPTL2*.

## 2.2 Étude 1

Le vieillissement est associé à une accumulation de dommages oxydants et des changements de l'expression d'enzymes antioxydantes notamment au niveau vasculaire, pouvant induire la sénescence et la dysfonction endothéliale (Voghel *et al.* 2008; Gendron *et al.* 2012). Il est important de définir le vieillissement comme une dynamique d'augmentation de l'âge, qui diffère de la vieillesse. Des approches expérimentales réduisant le stress oxydant telles que la supplémentation avec des antioxydants ou l'exposition à l'exercice physique sont en mesure de renverser ces dommages oxydants (Voghel *et al.* 2008; Durrant *et al.* 2009). Des travaux du laboratoire ont rapporté que l'expression de la MnSOD, une enzyme antioxydante qui protège le système cardiovasculaire contre le stress oxydant généré avec l'âge (Roos *et al.* 2013; Kwak *et al.* 2015), était diminuée dans l'aorte de souris vieillissantes lorsque traitées avec un polyphénol antioxydant, la catéchine (Gendron *et al.* 2012). Ceci suggère donc que l'expression de la MnSOD soit sensible à la signalisation des radicaux libres, mais le mécanisme moléculaire responsable de la régulation adaptative à l'environnement rédox est peu connu. La régulation de l'expression via la méthylation de l'ADN est un mécanisme sensible à l'environnement rédox et pourrait donc être impliquée dans l'adaptation au stress oxydant (Cencioni *et al.* 2013).

### 2.2.1 Hypothèse

L'expression vasculaire de la MnSOD est régulée par la méthylation de l'ADN en réponse à l'accumulation des radicaux libres associée avec le vieillissement chez la souris en fin de maturation, ce qui illustre l'impact de l'environnement lors de la maturation.

### 2.2.2 Objectifs spécifiques

- 1) Identifier et quantifier les changements de méthylation au niveau du gène *Sod2* induits avec le vieillissement chez des souris âgées de 9 et 12 mois.
- 2) Étudier l'impact d'interventions visant à réduire les dommages oxydants, soit la supplémentation avec le polyphénol catéchine ou l'exercice physique volontaire, sur les changements de méthylation observés avec l'âge.

- 3) Confirmer la fonctionnalité des changements de méthylation sur l'expression de *Sod2*.

## **2.3 Étude 2**

Dans le modèle de souris transgéniques LDLr<sup>-/-</sup>;hApoB<sup>+/+</sup> dyslipidémiques, les lésions athérosclérotiques (ATX) apparaissent spontanément à l'âge de 3 mois et se développent progressivement pour recouvrir environ 20% de la lumière interne de l'aorte à l'âge de 6 mois (Bolduc *et al.* 2011). Cette lignée de souris a été choisie due à sa propriété de générer des lésions athérosclérotiques de manière spontanée, c'est-à-dire sans l'implantation d'une alimentation riche en gras, contrairement à certains autres modèles murin de dyslipidémie (Kapourchali *et al.* 2014). L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par un profil altéré de l'expression de diverses enzymes pro- et antioxydantes en lien avec un taux élevé de radicaux libres et de stress oxydant (Weber & Noels 2011). Ce contexte pro-oxydant se traduit par des dommages dans la fonction endothéliale, mais peut être renversé par l'exercice physique (Bolduc *et al.* 2011). L'exercice physique stimule la défense antioxydante endogène, notamment au niveau du muscle squelettique où est libéré une grande quantité de ROS dépendantes de l'activité métabolique (Radak *et al.* 2008). Cependant, le mécanisme moléculaire des bienfaits de l'exercice physique sur la défense antioxydante est mal connu.

### **2.3.1 Hypothèse**

L'athérosclérose induit des changements épigénétiques au niveau des gènes impliqués dans les défenses antioxydantes, changements pouvant être renversés par l'exercice physique.

### **2.3.2 Objectifs spécifiques**

- 1) Caractériser les changements d'expression des gènes impliqués dans le système rédox dans le muscle squelettique de souris sévèrement dyslipidémiques qui développent spontanément des lésions athérosclérotiques.
- 2) Identifier les gènes régulés par méthylation de l'ADN et quantifier les changements de méthylation avec le contexte pathologique.

- 3) Observer les effets de l'exercice sur les changements engendrés par la dyslipidémie.
- 4) Confirmer la fonctionnalité des changements de méthylation sur l'expression des gènes pour qui la méthylation varie avec les stimuli environnementaux.

## **2.4 Étude 3**

L'Angptl2 est une protéine circulante avec des propriétés pro-inflammatoires et pro-athérosclérotiques (Farhat *et al.* 2013; Horio *et al.* 2014). L'implication de l'Angptl2 dans la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques est supportée par une augmentation significative de la concentration circulante d'Angptl2, en parallèle avec des marqueurs inflammatoires classiques tels que le CRP, chez des patients atteints de MCV (Tabata *et al.* 2009; Thorin-Trescases & Thorin 2014). La régulation de l'expression de l'Angptl2 par la méthylation de l'ADN au niveau du gène *ANGPTL2* a précédemment été observée dans le contexte de divers cancers (Kikuchi *et al.* 2008; Lee *et al.* 2012; Odagiri *et al.* 2014). Toutefois, la régulation épigénétique de l'Angptl2 n'a jamais été étudiée en lien avec les MCV.

### **2.4.1 Hypothèse**

Le promoteur de l'*ANGPTL2* est différenciellement méthylé dans les leukocytes circulants isolés à partir de patients souffrant de MCV, comparativement à des sujets en santé.

### **2.4.2 Objectifs spécifiques**

- 1) Quantifier les taux circulants d'Angptl2 chez des patients ayant souffert d'un syndrome coronarien aigu comparativement à des sujets en santé du même âge et des sujets en santé plus jeunes.
- 2) Identifier et quantifier les sites de méthylation dans le gène *ANGPTL2* en comparant les 3 groupes de participants.
- 3) Confirmer la fonctionnalité des changements de méthylation sur l'expression de l'Angptl2.

### 3. ARTICLES

#### 3.1 Article 1

Titre: Age-Dependent Demethylation of Sod2 Promoter in the Mouse Femoral Artery.

Cet article a été accepté pour publication le 13 janvier 2016 et publié dans le journal *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* le 16 février 2016.

##### ***3.1.1 Apport original et contribution des coauteurs***

**Albert Nguyen:** Conception du projet, réalisation des expériences, cueillette et analyse des données, interprétation des résultats, préparation des figures et rédaction du manuscrit.

**François Leblond:** Conception et gestion du projet.

**Maya Mamarbachi:** Conception d'expériences (essai de méthylation *in vitro*).

**Steve Geoffroy:** Conception d'expériences (quantification de la méthylation par EpiTYPER).

**Eric Thorin :** Conception du projet, interprétation des résultats et révision du manuscrit.

## Research Article

# Age-Dependent Demethylation of *Sod2* Promoter in the Mouse Femoral Artery

Albert Nguyen,<sup>1,2</sup> François Leblond,<sup>1,2,3</sup> Maya Mamarbachi,<sup>2</sup>  
Steve Geoffroy,<sup>2</sup> and Eric Thorin<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3T 1J4

<sup>2</sup>Research Centre, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, QC, Canada H1T 1C8

<sup>3</sup>Novartis Pharmaceuticals Canada Inc., Dorval, QC, Canada H9S 1A9

<sup>4</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada H3T 1J4

Correspondence should be addressed to Eric Thorin; [REDACTED]

Received 3 September 2015; Accepted 13 January 2016

Academic Editor: Çiğdem Yenisey

Copyright © 2016 Albert Nguyen et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We studied the age-dependent regulation of the expression of the antioxidant enzyme manganese superoxide dismutase (MnSOD encoded by *Sod2*) through promoter methylation. C57Bl/6 mice were either (i) sedentary (SED), (ii) treated with the antioxidant catechin (CAT), or (iii) voluntarily exercised (EX) from weaning (1-month old; mo) to 9 mo. Then, all mice aged sedentarily and were untreated until 12 mo. *Sod2* promoter methylation was similar in all groups in 9 mo but decreased ( $p < 0.05$ ) in 12 mo SED mice only, which was associated with an increased ( $p < 0.05$ ) transcriptional activity *in vitro*. At all ages, femoral artery endothelial function was maintained; this was due to an increased ( $p < 0.05$ ) contribution of eNOS-derived NO in 12 mo SED mice only. CAT and EX prevented these changes in age-related endothelial function. Thus, a ROS-dependent epigenetic positive regulation of *Sod2* gene expression likely represents a defense mechanism prolonging eNOS function in aging mouse femoral arteries.

## 1. Introduction

In the vasculature, age-related failure to control reactive oxygen species (ROS) levels creates a state of oxidative stress that irreversibly damages endothelial cell functions and leads to senescence [1]. For this reason, various antioxidants have been shown to have a beneficial effect on endothelial function, particularly through activation of the ROS-sensitive nitric oxide pathway [2, 3]. In the vasculature, chronic exercise (EX) maintains an optimal cardiovascular profile, increases antioxidant defenses, and preserves vascular endothelial function [4–7]. The endogenous antioxidant enzyme manganese superoxide dismutase (MnSOD) maintains low levels of ROS; knockdown of MnSOD is deleterious and shortens lifespan, while its overexpression counteracts age-related cardiovascular damage [8, 9]. We previously observed that the expression of MnSOD was reduced in the aorta of 12 mo mice chronically treated with the antioxidant catechin (CAT) [10], but the mechanisms responsible for

adaptive regulation to the redox environment are poorly understood. It is known that epigenetic DNA methylation regulates gene expression and is sensitive to the redox environment [5, 11, 12]. Studies have shown that methylation of various regions in the *SOD2* gene correlates with changes in MnSOD expression such as in ROS-rich cancer cells [13]. Thus, we hypothesized that ROS regulate MnSOD expression in vascular cells through an epigenetic mechanism, namely, DNA methylation. This would protect against oxidative stress and, ultimately, preserve endothelial function.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Animal Model.** To test our hypothesis, C57Bl/6 mice ( $n = 10$  in each group) were either left sedentary (SED), treated with CAT (30 mg/kg/d) to reduce ROS availability [10], or voluntarily exercised by access to a running wheel (EX) to preserve antioxidant defenses [14] from weaning to the age

of 9 months (9 mo) [14]. Half of each group was then kept in sedentariness and untreated for an additional 3 months. Approval by the Montreal Heart Institute Animal Ethical Committee (#R2014-62-02) was given for all animal experiments. At 9 and 12 mo, the femoral feed artery was isolated after euthanasia under anesthesia for reactivity studies [15] and for DNA extraction and methylation quantification.

**2.2. DNA Methylation Quantification.** Bisulfite conversion of DNA was done using the EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Irvine, CA). DNA methylation was quantified by EpiTYPER assay (Sequenom, San Diego, CA), as previously described [16]. For this method, specific forward (aggaagagagATGTTAGGTTAGGTTTTAGGGAAGG) and reverse (cagtaatacgcactatagggagaaggctTCCCCTATACCAAATTAATAAAAACC) primers were used to amplify the region of interest.

**2.3. In Vitro Methylation.** For *in vitro* methylation studies, constructions were done using the CpG-free and promoterless vector pCpG-free basic-Lucia (Invivogen, San Diego, CA) as the backbone. A 469-bp *Sod2* promoter region was amplified on mouse genomic DNA using forward BamHI (5'-ATTGGATCCTTTGCAGCTCACAGCCAGAGCTGGACA-3') and reverse HindIII (5'-TAAAAGCTTAGCCAGCCACGCCCGCCGCCCG-3')-linked primers and subsequently inserted in the backbone using BamHI and HindIII restriction sites. Cloned vectors were isolated by Qiagen QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). M.SssI CpG methyltransferase (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) was used for *in vitro* methylation according to manufacturer's instructions. Methylated DNA was then purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and quantified by NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, DE). Methylation was confirmed by digestion with the methylation-sensitive restriction enzymes HhaI and HpaII. HEK293 cells grown to confluence on 96-well plates were transfected with the pCpG-free *Sod2* vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Following 24 h transfection, luciferase activity was measured with the QUANTI-Luc reagent (Invivogen) by luminescence detection.

**2.4. Statistical Analysis.** Comparisons were done using 2-way ANOVA with Bonferroni posttests and the data were reported as means  $\pm$  SEM.

### 3. Results

**3.1. Catechin Treatment and Exercise Prevent Age-Induced *Sod2* Demethylation.** First, we studied the regulation of *Sod2* in segments of femoral arteries by targeting a DNA region in the promoter enriched in methylable CpG sites previously identified using the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) (Figure 1(a)). Out of the 16 CpG sites found in this region, only CpG #13 showed detectable levels of methylation (>2%) (Figure 1(b)). The novel CpG site identified in our study complements the various CpG methylation sites previously characterized within the human *SOD2* gene (reviewed in [13]). Methylation of this site was

similar between the 3 groups of 9 mo mice (Figure 1(c)). When compared to their respective 9 mo group, only 12 mo SED mice showed a 53% decrease in CpG #13 methylation, while CAT and EX mice remained unchanged with age. When comparing methylation levels at 12 mo, the EX group was the highest, the CAT group was intermediate, and the SED group was the lowest ( $p < 0.05$ ; Figure 1(c)). Therefore, demethylation of this CpG seems sensitive to the increase of ROS occurring with age and it can be prevented by CAT and EX; clearly, EX initiated during early life is more efficient than CAT at maintaining high methylation level in the promoter, suggesting a better regulation of the redox environment in chronically exercising mice, as previously suggested [14].

**3.2. In Vitro Methylation Decreases Expression.** We then tested whether methylation of the promoter regulates *Sod2* gene expression. Methylation of the promoter of the CpG-free *Sod2* gene construct (Figure 1(d)) led to a significant decrease in luciferase transcriptional activity compared to the unmethylated promoter in HEK293 cells (Figure 1(e)), confirming the regulatory role of this CpG in *Sod2* transcription. It is known, indeed, that methylation of different sites in the *Sod2* promoter region inhibits transcription by blocking binding of transcription factors [17, 18].

**3.3. Catechin Treatment and Exercise Prevent the Altered Vascular Function with Age.** Finally, we investigated the impact of *Sod2* methylation on the endothelial function of isolated and pressurized femoral artery segments. Endothelium-dependent dilations induced by increasing concentrations of acetylcholine were similar in arteries isolated from 9 and 12 mo mice (Figure 2(a)). After inhibition of NO production with LNNA, however, dilations tended to be lower at 9 mo and were significantly reduced at 12 mo in arteries isolated from SED mice only (Figure 2(b)). These results are indicative of the age-dependent loss of a highly ROS-sensitive dilatory factor that we previously identified in these arteries as a 17-octadecynoic acid (cytochrome P450/epoxygenase inhibitor) sensitive endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) [15]. We propose that NO production is increased to maintain the overall ability of the vessel to dilate in order to compensate for the loss of EDHF; because NO is susceptible to ROS inactivation, although to a lesser extent than EDHF in these arteries [15], an efficient antioxidant environment is required to preserve NO bioavailability [4]. These results, in parallel with the changes in methylation of *Sod2* promoter, suggest that the SED-associated accumulation of ROS in the femoral artery could stimulate the expression of MnSOD as a stress resistance mechanism in an attempt to maintain optimal endothelial function. In addition, they suggest that both CAT and to a greater extent regular EX delay the need for this adaptive epigenetic regulation to a later age by maintaining low oxidative stress. This hypothetical cascade of events is illustrated in Figure 3.

### 4. Discussion

In summary, our data confirm that vascular cells adapt to the changes in environment to limit stress by regulating the

Chromosome 17: 13007528–13007844  
 [...]aatgtcaggttagggcccagggaaggtcactcccgggcataaattaactgg gtcagaggggcccctgattactccataattctgaccagcagcagagccttg  
 1  
 gcttttccggaggaaagtctccagggtttccagaagcaggagtagaaata gagtggaaagctttgtagctcacagccagagctggacagggccggccggagg  
 2 3 4  
 aggggcgaggccacaccgggggcggacggggttccccgaggcggggcgg ggccaaggccgatgggtggggcgtggctgtagcaagcagccgggcctctac  
 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16  
 caatttggcacagggga[...]

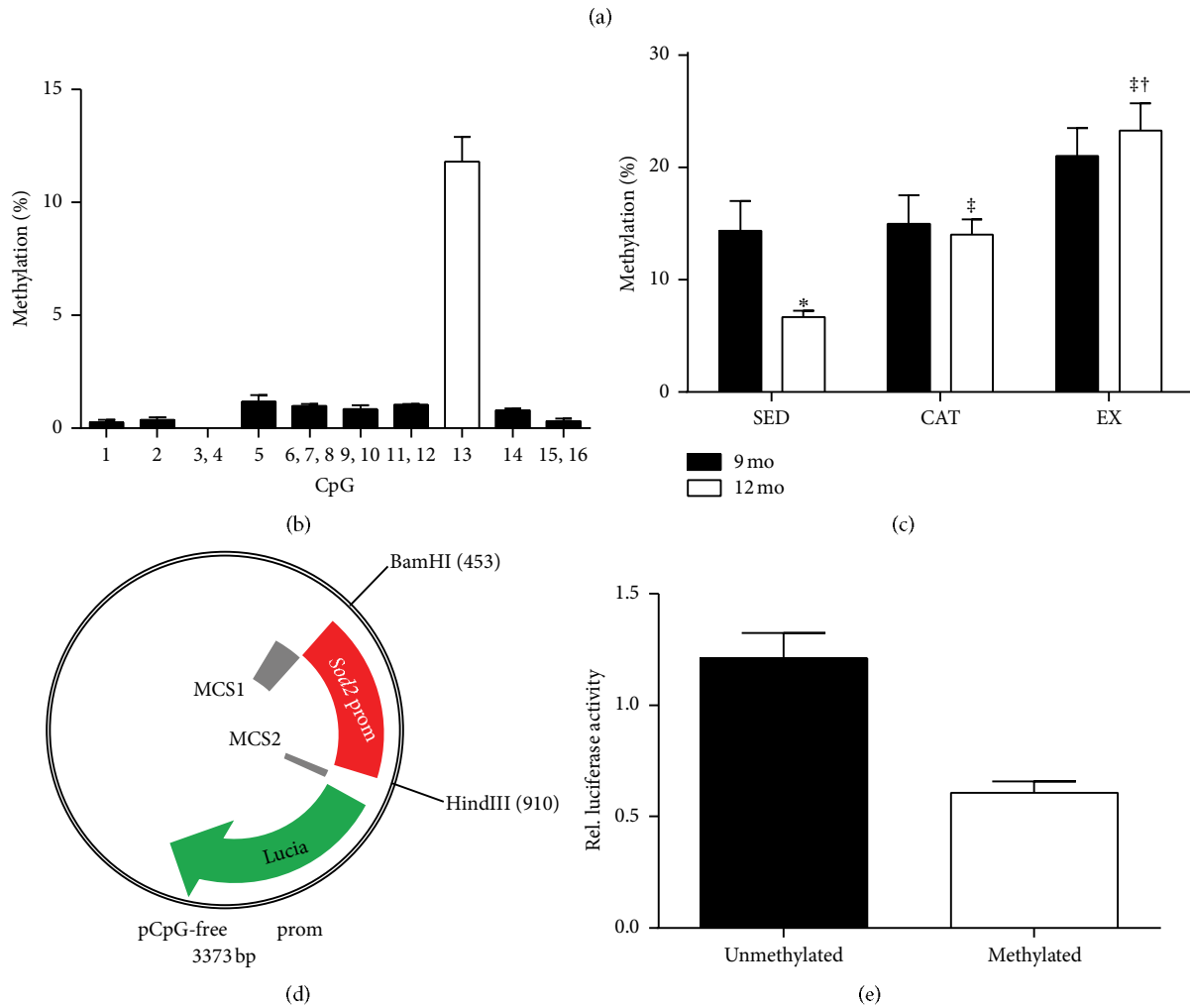


FIGURE 1: (a) Identification of all 16 CpG sites located in the targeted promoter region of the *Sod2* gene and (b) their methylation level independently of the experimental conditions tested. (c) Decrease with age (12 mo) in *Sod2* promoter methylation is prevented when mice had been treated by catechin, but more efficiently when voluntarily exercising. Methylation percentage of *Sod2* CpG in the femoral artery from sedentary (SED), voluntarily exercised (EX), and catechin-treated (CAT) mice at 9 mo and 12 mo. \* $p < 0.05$  compared with 9 mo; ‡ $p < 0.05$  compared with SED; † $p < 0.05$  compared with CAT;  $n = 3-7$  (two-way ANOVA, Bonferroni posttests). (d) Representation of the pCpG-free *Sod2* construct. (e) *In vitro* methylation decreases gene activity in a luciferase reporter assay. Luciferase activity was measured following transfection of HEK293 cells with the unmethylated or methylated pCpG-free *Sod2* plasmid. \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .

expression of defense mechanisms [19]. The current work extends from our two previous studies [14, 15] and suggests that ROS may trigger the transcriptional activity of the *Sod2* gene by epigenetic regulation of promoter activity through demethylation of at least one relevant CpG site.

Like others [20, 21], we identified an epigenetic mechanism responsible for *Sod2* expression and, to our knowledge,

methylation at this specific site has never been reported. Because of the small size of the isolated vessels, it was not possible to extract DNA and proteins or DNA and mRNA from the samples. This is the main limitation of the study. In addition to DNA methylation, femoral arteries were also used, in the same mice, to assess endothelial function in isolated pressurized segments, further limiting



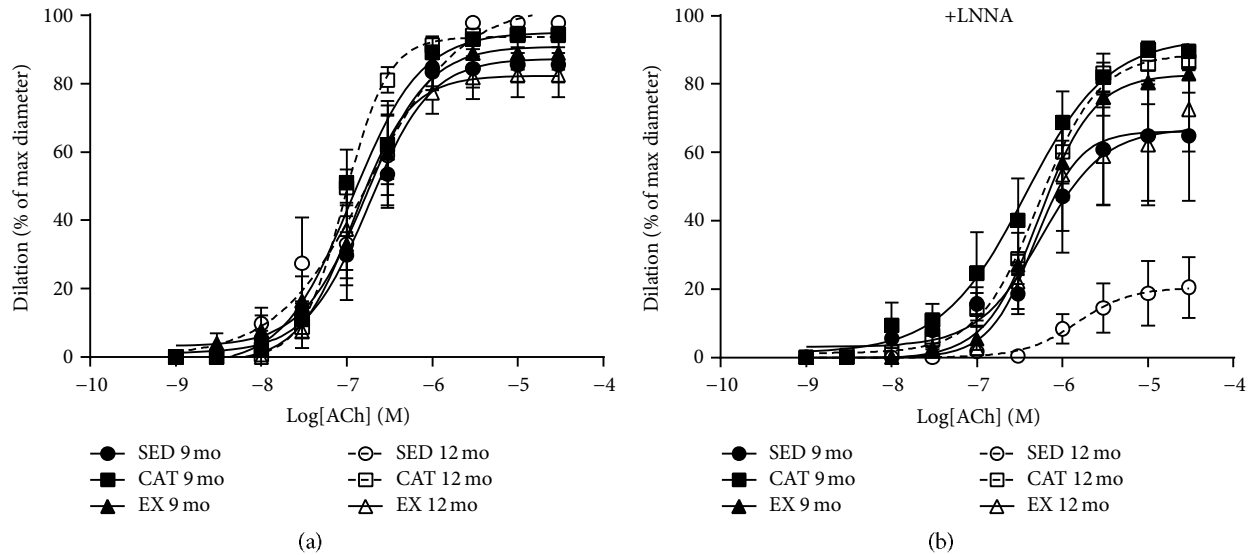


FIGURE 2: Catechin treatment and voluntary exercise prevent age-induced alterations in endothelial function. ACh-induced dilation of mouse femoral artery from sedentary (SED), voluntary exercising (EX), and catechin-treated (CAT) mice at 9 mo and 12 mo. Measurements were made in (a) basal conditions or (b) in the presence of N-nitro-L-arginine (LNNA; 100  $\mu$ M). \*  $p < 0.05$ ,  $n = 3-9$ .

the amount of tissue available. Because of this technical limitation, MnSOD expression was not quantified. Without the direct measurement of MnSOD expression in the vessel, the *in vitro* methylation assay was required to confirm the regulatory function of this methylation site (Figure 1(e)). The results obtained by this approach confirm that methylation of this site inhibits gene activity and allows us to speculate that in femoral arteries of aged mice any changes in the *Sod2* gene methylation can translate into changes in MnSOD expression. In addition, in a previous study using identical experimental groups of mice [14], we measured MnSOD activity in the aorta: at the age of 9 months, no difference in MnSOD activity was observed among control, CAT-treated, or exercised mice, data that are in agreement with similar *Sod2* methylation levels among groups in 9-month mice. At the age of 12 months, we previously observed that MnSOD activity tended to increase in the untreated sedentary group of mice, while MnSOD was the lowest in the exercising mice [14]; again, these results fit with a lower level of *Sod2* methylation in 12-month control sedentary mice and with a higher methylation level in 12-month exercised mice as shown in this study. However, despite the general agreement between aortic MnSOD activity and the methylation data obtained in femoral arteries, no direct correlation should be made.

It has been shown that vascular MnSOD expression is directly correlated with the preservation of vascular function [22, 23]. We considered the possibility that, while ROS trigger damage to the vascular endothelium, they also could signal for the upregulation of antioxidant defense mechanisms. We hypothesized that an epigenetic mechanism would be at the root of this regulatory adaptive process (Figure 3). Our results tend to support our hypothesis by showing that *Sod2* promoter methylation is regulated in response to the physiological context of aging vascular cells. Indeed, the observed

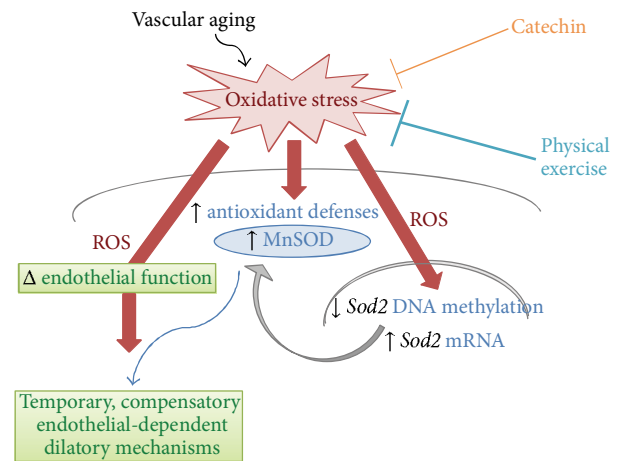


FIGURE 3: Schematic representation of redox-dependent *Sod2* promoter methylation in aging vascular cells. Aging is associated with a rise in oxidative stress, which favours increased MnSOD antioxidant defense, at least partially *via* a lower methylation of *Sod2*; a rise in MnSOD leads to a temporary, compensatory NO-dependent relaxing pathway that preserves endothelial function. This cascade is not observed in mice exposed to a protective cardiovascular environment provided by chronic treatment with the antioxidant catechin or long-term exposure to physical exercise.

decrease in *Sod2* methylation in 12-month control mice likely translates into higher MnSOD expression, in response to an age-dependent rise in oxidative stress. In contrast, the level of *Sod2* methylation rose in 12-month CAT-treated or exercised mice, suggesting lower MnSOD expression and activity in the antioxidant environment provided by both long-term catechin treatment and exercise. The reduction in promoter

methylation of *Sod2* may therefore represent an adaptive protective effect in order to upregulate MnSOD expression.

In parallel with decreased *Sod2* methylation, aged SED mice suffer from an altered endothelial function, revealed by a NO-dependent dilatory pathway not observed in CAT-treated or exercised mice, suggesting that a shift in the redox environment requires the expression of MnSOD antioxidant enzyme to maintain the overall endothelial function, at least temporarily. Catechin treatment and chronic exercise were able to prevent the age-induced effects on the vasculature together with the changes in *Sod2* methylation. We therefore believe that, in accordance with our working hypothesis, aging is associated with a rise in oxidative stress, which favours increased MnSOD antioxidant defense, at least partially via a lower methylation of *Sod2*, and leads to a compensatory NO-dependent relaxing pathway. This cascade is not observed in mice exposed to a protective cardiovascular environment. Further studies are required to determine at what age (>12 months) MnSOD antioxidant defense fails and oxidative damage compromises the compensatory endothelial relaxing pathway.

We hypothesized that the molecular signal responsible for the changes in DNA methylation is free radicals that accumulate with age in the vasculature: high oxidative stress leads to low DNA methylation, while low oxidative stress leads to high DNA methylation of *Sod2*, permitting fine-tuning in antioxidant enzyme expression according to the redox environment (Figure 3). Accordingly, the presence of the antioxidant catechin prevented the changes in DNA methylation. Surprisingly, exercise is associated with even higher methylation levels when compared to catechin, suggesting that exercise further decreases free radicals production, which would require even less MnSOD expression. This difference between catechin and exercise is in accordance with our previous study showing that exercise was more efficient at protecting cerebrovascular endothelial function than catechin treatment [14]. Relevant to this observation, the beneficial effects of antioxidant supplementation on the treatment of ROS-elevated diseases remain unclear, as reported by large-scale clinical trials [24].

Further studies are required to confirm and understand the regulatory role of free radicals on DNA methylation, as these interpretations are speculative.

In C57Bl/6 mice, 9 months of age is the tipping point for the maintenance of the endothelial function, the maturation of the defense mechanisms responsible for endothelial stress resistance being largely dependent on the early life diet and exercise environment [10, 14]. Our study provides, therefore, new insights into the mechanisms responsible for stress resistance by demonstrating that ROS may stimulate the expression of an adaptive defense system by regulating *Sod2* gene expression through methylation of the promoter. Whether beneficial interventions influence *Sod2* methylation in a direct manner or rather through the inhibition of ROS-driven epigenetic changes is unknown. Further studies are required to understand the mechanisms by which ROS interact with antioxidant enzymes regulation, likely involving the dual DNA methyltransferase and histone-modifying enzymes [25].

## 5. Conclusions

In the femoral artery of aging mice, a decrease in *Sod2* methylation can be prevented by either polyphenol supplementation or chronic exercise. This suggests a novel mechanism by which the expression of this antioxidant enzyme is regulated in response to a change in the redox environment.

## Abbreviations

EDHF:	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hydrogen peroxide
MnSOD:	Manganese superoxide dismutase
NO:	Nitric oxide
ROS:	Reactive oxygen species.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgment

This work was funded by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 14496).

## References

- [1] G. Voghel, N. Thorin-Trescases, N. Farhat et al., "Chronic treatment with *N*-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 129, no. 5, pp. 261–270, 2008.
- [2] N. Xia, U. Förstermann, and H. Li, "Resveratrol and endothelial Nitric oxide," *Molecules*, vol. 19, no. 10, pp. 16102–16121, 2014.
- [3] J. H. Kim, C. Auger, and V. B. Schini-Kerth, "BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 20, no. 22, pp. 3521–3529, 2014.
- [4] J. R. Durrant, D. R. Seals, M. L. Connell et al., "Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase," *Journal of Physiology*, vol. 587, no. 13, pp. 3271–3285, 2009.
- [5] J. A. Hawley, M. Hargreaves, M. J. Joyner, and J. R. Zierath, "Integrative biology of exercise," *Cell*, vol. 159, no. 4, pp. 738–749, 2014.
- [6] R. H. Lambertucci, A. C. Levada-Pires, L. V. Rossoni, R. Curi, and T. C. Pithon-Curi, "Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 128, no. 3, pp. 267–275, 2007.
- [7] D. R. Seals, A. E. Walker, G. L. Pierce, and L. A. Lesniewski, "Habitual exercise and vascular ageing," *The Journal of Physiology*, vol. 587, part 23, pp. 5541–5549, 2009.
- [8] C. M. Roos, M. Hagler, B. Zhang, E. A. Oehler, A. Arghami, and J. D. Miller, "Transcriptional and phenotypic changes in aorta and aortic valve with aging and MnSOD deficiency in mice,"

- The American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 305, no. 10, pp. H1428–H1439, 2013.
- [9] H. B. Kwak, Y. Lee, J. H. Kim, H. Van Remmen, A. G. Richardson, and J. M. Lawler, “MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart,” *The Journals of Gerontology A, Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 70, no. 5, pp. 533–544, 2014.
- [10] M.-E. Gendron, N. Thorin-Trescases, A. M. Mamarbachi et al., “Time-dependent beneficial effect of chronic polyphenol treatment with catechin on endothelial dysfunction in aging mice,” *Dose-Response*, vol. 10, no. 1, pp. 108–119, 2012.
- [11] G. H. Kim, J. J. Ryan, and S. L. Archer, “The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease,” *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 18, no. 15, pp. 1920–1936, 2013.
- [12] C. Cencioni, F. Spallotta, F. Martelli et al., “Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 9, pp. 17643–17663, 2013.
- [13] A. R. Cyr, M. J. Hitchler, and F. E. Domann, “Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG Methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics,” *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 18, no. 15, pp. 1946–1955, 2013.
- [14] F. Leblond, A. Nguyen, V. Bolduc et al., “Postnatal exposure to voluntary exercise but not the antioxidant catechin protects the vasculature after a switch to an atherogenic environment in middle-age mice,” *Pflügers Archiv*, vol. 465, no. 2, pp. 197–208, 2013.
- [15] S. Krummen, A. Drouin, M.-È. Gendron, J. R. Falck, and E. Thorin, “ROS-sensitive cytochrome P450 activity maintains endothelial dilatation in ageing but is transitory in dyslipidaemic mice,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 147, no. 8, pp. 897–904, 2006.
- [16] M. Ehrlich, M. R. Nelson, P. Stanssens et al., “Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 44, pp. 15785–15790, 2005.
- [17] D. R. Hodge, W. Xiao, B. Peng, J. C. Cherry, D. J. Munroe, and W. L. Farrar, “Enforced expression of superoxide dismutase 2/manganese superoxide dismutase disrupts autocrine interleukin-6 stimulation in human multiple myeloma cells and enhances dexamethasone-induced apoptosis,” *Cancer Research*, vol. 65, no. 14, pp. 6255–6263, 2005.
- [18] Y. Huang, J. Peng, L. W. Oberley, and F. E. Domann, “Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5′ CpG island,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 314–320, 1997.
- [19] E. Thorin, “On the environmental stress that reshapes our vessels,” *Cardiovascular Research*, vol. 93, no. 4, pp. 537–539, 2012.
- [20] J. Nanduri, V. Makarenko, V. D. Reddy et al., “Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 7, pp. 2515–2520, 2012.
- [21] S. L. Archer, G. Marsboom, G. H. Kim 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*, vol. 121, no. 24, pp. 2661–2671, 2010.
- [22] M. Ohashi, M. S. Runge, F. M. Faraci, and D. D. Heistad, “MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 10, pp. 2331–2336, 2006.
- [23] Z. Liu, Y. Gou, H. Zhang et al., “Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall,” *Redox Biology*, vol. 3, pp. 88–99, 2014.
- [24] H. N. Siti, Y. Kamisah, and J. Kamsiah, “The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review),” *Vascular Pharmacology*, vol. 71, pp. 40–56, 2015.
- [25] M. S.-C. Yan, C. C. Matouk, and P. A. Marsden, “Epigenetics of the vascular endothelium,” *Journal of Applied Physiology*, vol. 109, no. 3, pp. 916–926, 2010.

## 3.2 Article 2

Titre: Epigenetic Regulatory Effect of Exercise on Glutathione Peroxidase 1 Expression in the Skeletal Muscle of Severely Dyslipidemic Mice.

Cet article a été accepté pour publication le 9 mars 2016 et publié dans le journal *PLoS One* le 24 mars 2016.

### 3.2.1 *Apport original et contribution des coauteurs*

**Albert Nguyen** : Conception du projet, réalisation des expériences, cueillette et analyse des données, interprétation des résultats, préparation des figures et rédaction du manuscrit.

**Natacha Duquette** : Cueillette de données (paramètres hémodynamiques et d'exercice des souris)

**Maya Mamarbachi**: Conception d'expériences (essai de méthylation *in vitro*).

**Eric Thorin** : Conception du projet, interprétation des résultats et révision du manuscrit.

RESEARCH ARTICLE

# Epigenetic Regulatory Effect of Exercise on Glutathione Peroxidase 1 Expression in the Skeletal Muscle of Severely Dyslipidemic Mice

Albert Nguyen<sup>1,2</sup>, Natacha Duquette<sup>2</sup>, Maya Mamarbachi<sup>2</sup>, Eric Thorin<sup>1,2,3\*</sup>

**1** Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, **2** Montreal Heart Institute, Research Center, Montreal, Quebec, Canada, **3** Department of Surgery, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

\* 



 OPEN ACCESS

**Citation:** Nguyen A, Duquette N, Mamarbachi M, Thorin E (2016) Epigenetic Regulatory Effect of Exercise on Glutathione Peroxidase 1 Expression in the Skeletal Muscle of Severely Dyslipidemic Mice. PLoS ONE 11(3): e0151526. doi:10.1371/journal.pone.0151526

**Editor:** Laszlo Csernoch, University of Debrecen, HUNGARY

**Received:** September 22, 2015

**Accepted:** February 28, 2016

**Published:** March 24, 2016

**Copyright:** © 2016 Nguyen et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Canadian Institutes of Health Research operating grant numbers 14496 and 133649 to ET (<http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/193.html>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Approval by the Montreal Heart Institute Animal Ethical Committee (#R2014-62-02) was given for all animal experiments, which

## Abstract

Exercise is an effective approach for primary and secondary prevention of cardiovascular diseases (CVD) and loss of muscular mass and function. Its benefits are widely documented but incompletely characterized. It has been reported that exercise can induce changes in the expression of antioxidant enzymes including Sod2, Trx1, Prdx3 and Gpx1 and limits the rise in oxidative stress commonly associated with CVD. These enzymes can be subjected to epigenetic regulation, such as DNA methylation, in response to environmental cues. The aim of our study was to determine whether in the early stages of atherogenesis, in young severely dyslipidemic mice lacking LDL receptors and overexpressing human ApoB100 (LDLR<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup>), exercise regulates differentially the expression of antioxidant enzymes by DNA methylation in the skeletal muscles that consume high levels of oxygen and thus generate high levels of reactive oxygen species. Expression of *Sod2*, *Trx1*, *Prdx3* and *Gpx1* was altered by 3 months of exercise and/or severe dyslipidemia in 6-mo dyslipidemic mice. Of these genes, only *Gpx1* exhibited changes in DNA methylation associated with dyslipidemia and exercise: we observed both increased DNA methylation with dyslipidemia and a transient decrease in DNA methylation with exercise. These epigenetic alterations are found in the second exon of the *Gpx1* gene and occur alongside with inverse changes in mRNA expression. Inhibition of expression by methylation of this specific locus was confirmed *in vitro*. In conclusion, *Gpx1* expression in the mouse skeletal muscle can be altered by both exercise and dyslipidemia through changes in DNA methylation, leading to a fine regulation of free radical metabolism.

## Introduction

Chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis are characterized in part by high levels of free radicals, inducing oxidative stress [1]. This oxidative stress targets DNA, lipids and proteins, altering cellular functions and leading to organ failure [2]. To maintain a healthy redox equilibrium, cells normally express endogenous antioxidant enzymes including peroxiredoxins (Prx), thioredoxins (Trx), superoxide dismutases (SOD) and glutathione peroxidases (Gpx).

were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Canada.

These enzymes inactivate reactive oxygen species (ROS) and maintain them to physiological levels. ROS are indeed signalling molecules and natural by-products of the metabolic machinery and are therefore necessary for cellular function [3].

ROS are poorly regulated in the presence of a chronic inflammatory state such as diabetes, cancer and dyslipidemia [4]. With inflammation, the *redox* equilibrium tips towards the generation of free radicals by simultaneous occurrences of pro-oxidative events, including dysregulation of ROS-generating enzymes such as NADPH oxidases (NOX) normally involved in cell survival, growth and death [5], as well as regulators of the mitochondrial respiratory chain such as uncoupling proteins (UCP) [6]. The primary consequence of a rise in oxidative stress is a vascular endothelial dysfunction, a marker of future cardiovascular events [7]. However, clinical trials using antioxidants in patients with cardiovascular diseases (CVD) have provided controversial and still inconclusive results [8, 9]. In contrast, while physical exercise paradoxically increases ROS production both in animal studies [10] and humans [11], physical training is an excellent primary and secondary prevention strategy in CVD [12] and delay the loss muscle mass and function (sarcopenia) [13], including in patients suffering from atherosclerosis [14, 15]. While an acute bout of exercise increases ROS production, chronic regular exercise upregulates antioxidant defenses [16–18].

Little is known, however, about the molecular mechanisms increasing stress resistance. During physical exercise, the main source of ROS is the skeletal muscle [13]. Muscles of the lower limbs are high producers of mitochondria-derived metabolites, and it is therefore likely that ROS arising from the metabolic activity of the skeletal muscle could potentially damage the vascular endothelium if the appropriate defense mechanisms are not maintained properly [13]. This supposes that genes coding for antioxidant proteins are partly regulated by the level of physical activity.

Epigenetic regulation of gene expression in response to environmental stimuli is well documented [19]. In mammals, the addition of a methyl group to a cytosine preceding a guanine (CpG), usually leads to gene silencing if located in CpG-dense promoter regions. However, the regulatory effects of methylation in the gene body are more ambiguous [20–22]. DNA methylation is a dynamic process that can respond to most extracellular cues including diet [23] and physical activity [24]. This sensitivity of DNA methylation to environmental signals is suggested to contribute to the development of various pathological conditions since gene-specific and genome-wide DNA methylation have been linked to a wide variety of disease states ranging from inflammatory [25] and CVD [26] including atherosclerosis [27, 28] and skeletal muscle [29]. This highlights the importance of epigenetic plasticity to the environment.

Studies have shown that antioxidant enzymes could be induced or repressed by methylation of regions in the corresponding gene, while aberrant methylation patterns have been associated with pro-oxidative and pro-inflammatory diseases [30–32]. We therefore hypothesised that in young mice, severe dyslipidemia would alter antioxidant gene expression while chronic physical exercise would maintain it, in part due to epigenetic regulation. In this study, we demonstrate the dynamic nature of antioxidant genes expression in the mouse skeletal muscle in sedentary and active dyslipidemic mice. Our results show for the first time that *Gpx1* expression is associated with changes in DNA methylation in a specific region in the gene body. Hence, physical exercise influences *Gpx1* gene expression through epigenetic regulation and may ultimately contribute to the cellular defense against metabolic stress.

## Materials and Methods

Approval by the Montreal Heart Institute Animal Ethical Committee (#R2014-62-02) was given for all animal experiments, which were performed in accordance with the *Guide to Care*

and *Use of Experimental Animals* (vol.1, 2<sup>nd</sup> ed., 1993) of the Canadian Council on Animal Care. No animals became ill or died prior to the experimental endpoint. Experiments were conducted on the femoral artery and the skeletal muscle (soleus and gastrocnemius) isolated from 6-months old (6-mo) male C57/bl6 control wild type (WT) compared to severely dyslipidemic and spontaneously atherosclerotic (ATX) mice. Transgenic LDLr<sup>-/-</sup>:hApoB<sup>+/+</sup> ATX mice display high levels of cholesterol, they spontaneously develop atherosclerotic lesions (under a normal diet) and endothelial dysfunction in the aorta, carotids and renal arteries [33, 34]. Both 3-mo WT and ATX mice were randomly assigned to two groups; one remained in control sedentary (SED) conditions (n = 10) and one was exposed to 3 months of voluntary exercise (EX) (n = 10). To this end, mice were kept individually in cages instrumented with a running wheel (Lafayette Instrument Company, Lafayette, IN) [34]. Heart rate, systolic and diastolic blood pressure were monitored weekly by tail-cuff (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT). Mice were studied at 6-mo and were sacrificed after anesthesia with a 1:1 mixture of Xylazine (Bayer Inc, Toronto, ON, Canada) and Ketamine hydrochloride (Bioniche, Belleville, ON, Canada) at two different times of the day, either at 10:00 AM while being inactive or at 2:00 AM, i.e. during their running time (Fig 1).

## DNA and RNA extraction

Upon sacrifice, skeletal muscle tissues were harvested and snap-frozen. Total DNA and RNA were extracted using Qiagen RNeasy mini kit and DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen, Toronto, ON), respectively, following manufacturer's protocol.

## Gene expression

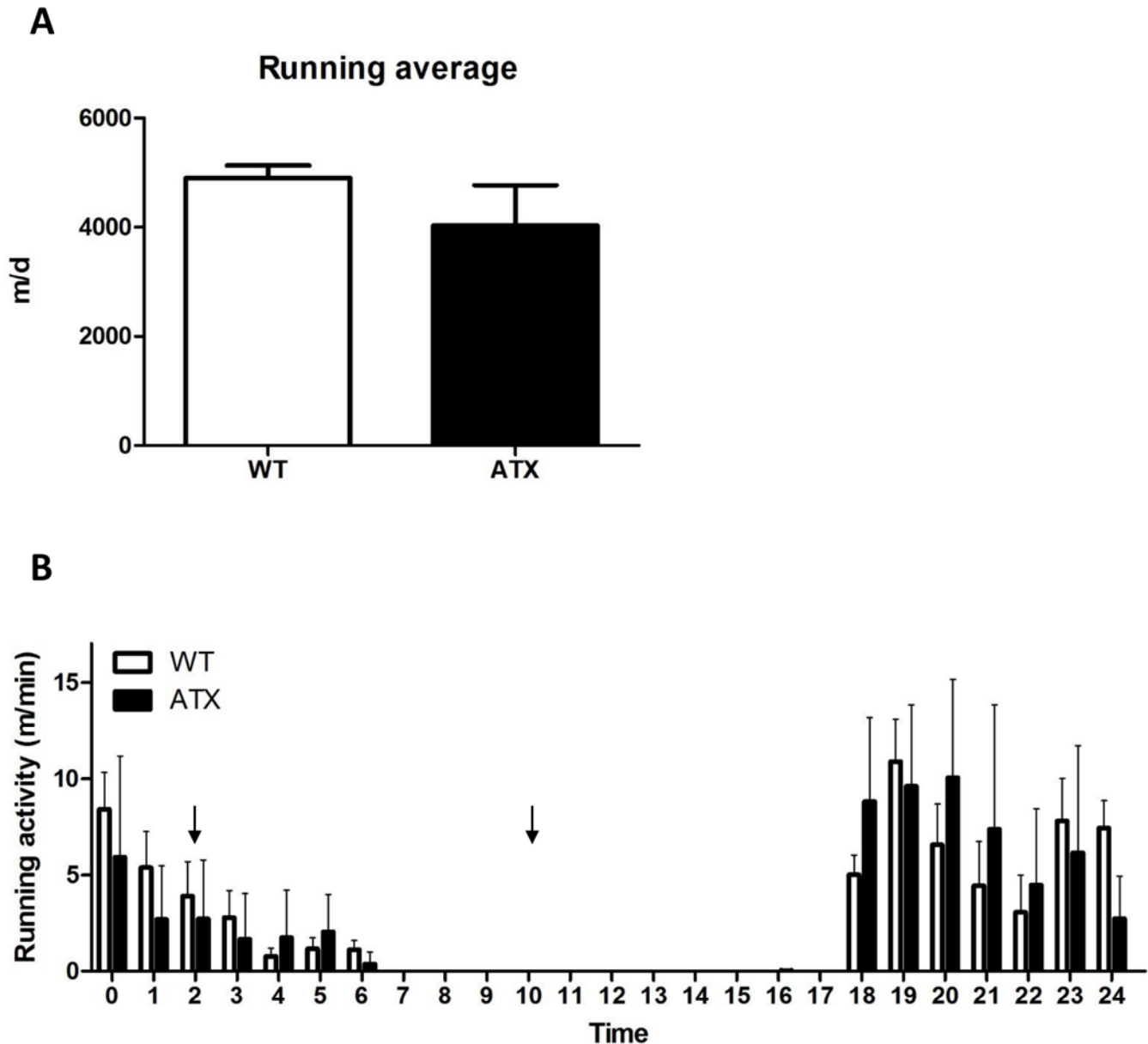
Total RNA was reverse transcribed with RT-MMLV (Invitrogen, Burlington, ON) and amplified using EvaGreen (Applied Biological Materials, Richmond, BC) for quantitative real-time PCR. Target genes *UCP2/3*, *NOX2/4*, *Trx1*, *Sod2*, *Prdx3*, *Gpx1* and the internal control, *cycloA*, were amplified with gene specific primers (S1 Table).

## DNA methylation quantification

Following extraction, DNA was converted by bisulfite reaction using the EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Irvine, CA). Global DNA methylation was measured by ELISA with the 5-mC DNA ELISA kit (Zymo Research). Gene-specific DNA methylation was quantified by EpiTYPER assay (Sequenom, San Diego, CA), as previously described [35]. We chose to target regions identified as CpG islands, by the UCSC Genome Browser at <http://genome.ucsc.edu/> [36], found in our genes of interest with bisulfite-specific primers (S2 Table) required for the assay.

## Cloning of pCpG free-Gpx1 vector

To study the regulatory consequence of *in vitro* methylation of the targeted CpG island, we first used the commercially available reporter plasmid pCpGfree-promoter as the backbone (Invivogen, San Diego, CA). This plasmid containing both a sequence for secreted luciferase and a promoter devoid of CpG dinucleotides, which renders it insensitive to DNA methylation. We then synthesized the *Gpx1* CpG island region by PCR amplification using forward 5'-TAT AAGCTTGAAGTGAATGGTGAGAAGGCTCACCCGC-3' and reverse 5'-ATATGTACAA CCAAGCCAATGCCAGGGCCGCTTAG-3' primers on mouse genomic DNA as a template. This newly generated CpG-rich sequence was then inserted in the pCpG free-promoter



**Fig 1. Voluntary running activity is similar between WT and ATX.** (A) Average of the daily running distance over the course of the 3 months exposure to voluntary exercise for both WT and ATX groups. (B) Typical distribution of the running activity during an arbitrary day of voluntary exercise. Arrows indicate the two different times of sacrifice (2:00 AM and 10:00 AM).

doi:10.1371/journal.pone.0151526.g001

plasmid using HindIII and BsrGI restriction sites. We named the resulting vector “pCpG free-Gpx1” (see “results”).

### *In vitro* methylation, transient transfection and Luciferase assay

Cloned vectors were isolated by Qiagen QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). *M. SssI* CpG methyltransferase (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) was used for *in vitro* methylation according to manufacturer’s instructions. Methylated DNA was then purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and quantified by NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop products, Wilmington, DE). Methylation was confirmed by digestion with the



methylation-sensitive restriction enzymes *HhaI* and *HpaII*. HEK293 cells grown to confluence on 96-well plates were transfected with the pCpG free-Gpx1 vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 24 h after transfection, luciferase activity was measured with the QUANTI-Luc reagent (Invivogen, San Diego, CA) by luminescence detection. Promoter activity was normalized to the total amount of protein measured by a Bradford assay (Biorad, Hercules, CA).

### Oxidative stress quantification

The fluorescent probe dihydroethidium (DHE) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) was used to indirectly assess the amount of superoxide production. DHE is a dye that will bind to DNA once it is oxidized by superoxide. An antibody against 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Abcam Inc, Toronto, ON, Canada) was used to detect 4-HNE expression, a marker of lipid peroxidation, by immunostaining. Tissue cross-sections were obtained from OCT-preserved skeletal muscle and confocal images were taken.

### Statistical Analysis

Results are presented as mean $\pm$ SEM of (n) mice. Two-way ANOVA (with Bonferonni post-tests) and unpaired t-tests were used where applicable to test the differences between conditions. A p value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Phenotypic effects of exercise on severely dyslipidemic mice

We previously reported that *LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup>* atherosclerotic (ATX) mice exhibit severe dyslipidemia: compared to wild-type (WT) mice, in 6 months old ATX mice plasma levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides are  $\sim 7$ ,  $\sim 13$  and  $\sim 10$  folds higher, respectively [34, 37, 38]. In addition, 3 months of voluntary running had no influence on the observed severe dyslipidemia in ATX mice [34]. At 6-mo, as expected resting systolic and diastolic blood pressures were higher in ATX mice when compared to WT, and this was not affected by voluntary exercise (Table 1). The heart rate was similar across all groups (Table 1). Severe dyslipidemia did not interfere with the running capacity of ATX mice; they ran an average of  $4.3 \pm 0.4$  km/d over the course of the study compared to  $4.7 \pm 1.0$  km/d for WT mice ( $p > 0.05$ ) (Fig 1A). Both WT and ATX mice ran during the night (Fig 1B).

### Dyslipidemia and exercise influence the expression of ROS generating enzymes in the skeletal muscle

To evaluate the level of expression of endogenous producers of ROS, we quantified the expression of *NOX* and mitochondrial *UCP*. *UCP2* mRNA levels was significantly decreased in ATX mice when compared to WT for both sedentary and EX groups (Fig 2A). *UCP3* expression did not vary between groups (Fig 2B). We did not find differences in expression between WT and ATX sedentary mice for both *NOX2* and *NOX4*. However, *NOX2* expression was significantly stimulated by exercise in both WT and ATX groups (Fig 2C), while *NOX4* expression did not change with exercise (Fig 2D).

### Dyslipidemia and exercise induce changes in antioxidant enzymes expression in the skeletal muscle

We next examined some of the antioxidant enzymes expressed in the skeletal muscle. In sedentary conditions, both *Trx1* (Fig 3A) and *Sod2* (Fig 3B) were up-regulated in ATX when

**Table 1. Hemodynamic parameters in wild type and dyslipidemic mice exposed or not to a 3 months period of voluntary exercise.**

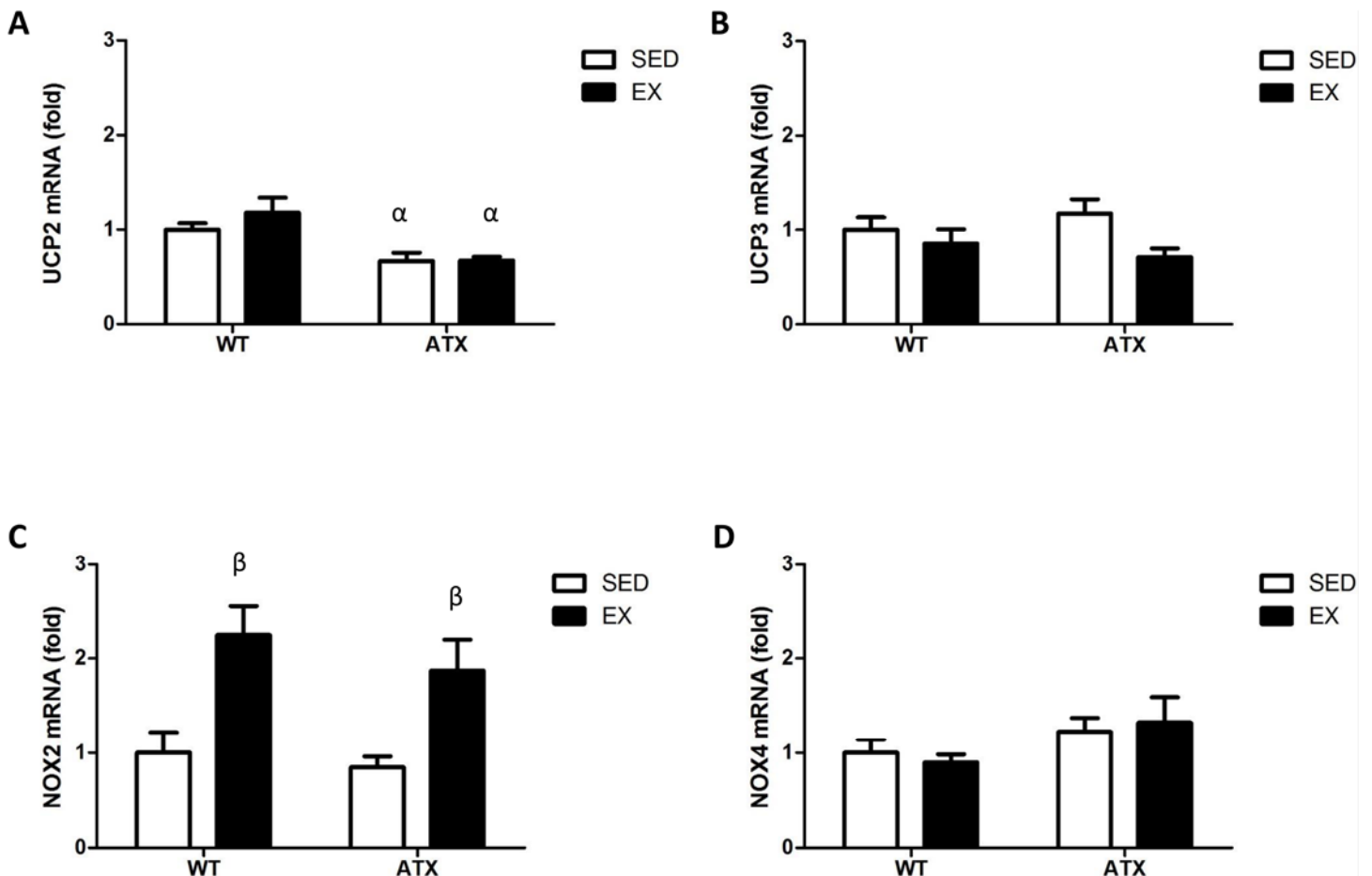
	n	WT SED	WT EX	ATX SED	ATX EX
Systolic (mmHg)	10	115 ± 7	129 ± 5	156 ± 5 *	160 ± 6 *
Diastolic (mmHg)	10	84 ± 8	95 ± 5	121 ± 5 *	126 ± 5 *
HR (beats/min)	10	605 ± 21	595 ± 18	651 ± 20	640 ± 14

Systolic and diastolic blood pressure (mmHg) and heart rate (HR; beats/min) were measured by tail-cuff. Data are mean ± SEM of 10 mice. WT: wild type; ATX: dyslipidemic mice; SED: sedentary; EX: exercise

\*: p<0.05 vs. WT (Two-way ANOVA).

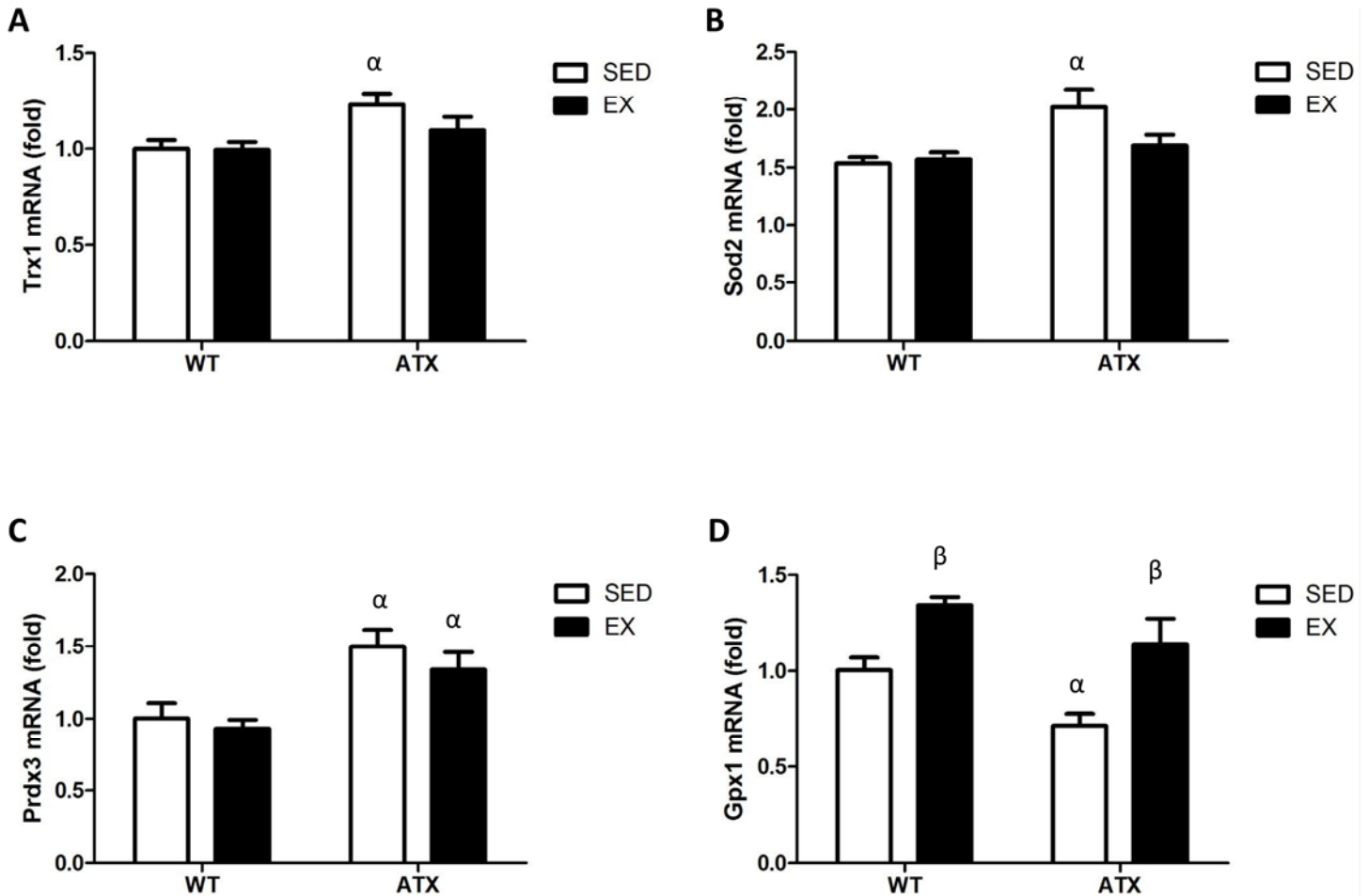
doi:10.1371/journal.pone.0151526.t001

compared to WT. This change in expression associated with dyslipidemia was prevented by exercise (Fig 3A and 3B). *Prdx3* was up-regulated in both sedentary and exercising ATX mice when compared to the corresponding WT group (Fig 3C). *Gpx1* mRNA expression was significantly lower in sedentary ATX mice in comparison to sedentary WT mice (Fig 3D). *Gpx1*



**Fig 2. Dyslipidemia and exercise-induced changes in ROS-generating enzymes expression.** mRNA levels of *UCP2*, *UCP3*, *NOX2* and *NOX4* in the skeletal muscle of wild type (WT) and dyslipidemic (ATX) mice in the sedentary (SED) and exercise (EX) groups. *UCP2/3*: uncoupling protein (mitochondrial proton carrier) 2/3; *NOX2/4*: NADPH oxidase 2/3. Data are mean ± SEM, n = 9–10 mice.  $\alpha$ : p<0.05 vs. WT;  $\beta$ : p<0.05 vs. SED (Two-way ANOVA).

doi:10.1371/journal.pone.0151526.g002



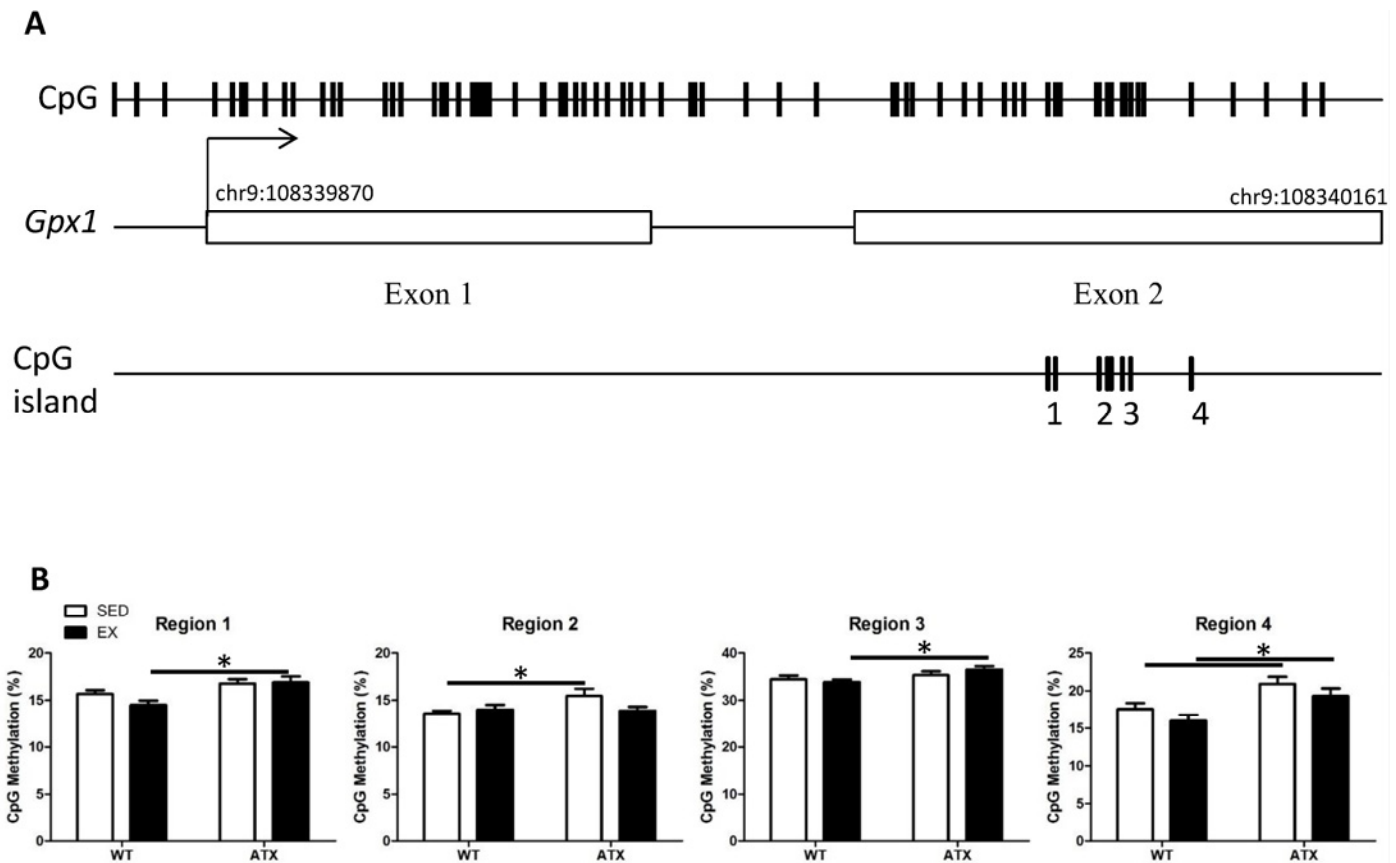
**Fig 3. Dyslipidemia and exercise-induced changes in antioxidant enzymes expression.** mRNA levels of *Trx1*, *Sod2*, *Prdx3* and *Gpx1* in the skeletal muscle of wild type (WT) and dyslipidemic (ATX) mice from the sedentary (SED) and exercise (EX) groups. *Trx1*: thioredoxin 1; *Gpx1*: glutathione peroxidase 1; *Prdx3*: peroxiredoxin 3; *Sod2*: superoxide dismutase 2, mitochondrial. Data are mean  $\pm$  SEM, n = 6–10 mice.  $\alpha$ :  $p < 0.05$  vs. WT;  $\beta$ :  $p < 0.05$  vs. SED (Two-way ANOVA).

doi:10.1371/journal.pone.0151526.g003

mRNA expression was also higher in exercising WT and ATX mice when compared to sedentary WT and ATX mice (Fig 3D). These changes in *Gpx1* mRNA expression are also reproduced in *Gpx1* protein expression of WT, but not ATX mice (S1 Fig). Therefore, in ATX mice at this young age corresponding to the early stages of atherosclerosis, skeletal muscle antioxidant enzymes are up-regulated except for *Gpx1*.

### Differential DNA methylation of *Gpx1* in the skeletal muscle of ATX mice

We targeted CpG islands located in genes coding for the aforementioned antioxidant enzymes in order to test the hypothesis that epigenetic regulation contributes to the changes in gene expression. DNA methylation was below detection levels for *Trx1* and *Prdx3*, while *Sod2* methylation (>10%) did not vary between conditions (S2 Fig). Quantification of *Gpx1* gene methylation by regions regrouping a single or more CpGs revealed differential methylation levels in the second exon (Fig 4A). Levels of methylation were significantly higher in ATX mice when compared to WT mice for both sedentary (regions 2 and 4) and EX conditions (regions 1, 3 and 4) (Fig 4B). Three months of voluntary exercise did not, however, alter the methylation of this gene, neither in WT nor in ATX mice (Fig 4B).



**Fig 4. Dyslipidemia induces methylation changes in the *Gpx1* gene body.** (A) Glutathione peroxidase 1 gene targeted for methylation quantification; representation of (top track) all CpG sites located in *Gpx1* gene, (middle track) the coordinates of exons and (bottom track) the CpG islands containing the four regions covered by DNA methylation quantification. (B) Methylation percentage of four regions covering CpGs in the skeletal muscle of wild type (WT) or dyslipidemic (ATX) mice under sedentary (SED) or exercise condition (EX). Data are mean  $\pm$  SEM, n = 7–8 mice. \*: p<0.05 (Two-way ANOVA).

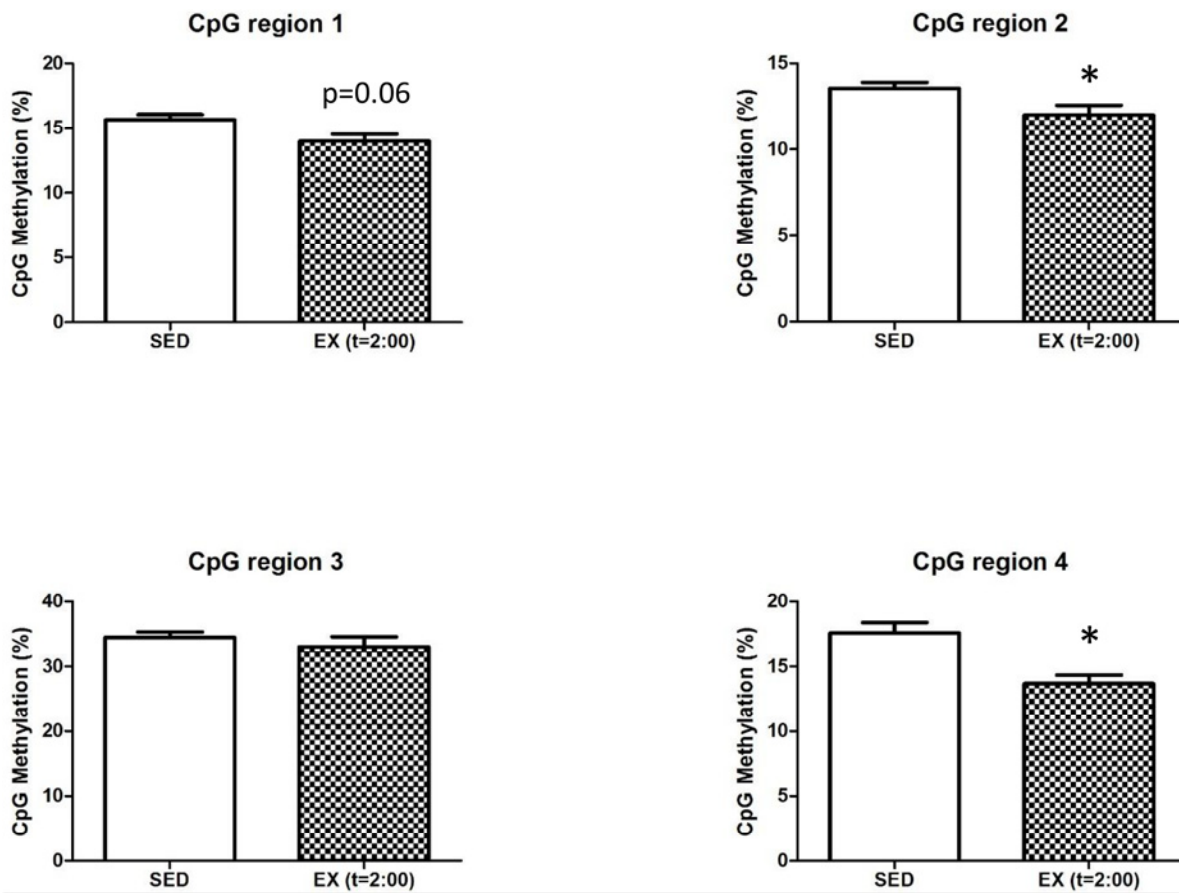
doi:10.1371/journal.pone.0151526.g004

### Transient changes in DNA methylation following exercise

To assess whether exercise could induce rapid changes in DNA methylation immediately after an exercise bout, we sacrificed WT mice during the last hour of their daily running activity (2:00 AM; Fig 1B), rather than during the day when they are inactive (Fig 1B). Interestingly, when methylation levels were measured in active WT mice (at t = 2:00), we observed that CpG regions 2 and 4 were demethylated during exercise, CpG region 1 tended to be demethylated, while region 3 remained unaffected (Fig 5). By comparison, methylation of none of these regions was affected in trained WT mice sacrificed during their inactive time (Fig 4B). This demonstrates the highly dynamic nature of epigenetic regulation.

### *In vitro* methylation decreases gene expression

To investigate the direct effect of DNA methylation on gene expression, the CpG-rich region of *Gpx1*, along with a CpG free promoter, was subcloned into the CpG-free-basic luciferase vector. This new construction, CpG free-*Gpx1* (Fig 6A), was methylated and transiently transfected in HEK293 cells to measure luciferase activity. The addition of the CpG-rich region significantly increases promoter activity (Fig 6B). Previously methylated vectors show no increase in promoter activity, similarly to empty vectors (Fig 6B). Therefore, methylation of this region is expected to inhibit *Gpx1* expression.



**Fig 5. Exercise induces a temporary decrease in DNA methylation.** Methylation percentage of the four CpG groups covering the targeted CpG island found in *Gpx1* comparing sedentary condition (SED, n = 7–8 mice) and exercise at time of sacrifice during their physically active time frame (EX (t = 2:00), n = 3). For reference, see daily running activity on Fig 1. Data are mean ± SEM, n = 3–8 mice. \*: p<0.05 versus SED (Unpaired t-test).

doi:10.1371/journal.pone.0151526.g005

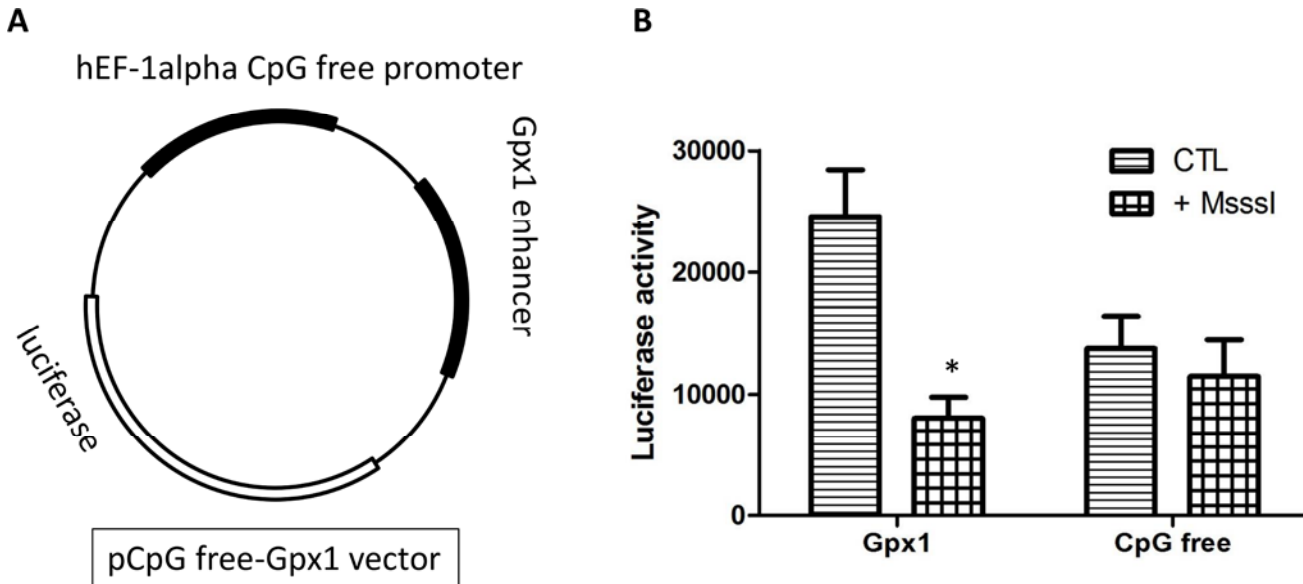
### No sign of oxidative stress in the skeletal muscle of dyslipidemic mice

Assessment of superoxide production by DHE staining and quantification of lipid peroxidation by 4-HNE immunostaining, in the skeletal muscle reveals similar oxidative stress between ATX and WT mice across all conditions (Fig 7), suggesting an efficient antioxidant compensation at this age.

### Discussion

Our findings indicate that the expression of *Gpx1* in the skeletal muscle is sensitive to the unstable *redox* environment associated with severe dyslipidemia and exercise. We also provide evidence that its expression is associated with epigenetic regulation, namely DNA methylation of a novel locus located in a coding region of the gene.

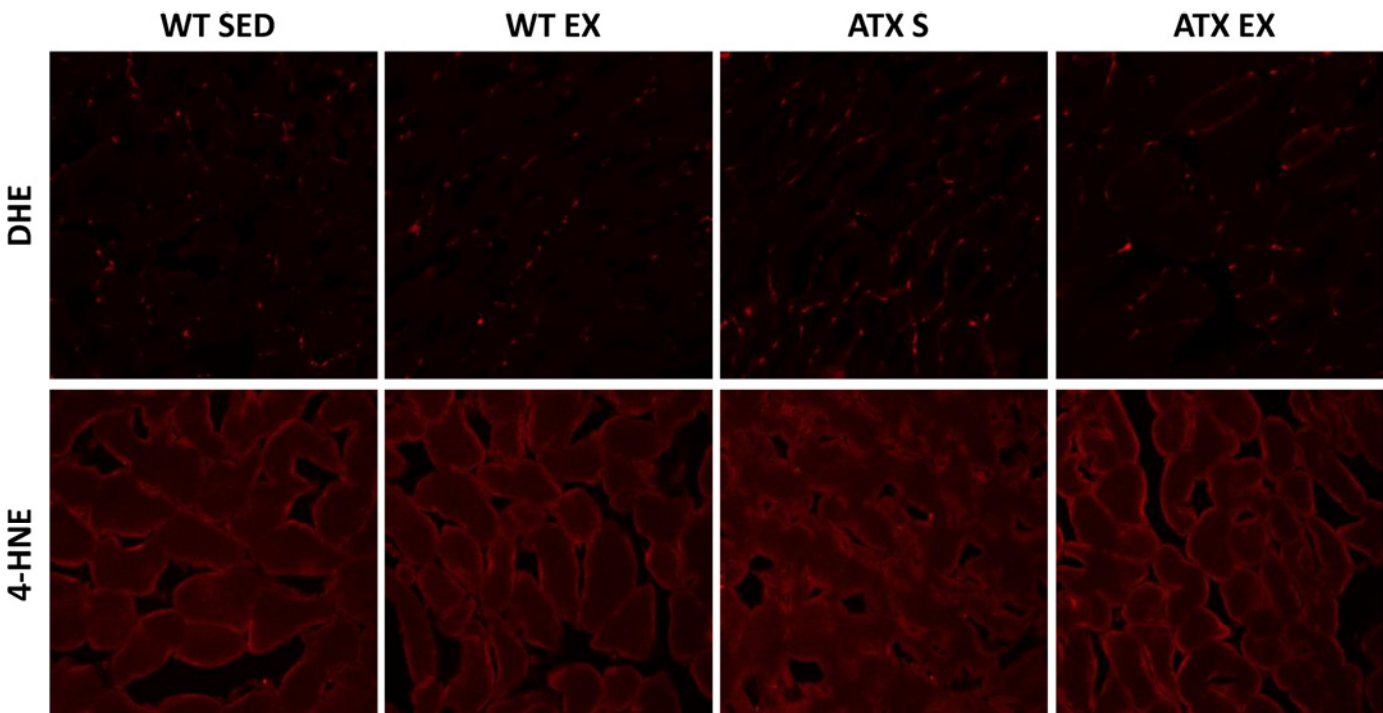
To generate energy, mitochondria exert oxidative phosphorylation. This process needs to be tightly regulated since electrons leakage from the electron transport chain reacts to oxygen generating superoxide. Uncoupling proteins (UCP) were first named as such for their ability to carry protons and steers the respiratory chain away from ATP synthesis in favour of thermogenesis [39]. UCP1 is only expressed in the brown adipose tissue whereas UCP2 and UCP3 are also found in the skeletal muscle where they play a role in fatty acid metabolism [40]. Regarding their role in ROS production and oxidative stress regulation, knock-down experiments in



**Fig 6. DNA methylation of *Gpx1* decreases gene expression.** *In vitro* methylation of *Gpx1* target region inhibited transcriptional activity, as measured by a luciferase reporter assay. (A) Schematic representation of the plasmid construction containing the *Gpx1* CpG island region. (B) Luciferase activity ratio of methylated (M.SssI treated) to unmethylated control (CTL) plasmids containing a CpG-free promoter or the *Gpx1* CpG island region. The assay was repeated 4 times and data are mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$  versus CTL (Unpaired t-test).

doi:10.1371/journal.pone.0151526.g006

mice have shown increases in ROS production linked to deficiency in UCP2 [41] and UCP3 [42]. Our study reveals that expression of UCP2, but not UCP3, is lower in the skeletal muscle of ATX mice, suggesting that ROS production is favoured under dyslipidemia and that oxidative stress is more prone to happen.



**Fig 7. Oxidative stress estimation.** Oxidative stress was measured by the fluorescent dye DHE (top panels) and the expression of 4-HNE (bottom panels) following staining of skeletal muscle cross-sections cut from (left to right) WT SED, WT EX, ATX SED and ATX EX mice.

doi:10.1371/journal.pone.0151526.g007

Dysregulation of NOX activity is another well-known source of ROS in association with systemic pathological conditions including atherosclerosis [43] as well as diseases specific to the skeletal muscle [44, 45]. Importantly, NOX are expressed in both arteries and skeletal muscle precursor cells [46]. NOX2 and NOX4 regulate basal ROS production and although they are generally associated with inflammation, there is a controversy regarding their role in cell signalling, suggesting that there is an influence of the cell type and context [5]. In our study, we observed that exercise induces *Nox2* expression in the skeletal muscle of both WT and ATX mice without changes in *Nox4*. Although we did not assess whether the overexpression of *Nox2* is deleterious or beneficial to the skeletal muscle, this up-regulation of *Nox2* by exercise is somewhat surprising given the reports linking NOX2 to atherosclerotic lesions progression [47]. The role of NOX2 in the skeletal muscle is unclear, but recent reports have shown that the skeletal muscle contractile response triggers ROS production through a NOX2-dependent pathway [48] in addition to evidence for NOX2-mediated superoxide production in the aorta of rats following acute exercise [49]. Therefore, the contribution of ROS-generating enzyme to the level of oxidative stress in the presence of chronic severe dyslipidemia is only suggested by a change in their expression since non-specific DHE staining did not detect changes in ROS levels and 4-HNE immuno-histological staining did not show changes in lipid peroxidation. Antioxidant defense mechanisms are therefore expected to be up-regulated in these young dyslipidemic mice.

Expression of antioxidant enzymes is very dynamic, and changes in both expression and activity have been linked to atherosclerosis [50–52] as well as exercise [53, 54] and are determinant for preserving cellular functions [55–57]. In the present study, we found that expression of each antioxidant enzyme responded differently to the environmental context. *Trx1*, *Sod2* and *Prdx3* are all up-regulated in the skeletal muscle of sedentary ATX mice, and this was prevented by exercise, except for *Prdx3*. The increase in these antioxidant enzymes suggests a prooxidative state requiring an antioxidant response from the organ to prevent oxidative damage. These findings are consistent with other reports showing an increase in antioxidant enzymes expression during the onset and development of oxidative stress-related diseases [58, 59]. Exercise seems to lessen the amplitude of the antioxidant response by preventing the overexpression of *Trx1* and *Sod2* only. The mechanistic origin of this regulation is however unknown. Nonetheless, because exercise normalized their level of expression, this is likely secondary to a reduction in oxidative stress. If these two enzymes were responsible for the antioxidant effects of exercise, we would anticipate that their levels had increased above sedentary levels measured in WT mice.

In contrast to *Trx1* and *Sod2*, we observed that *Gpx1* varies in an opposite manner: not only its expression is decreased in ATX mice, it is also increased by exercise above basal levels in both WT and ATX mice. A study has previously shown that low activity of *Gpx1* is an independent risk factor of cardiovascular events [60]. The increase in *Gpx1* with exercise is also coherent with the literature [61, 62] and concurs with the known antioxidant properties of chronic exercise [16, 17]. Therefore, our data, in support of the current knowledge, suggest that overexpression of *Gpx1* is one of the mechanisms responsible for the antioxidant protection by exercise.

Our next aim was to test the hypothesis that the chronic changes in expression of the antioxidant enzymes were driven by DNA methylation. In our study, DNA methylation was undetectable for *Trx1* and *Prdx3* and did not vary between conditions for *Sod2*. *Gpx1*, however, exhibited significant levels of methylation that were increased in ATX mice. Recent studies have shown that this gene could be regulated by DNA methylation of regions near the promoter in cancer cells, where a hypermethylation of *Gpx1* and the consequent silencing of the gene disturb the *redox* environment, favouring progression of the disease [63–65]. In line with

these studies, we observed that hypermethylation of this novel CpG-rich region was associated with a reduced *Gpx1* expression, in the context of dyslipidemia.

The *in vitro* methylation assay allowed us to confirm that methylation of this specific locus causes an inhibition of gene expression. By itself, the CpG-rich region increases gene activity and when methylated, we observe transcriptional activity similar to that of a *Gpx1*-free sequence. This suggests that methylation of the CpG island element blocks the binding and subsequent activity of a transcription co-factor. An interesting finding is that although *Gpx1* expression responds to both dyslipidemia and exercise, only changes in methylation are detected with dyslipidemia and not exercise, at least not in the long-term. This finding could contradict various studies that show changes of DNA methylation in response to exercise for various genes in the skeletal muscle [66–68]. Alternatively, changes in *Gpx1* expression in response to physical training may be modulated by mechanisms other than epigenetics. Albeit this cannot be dismissed, a previous study in human skeletal muscle showed that acute exercise induces transient changes in the methylation of genes with changes in expression only observed later, once methylation changes reverted to pre-exercise levels [69]. This mismatch in the timing of both events (changes in methylation and expression) could have occurred in our study. Exercise could induce temporary epigenetic changes that would have disappeared as little as minutes after the muscle work. In our first series of experiments, sacrifice of the animal was performed at 10 AM, several hours after the last running session. Hence, to assess the methylation profile in mice during physical activity, we sacrificed mice at 2 AM ( $t = 2:00$ ) when they are still running (Fig 1B); in these conditions we observed methylation changes that were not detected in our previous experiments, demonstrating the temporary changes in methylation induced by physical exercise. Altogether, these data suggest that epigenetic mechanisms could be responsible for the changes in expression in response to exercise that we observed for *Gpx1* in the long-term. Further investigation is required to understand the link between the initial transient changes in DNA methylation that occurs during exercise bouts and lasting changes in gene expression observed in the long-term.

Exacerbation of oxidative stress in the skeletal muscle cells in the context of dyslipidemia is caused by a disturbance in the production and elimination of mitochondria-derived free radicals [13]. This, in turn, impairs the organ, and the excess of ROS can diffuse to the femoral vascular bed causing vascular endothelial dysfunction, consequently impeding blood flow regulation to the muscle leading to sarcopenia [13]. This vicious circle has previously been observed in hypertensive rats [70]. In our experimental conditions, there is no evidence of oxidative stress-dependent damage in the skeletal muscle of our young, middle-age ATX mice, suggesting that oxidative stress is well compensated in skeletal muscle, supporting the adaptive responses of antioxidant gene expression reported above. This is confirmed by the demonstration that in these mice, skeletal muscle function was not altered as evidenced by their conserved running capacity.

### Limitations of the study

The nature of voluntary exercise makes it difficult to detect the minute changes in the methylation landscape in the long-term, if any. First, the impact of voluntary running used in the present study could be considered as mild when compared to other types of experiments in the field of exercise training: “forced” approaches such as treadmill or swim tests might be able to induce greater and more stable epigenetic changes. However, one could argue that the stress occurring during these forced bouts of exercise could have a significant impact on the observation. We chose to rule out the stress factor with our voluntary approach, knowing the significant impact of stress on epigenetics [71, 72]. Secondly, a possible explanation for the



discrepancies between dyslipidemia and exercise on epigenetics is that the former is a long-term and continuous stimulation, as opposed to a short-term and intermittent stimulation for the latter. In other words, mice are constantly exposed to dyslipidemia from *intra utero* but they only practice intermittent voluntary bouts of exercise, starting at 3-month of age. Studies in the field of developmental plasticity have shown that *in utero* and early life exposure to environmental factors induces phenotypic adaptations that are reflected through adulthood and that these changes are deeply rooted in the epigenome [73, 74]. Protein expressions of Gpx1 reveal yet another level of complexity and do not fully reflect the changes in mRNA levels in ATX mice. This is likely associated with differential post-translational regulation in dyslipidemia beyond the scope of the present study. Finally, whether ROS are responsible for the epigenetic changes observed both with dyslipidemia and during exercise was not directly tested. The use of an antioxidant may help, although they most likely may directly impact on the epigenome.

## Conclusions

The overexpression of some pro- and anti-oxidant enzymes by severe dyslipidemia suggests a pro-oxidative state in the skeletal muscle where the chronic rise in ROS could damage skeletal muscle cells, to latter contribute to the damage of the neighbouring vascular cells. We show that one of the mechanisms by which the antioxidant enzyme Gpx1 is modulated is by DNA methylation; its lower expression is associated with the higher level of methylation of a novel CpG island region in ATX mice. We also reinforced the cause-effect relationship between DNA methylation of this loci and its mRNA expression. Our data suggests, therefore, that DNA methylation is a possible mechanism for regulating gene expression in dyslipidemia as well as following chronic voluntary exercise training. Whether ROS are directly involved remains debatable.

## Supporting Information

**S1 Fig. Gpx1 protein expression.**  
(PDF)

**S2 Fig. CpG methylation analysis of *Prdx3*, *Sod2* and *Trx1*.**  
(PDF)

**S1 Table. Primer sequences used for qPCR analysis.**  
(PDF)

**S2 Table. Primer sequences used for DNA methylation analysis.**  
(PDF)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AN MM ET. Performed the experiments: AN ND MM. Analyzed the data: AN ET. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM. Wrote the paper: AN ET.

## References

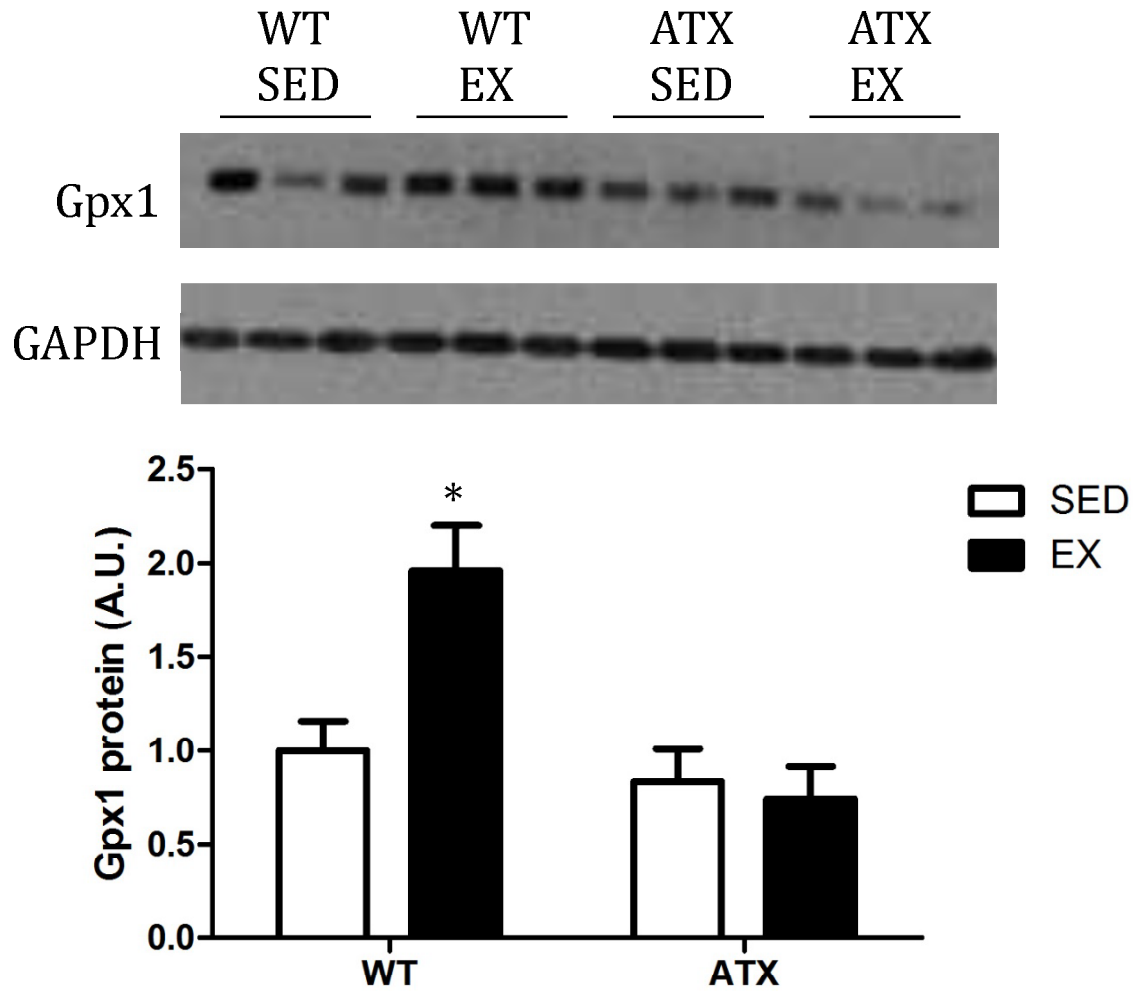
1. Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol*. 2015; 71:40–56. doi: [10.1016/j.vph.2015.03.005](https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005) PMID: [25869516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25869516/).

2. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol.* 2015; 31(5):631–41. doi: [10.1016/j.cjca.2015.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.02.008) PMID: [25936489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25936489/).
3. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):47–95. doi: [10.1152/physrev.00018.2001](https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001) PMID: [11773609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11773609/).
4. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011; 17(11):1410–22. doi: [10.1038/nm.2538](https://doi.org/10.1038/nm.2538) PMID: [22064431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064431/).
5. Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2012; 110(10):1364–90. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.111.243972](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243972) PMID: [22581922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22581922/); PubMed Central PMCID: [PMC3365576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3365576/).
6. Kim HS, Park KG, Koo TB, Huh S, Lee IK. The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77 Suppl 1:S46–8. doi: [10.1016/j.diabres.2007.01.032](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.01.032) PMID: [17462780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17462780/).
7. Victor VM, Rocha M, Sola E, Banuls C, Garcia-Malpartida K, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(26):2988–3002. PMID: [19754375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19754375/).
8. Katsiki N, Manes C. Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? *Clin Nutr.* 2009; 28(1):3–9. doi: [10.1016/j.clnu.2008.10.011](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.10.011) PMID: [19042058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19042058/).
9. Steinhubl SR. Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol.* 2008; 101(10A):14D–9D. doi: [10.1016/j.amjcard.2008.02.003](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.003) PMID: [18474268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18474268/).
10. Leblond F, Nguyen A, Bolduc V, Lambert J, Yu C, Duquette N, et al. Postnatal exposure to voluntary exercise but not the antioxidant catechin protects the vasculature after a switch to an atherogenic environment in middle-age mice. *Pflugers Arch.* 2013; 465(2):197–208. doi: [10.1007/s00424-012-1206-8](https://doi.org/10.1007/s00424-012-1206-8) PMID: [23291710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23291710/); PubMed Central PMCID: [PMC3695887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3695887/).
11. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehnkopf M, et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(21):8665–70. doi: [10.1073/pnas.0903485106](https://doi.org/10.1073/pnas.0903485106) PMID: [19433800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19433800/); PubMed Central PMCID: [PMC2680430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2680430/).
12. Vuori IM, Lavie CJ, Blair SN. Physical activity promotion in the health care system. *Mayo Clin Proc.* 2013; 88(12):1446–61. doi: [10.1016/j.mayocp.2013.08.020](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.08.020) PMID: [24290119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24290119/).
13. Roden M. Future of muscle research in diabetes: a look into the crystal ball. *Diabetologia.* 2015; 58(8):1693–8. doi: [10.1007/s00125-015-3629-1](https://doi.org/10.1007/s00125-015-3629-1) PMID: [26003326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26003326/).
14. Palmefors H, DuttaRoy S, Rundqvist B, Borjesson M. The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis—A systematic review. *Atherosclerosis.* 2014; 235(1):150–61. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.026](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.026) PMID: [24835434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24835434/).
15. Szostak J, Laurant P. The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity. *Clin Sci (Lond).* 2011; 121(3):91–106. doi: [10.1042/CS20100520](https://doi.org/10.1042/CS20100520) PMID: [21729002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21729002/).
16. Seals DR, Edward F. Adolph Distinguished Lecture: The remarkable anti-aging effects of aerobic exercise on systemic arteries. *J Appl Physiol* (1985). 2014; 117(5):425–39. doi: [10.1152/jappphysiol.00362.2014](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00362.2014) PMID: [24855137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24855137/); PubMed Central PMCID: [PMC4157159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4157159/).
17. Rengo G, Parisi V, Femminella GD, Pagano G, de Lucia C, Cannavo A, et al. Molecular aspects of the cardioprotective effect of exercise in the elderly. *Aging Clin Exp Res.* 2013; 25(5):487–97. doi: [10.1007/s40520-013-0117-7](https://doi.org/10.1007/s40520-013-0117-7) PMID: [23949971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23949971/).
18. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8(8):457–65. doi: [10.1038/nrendo.2012.49](https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49) PMID: [22473333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22473333/).
19. Kim GH, Ryan JJ, Archer SL. The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(15):1920–36. doi: [10.1089/ars.2012.4926](https://doi.org/10.1089/ars.2012.4926) PMID: [23480168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23480168/); PubMed Central PMCID: [PMC3624767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3624767/).
20. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16(1):6–21. doi: [10.1101/gad.947102](https://doi.org/10.1101/gad.947102) PMID: [11782440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11782440/).
21. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(5):295–304. doi: [10.1038/nrg2540](https://doi.org/10.1038/nrg2540) PMID: [19308066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19308066/).
22. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(7):484–92. doi: [10.1038/nrg3230](https://doi.org/10.1038/nrg3230) PMID: [22641018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22641018/).
23. Jimenez-Chillaron JC, Diaz R, Martinez D, Pentinat T, Ramon-Krauel M, Ribo S, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie.* 2012; 94(11):2242–63. doi: [10.1016/j.biochi.2012.06.012](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.012) PMID: [22771843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771843/).
24. Ling C, Ronn T. Epigenetic adaptation to regular exercise in humans. *Drug Discov Today.* 2014; 19(7):1015–8. doi: [10.1016/j.drudis.2014.03.006](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.006) PMID: [24632002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24632002/).

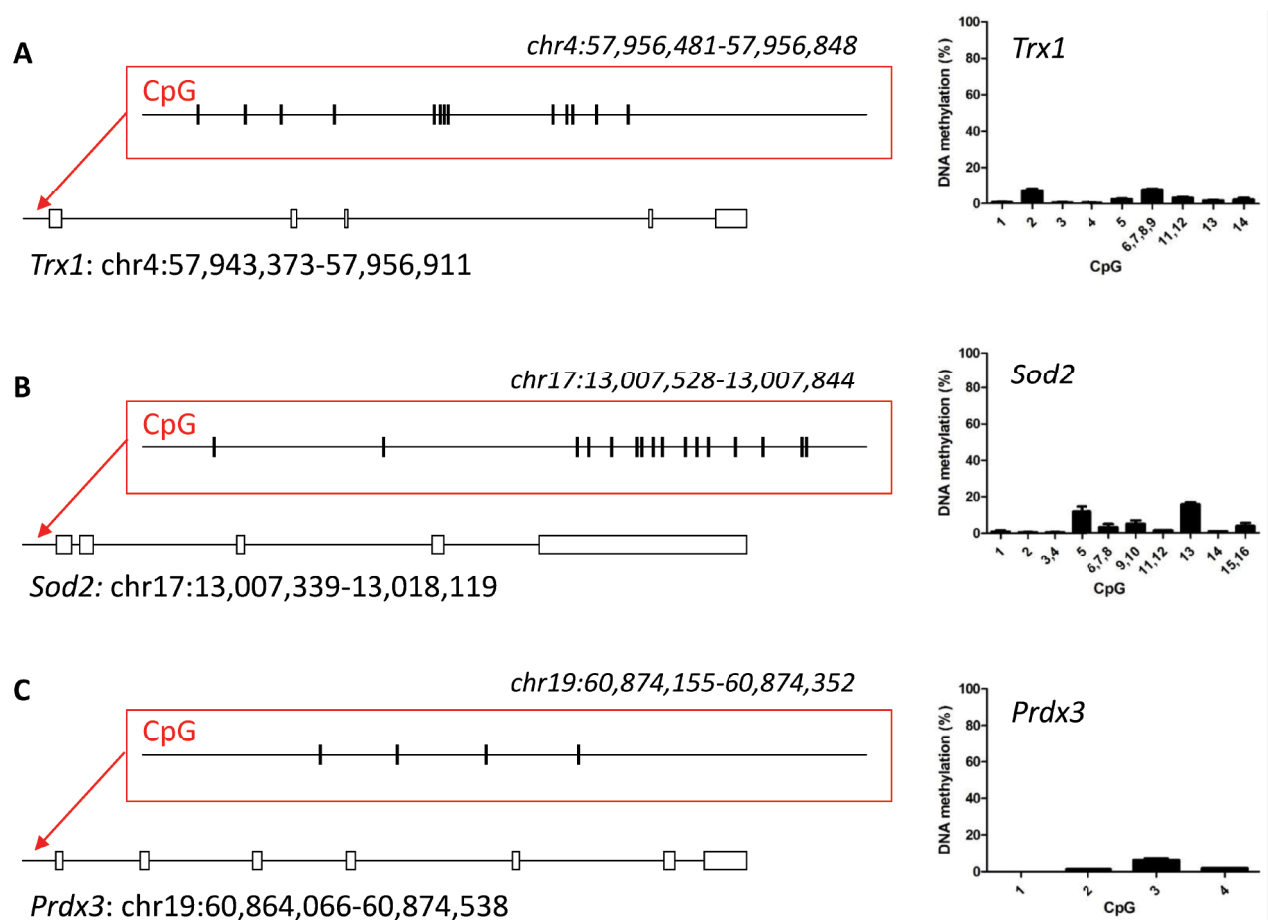
25. Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol*. 2008; 79(8 Suppl):1514–9. doi: [10.1902/jop.2008.080172](https://doi.org/10.1902/jop.2008.080172) PMID: [18673005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18673005/).
26. Ordovas JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2010; 7(9):510–9. doi: [10.1038/nrcardio.2010.104](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.104) PMID: [20603647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20603647/); PubMed Central PMCID: PMC3075976.
27. Turunen MP, Aavik E, Yla-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1790(9):886–91. doi: [10.1016/j.bbagen.2009.02.008](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.008) PMID: [19233248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19233248/).
28. Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis. *Circulation*. 2005; 112(9):1353–61. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.104.519025](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.519025) PMID: [16116050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16116050/).
29. Carrio E, Suelves M. DNA methylation dynamics in muscle development and disease. *Front Aging Neurosci*. 2015; 7:19. doi: [10.3389/fnagi.2015.00019](https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00019) PMID: [25798107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25798107/); PubMed Central PMCID: PMC4350440.
30. Lakshmi SV, Naushad SM, Reddy CA, Saumya K, Rao DS, Kotamraju S, et al. Oxidative stress in coronary artery disease: epigenetic perspective. *Mol Cell Biochem*. 2013; 374(1–2):203–11. doi: [10.1007/s11010-012-1520-7](https://doi.org/10.1007/s11010-012-1520-7) PMID: [23160801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23160801/).
31. 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):2661–71. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916098](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916098) PMID: [20529999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20529999/); PubMed Central PMCID: PMC2914302.
32. Paneni F, Costantino S, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. Epigenetic signatures and vascular risk in type 2 diabetes: a clinical perspective. *Atherosclerosis*. 2013; 230(2):191–7. doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.003](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.003) PMID: [24075743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24075743/).
33. Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, et al. Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298(6):H2062–70. doi: [10.1152/ajpheart.00532.2009](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00532.2009) PMID: [20382853](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20382853/); PubMed Central PMCID: PMC3701586.
34. Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, et al. Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(5):H2081–92. doi: [10.1152/ajpheart.00706.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00706.2011) PMID: [21926346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21926346/); PubMed Central PMCID: PMC3700878.
35. Ehrlich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(44):15785–90. doi: [10.1073/pnas.0507816102](https://doi.org/10.1073/pnas.0507816102) PMID: [16243968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16243968/); PubMed Central PMCID: PMC1276092.
36. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002; 12(6):996–1006. doi: [10.1101/gr.229102](https://doi.org/10.1101/gr.229102) Article published online before print in May 2002. PMID: [12045153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12045153/); PubMed Central PMCID: PMC186604.
37. Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, et al. Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(3):H1032–43. doi: [10.1152/ajpheart.00410.2010](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00410.2010) PMID: [21186270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21186270/); PubMed Central PMCID: PMC3702511.
38. Bolduc V, Baraghis E, Duquette N, Thorin-Trescases N, Lambert J, Lesage F, et al. Catechin prevents severe dyslipidemia-associated changes in wall biomechanics of cerebral arteries in LDLr<sup>-/-</sup>:hApoB<sup>+/+</sup> mice and improves cerebral blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302(6):H1330–9. doi: [10.1152/ajpheart.01044.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01044.2011) PMID: [22268108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22268108/); PubMed Central PMCID: PMC3695886.
39. Argypopoulos G, Harper ME. Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol* (1985). 2002; 92(5):2187–98. doi: [10.1152/jappphysiol.00994.2001](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00994.2001) PMID: [11960973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11960973/).
40. Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1:S130–5. PMID: [14749278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14749278/).
41. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*. 2000; 26(4):435–9. doi: [10.1038/82565](https://doi.org/10.1038/82565) PMID: [11101840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11101840/).
42. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, et al. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*. 2000; 275(21):16258–66. doi: [10.1074/jbc.M910179199](https://doi.org/10.1074/jbc.M910179199) PMID: [10748196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10748196/).
43. Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(12):1429–35. PMID: [11914250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11914250/).

44. Whitehead NP, Yeung EW, Froehner SC, Allen DG. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *PLoS One*. 2010; 5(12):e15354. doi: [10.1371/journal.pone.0015354](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015354) PMID: [21187957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21187957/); PubMed Central PMCID: PMC3004864.
45. Sullivan-Gunn MJ, Campbell-O'Sullivan SP, Tisdale MJ, Lewandowski PA. Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011; 2(3):181–8. doi: [10.1007/s13539-011-0037-3](https://doi.org/10.1007/s13539-011-0037-3) PMID: [21966644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21966644/); PubMed Central PMCID: PMC3177039.
46. Mofarrahi M, Brandes RP, Gorchach A, Hanze J, Terada LS, Quinn MT, et al. Regulation of proliferation of skeletal muscle precursor cells by NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(3):559–74. doi: [10.1089/ars.2007.1792](https://doi.org/10.1089/ars.2007.1792) PMID: [18092937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18092937/).
47. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab*. 2014; 25(9):452–63. doi: [10.1016/j.tem.2014.06.012](https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.012) PMID: [25066192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25066192/).
48. Diaz-Vegas A, Campos CA, Contreras-Ferrat A, Casas M, Buvinic S, Jaimovich E, et al. ROS Production via P2Y1-PAK-NOX2 Is Triggered by Extracellular ATP after Electrical Stimulation of Skeletal Muscle Cells. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0129882. doi: [10.1371/journal.pone.0129882](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129882) PMID: [26053483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26053483/); PubMed Central PMCID: PMC4460042.
49. Tanaka LY, Bechara LR, dos Santos AM, Jordao CP, de Sousa LG, Bartholomeu T, et al. Exercise improves endothelial function: a local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Nitric Oxide*. 2015; 45:7–14. doi: [10.1016/j.niox.2015.01.003](https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.01.003) PMID: [25619203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25619203/).
50. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(6):1583–606. doi: [10.1089/ars.2011.3999](https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999) PMID: [21473702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21473702/); PubMed Central PMCID: PMC3151424.
51. Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Fernandez-Garcia CE, Ramos-Mozo P, Burillo E, Egido J, et al. Cell stress proteins in atherothrombosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012:232464. doi: [10.1155/2012/232464](https://doi.org/10.1155/2012/232464) PMID: [22792412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22792412/); PubMed Central PMCID: PMC3389727.
52. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008; 23(3):381–90. PMID: [18072094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18072094/).
53. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*. 1999; 58(4):1025–33. PMID: [10817171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10817171/).
54. Brinkmann C, Brixius K. Peroxiredoxins and sports: new insights on the antioxidative defense. *J Physiol Sci*. 2013; 63(1):1–5. doi: [10.1007/s12576-012-0237-4](https://doi.org/10.1007/s12576-012-0237-4) PMID: [23055024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23055024/).
55. Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Lubos E, Doppler C, Hausding M, et al. Glutathione peroxidase-1 deficiency potentiates dysregulatory modifications of endothelial nitric oxide synthase and vascular dysfunction in aging. *Hypertension*. 2014; 63(2):390–6. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01602](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01602) PMID: [24296279](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24296279/).
56. Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z, et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*. 2002; 106(5):544–9. PMID: [12147534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12147534/).
57. Jang YC, Van Remmen H. The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp Gerontol*. 2009; 44(4):256–60. doi: [10.1016/j.exger.2008.12.006](https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.12.006) PMID: [19171187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19171187/).
58. Okuda M, Inoue N, Azumi H, Seno T, Sumi Y, Hirata K, et al. Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(9):1483–7. PMID: [11557676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11557676/).
59. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(4):344–56. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018) PMID: [19477268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19477268/); PubMed Central PMCID: PMC2731574.
60. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2003; 349(17):1605–13. doi: [10.1056/NEJMoa030535](https://doi.org/10.1056/NEJMoa030535) PMID: [14573732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14573732/).
61. Alessio HM, Ansinelli H, Threadgill C, Hagerman AE. Comparison of gene and protein expressions in rats residing in standard cages with those having access to an exercise wheel. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:950516. doi: [10.1155/2014/950516](https://doi.org/10.1155/2014/950516) PMID: [24719897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24719897/); PubMed Central PMCID: PMC3955688.
62. Sindler AL, Reyes R, Chen B, Ghosh P, Gurovich AN, Kang LS, et al. Age and exercise training alter signaling through reactive oxygen species in the endothelium of skeletal muscle arterioles. *J Appl Physiol* (1985). 2013; 114(5):681–93. doi: [10.1152/japplphysiol.00341.2012](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00341.2012) PMID: [23288555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23288555/); PubMed Central PMCID: PMC3615591.
63. Kulak MV, Cyr AR, Woodfield GW, Bogachek M, Spanheimer PM, Li T, et al. Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. *Oncogene*. 2013; 32(34):4043–51. doi: [10.1038/onc.2012.400](https://doi.org/10.1038/onc.2012.400) PMID: [22964634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22964634/); PubMed Central PMCID: PMC3522755.

64. Min SY, Kim HS, Jung EJ, Jung EJ, Jee CD, Kim WH. Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 (GPX1) down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer. *Anticancer Res.* 2012; 32(8):3169–75. PMID: [22843889](#).
65. Jee CD, Kim MA, Jung EJ, Kim J, Kim WH. Identification of genes epigenetically silenced by CpG methylation in human gastric carcinoma. *Eur J Cancer.* 2009; 45(7):1282–93. doi: [10.1016/j.ejca.2008.12.027](#) PMID: [19195878](#).
66. Laker RC, Lillard TS, Okutsu M, Zhang M, Hoehn KL, Connelly JJ, et al. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1alpha gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. *Diabetes.* 2014; 63(5):1605–11. doi: [10.2337/db13-1614](#) PMID: [24430439](#).
67. Ronn T, Ling C. Effect of exercise on DNA methylation and metabolism in human adipose tissue and skeletal muscle. *Epigenomics.* 2013; 5(6):603–5. doi: [10.2217/epi.13.61](#) PMID: [24283873](#).
68. Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, Elgzyri T, Hall E, Nilsson E, et al. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2012; 61(12):3322–32. doi: [10.2337/db11-1653](#) PMID: [23028138](#); PubMed Central PMCID: PMC3501844.
69. Barres R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 2012; 15(3):405–11. doi: [10.1016/j.cmet.2012.01.001](#) PMID: [22405075](#).
70. Zhao W, Swanson SA, Ye J, Li X, Shelton JM, Zhang W, et al. Reactive oxygen species impair sympathetic vasoregulation in skeletal muscle in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2006; 48(4):637–43. doi: [10.1161/01.HYP.0000240347.51386.ea](#) PMID: [16940212](#).
71. Reul JM. Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways. *Front Psychiatry.* 2014; 5:5. doi: [10.3389/fpsy.2014.00005](#) PMID: [24478733](#); PubMed Central PMCID: PMC3897878.
72. Stankiewicz AM, Swiergiel AH, Lisowski P. Epigenetics of stress adaptations in the brain. *Brain Res Bull.* 2013; 98:76–92. doi: [10.1016/j.brainresbull.2013.07.003](#) PMID: [23906660](#).
73. Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel JC, et al. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocr Rev.* 2011; 32(2):159–224. doi: [10.1210/er.2009-0039](#) PMID: [20971919](#); PubMed Central PMCID: PMC3365792.
74. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdige GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011; 106(1):272–80. doi: [10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.008](#) PMID: [21219925](#).



**S1 Fig. Gpx1 protein expression.** Protein were extracted from skeletal muscle of wild-type (WT) and dyslipidemic (ATX) mice in the sedentary (SED) and exercise (EX) groups. Data are mean  $\pm$  SEM, n=6 mice per group. \*: p<0.05 vs. WT-SED (Two-way ANOVA).



**S2 Fig. CpG methylation analysis of *Prdx3*, *Sod2* and *Trx1*.** *Prdx3*: peroxiredoxin 3; *Sod2*: superoxide dismutase 2, mitochondrial; *Trx1*: thioredoxin 1.

**S1 Table. Primer sequences used for qPCR analysis.** UCP2/3: uncoupling protein (mitochondrial proton carrier) 2/3; NOX2/4: NADPH oxidase 2/3; Trx1: thioredoxin 1; SOD2: superoxide dismutase 2, mitochondrial; Prdx3: peroxiredoxin 3; Gpx1: glutathione peroxidase 1.

<b>Gene</b>	<b>Primer sequence</b>
UCP2	(F) CTCGTCTTGCCGATTGAAGGT (R) TCTGCAATGCAGGCAGCTGTC
UCP3	(F) GAGAAGTTGCTGGAGTCTCAC (R) GAGCCACCATCTTCAGCATAAC
NOX2	(F) AGTGCCCAGTACCAAAGTTC (R) GTCCACCTCCATCTTGAATC
NOX4	(F) CCTTTGTGCCTTTATTGTGCG (R) GAATCGTTCTGTCCAGTCTCC
Trx1	(F) AATGGTGAAGCTGATCGAGAC (R) TTTCCCTTGTTAGCACCGGAG
SOD2	(F) GGCCAAGGGAGATGTTACAA (R) GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
Prdx3	(F) TCGGTATCTCCGCCTATCGT (R) GAGGAACTGGTGCTAAAGGCT
GPx1	(F) CACCGAGATGAACGATCTG (R) CAGGTCGGACGTACTIONGAG



**S2 Table. Primer sequences used for DNA methylation analysis.** Gpx1: glutathione peroxidase 1; Prdx3: peroxiredoxin 3; Sod2: superoxide dismutase 2, mitochondrial; Trx1: thioredoxin 1.

<b>Gene</b>	<b>EPITYPER Primer sequence</b>
<i>Gpx1</i>	(F)aggaagagagGGGATTTTGAGATTTAGAGTTGGTT (R)cagtaatacgactcactatagggagaaggctATTCTCAATAACAACACCTTACCC
<i>Prdx3</i>	(F)aggaagagagTTAGGTTTGGGTGTTTTAGTGAAGA (R)cagtaatacgactcactatagggagaaggctCCCTTAAATCTACTACCCACTAACTCC
<i>Sod2</i>	(F)aggaagagagATGTTAGGTTAGGTTTTAGGGAAGG (R)cagtaatacgactcactatagggagaaggctTCCCCTATACCAAATTAATAAAAACC
<i>Trx1</i>	(F)aggaagagagTTAGTGTAGTTTGGGGATTGTTTTA (R)cagtaatacgactcactatagggagaaggctCCCTAATCTAAAAATACACCTCTACC

### 3.3 Article 3

Titre: Lower methylation of the *ANGPTL2* gene in leukocytes from post-acute coronary syndrome patients.

Cet article a été accepté pour publication le 12 avril 2016 et publié dans le journal *PLoS One* le 21 avril 2016.

#### 3.3.1 *Apport original et contribution des coauteurs*

**Albert Nguyen:** Conception du projet, réalisation des expériences, cueillette et analyse des données, interprétation des résultats, préparation des figures et rédaction du manuscrit.

**Maya Mamarbachi:** Conception d'expériences (essai de méthylation *in vitro*).

**Valérie Turcot:** Analyse de résultats (Infinium Human Methylation 450 BeadChip Kit).

**Samuel Lessard:** Analyse de résultats (Infinium Human Methylation 450 BeadChip Kit).

**Carol Yu:** Réalisation d'expériences et analyse des données (mesure de l'Angptl2 par kit ELISA).

**Xiaoyan Luo:** Réalisation d'expériences et analyse des données (mesure de l'Angptl2 par kit ELISA).

**Julie Lalongé:** Gestion et recrutement de patients et des collectes de sang, analyse des données cliniques.

**Doug Hayami:** Conception du projet, interprétation des données cliniques et révision du manuscrit

**Mathieu Gayda:** Conception du projet, interprétation des données cliniques et révision du manuscrit.

**Martin Juneau:** Conception du projet, interprétation des données cliniques et révision du manuscrit.

**Nathalie Thorin-Trescases:** Analyse et interprétation de résultats, révision du manuscrit.

**Guillaume Lettre:** Conception d'expériences et analyse de résultats (Infinium Human Methylation 450 BeadChip Kit) et révision du manuscrit.

**Anil Nigam:** Conception du projet, interprétation des données cliniques et révision du manuscrit.

**Eric Thorin:** Conception du projet, interprétation des résultats et révision du manuscrit

RESEARCH ARTICLE

# Lower Methylation of the *ANGPTL2* Gene in Leukocytes from Post-Acute Coronary Syndrome Patients

Albert Nguyen<sup>1,2</sup>, Maya Mamarbachi<sup>1</sup>, Valérie Turcot<sup>1</sup>, Samuel Lessard<sup>1</sup>, Carol Yu<sup>1,2</sup>, Xiaoyan Luo<sup>1</sup>, Julie Lalongé<sup>1,3</sup>, Doug Hayami<sup>1,3,4</sup>, Mathieu Gayda<sup>1,3,4</sup>, Martin Juneau<sup>1,3,4</sup>, Nathalie Thorin-Trescases<sup>1</sup>, Guillaume Lettre<sup>1,4</sup>, Anil Nigam<sup>1,3,4\*</sup>, Eric Thorin<sup>1,5\*</sup>

**1** Montreal Heart Institute, Research Center, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, **2** Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, **3** Cardiac Rehabilitation and Prevention Center (EPIC) of the Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, **4** Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, **5** Department of Surgery, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

\* [REDACTED] (AN); [REDACTED] (ET)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Nguyen A, Mamarbachi M, Turcot V, Lessard S, Yu C, Luo X, et al. (2016) Lower Methylation of the *ANGPTL2* Gene in Leukocytes from Post-Acute Coronary Syndrome Patients. *PLoS ONE* 11(4): e0153920. doi:10.1371/journal.pone.0153920

**Editor:** Carlo Gaetano, Goethe University, GERMANY

**Received:** December 3, 2015

**Accepted:** April 6, 2016

**Published:** April 21, 2016

**Copyright:** © 2016 Nguyen et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data have been included in the paper. Due to ethical restrictions, individual data from the current study are available upon request from the corresponding author. The corresponding author Eric Thorin may be contacted at [REDACTED]

**Funding:** The work was funded by the Canadian Institute for Health Research (ET). Students were supported through fellowship (VT) and scholarship (SL) of the Canadian Institute for Health Research. GL holds a Canada Research Chair. Clinical research (JL, MG, DH, MJ, A Nigam) and basic research (ET,

## Abstract

DNA methylation is believed to regulate gene expression during adulthood in response to the constant changes in environment. The methylome is therefore proposed to be a biomarker of health through age. *ANGPTL2* is a circulating pro-inflammatory protein that increases with age and prematurely in patients with coronary artery diseases; integrating the methylation pattern of the promoter may help differentiate age- vs. disease-related change in its expression. We believe that in a pro-inflammatory environment, *ANGPTL2* is differentially methylated, regulating *ANGPTL2* expression. To test this hypothesis we investigated the changes in promoter methylation of *ANGPTL2* gene in leukocytes from patients suffering from post-acute coronary syndrome (ACS). DNA was extracted from circulating leukocytes of post-ACS patients with cardiovascular risk factors and from healthy young and age-matched controls. Methylation sites (CpGs) found in the *ANGPTL2* gene were targeted for specific DNA methylation quantification. The functionality of *ANGPTL2* methylation was assessed by an *in vitro* luciferase assay. In post-ACS patients, C-reactive protein and *ANGPTL2* circulating levels increased significantly when compared to healthy controls. Decreased methylation of specific CpGs were found in the promoter of *ANGPTL2* and allowed to discriminate age vs. disease associated methylation. *In vitro* DNA methylation of specific CpG lead to inhibition of *ANGPTL2* promoter activity. Reduced leukocyte DNA methylation in the promoter region of *ANGPTL2* is associated with the pro-inflammatory environment that characterizes patients with post-ACS differently from age-matched healthy controls. Methylation of different CpGs in *ANGPTL2* gene may prove to be a reliable biomarker of coronary disease.

NTT) teams are supported by an annual grant of the Foundation of the Montreal Heart Institute. Clinical research in prevention is supported by the EPIC Foundation, the prevention center of the Montreal Heart Institute.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are known to be caused by the prolonged exposure to a growing list of risk factors such as tobacco use, unhealthy diet, physical inactivity, obesity, hypertension, dyslipidemia and metabolic disorders [1, 2]. CVD are characterized by a state of low-grade chronic inflammation through the increased production of pro-inflammatory mediators [3].

Angiotensin-like 2 (ANGPTL2) is a circulating protein with pro-inflammatory properties [4–8], which levels increase with aging in the general population [6]. The early involvement of ANGPTL2 in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases in humans is supported by the elevated plasma ANGPTL2 concentration detected in patients suffering from CVD [4–6, 9], diabetes [5, 10, 11] and obesity [5, 12, 13] alongside other classical markers of inflammation such as C-reactive protein (CRP) [14, 15]; a positive correlation between serum CRP and ANGPTL2 has previously been reported in diabetic patients [5]. In line with these previous findings, recent studies propose that plasma ANGPTL2 is a promising biomarker for inflammatory diseases such as various cancers [16–19], atherosclerosis [5, 20], diabetes [5] and heart failure [21].

The origin of circulating ANGPTL2 is however problematic. Early reports state that ANGPTL2 is mainly produced from the adipose tissue [5], but its mRNA can also be detected in other organs [22] such as the skeletal muscle, heart [5] and endothelial cells [4]. Therefore, ANGPTL2 likely has both systemic and tissue-specific activities depending if it is secreted or expressed locally. ANGPTL2 has also been found to be expressed in mouse bone marrow derived macrophages [23], infiltrating mouse [24] and human macrophages [6, 24], as well as *in vitro*, in human primary peritoneal macrophages (RAW264.7) [25] and macrophage-like cell line (THP-1) [26]. Therefore, although ANGPTL2 could be used as a biomarker of inflammation like CRP, it is unlikely that ANGPTL2 is associated with a specific disorder. A more refined parameter characterizing ANGPTL2 would, therefore, provide more information of the health status of patients.

In this regards, it is well established that aging [27] and environmental stimuli, including risk factors for CVD [28], induce epigenetic changes such as DNA methylation that modify gene expression. The consequences of DNA methylation on gene transcription vary with their locations within the gene and they are highly specific of a cell type [29, 30]. In general, methylation of the promoter region has been shown to decrease gene expression [31], while in the gene body, methylation can induce up or down regulation of the expression [32, 33]. In mammalian cells, methylation is predominantly found on cytosines preceding a guanine called CpG dinucleotide. *ANGPTL2* has been shown to be increasingly methylated in ovarian cancer [34] and myelodysplastic syndrome [35], while *ANGPTL2* promoter methylation is decreased in osteosarcoma [36]. Taken together, these studies reveal a potential role of DNA methylation in *ANGPTL2* expression. *ANGPTL2* methylation has not been studied in CVD, despite considerable evidence now showing that DNA methylation is associated with inflammation [37–39] and atherosclerosis [28, 40]. CVD are associated with both global [41] and gene-specific [40, 42, 43] differentiated methylation profiles, notably in leukocytes. These epigenetic changes are also linked to known CVD risk factors such as smoking [44–46], hypertension [47, 48] and obesity [49, 50]. Hence, blood DNA methylation quantification is emerging as a powerful diagnostic tool that has been shown to predict all-cause mortality [51].

The aim of our project was to test whether *ANGPTL2* methylation in circulating leukocytes isolated from patients with a recent first cardiovascular event could identify differential methylation marks compared to age-matched healthy volunteers.

## Materials and Methods

### Participants

Fasting blood samples were collected from 33 patients (26 men / 7 women;  $62 \pm 2$  y) with post-acute coronary syndrome (ACS) who provided written informed consent and were recruited at the cardiovascular prevention center of the Montreal Heart Institute. Consecutive cases of post-ACS patients were recruited from September 2011 to December 2013 at the Montreal Heart Institute. Per day, an average of 3 to 4 patients was studied: 750 patients per year (3 patients x 250 days of recruitment), i.e 1500 cases within 2 years, were evaluated. Among those cases, only 2–3 patients per week were eligible, and at the end 46 patients were enrolled. Among these 46 eligible patients, 9 dropped (5 patients stopped the training program that they were supposed to follow during the study, 1 patient was already involved in another clinical study, 1 was unfit for the physical training, 1 developed *de novo* atrial fibrillation, 1 developed a new ACS during the study). Among the remaining 37 patients, blood was available for ANGPTL2 quantification only in 33 patients. The mean duration after ACS was  $65 \pm 7$  days (median of 51 days [25–249]). One patient was enrolled after a period >4 months, 249 days after the ACS. The study was approved by the Ethical Board of the Montreal Heart Institute. Post-ACS patients were hypertensive, diabetic, dyslipidemic, obese, smokers (Tables 1 and 2), and were new members of the cardiovascular prevention center. Baseline characteristics, comorbidities and the medication of the patients are presented in Table 1.

Blood samples were collected in EDTA and heparin tubes from post-ACS patients and from 20 young ( $28 \pm 1$  years) healthy and 20 age-matched ( $61 \pm 2$  years) healthy volunteers recruited

**Table 1. Baseline parameters of post-ACS patients.**

	Post-ACS patients (n = 33)
<b>Age (years)</b>	62±2
<b>Men</b>	26 (79%)
<b>Family history</b>	16/33 (49%)
<b>Actual Percutaneous transluminal coronary angioplasty</b>	33/33 (100%)
<b>Actual Myocardial infarction</b>	29/33 (88%)
<b>Actual Unstable angina</b>	4/33 (21%)
<b>Hypertension</b>	21/33 (64%)
<b>Type II diabetes</b>	4/33 (12%)
<b>Dyslipidemia</b>	27/33(82%)
<b>Obesity</b>	21/33 (64%)
<b>Smoking</b>	5/33 (15%)
<b>Ex smoking</b>	19/33 (58%)
<b>Medication</b>	
Statins	32/33 (97%)
Aspirin	32/33 (97%)
β-blockers	28/33 (85%)
Angiotensin Converting Enzyme inhibitors	26/33 (79%)
Clopidogrel/Pasugrel	24/33 (73%)
Nitrates	14/33 (42%)
Calcium channel blockers	2/33 (6%)
Angiotensin II receptor antagonists	3/33 (9%)

Data are mean ± SEM of n participants.

doi:10.1371/journal.pone.0153920.t001

**Table 2. Anthropometric, hemodynamic and metabolic parameters of participants.**

	Young healthy controls	n	Age-matched healthy controls	n	Post-ACS patients	n
Age (years)	28±1	20	61±2 (20)	20	62±2	33
Men	5		4		26	
VO <sub>2</sub> max (ml/min/kg LBM)	54.8±2.4	20	44.6±2.0	20	29.7±1.0 *, a	32
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.6±0.4	20	23.8±0.5	20	28.1±0.8 *, a	33
Body fat (%)	17.2±1.5	20	25.2±1.6 *	20	28.2±1.2 *	32
SAP (mm Hg)	112±3	19	118±3	20	122±3 *	33
DAP (mm Hg)	68±2	19	73±1	20	69±1	33
Heart rate (bpm)	67±2	20	65±2	20	65±2	33
Glucose (mM)	4.8±0.1	19	5.0±0.1	19	5.4±0.1 *, a	33
Insulin (pM)	34.7±3.3	19	38.4±3.0	17	79.2±9.4 *, a	33
TG (mM)	0.71±0.07	20	1.04±0.13	19	1.09±0.07 *	33
Total Cholesterol (mM)	4.2±0.1	20	4.8±0.2 *	19	3.0±0.1 *, a	33
LDL (mM)	2.3±0.1	20	2.9±0.2 *	17	1.5±0.1 *, a	33
HDL (mM)	1.6±0.1	20	1.6±0.1	18	1.0±0.1 *, a	33
CRP (mg/L)	0.89±0.25	20	0.99±0.20	15	2.20±0.46 *	31

Data are mean ± SEM of (n) participants.

\*: p<0.05 versus Young healthy controls,

<sup>a</sup>: p<0.05 versus Age-matched controls (Kruskal-Wallis test).

BMI, Body mass index; SAP, Systolic arterial pressure; DAP, Diastolic arterial pressure; TG, Triglycerides; LDL, Low-density lipoprotein; HDL, High-density lipoprotein; CRP, C-reactive protein.

doi:10.1371/journal.pone.0153920.t002

in a previous study [20]. Control healthy volunteers had no comorbidities and no medication; baseline characteristics, inclusion and exclusion criteria for these healthy volunteers have been previously reported [20].

Inclusion criteria for the post-ACS patients were the following: 1) men or women aged ≥18 years; 2) with previous ACS (unstable angina, or non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI), or ST elevation myocardial infarction (STEMI) with the presence of 2/3 criteria *i.e.* typical chest pain, electrocardiographic ischemic change, or elevated troponin T; 3) complete revascularization defined as no major epicardial coronary artery or bypass graft with a residual diameter stenosis > 50% and no residual left main stenosis > 40%; 4) left ventricular ejection fraction > 40%; 5) stable doses of medication during the 4 weeks prior to enrolment (STEMI patients must be on a stable dose of β-blocker); 6) able to perform a maximal cardiopulmonary exercise test; 7) capacity and willingness to sign informed consent.

Exclusion criteria for the post-ACS patients were: 1) recent (< 6 months) coronary bypass surgery; 2) incomplete revascularisation; 3) left ventricular ejection fraction (LVEF) < 40%; 4) significant valvular heart disease defined as mitral stenosis, grade III-IV mitral insufficiency, moderate-severe aortic stenosis, moderate-severe aortic insufficiency; 5) uncontrolled hypertension defined as blood pressure >180/110 mmHg; 6) significant resting ECG abnormalities including left bundle branch block, non-specific intraventricular conduction delay, left ventricular hypertrophy and resting ST-segment depression; 7) chronic atrial fibrillation; 8) pacemaker or implantable cardioverter defibrillator; 9) low functional capacity on baseline maximal exercise test (<5 METs); 10) any contra-indication to exercise training or any condition limiting effort to a greater degree than the CAD (such as neurologic disease, peripheral artery disease, osteoarthritis). The information concerning the presence of inflammatory disorders is not available.

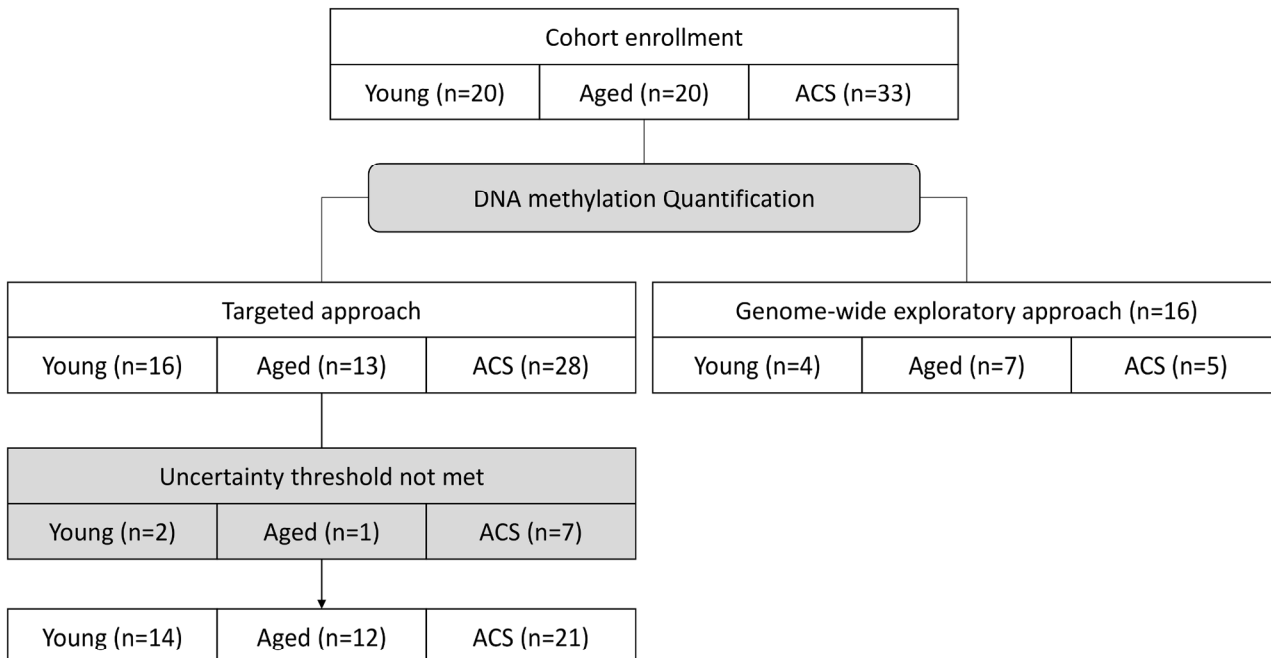
The anthropometric, hemodynamic and metabolic parameters of the controls and the post-ACS patients are summarized in [Table 2](#). The research protocol was approved by the Research Ethics and New Technology Development Committee of the Montreal Heart Institute. Following collection, ice-blood samples were centrifuged at 4°C and plasma was stored at -80°C. ANGPTL2 concentration was quantified by a commercial enzymatic immunoassay kit, as previously described [\[20\]](#).

### DNA extraction and bisulfite conversion

In all available samples (n = 20 young healthy controls, n = 20 age-matched healthy controls and n = 33 post-ACS patients) ([Fig 1](#)), total DNA was isolated from whole blood using a Qia-gen DNeasy Blood & tissue kit following the manufacturer’s instructions. No selection of white blood cells was done, DNA was isolated from the whole white blood cells population. After extraction, DNA was quantified by NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop products, Wilmington, DE). DNA was then converted by bisulfite reaction using the EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Irvine, CA) following the manufacturer’s protocol.

### DNA methylation quantification

A genome-wide exploratory DNA methylation quantification protocol assay was performed on bisulfite-converted DNA using the Infinium Human Methylation 450 BeadChip Kit (Illumina, San Diego, CA) to obtain the methylation status of >485 000 CpG sites across the genome, as previously described [\[52\]](#). This exploratory approach was performed in a small number of subjects (n = 4 young healthy controls, n = 7 aged healthy controls and n = 5 post-ACS patients) ([Fig 1](#)). We normalized probe intensities using the ARRM software [Fortin JP, Greenwood CMT, Labbe A: ARRMNormalization: Adaptive Robust Regression normalization for Illumina



**Fig 1. Flowchart illustrating the "n" values between groups throughout the study.**

doi:10.1371/journal.pone.0153920.g001

**Table 3. EpiTYPER primer sequences.** ANGPTL2-specific bisulfite primers required for PCR amplification.

Primer	Sequence
Forward	aggaagagagTTATTTTAAATTTGGGAAAGG
Reverse	cagtaatacgactcactatagggagaaggctCTCCAAAATCCTAAACTCAATTCAA

doi:10.1371/journal.pone.0153920.t003

methylation data. In R package 1.0.0 edition; 2013.]. We removed probes that target a genomic region containing SNPs based on dbSNP version 137 (N = 82,694).

After this genome-wide exploratory DNA methylation quantification, fine mapping DNA methylation was then quantified by EpiTYPER assay (Sequenom, San Diego, CA), as previously described [53]. Gene-specific primers required for the assay are presented in Table 3. These experiments were performed at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada. This targeted approach was performed in all the remaining patients (n = 16 young healthy controls, n = 13 aged healthy controls and n = 28 post-ACS patients) (Fig 1). During the targeted approach, some samples showed undetectable methylation ratios because the maximum level of uncertainty was not met. In other words, any data with an estimated error larger than the uncertainty threshold (which is a value for the maximum amount of error accepted) was excluded and not displayed: some undetectable data were excluded in n = 2 young healthy controls, n = 1 aged healthy controls and n = 7 post-ACS patients. The fine targeted DNA methylation mapping was therefore performed in a total of n = 14 young healthy controls, n = 12 aged healthy controls and n = 21 post-ACS patients (Fig 1).

### Cloning of pCpG free-ANGPTL2 vector

Constructions were done using the CpG free plasmid pCpGfree-promoter (Invivogen, San Diego, CA) as the backbone to study enhancer methylation. The ANGPTL2 CpG region was amplified using forward 5' -TAAGCTCCTTCCCACGTGACCTCACAGAGTCG-3' and reverse 5' -GATCCGACTCTGTGAGGTACCGTGGGAAGGAGCTTATGCA-3' primers and subsequently inserted in the backbone using NsiI and BamHI restriction sites as previously described [54, 55].

### In vitro methylation, transient transfection and luciferase assay

Cloned vectors were isolated by Qiagen QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). M. SssI CpG methyltransferase (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) was used for *in vitro* methylation according to manufacturer's instructions. Methylated DNA was then purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and quantified by NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop products, Wilmington, DE). Methylation was confirmed by digestion with the methylation-sensitive restriction enzymes HhaI and HpaII. HEK293 cells grown to confluence on 96-well plates were transfected with the pCpG free-Gpx1 vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Twenty-four hours after transfection, luciferase activity was measured with the QUANTI-Luc reagent (Invivogen, San Diego, CA) by luminescence detection. Promoter activity was normalized to the total amount of protein measured by a Bradford assay (Biorad, Hercules, CA) [54, 55].

### Statistical Analysis

Results are presented as mean±SEM of (n) participants. One-way ANOVA (with Bonferonni post-test) or Kruskal-Wallis test (with Dunn post-test), unpaired t-test or Mann Whitney test were used where applicable, depending on Gaussian distributions, to test the difference



between groups (Graph Pad Prism). A p-value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

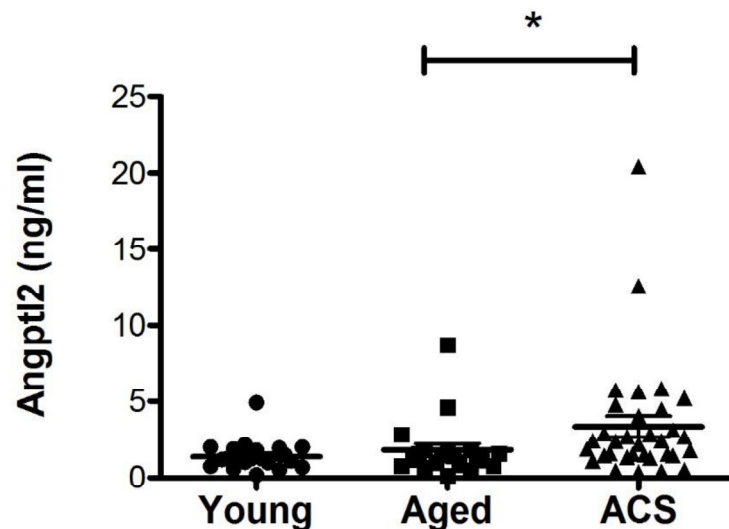
### Increased circulating ANGPTL2 concentration in post-ACS patients

In accordance with our previously published data [4, 20], plasma ANGPTL2 concentration was higher in post-ACS patients ( $3.35 \pm 0.67$  ng/mL,  $n = 33$ ) when compared to age-matched controls ( $1.80 \pm 0.42$  ng/mL,  $n = 20$ ) (Fig 2). The post-ACS patients also display higher circulating CRP levels ( $2.20 \pm 0.46$  mg/L,  $n = 31$ ) in comparison to young healthy controls ( $0.89 \pm 0.25$  mg/L,  $n = 20$ ) (Table 2), illustrating the presence of a pro-inflammatory environment in these patients with various CVD risk factors (Table 1).

### Exploratory discovery of *ANGPTL2* methylation sites

We selected a total of 16 patients from the young controls ( $n = 4$ ), age-matched controls ( $n = 7$ ) and post-ACS patients ( $n = 5$ ) for this genome-wide exploratory DNA methylation analysis. Out of the  $>485,000$  probes included in the genome-wide quantification, only 6 probes were associated with the *ANGPTL2* gene: 1 probe (cg09427311) was distributed in the promoter region of the *ANGPTL2* gene, 2 probes (cg08076018 and cg13662634) were distributed in the 5' region transcription start site and 3 probes were located in the gene body (cg11213150, cg14281592 and cg13508369) (Table 4). Significant levels of DNA methylation were detected in all 6 probes (Fig 3). However, due to the low number of individuals among each group, no statistical difference was observed between controls and post-ACS groups (data not shown).

Fine mapping DNA methylation was then quantified by EpiTYPER assay in larger groups; we chose to proceed with the investigation of probe cg09427311, since it is the only one located in the promoter region of *ANGPTL2* gene and that it is sufficiently far from the other probes to allow targeting with specific primers for downstream fine mapping analysis.



**Fig 2. Increased ANGPTL2 in post-ACS patients.** Fasting ANGPTL2 levels in the plasma of patients with post-acute coronary syndrome (ACS) ( $n = 33$ ) compared to age-matched ( $n = 20$ ) and young ( $n = 20$ ) healthy controls. Data are mean  $\pm$  SEM of ( $n$ ) participants, \*:  $p < 0.05$  vs Age-matched controls (Kruskal-Wallis test).

doi:10.1371/journal.pone.0153920.g002

**Table 4. Exploratory probe coordinates.** Genomic localisation of probes covering ANGPTL2 CpG sites analyzed by the Infinium HumanMethylation450 exploratory assay, as provided by the manufacturer.

Probe ID	Coordinates
cg08076018	chr9:128924901
cg09427311	chr9:128925551
cg11213150	chr9:128924278
cg13508369	chr9:128923847
cg13662634	chr9:128924769
cg14281592	chr9:128924134

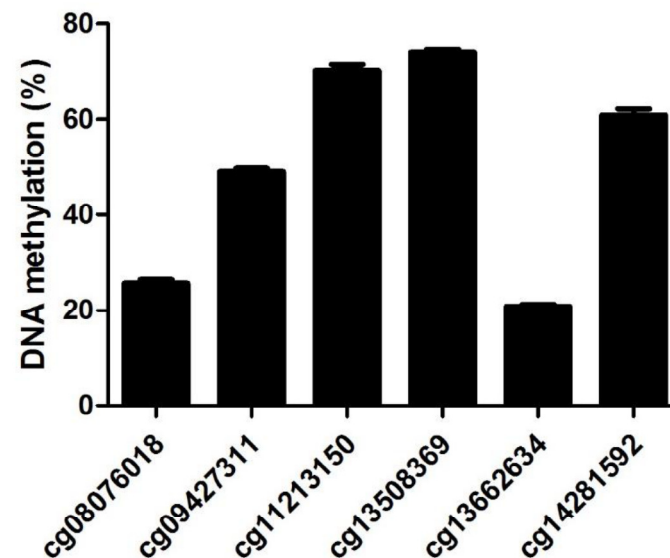
doi:10.1371/journal.pone.0153920.t004

### Post-ACS patients have decreased ANGPTL2 methylation

Using a targeted approach, we proceeded to the fine mapping analysis of the unique CpGs (Fig 4) surrounding the previously identified *ANGPTL2* methylation site covered by the selected probe cg09427311.

Of the 6 CpGs found within the 344 bp region amplified by specific primers, 2 CpGs (CpG5 and CpG6) show differential methylation between groups (Fig 5). Methylation of CpG5 was significantly decreased in post-ACS patients ( $34.7 \pm 1.4\%$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 21$ ) when compared to young ( $45.8 \pm 1.5\%$ ,  $n = 14$ ) and aged-matched ( $40.6 \pm 2.3\%$ ,  $n = 12$ ) control groups. However, no difference was observed between young and age-matched control groups (Fig 5D). Compared to young controls ( $66.6 \pm 0.9\%$ ,  $n = 14$ ), methylation of CpG6 was also lower in post-ACS ( $60.4 \pm 1.5\%$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 21$ ), but no significant difference was observed with age-matched controls ( $61.4 \pm 2.0\%$ ,  $n = 12$ ). Again, methylation of CpG6 was similar between both control groups (Fig 5E).

These results suggest that CpG5 methylation is sensitive to the disease state since a significant hypomethylation is detected in post-ACS patients when compared to both healthy groups.



**Fig 3. Detectable *ANGPTL2* methylation profile.** Quantification of various methylation sites located in the *ANGPTL2* gene identified following a preliminary genome-wide exploratory assay. DNA samples were pooled from a small number of participants taken from all three groups. Data are mean  $\pm$  SEM of a total of 16 patients from the young controls ( $n = 4$ ), age-matched controls ( $n = 7$ ) and post-ACS patients ( $n = 5$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0153920.g003

chr9:127123170

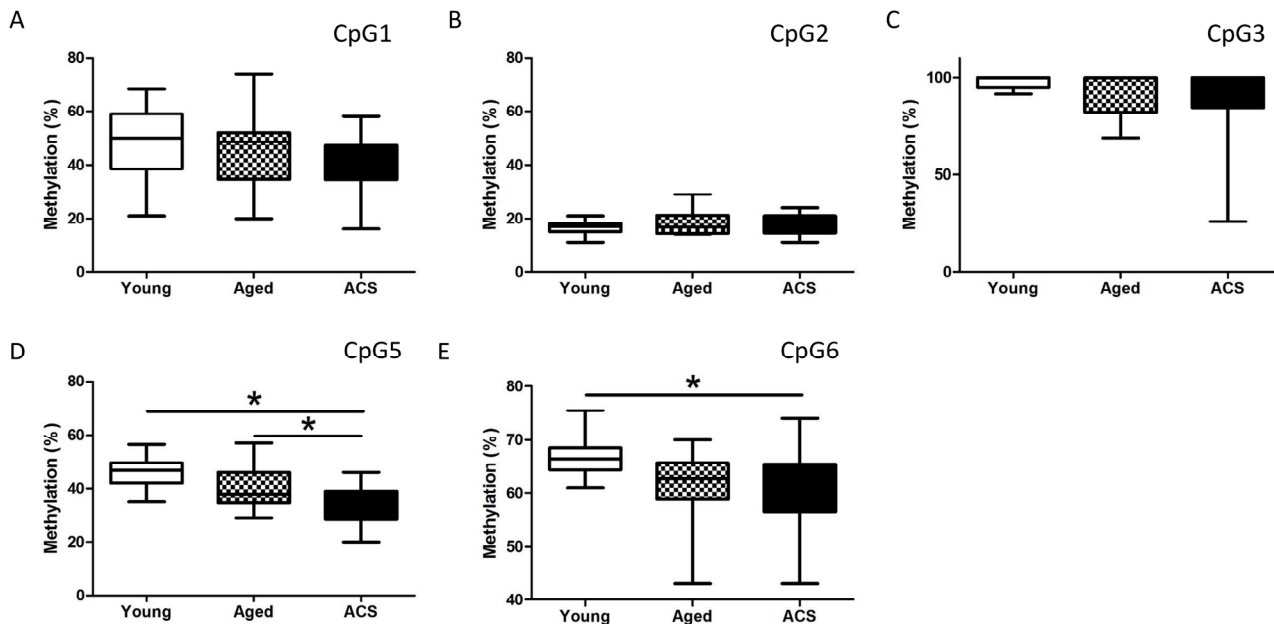


**Fig 4. Fine mapping of ANGPTL2 methylation profile.** Identification (CpG1-6) and localization of CpGs targeted for DNA methylation quantification. The arrow represents the CpG previously characterized by probe cg09427311 during the exploratory analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0153920.g004

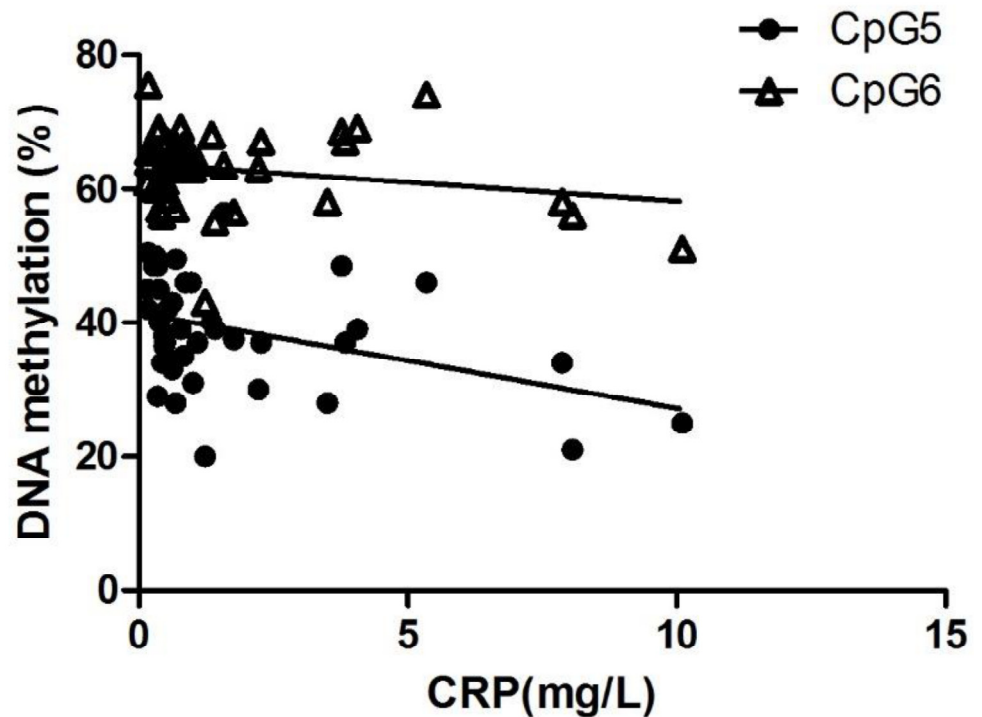
Conversely, it is unclear which factor regulates CpG6 methylation due to the lack of discrepancy between the post-ACS group and the age-matched controls or between the young and age-matched controls.

On the other hand, no significant variations in the methylation levels among groups were detected for CpG1, CpG2 and CpG3 (Fig 5A–5C). The remaining CpG4 could not be analyzed due to a limitation of this assay: the EpiTYPER technology relies on a mass spectroscopy



**Fig 5. Hypomethylation of CpG5 and CpG6 in post-ACS patients.** Methylation percentage of the methylation sites (A) CpG1, (B) CpG2, (C) CpG3, (D) CpG5 and (E) CpG6, previously identified in Fig 4. DNA was isolated from leukocytes of post-ACS patients (n = 21), age-matched (n = 12) and young (n = 14) healthy controls. Box and whiskers plot of (n) participants, \*: p<0.05 (Kruskal-Wallis test).

doi:10.1371/journal.pone.0153920.g005



**Fig 6. CpG5 methylation is inversely correlated with CRP concentration.** Negative correlation between plasma CRP concentrations and CpG5 ( $p = 0.0096$ ,  $r = -0.395$ ,  $n = 42$ ) and CpG6 ( $p = 0.1731$ ,  $r = -0.214$ ,  $n = 42$ ) methylation in all participants ( $n = 14$  young healthy controls,  $n = 9$  age-matched healthy controls,  $n = 19$  post-ACS patients).

doi:10.1371/journal.pone.0153920.g006

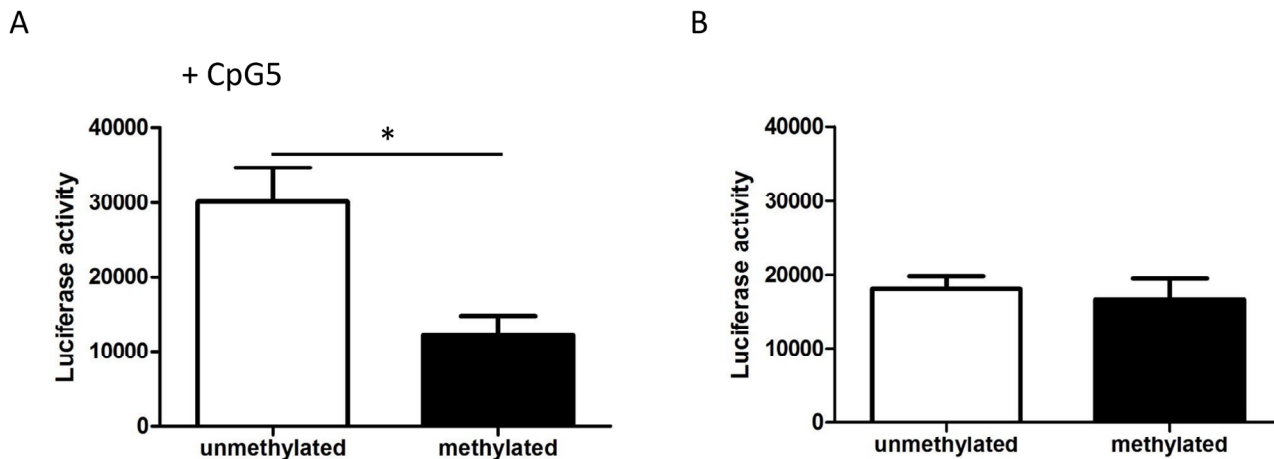
analysis of CpG-containing DNA fragments by uracil-specific cleavage and the CpG4 fragment was too small to be reliably detected by mass spectrometry (data not shown).

### ANGPTL2 methylation is correlated with CRP levels

Interestingly, CpG5, but not CpG6 methylation negatively correlates ( $p < 0.05$ ) with circulating CRP levels when all participants were considered (Fig 6), suggesting that *ANGPTL2* hypomethylation is associated with high levels of CRP, establishing a link between *ANGPTL2* methylation and inflammation. For this reason, only CpG5 was considered for further analysis.

### *In vitro* methylation decreases *ANGPTL2* promoter activity

To assess the impact of CpG5 methylation on *ANGPTL2* expression, we used an *in vitro* methylation luciferase assay as previously described [54–56]. A 32 bp promoter sequence containing CpG5 was inserted into the pCpGfree-basic vector, upstream of a hEF-1 $\alpha$  CpG-free promoter. This construct was then methylated *in vitro* and subsequently transfected in HEK293 cells where luciferase activity was measured as an indicator of promoter activity. *In vitro* methylation of the construct containing the *ANGPTL2* promoter fragment significantly reduced promoter activity as shown by a decrease of 60% ( $p < 0.05$ ) in luciferase activity (Fig 7A). Conversely, methylation of the vector lacking the CpG5 sequence did not alter promoter activity (Fig 7B). These results suggest a potential molecular regulatory role of CpG5 methylation on *ANGPTL2* expression.



**Fig 7. *In vitro* methylation of *ANGPTL2* decreases promoter activity.** *In vitro* methylation of *ANGPTL2* target region containing CpG5 inhibited transcriptional activity, as measured by a luciferase reporter assay. Luciferase activity of methylated (M.SssI treated) and unmethylated constructs (A) containing the CpG5 site or (B) without. The assay was repeated 3 times and data are mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$  versus unmethylated (Unpaired t-test).

doi:10.1371/journal.pone.0153920.g007

## Discussion

In this study, we show for the first time that *ANGPTL2* methylation pattern varies in post-ACS patients and that this methylation pattern is independent of aging. During the course of the study we also identified a novel regulatory region in the *ANGPTL2* promoter, the CpG5, which is hypomethylated in association with the pro-inflammatory environment in these patients. We found that *in vitro* methylation of CpG5 induced a lower transcriptional activity. Therefore, differential CpG5 methylation pattern may identify patients at risk of a first cardiovascular event.

Previous studies suggest that *ANGPTL2* expression is regulated by DNA methylation. For example, hypermethylation of CpGs located in *ANGPTL2* gene have been reported in various ovarian cancer cell lines, where *ANGPTL2* is silenced [34] and in bone marrow samples from patients suffering from primary myelodysplastic syndrome [35]. In contrast, hypomethylation of *ANGPTL2* promoter has been observed in human osteosarcoma cell lines, proportionally with the increase in *ANGPTL2* expression and progression of the disease when these cells were injected in mice [36]. In our study, we observed a decrease in *ANGPTL2* methylation in the CpG5 region in post-ACS patients. In our hands, human leukocytes do not produce detectable levels of *ANGPTL2* and mRNA levels were at the low detection limit (data not shown). Nonetheless, our data suggest that methylation of CpG may represent a mechanism of regulation that could in part account for the elevated circulating levels of *ANGPTL2* in these patients. Indeed, we have demonstrated that two specific methylation sites, CpG5 and CpG6, are less methylated in diseased patients when compared to young healthy controls. However, only CpG5 significantly differed from the age-matched control group and significantly correlated with CRP levels, suggesting that potential methylation sites are differently sensitive to various stimuli such as age and the disease state. This is also supported by the observation that methylation in surrounding CpGs (CpG1-3) do not significantly vary in any of our groups. The amplitudes of the changes in methylation levels observed in our study (>5 to 10%) are in line with what is typically observed in studies conducted on white blood cells in a pro-inflammatory context [57, 58]. In addition, a previously published study conducted on cord blood cells in association with maternal obesity revealed that *ANGPTL2* methylation differed by less than 5%

across body mass index categories [59]. Aberrant methylation patterns have been extensively studied in the context on chronic inflammatory diseases. In cancer, global DNA methylation measured from the blood can be used as a biomarker for cancer risk [60]. In CVD, low-density lipoproteins exert their effect on endothelial cells through changes in DNA methylation [61, 62] and atherosclerosis is characterized by a global state of hypomethylation [63]. Therefore, it could be speculated that changes in methylation patterns could reflect the health status of the patients and be much more specific of the pathology involved compared to the circulating levels of the protein.

Indeed, as previously mentioned, our group [4, 20] and others [5, 12, 13] have demonstrated that circulating ANGPTL2 concentration is increased in a pro-inflammatory context in a proportional manner to the severity of the disease. In our study, only a small difference was observed in Angpt2 plasma concentrations of post-ACS patients when compared to age-matched healthy controls, reflecting a lesser or shorter cumulative inflammatory burden compared to that of patients with known CVD and a longer history of cardiovascular events [20]. We can hypothesize that in the presence of a more severe inflammatory environment such as in patients with established CVD, which would be highlighted by higher ANGPTL2 levels, changes in *ANGPTL2* methylation may become detectable in other CpGs. Such graded methylation has been previously reported in cancer: methylation of *ANGPTL2* varies proportionally with tumour metastasis [36].

ANGPTL2 is often associated with markers of inflammation such as CRP [64, 65], IL-6 and TNF- $\alpha$  [4, 66] and although it is not always clear which comes first, it is acknowledged that ANGPTL2 participates in a pro-inflammatory loop by being sensitive to inflammation and in turn, further promotes inflammatory pathways. In our study, *ANGPTL2* methylation at CpG5 is inversely correlated with CRP. Furthermore, CpG5 and CpG6 methylation is decreased in leukocytes from post-ACS patients who also happen to have higher levels of circulating ANGPTL2 and CRP; this suggests that a pro-inflammatory environment may favour the production of ANGPTL2 in part by decreasing DNA methylation in the relevant producing cells. An interesting finding by Sasaki and al. [26] indeed states that ANGPTL2 can act in an auto-crine manner. Their work shows that treatment of macrophage-like cells with ANGPTL2 increases its own expression in a dose-dependent manner [26]. Taking these results together, we can hypothesize that in addition of inflammation *per se*, ANGPTL2 could induce its own expression through a DNA methylation mechanism.

## Limitations of the study

The present study allows us to observe the methylation changes of *ANGPTL2* in a context of mild inflammatory stress in optimally treated post-ACS patients. Our group has previously demonstrated that patients with chronic documented coronary artery disease exhibit greater signs of inflammation through slightly higher circulating ANGPTL2 ( $3.35 \pm 0.67$  ng/mL for post-ACS versus  $5.74 \pm 0.75$  ng/mL for CAD) [20]. It would be interesting to study *ANGPTL2* methylation under such conditions.

Following the exploratory experiment aiming to identify methylation candidates, we narrowed our target CpGs down to 6 potential regulatory CpGs. Hence, DNA methylation quantification approaches covering broader *ANGPTL2*-related CpGs and regulatory regions should be considered, especially when considering patients with longer history of risk factors and longer history of cardiovascular events. Therefore, other regulatory methylation sites previously characterized by others [34–36] in different pathological contexts could be included in future studies enrolling patients with CVD. This would allow us to determine how these epigenetic marks can differ when comparing various types of inflammatory diseases. Based on the limited

literature on the subject of *ANGPTL2* methylation, we observe contrasting results; in cancer cells, researchers have reported a decrease in *ANGPTL2* methylation resulting in an increased *ANGPTL2* expression with the progression of the disease [36] while others [34, 35] have shown the opposite. These illustrate how epigenetic mechanisms can vary within the same type of disease by taking into consideration the cell type.

Leukocytes represent an accessible and reliable way to obtain DNA with little discomfort to the patient. However, it is a mixed population of cells in which methylation patterns may be different [67]. Although immune cells express *ANGPTL2* [6, 23, 24] and are likely not the main contributor to the circulating pool of *ANGPTL2* [5], further studies should isolate the mixed leukocytes population.

In conclusion, reduced leukocyte DNA methylation in the promoter region of *ANGPTL2* is associated with the pro-inflammatory environment that characterizes post-ACS patients differently from age-matched healthy controls. Importantly, our data suggest that methylation of different CpGs in *ANGPTL2* may prove to be a reliable biomarker of coronary disease. Replication of our study in a wider range of CpGs in patients with different combination of risk factors for CVD and a history of cardiovascular events should validate the usefulness of methylation patterns in *ANGPTL2* as a biomarker for a better risk assessment of future cardiovascular events.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: A. Nguyen ET. Performed the experiments: A. Nguyen MM CY XL. Analyzed the data: A. Nguyen VT SL NTT GL ET. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM VT SL GL. Wrote the paper: A. Nguyen NTT GL ET. Clinical team that recruited patients and volunteers and followed them: JL MG DH MJ A. Nigam. Corrected the manuscript: A. Nguyen MM VT SL CY XL JL DH MG MJ NTT GL A. Nigam ET.

## References

1. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380(9859):2224–60. doi: [10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8) PMID: [23245609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23245609/); PubMed Central PMCID: [PMC4156511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4156511/).
2. Daskalopoulou SS, Rabi DM, Zarnke KB, Dasgupta K, Nerenberg K, Cloutier L, et al. The 2015 Canadian Hypertension Education Program recommendations for blood pressure measurement, diagnosis, assessment of risk, prevention, and treatment of hypertension. *Can J Cardiol*. 2015; 31(5):549–68. doi: [10.1016/j.cjca.2015.02.016](https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.02.016) PMID: [25936483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25936483/).
3. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 107(3):499–511. PMID: [12551878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12551878/).
4. Farhat N, Thorin-Trescases N, Mamarbachi M, Villeneuve L, Yu C, Martel C, et al. Angiotensin-like 2 promotes atherogenesis in mice. *J Am Heart Assoc*. 2013; 2(3):e000201. doi: [10.1161/JAHA.113.000201](https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000201) PMID: [23666461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23666461/); PubMed Central PMCID: [PMC3698785](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3698785/).
5. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, et al. Angiotensin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*. 2009; 10(3):178–88. doi: [10.1016/j.cmet.2009.08.003](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.003) PMID: [19723494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19723494/).
6. Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, et al. Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34(4):790–800. doi: [10.1161/ATVBAHA.113.303116](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303116) PMID: [24526691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24526691/).
7. Thorin-Trescases N, Thorin E. Angiotensin-like-2: a multifaceted protein with physiological and pathophysiological properties. *Expert Rev Mol Med*. 2014; 16:e17. doi: [10.1017/erm.2014.19](https://doi.org/10.1017/erm.2014.19) PMID: [25417860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25417860/).

8. Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y. Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25(5):245–54. doi: [10.1016/j.tem.2014.03.012](https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.012) PMID: [24746520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24746520/).
9. Oike Y, Tabata M. Angiotensin-like proteins—potential therapeutic targets for metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Circ J.* 2009; 73(12):2192–7. PMID: [19875897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19875897/).
10. Li Q, Gong W, Yang Z, Lu B, Yang Y, Zhao W, et al. Serum Angptl2 levels are independently associated with albuminuria in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013; 100(3):385–90. doi: [10.1016/j.diabres.2013.03.028](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.03.028) PMID: [23602322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23602322/).
11. Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Takahashi O, Mukai N, Hata J, et al. Angiotensin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama study. *Diabetes Care.* 2013; 36(1): 98–100. doi: [10.2337/dc12-0166](https://doi.org/10.2337/dc12-0166) PMID: [22966088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22966088/); PubMed Central PMCID: [PMC3526200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3526200/).
12. Muramoto A, Tsushita K, Kato A, Ozaki N, Tabata M, Endo M, et al. Angiotensin-like protein 2 sensitively responds to weight reduction induced by lifestyle intervention on overweight Japanese men. *Nutr Diabetes.* 2011; 1:e20. doi: [10.1038/nutd.2011.16](https://doi.org/10.1038/nutd.2011.16) PMID: [23154406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23154406/); PubMed Central PMCID: [PMC3302127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3302127/).
13. Meng QX, Wen L, Chen XY, Zhong HJ. Association of serum angiotensin-like protein 2 and epinephrine levels in metabolically healthy but obese individuals: and evidence. *Exp Ther Med.* 2013; 5(6): 1631–6. doi: [10.3892/etm.2013.1045](https://doi.org/10.3892/etm.2013.1045) PMID: [23837045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23837045/); PubMed Central PMCID: [PMC3702721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3702721/).
14. Emerging Risk Factors C, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, Wood AM, White IR, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med.* 2012; 367(14):1310–20. doi: [10.1056/NEJMoa1107477](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1107477) PMID: [23034020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23034020/); PubMed Central PMCID: [PMC3714101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3714101/).
15. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2010; 122(25):e584–636. doi: [10.1161/CIR.0b013e3182051b4c](https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3182051b4c) PMID: [21098428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21098428/).
16. Ide S, Toiyama Y, Shimura T, Kawamura M, Yasuda H, Saigusa S, et al. Angiotensin-Like Protein 2 Acts as a Novel Biomarker for Diagnosis and Prognosis in Patients with Esophageal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2015. doi: [10.1245/s10434-014-4315-0](https://doi.org/10.1245/s10434-014-4315-0) PMID: [25564164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25564164/).
17. Shimura T, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Kitajima T, Kondo S, et al. Angiotensin-like Protein 2 as a Predictor of Early Recurrence in Patients After Curative Surgery for Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 2015; 35(9):4633–9. PMID: [26254352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26254352/).
18. Toiyama Y, Tanaka K, Kitajima T, Shimura T, Imaoka H, Mori K, et al. Serum angiotensin-like protein 2 as a potential biomarker for diagnosis, early recurrence and prognosis in gastric cancer patients. *Carcinogenesis.* 2015. doi: [10.1093/carcin/bgv139](https://doi.org/10.1093/carcin/bgv139) PMID: [26420253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26420253/).
19. Toiyama Y, Tanaka K, Kitajima T, Shimura T, Kawamura M, Kawamoto A, et al. Elevated serum angiotensin-like protein 2 correlates with the metastatic properties of colorectal cancer: a serum biomarker for early diagnosis and recurrence. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(23):6175–86. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-14-0007](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0007) PMID: [25294915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25294915/).
20. Larouche JF, Yu C, Luo X, Farhat N, Guiraud T, Lalonde J, et al. Acute High-Intensity Intermittent Aerobic Exercise Reduces Plasma Angiotensin-Like 2 in Patients With Coronary Artery Disease. *Can J Cardiol.* 2015. doi: [10.1016/j.cjca.2015.01.038](https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.01.038) PMID: [25980632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25980632/).
21. Huang CL, Wu YW, Wu CC, Hwang JJ, Yang WS. Serum Angiotensin-Like Protein 2 Concentrations Are Independently Associated with Heart Failure. *PLoS One.* 2015; 10(9):e0138678. doi: [10.1371/journal.pone.0138678](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138678) PMID: [26397985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26397985/); PubMed Central PMCID: [PMC4580406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4580406/).
22. Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of angiotensin-related protein. angiotensin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem.* 1999; 274(37):26523–8. PMID: [10473614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10473614/).
23. Swain L, Wottawa M, Hillemann A, Beneke A, Odagiri H, Terada K, et al. Prolyl-4-hydroxylase domain 3 (PHD3) is a critical terminator for cell survival of macrophages under stress conditions. *J Leukoc Biol.* 2014; 96(3):365–75. doi: [10.1189/jlb.2HI1013-533R](https://doi.org/10.1189/jlb.2HI1013-533R) PMID: [24626957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24626957/).
24. Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, et al. Macrophage-derived angiotensin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(6):1400–9. doi: [10.1161/ATVBAHA.112.247866](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.247866) PMID: [22556334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22556334/).
25. Lee HJ, Kim JH, Kim JH, Martinus RD, Park SH. Angiotensin-like protein 2, a chronic inflammatory mediator, is a new target induced by TGF-beta1 through a Smad3-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430(3):981–6. doi: [10.1016/j.bbrc.2012.11.127](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.127) PMID: [23261458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23261458/).
26. Sasaki Y, Ohta M, Desai D, Figueiredo JL, Whelan MC, Sugano T, et al. Angiotensin Like Protein 2 (ANGPTL2) Promotes Adipose Tissue Macrophage and T Lymphocyte Accumulation and Leads to Insulin Resistance. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0131176. doi: [10.1371/journal.pone.0131176](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131176) PMID: [26132105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26132105/); PubMed Central PMCID: [PMC4489192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4489192/).



27. Bjornsson HT, Fallin MD, Feinberg AP. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet.* 2004; 20(8):350–8. doi: [10.1016/j.tig.2004.06.009](https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.06.009) PMID: [15262407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15262407/).
28. Wierda RJ, Geutskens SB, Jukema JW, Quax PH, van den Elsen PJ. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6A):1225–40. doi: [10.1111/j.1582-4934.2010.01022.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01022.x) PMID: [20132414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20132414/); PubMed Central PMCID: [PMC3828841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3828841/).
29. Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 2013; 23(3):555–67. doi: [10.1101/gr.147942.112](https://doi.org/10.1101/gr.147942.112) PMID: [23325432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23325432/); PubMed Central PMCID: [PMC3589544](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3589544/).
30. Deaton AM, Webb S, Kerr AR, Illingworth RS, Guy J, Andrews R, et al. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Res.* 2011; 21(7):1074–86. doi: [10.1101/gr.118703.110](https://doi.org/10.1101/gr.118703.110) PMID: [21628449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21628449/); PubMed Central PMCID: [PMC3129250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3129250/).
31. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One.* 2011; 6(1):e14524. doi: [10.1371/journal.pone.0014524](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014524) PMID: [21267076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21267076/); PubMed Central PMCID: [PMC3022582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3022582/).
32. Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol.* 2009; 27(4):361–8. doi: [10.1038/nbt.1533](https://doi.org/10.1038/nbt.1533) PMID: [19329998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19329998/); PubMed Central PMCID: [PMC3566772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3566772/).
33. Aran D, Toperoff G, Rosenberg M, Hellman A. Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(4):670–80. doi: [10.1093/hmg/ddq513](https://doi.org/10.1093/hmg/ddq513) PMID: [21112978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21112978/).
34. Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, et al. Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(13):5067–75. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-08-0062](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0062) PMID: [18593905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18593905/).
35. Lee S, Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee JH, Lee YS, et al. Identification of genes underlying different methylation profiles in refractory anemia with excess blast and refractory cytopenia with multilineage dysplasia in myelodysplastic syndrome. *Korean J Hematol.* 2012; 47(3):186–93. doi: [10.5045/kjh.2012.47.3.186](https://doi.org/10.5045/kjh.2012.47.3.186) PMID: [23071473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23071473/); PubMed Central PMCID: [PMC3464335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3464335/).
36. Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka MS, Fukuhara S, et al. The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin alpha5beta1, p38 MAPK, and matrix metalloproteinases. *Sci Signal.* 2014; 7(309):ra7. doi: [10.1126/scisignal.2004612](https://doi.org/10.1126/scisignal.2004612) PMID: [24448647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24448647/).
37. Horsburgh S, Robson-Ansley P, Adams R, Smith C. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. *Exerc Immunol Rev.* 2015; 21:26–41. PMID: [25826329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25826329/).
38. Obata Y, Furusawa Y, Hase K. Epigenetic modifications of the immune system in health and disease. *Immunol Cell Biol.* 2015; 93(3):226–32. doi: [10.1038/icb.2014.114](https://doi.org/10.1038/icb.2014.114) PMID: [25666097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25666097/).
39. Yara S, Lavoie JC, Levy E. Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome. *Epigenomics.* 2015; 7(2):283–300. doi: [10.2217/epi.14.84](https://doi.org/10.2217/epi.14.84) PMID: [25942536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25942536/).
40. Turunen MP, Aavik E, Yla-Herttuala S. Epigenetics and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(9):886–91. doi: [10.1016/j.bbagen.2009.02.008](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.008) PMID: [19233248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19233248/).
41. Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EE, Ravasco P, Camilo ME, et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem.* 2003; 49(8):1292–6. PMID: [12881445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12881445/).
42. Webster AL, Yan MS, Marsden PA. Epigenetics and cardiovascular disease. *Can J Cardiol.* 2013; 29(1):46–57. doi: [10.1016/j.cjca.2012.10.023](https://doi.org/10.1016/j.cjca.2012.10.023) PMID: [23261320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23261320/).
43. Udali S, Guarini P, Moruzzi S, Choi SW, Friso S. Cardiovascular epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(4):883–901. doi: [10.1016/j.mam.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.08.001) PMID: [22981780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22981780/).
44. Bouwland-Both MI, van Mil NH, Tolhoek CP, Stolk L, Eilers PH, Verbiest MM, et al. Prenatal parental tobacco smoking, gene specific DNA methylation, and newborns size: the Generation R study. *Clin Epigenetics.* 2015; 7(1):83. doi: [10.1186/s13148-015-0115-z](https://doi.org/10.1186/s13148-015-0115-z) PMID: [26265957](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26265957/); PubMed Central PMCID: [PMC34531498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC34531498/).
45. Bauer M, Linsel G, Fink B, Offenberg K, Hahn AM, Sack U, et al. A varying T cell subtype explains apparent tobacco smoking induced single CpG hypomethylation in whole blood. *Clin Epigenetics.* 2015; 7(1):81. doi: [10.1186/s13148-015-0113-1](https://doi.org/10.1186/s13148-015-0113-1) PMID: [26246861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26246861/); PubMed Central PMCID: [PMC34526203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC34526203/).
46. Burris HH, Baccarelli AA, Byun HM, Cantoral A, Just AC, Pantic I, et al. Offspring DNA methylation of the aryl-hydrocarbon receptor repressor gene is associated with maternal BMI, gestational age, and birth weight. *Epigenetics.* 2015; 1–9. doi: [10.1080/15592294.2015.1078963](https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1078963) PMID: [26252179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26252179/).

47. Kato N, Loh M, Takeuchi F, Verweij N, Wang X, Zhang W, et al. Trans-ancestry genome-wide association study identifies 12 genetic loci influencing blood pressure and implicates a role for DNA methylation. *Nat Genet.* 2015. doi: [10.1038/ng.3405](https://doi.org/10.1038/ng.3405) PMID: [26390057](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26390057/).
48. Wang J, Gong L, Tan Y, Hui R, Wang Y. Hypertensive epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *J Hum Hypertens.* 2015; 29(10):575–82. doi: [10.1038/jhh.2014.132](https://doi.org/10.1038/jhh.2014.132) PMID: [25631220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25631220/).
49. Mansego ML, Milagro FI, Zulet MA, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA. Differential DNA Methylation in Relation to Age and Health Risks of Obesity. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(8):16816–32. doi: [10.3390/ijms160816816](https://doi.org/10.3390/ijms160816816) PMID: [26213922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26213922/); PubMed Central PMCID: [PMC4581172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4581172/).
50. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS, Members of Epi S. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes (Lond).* 2015; 39(1):85–97. doi: [10.1038/ijo.2014.34](https://doi.org/10.1038/ijo.2014.34) PMID: [24566855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24566855/).
51. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* 2015; 16:25. doi: [10.1186/s13059-015-0584-6](https://doi.org/10.1186/s13059-015-0584-6) PMID: [25633388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25633388/); PubMed Central PMCID: [PMC4350614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4350614/).
52. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics.* 2011; 98(4):288–95. doi: [10.1016/j.ygeno.2011.07.007](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007) PMID: [21839163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21839163/).
53. Ehrlich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(44):15785–90. doi: [10.1073/pnas.0507816102](https://doi.org/10.1073/pnas.0507816102) PMID: [16243968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16243968/); PubMed Central PMCID: [PMC1276092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1276092/).
54. Nguyen A, Duquette N, Mamarbachi M, Thorin E. Epigenetic regulatory effect of exercise on glutathione peroxidase 1 expression in the skeletal muscle of severely dyslipidemic mice *PLoS One.* 2016; In Press.
55. Nguyen A, Leblond F, Mamarbachi M, Geoffroy S, Thorin E. Age-Dependent Demethylation of Sod2 Promoter in the Mouse Femoral Artery. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2016; 2016:1–6. doi: [10.1155/2016/8627384](https://doi.org/10.1155/2016/8627384)
56. Malhotra P, Soni V, Kumar A, Anbazhagan AN, Dudeja A, Saksena S, et al. Epigenetic modulation of intestinal cholesterol transporter Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) gene expression by DNA methylation. *J Biol Chem.* 2014; 289(33):23132–40. doi: [10.1074/jbc.M113.546283](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546283) PMID: [24904062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24904062/); PubMed Central PMCID: [PMC4132811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4132811/).
57. Nestor CE, Barrenas F, Wang H, Lentini A, Zhang H, Bruhn S, et al. DNA methylation changes separate allergic patients from healthy controls and may reflect altered CD4+ T-cell population structure. *PLoS Genet.* 2014; 10(1):e1004059. doi: [10.1371/journal.pgen.1004059](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004059) PMID: [24391521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24391521/); PubMed Central PMCID: [PMC3879208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3879208/).
58. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics.* 2011; 6(7):828–37. PMID: [21636973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21636973/); PubMed Central PMCID: [PMC3154425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3154425/).
59. Liu X, Chen Q, Tsai HJ, Wang G, Hong X, Zhou Y, et al. Maternal preconception body mass index and offspring cord blood DNA methylation: exploration of early life origins of disease. *Environ Mol Mutagen.* 2014; 55(3):223–30. doi: [10.1002/em.21827](https://doi.org/10.1002/em.21827) PMID: [24243566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24243566/).
60. Woo HD, Kim J. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012; 7(4):e34615. doi: [10.1371/journal.pone.0034615](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034615) PMID: [22509334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22509334/); PubMed Central PMCID: [PMC3324531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3324531/).
61. Kim YR, Kim CS, Naqvi A, Kumar A, Kumar S, Hoffman TA, et al. Epigenetic upregulation of p66shc mediates low-density lipoprotein cholesterol-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; 303(2):H189–96. doi: [10.1152/ajpheart.01218.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01218.2011) PMID: [22661506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22661506/); PubMed Central PMCID: [PMC3404699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3404699/).
62. Mitra S, Khaidakov M, Lu J, Ayyadevara S, Szewedo J, Wang XW, et al. Prior exposure to oxidized low-density lipoprotein limits apoptosis in subsequent generations of endothelial cells by altering promoter methylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301(2):H506–13. doi: [10.1152/ajpheart.00252.2011](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00252.2011) PMID: [21602467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21602467/).
63. Lund G, Zaina S. Atherosclerosis: an epigenetic balancing act that goes wrong. *Curr Atheroscler Rep.* 2011; 13(3):208–14. doi: [10.1007/s11883-011-0174-3](https://doi.org/10.1007/s11883-011-0174-3) PMID: [21384259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21384259/).
64. Toiyama Y, Inoue Y, Shimura T, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, et al. Serum Angiopoietin-like Protein 2 Improves Preoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2015; 35(5):2849–56. PMID: [25964566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25964566/).
65. Wang Z, Zheng H, Chen H, Lin X, Chen J, Wang L, et al. Elevated Serum Angiopoietin-like Protein 2 in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Arch Med Res.* 2015; 46(4):257–64. doi: [10.1016/j.arcmed.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.003) PMID: [25999029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25999029/).

66. Wang JY, Xiao HB, Sun ZL, Zhang DS. Angiotensin-like protein 2 may mediate the inflammation in murine mastitis through the activation of interleukin-6 and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *World J Microbiol Biotechnol*. 2015; 31(8):1235–40. doi: [10.1007/s11274-015-1873-7](https://doi.org/10.1007/s11274-015-1873-7) PMID: [26003652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26003652/).
67. Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, Pershagen G, Dahlen SE, Greco D, et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One*. 2012; 7(7):e41361. doi: [10.1371/journal.pone.0041361](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041361) PMID: [22848472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22848472/); PubMed Central PMCID: PMCPMC3405143.

#### 4. DISCUSSION

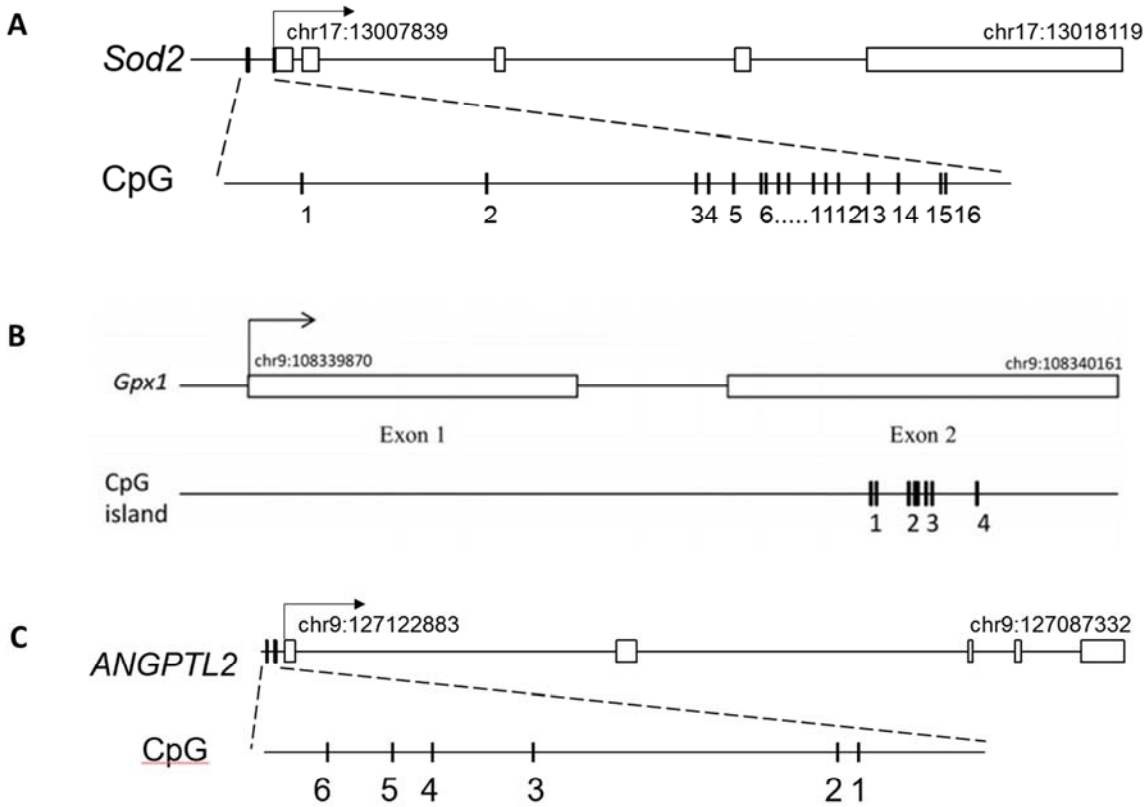
La méthylation de l'ADN est un mécanisme de régulation sensible à l'environnement, souvent impliqué dans les changements de l'expression génique observés en contexte pathologique. D'autre part, l'expression aberrante des gènes dans le contexte du vieillissement et des MCV peut être associée à un changement de méthylation. Les études présentées dans cette thèse avaient comme objectif d'identifier des modifications épigénétiques dans divers contextes physiopathologiques, en gardant en perspective les conséquences physiologiques potentielles associées à des changements dans la méthylation de gènes d'intérêt.

Nous avons d'abord étudié la régulation de l'expression d'enzymes antioxydantes dans le contexte pro-oxydant du vieillissement vasculaire et des MCV, dans un modèle de souris. Plus précisément, la première étude a démontré qu'en réponse à une accumulation du stress oxydant associé avec le vieillissement, les cellules vasculaires stimulent l'expression de leurs défenses antioxydantes, notamment celle de la MnSOD, permettant de préserver la fonction endothéliale. La diminution de la méthylation de *Sod2* au niveau de son promoteur (Figure 18A) se traduit par une augmentation de l'expression de MnSOD et donc un renforcement des défenses antioxydantes. Cette réponse épigénétique adaptatrice des cellules vasculaires au stress oxydant s'accompagne d'un changement de la susceptibilité des mécanismes de vasodilatation de l'endothélium via une redistribution de la contribution des différentes voies de vasodilatation : le stress oxydant cause une perte d'EDHF qui est compensée par l'activation de la voie du NO, ce qui permet de préserver la fonction endothéliale. La diminution du stress oxydant par la supplémentation d'un antioxydant, la catéchine, ou par l'exercice physique chronique prévient l'induction de l'expression de la MnSOD par un changement de méthylation de *Sod2* ou l'activation des changements dans la fonction endothéliale. Cette étude illustre donc la sensibilité des mécanismes épigénétiques à l'environnement rédox.

Dans la deuxième étude dans le contexte de la dyslipidémie sévère, nous avons observé une hyperméthylation au niveau de *Gpx1* (Figure 18B) dans le muscle squelettique de souris, se traduisant par une perte de l'expression de Gpx1. L'exercice physique a augmenté l'expression de

Gpx1 bien qu'aucun changement de méthylation n'ait été détecté, mis à part une hypométhylation transitoire immédiatement après l'effort physique. Cette étude démontre que le contexte pro-oxydant associé à la dyslipidémie sévère est caractérisé par une altération des mécanismes de la défense antioxydante endogène, régulée, du moins en partie, par un mécanisme épigénétique. Cette étude confirme que l'exercice physique est une approche efficace pour renverser les effets associés au contexte pro-oxydant, mais démontre également que les effets de l'exercice sur les changements épigénétiques peuvent être transitoires.

Nous avons également étudié la régulation de l'Angptl2, une protéine circulante pro-inflammatoire, dont le niveau augmente significativement dans le cadre des MCV chez l'humain et avons observé une hypométhylation du gène de l'Angptl2 (Figure 18C) en lien avec la maladie. Ceci suggère qu'un mécanisme épigénétique pourrait expliquer la surproduction d'Angptl2 observée chez les patients souffrant de MCV, favorisant ainsi le contexte pro-inflammatoire caractéristique des MCV. En lien avec l'étude précédente, nous avons observé dans le laboratoire qu'une seule séance d'exercice physique pouvait diminuer transitoirement les niveaux circulants d'Angptl2 chez les patients coronariens (Larouche *et al.* 2015).



**Figure 18.** Localisation des régions ciblées pour analyses de méthylation. Représentation des gènes (A) *Sod2*, (B) *Gpx1* et (C) *ANGPTL2*, ainsi que les régions d'intérêt où se retrouvent les CpG ciblés pour la quantification de la méthylation.

Les observations générées par nos trois études sont résumées dans le Tableau 2. Cette discussion sera présentée sous forme de questions soulevées par les observations provenant de nos études. Les principaux sujets abordés concerneront la régulation épigénétique en lien avec ses répercussions biologiques et fonctionnelles, le messager moléculaire responsable de la réponse épigénétique face aux stimuli environnementaux, la stabilité des changements dans la méthylation de l'ADN et finalement, la régulation épigénétique spécifique de l'*ANGPTL2* en réponse aux signaux provenant de l'environnement. Les limites de nos travaux et finalement quelques perspectives expérimentales pouvant potentiellement répondre aux questions laissées sans réponse seront ensuite abordées.

**Tableau 2.** Changements observés sur la méthylation des gènes ciblés en réponse aux conditions expérimentales dans le cadre de nos études.

Étude	Gène ciblé	Conditions expérimentales	Effet sur la méthylation du gène	Effet biologique
#1	<i>Sod2</i>	Vieillessement	↓	Changement de la contribution relative des mécanismes de vasodilatation, ce qui maintient la fonction endothéliale globale
		Catéchine	↑	Fonction endothéliale normale
		Exercice	↑↑	
#2	<i>Gpx1</i>	Dyslipidémie sévère	↑	↓ Gpx1 et diminution de la défense antioxydante
		Exercice	↓ (transitoire)	↑ Gpx1 et renforcement de la défense antioxydante
#3	<i>ANGPTL2</i>	Vieillessement chez des sujets sains et physiquement actifs	aucun effet	Homéostasie du système inflammatoire
		MCV	↓	↑ de l'expression de l'Angptl2, ce qui favorise l'inflammation

#### 4.1 Quelles sont les conséquences biologiques de la régulation épigénétique par la méthylation de l'ADN ?

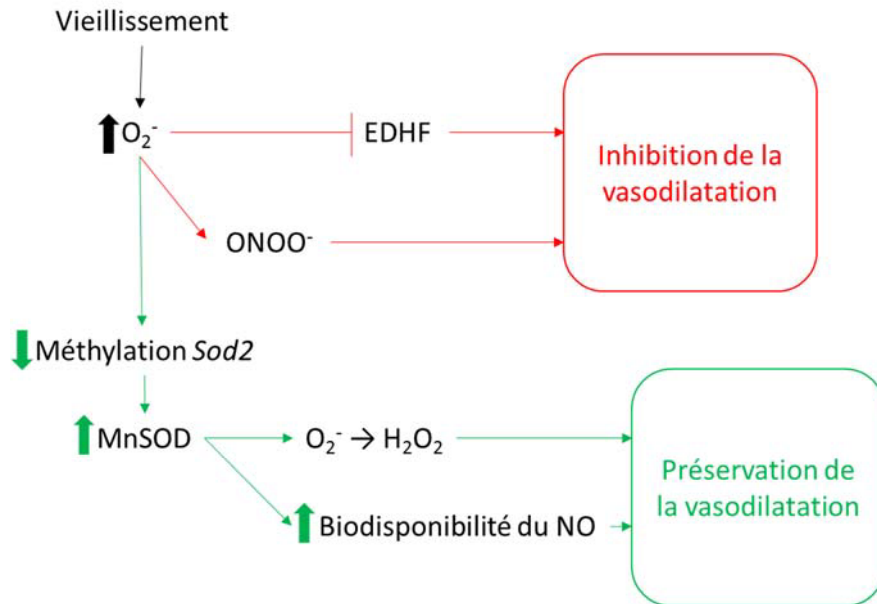
L'établissement d'une relation de cause à effet entre un changement épigénétique et un effet biologique dépend en premier lieu d'un changement dans la régulation du gène ciblé. En effet, la

méthylation de l'ADN cause en premier lieu une augmentation ou une dérégulation de l'expression d'un gène. Dans le cadre de nos études, nous démontrons que la présence de méthylation au niveau de loci spécifiques est associée à une plus faible expression des gènes *Sod2*, *Gpx1* et *ANGPTL2* (Tableau 2). Bien que les modifications dans l'expression d'un gène affectent directement les voies moléculaires dans lesquelles ces gènes sont impliqués, ceci se traduit-il par des changements phénotypiques évidents? Deux de nos études supportent ce concept.

Premièrement, la déméthylation de *Sod2* avec l'âge et la surexpression de MnSOD perturbent la contribution des différentes voies de vasodilatation, même si la fonction endothéliale est globalement préservée, supportant un rôle de MnSOD dans le maintien de la fonction endothéliale. Le mécanisme proposé est qu'avec l'âge, l'équilibre rédox soit rompu, favorisant la production de ROS, principalement le  $O_2^-$ . Au niveau de l'artère fémorale, le mécanisme de vasodilatation dépendant des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF; *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) est très susceptible aux dommages oxydants et devient donc compromis face à cette surproduction de radicaux libres. En réponse à l'accumulation de ROS, l'expression de MnSOD, première ligne de défense contre la production de  $O_2^-$  (voir section 1.1.1.2.1), est stimulée via un mécanisme épigénétique permettant de réduire le surplus de  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ . Sachant que l' $O_2^-$  séquestre et inactive le NO en le transformant en  $ONOO^-$ , cette réponse épigénétique engendrant une augmentation de MnSOD préserve la biodisponibilité du NO en diminuant le stress oxydant (Figure 19). Cette étude suggère donc que l'impact fonctionnel de la déméthylation de *Sod2* soit la préservation de la fonction endothéliale par un renforcement de la défense antioxydante. Le traitement des souris avec de la catéchine confirme que les changements fonctionnels (fonction endothéliale) et moléculaires (déméthylation de *Sod2*) associés au vieillissement sont dépendants des radicaux libres. En effet, l'antioxydant catéchine neutralise et empêche l'accumulation de radicaux libres, prévenant la déméthylation de *Sod2* et la surexpression de MnSOD et donc, prévenant les changements de la fonction endothéliale. L'exercice produirait des effets supérieurs à ceux observés avec la catéchine puisque la méthylation de *Sod2* observée suite à l'exercice est non seulement plus élevée comparativement à la condition contrôle, mais également par rapport au traitement à la catéchine. Ceci suggère que l'exercice procure un meilleur effet antioxydant que la catéchine, ce qui concorde avec une précédente étude où nous avons observé que l'exercice est en général plus efficace que la catéchine pour protéger la fonction



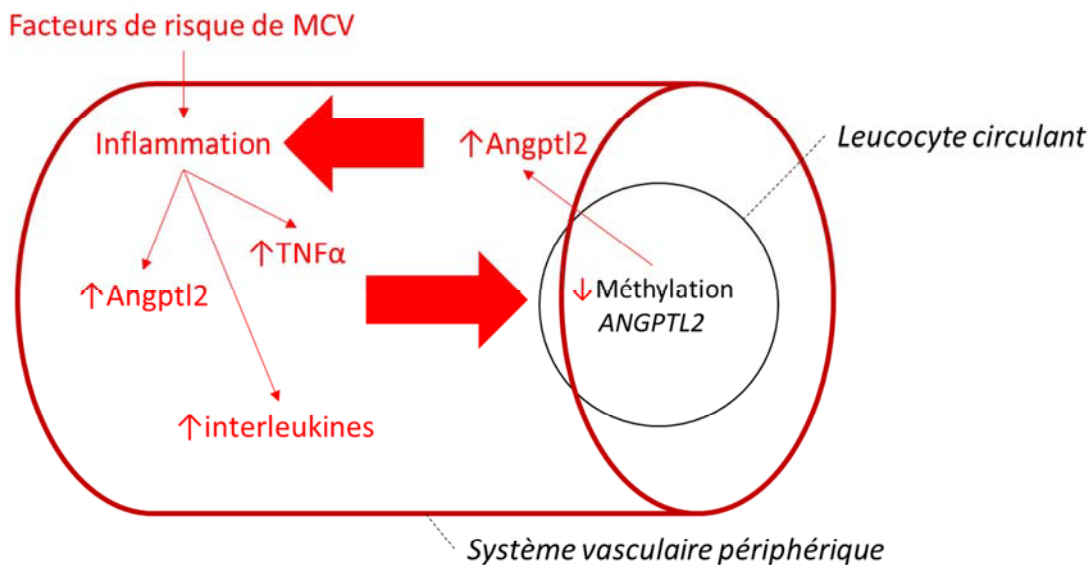
endothéliale avec l'âge (Leblond *et al.* 2013). De plus, le traitement chronique à la catéchine peut induire, paradoxalement, une réponse oxydante à long terme (Leblond *et al.* 2013), voire même une dysfonction endothéliale (Gendron *et al.* 2012), ce qui limite ses effets biologiques bénéfiques.



**Figure 19.** Impact fonctionnel de la déméthylation de *Sod2* sur la fonction endothéliale. L'augmentation de l'expression de MnSOD suite à la déméthylation de son gène permet la préservation de la biodisponibilité du NO et par conséquent, le maintien la fonction endothéliale.

Deuxièmement, la méthylation de l'*ANGPTL2* est négativement corrélée avec le niveau de CRP et donc l'état inflammatoire du patient, suggérant un rôle de l'Angptl2 dans la médiation de la réponse pro-inflammatoire. Une cascade signalétique potentielle serait qu'initialement, l'exposition des sujets à divers facteurs de risque des MCV engendre un état pro-inflammatoire menant à un événement cardiovasculaire qui, dans le cas de notre étude, est un événement coronarien aigu. Cet état pathologique est caractérisé par une production accrue d'une panoplie de médiateurs pro-inflammatoires, pouvant inclure l'Angptl2 (Kadomatsu *et al.* 2014; Thorin-Trescases & Thorin 2014) et autres cytokines (interleukines, TNF- $\alpha$ ) (Savoia & Schiffrin 2006; Viola & Soehnlein 2015). L'exposition des leucocytes circulants à cet environnement inflammatoire induit une déméthylation au niveau du promoteur de l'*ANGPTL2*, se traduisant par une production accrue d'Angptl2 pouvant elle-même stimuler le contexte inflammatoire,

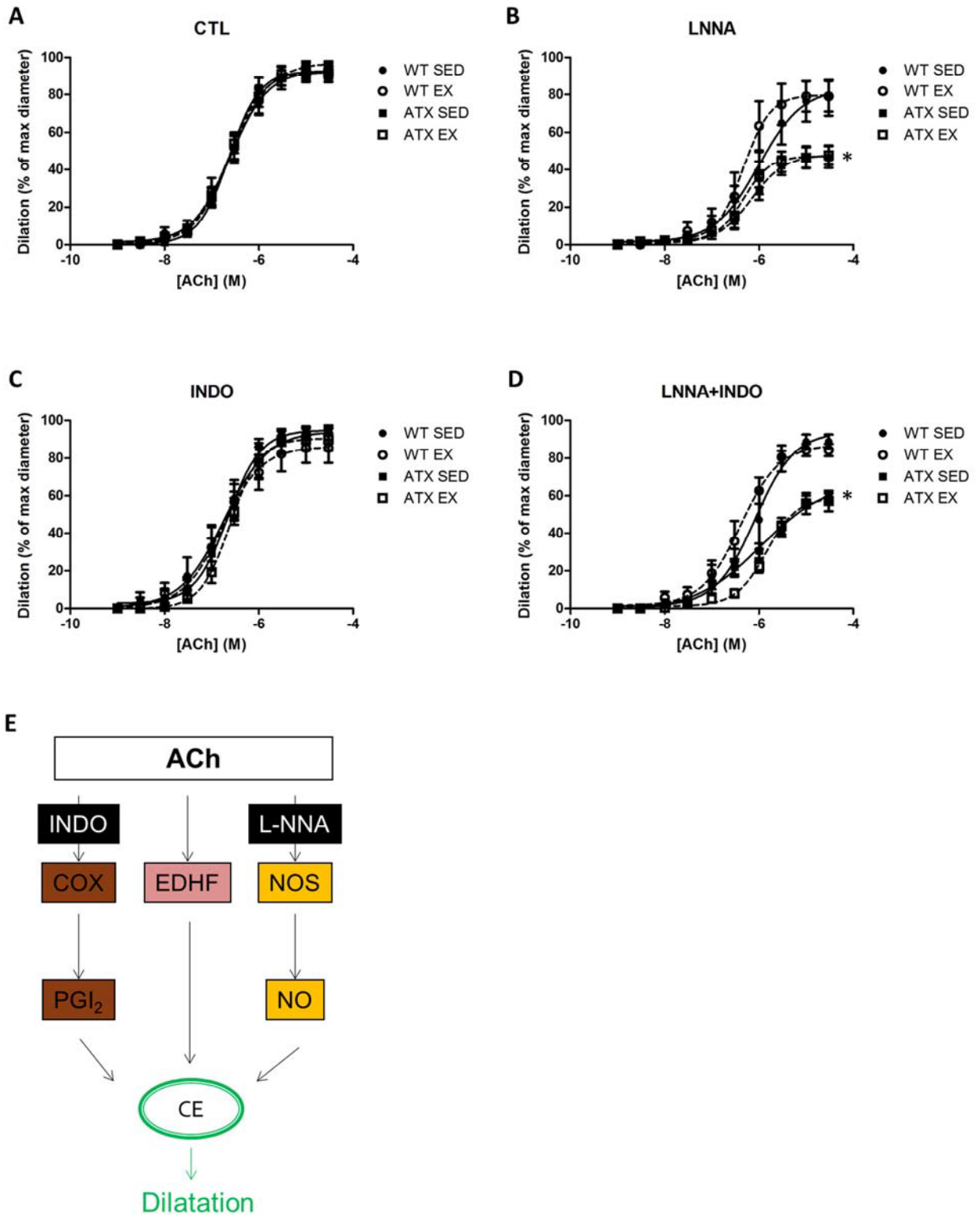
constituant ainsi un cercle vicieux pro-inflammatoire (Figure 20). Cette hypothèse est supportée par nos résultats démontrant que la méthylation de l'*ANGPTL2* corrèle avec le niveau d'inflammation (classiquement mesuré par la concentration de CRP circulante) et par les données de la littérature démontrant que l'expression de l'Angptl2 est stimulée par les médiateurs inflammatoires (Kadomatsu *et al.* 2014; Thorin-Trescases & Thorin 2014). Ainsi, les données de notre étude suggèrent qu'une hypométhylation de l'*ANGPTL2* a comme effet biologique de renforcer un contexte pathologique pro-inflammatoire.



**Figure 20.** Impact de la déméthylation de l'*ANGPTL2* sur l'exacerbation du phénotype inflammatoire.

Cependant contrairement à notre concept qu'un changement épigénétique se traduise par un effet biologique, nous avons observé que l'hyperméthylation de *Gpx1* et la diminution de son expression ne sont pas accompagnées d'une augmentation du stress oxydant dans le muscle lisse de souris dyslipidémiques. De plus, des données non publiées démontrent que les souris dyslipidémiques possèdent une altération de la fonction endothéliale de l'artère fémorale qui n'est pas renversée par l'exercice (Figure 21), malgré une récupération de l'expression de *Gpx1*. En effet, bien que la fonction endothéliale globale de l'artère fémorale soit maintenue chez les souris dyslipidémiques et soit identique à celle observée chez des souris WT (Figure 20A), on observe une diminution de la vasodilatation suite à l'inhibition de la voie dépendante du NO (Figure 20B et Figure 20D),

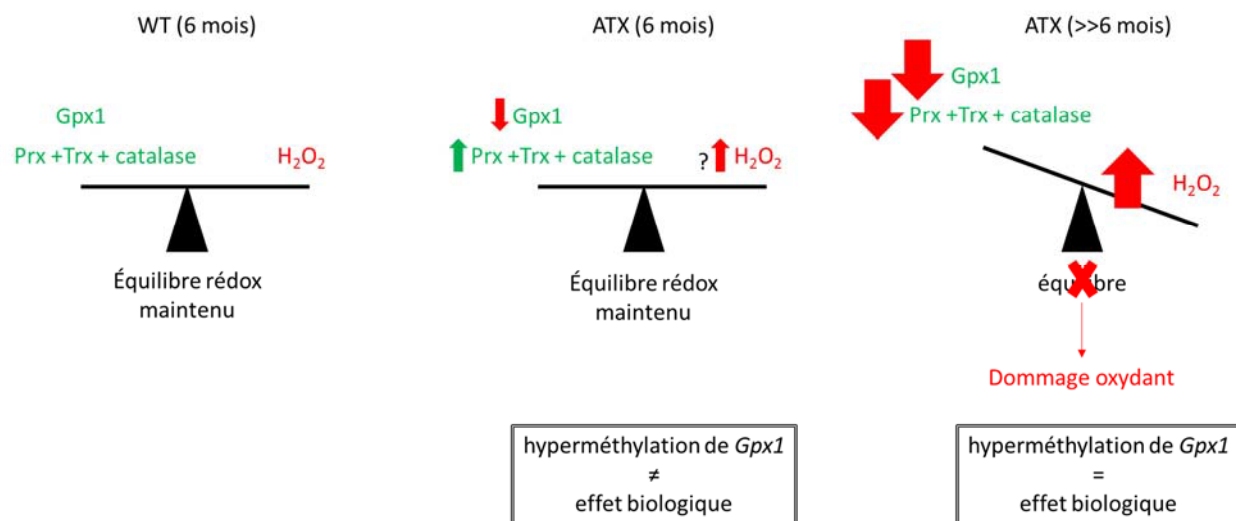
suggérant que chez les souris dyslipidémiques seulement, le NO contribue à la vasodilatation. En revanche, l'indométacine qui inhibe la cascade signalétique des cyclooxygénases est sans effet, ce qui révèle que ce mécanisme ne contribue pas à la réponse vasodilatatrice (Figure 20C). L'isolation de la voie EDHF par l'inhibition simultanée de la voie du NO et de celle des cyclooxygénases (Figure 20E) démontre que les souris dyslipidémiques souffrent d'une déficience dans la voie EDHF, ce qui se traduit par une plus faible réponse vasodilatatrice (Figure 20D). Ces expériences de réactivité vasculaires révèlent que, chez les souris dyslipidémiques ATX, la vasodilatation dépend davantage de la voie du NO, probablement dû à une défaillance dans la voie des EDHF. Il est intéressant de noter que ces altérations ne sont pas renversées par l'exercice physique: malgré une augmentation de l'expression de Gpx1 avec l'exercice physique, les souris dyslipidémiques ne récupèrent pas une fonction endothéliale comparable à celle des souris contrôles. En réponse à la dyslipidémie, on observe donc d'une part, une diminution de l'expression de Gpx1 en lien avec une hyperméthylation de *Gpx1* et redistribution des facteurs relaxants endothéliaux. D'autre part, on observe qu'en réponse à l'exercice physique, les changements dans la régulation épigénétique et dans l'expression de Gpx1 ne sont pas associés à des changements fonctionnels de l'endothélium. Cette étude démontre donc que l'impact fonctionnel d'un changement épigénétique est complexe et varie en fonction des stimuli environnementaux.



**Figure 21.** La fonction endothéliale est altérée chez les souris ATX. Dilatation induite par l'ACh de l'artère fémorale provenant de souris âgées de 6 mois de type sauvage (WT) et sévèrement dyslipidémiques (ATX) sédentaires (SED) ou après 3 mois d'exercice (EX). L'expérience a été effectuée en conditions (A) contrôles, en présence (B) d'un inhibiteur de la voie du NO, le N-nitro-L-arginine (L-NNA; 100  $\mu$ M), (C) d'un inhibiteur de la voie des cyclooxygénases, l'indométacine (INDO; 100  $\mu$ M) ou (D) des deux inhibiteurs. (E) Schéma représentant les 3 mécanismes de vasodilatation activés dans les cellules endothéliales (CE) suite à l'addition d'ACh, ainsi que l'action des deux inhibiteurs : l'INDO inhibe la voie des cyclooxygénases (COX) et empêche la dilatation induite par la prostacycline ( $PGI_2$ ) produite par les COX, alors que le L-NNA inhibe l'activité de la NO synthase (NOS), bloquant la dilatation dépendante du monoxyde d'azote (NO). En présence des deux inhibiteurs, seule la voie des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF; *endothelium-derived hyperpolarizing factors*) reste active. \*:  $p < 0,05$  versus WT; n=4-10.

La relation entre un changement épigénétique et un effet biologique peut être complexe à démontrer: il est important de considérer l'ampleur de la variation épigénétique et par le fait même la contribution relative de celle-ci par rapport à l'effet physiologique global. Dans l'ensemble de nos études, nous ne sommes pas dans une situation extrême où la méthylation d'un gène est présente dans 100% des cellules, abolissant complètement l'expression du gène, tel un interrupteur. Nos études démontrent plutôt un gradient de méthylation, soit une méthylation partielle des cellules, associé vraisemblablement à un gradient d'expression. Ainsi, il est possible que l'impact fonctionnel ne puisse pas être observé si les changements, d'une part par la régulation épigénétique ou d'autre part, par le stress environnemental, ne sont pas assez importants pour perturber l'équilibre du système. Cette hypothèse s'applique à notre étude sur la régulation de Gpx1 et de ses conséquences physiologiques (stress oxydant et fonction endothéliale). D'une part, le phénotype pathologique du muscle squelettique des souris ATX diffère peu du phénotype sain des souris WT concernant l'environnement rédox puisque la mesure du stress oxydant est du même niveau entre les deux lignées. À ce stade précoce du contexte pathologique, il est probable que l'organisme, dans ce cas les cellules du muscle squelettique, soit encore en mesure de compenser pour la hausse de radicaux libres jumelée à la perte d'expression de Gpx1 et ainsi de maintenir l'équilibre rédox. Ainsi, la conséquence biologique attendue d'une hyperméthylation de Gpx1 serait masquée par la compensation des autres mécanismes antioxydants. Ceci est d'autant plus plausible considérant que le  $H_2O_2$  est métabolisé par 3 autres classes d'enzymes en plus de Gpx1,

c'est-à-dire les Prx, les Trx et la catalase (voir section 1.1.1.2). La mise en évidence de changements phénotypiques en lien avec la méthylation de *Gpx1* serait plus facilement réalisable en réponse à des stimuli environnementaux plus importants pouvant causer des changements épigénétiques plus grands. L'utilisation de souris ATX plus vieilles et manifestant des désordres oxydants détectables permettrait de mieux apprécier la contribution de *Gpx1* dans le phénotype du stress oxydant. Cependant dans un tel contexte, les observations phénotypiques seront vraisemblablement issues de la défaillance de plusieurs mécanismes endogènes combinés et non uniquement de *Gpx1* (hypothèse illustrée dans la Figure 22).



**Figure 22.** L'implication partielle de *Gpx1* dans la régulation du stress oxydant. Chez les souris WT de 6 mois, le  $H_2O_2$  est neutralisé par les diverses familles d'enzymes antioxydantes endogènes, soit les Gpx (dont fait partie *Gpx1*), les Prx, les Trx et la catalase, ce qui maintient l'équilibre rédox. À l'état précoce de la maladie, soit chez les souris ATX de 6 mois, on observe une hyperméthylation de *Gpx1* associée à une diminution de son expression. Néanmoins, l'équilibre rédox est toujours conservé grâce à la surexpression des autres enzymes antioxydantes, ce qui peut palier à une éventuelle surproduction de  $H_2O_2$ . Dans ce scénario, un changement dans la régulation épigénétique de *Gpx1* ne peut être associé à des effets biologiques. Dans le contexte hypothétique des souris ATX plus âgées et à un stade plus avancé de la pathologie, une défaillance importante des mécanismes de défense antioxydants dont fait partie *Gpx1*, causerait l'accumulation de  $H_2O_2$ , ce qui se traduirait par un phénotype caractérisé par des dommages oxydants. Ainsi, sous l'influence de stimuli environnementaux plus importants, on observerait des changements épigénétiques associés à un effet biologique.

En résumé, nos observations supportent fortement qu'un mécanisme épigénétique régit bel et bien l'expression des gènes ciblés. Ceci peut ultimement se traduire par des effets fonctionnels, mais l'amplitude de ces derniers dépend à la fois de l'intensité du signal environnemental et de la réponse épigénétique face à ce stimulus. Cependant, bien qu'une relation causale entre un changement de méthylation et une fonction physiologique semble exister, il faut considérer que le phénotype observé découle d'une synergie de plusieurs facteurs, régis par divers mécanismes moléculaires, incluant l'épigénétique dont fait partie la méthylation de l'ADN. Bien que complexe, le concept de la relation entre un changement épigénétique et un effet biologique est un concept démontré dans nos études.

#### **4.2 Quel est le médiateur moléculaire pouvant déclencher une réponse épigénétique suite à une stimulation environnementale?**

Si la régulation de l'expression génique, en réponse au contexte environnemental, se fait par des changements de méthylation, quel est le médiateur moléculaire responsable d'une telle adaptation? En raison des contextes expérimentaux de nos études, nous croyons que les ROS font partie des signaux perçus par la cellule, induisant séquentiellement une modification épigénétique, un changement de l'expression génique et un effet phénotypique. Cette hypothèse est supportée par l'identification des gènes antioxydants régulés par la méthylation de l'ADN ainsi que le contexte environnemental pro-oxydants (vieillesse, dyslipidémie et MCV).

Nous avons en effet détecté des changements de méthylation au niveau de deux gènes d'enzymes antioxydantes, Sod2 et Gpx1, ainsi que pour une protéine pro-inflammatoire et pro-oxydante, Angptl2. Il a été démontré que l'expression de Sod2 et Gpx1 peut être stimulée en présence de ROS et cette réponse adaptative constitue une stimulation la défense antioxydante en réponse au stress oxydant (Ji 2008). L'expression d'Angptl2 semble également stimulée par les ROS. Ceci est supporté par le fait que l'expression d'Angptl2 soit augmentée dans des contextes de ROS élevés (cancers, MCV et maladies métaboliques) (Kadamatsu *et al.* 2014; Thorin-Trescases & Thorin 2014) et suite à l'observation que l'expression d'Angptl2 dans des cellules endothéliales sénescents soit diminuée en présence d'un antioxydant (Farhat *et al.* 2013). Dans des cellules

cancéreuses, l'expression d'Angptl2 est positivement corrélée aux niveaux de ROS (Aoi *et al.* 2011) et l'Angptl2 induit également du stress oxydant (Aoi *et al.* 2014). Dans la première étude, nous avons étudié l'impact du vieillissement qui est associé à une augmentation de la production de ROS. Par la suite, le contexte de la deuxième étude était les MCV, pouvant également être définies par un environnement pro-oxydant. De plus, nous avons étudié les effets de l'exercice, qui est associé à une production aiguë de ROS, et à un effet antioxydant à long terme. Finalement, la troisième étude a observé les effets de l'âge et des MCV, tous deux associés à des niveaux élevés de ROS. Par ailleurs, si les ROS stimulent des changements épigénétiques, l'inhibition de la signalisation des ROS devrait prévenir ces changements. C'est ce qui a été démontré dans la première étude, où la supplémentation avec un antioxydant, ou l'exposition à l'exercice physique, a prévenu les changements observés avec l'âge. En résumé, puisque nos travaux ont été effectués dans des conditions modulant la production de ROS et que l'expression des gènes étudiés est sensible aux ROS, il est logique de suggérer que la signalisation des ROS est à la base de ces observations épigénétiques.

Les mécanismes moléculaires et cascades signalétiques activés par les radicaux libres conduisant à des changements de méthylation de l'ADN sont majoritairement inconnus. Toutefois, certains effets directs des ROS sur la méthylation de l'ADN ont été décrits dans la littérature (Wu & Ni 2015). En effet, les ROS peuvent induire une hypométhylation de l'ADN par deux mécanismes : par l'oxydation des résidus guanine de l'ADN, ce qui inhibe la méthylation des résidus cytosine avoisinants (Weitzman *et al.* 1994; Turk *et al.* 1995) et par l'oxydation directe de 5mC, menant à la conversion en 5hmC et subséquentement à l'initiation du processus de déméthylation (Valinluck & Sowers 2007). La méthylation de l'ADN peut également être directement induite par les ROS en lien avec l'activité des DNMT : les ROS induisent l'expression des enzymes DNMT et favorisent leur recrutement à l'ADN (Campos *et al.* 2007; Fan & Luo 2010; Afanas'ev 2014). Bien qu'ils soient potentiellement pertinents à nos études, ces mécanismes moléculaires semblent non-spécifiques et aléatoires, offrant peu d'explications en lien avec le ciblage spécifique des gènes en réponse à un stress oxydant.

Il est intéressant de noter que les changements dans la défense antioxydante endogène varient en fonction de l'enzyme étudiée : les souris dyslipidémiques surexpriment MnSOD alors que



l'expression de Gpx1 est inhibée. La surexpression de MnSOD peut être interprétée comme un mécanisme de défense visant à compenser pour l'accumulation de ROS, particulièrement l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dans le contexte pathologique de la dyslipidémie sévère. Un résultat similaire a été observé dans l'étude #1 où nous rapportons que l'expression de MnSOD serait favorisée avec le vieillissement. Cependant, bien que la surexpression de MnSOD permette de métaboliser l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ceci se fait aux dépens de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui augmente. En plus de cette surproduction, la voie de détoxification du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la Gpx1 est également ralentie en contexte de dyslipidémie par une baisse de l'expression de Gpx1. L'effet net est donc une accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'espèces radicales dérivées du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le muscle squelettique, ce qui peut entraîner des effets dommageables incluant l'inflammation et la dégradation protéique contribuant au dysfonctionnement de l'organe et de son réseau vasculaire (Supinski & Callahan 2007). L'hypothèse voulant que la nature des ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup> versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puisse réguler chaque enzyme antioxydante de manière différente pourrait expliquer pourquoi l'expression de la MnSOD et de la Gpx1 varie de manière opposée et ce, dans un même contexte pathologique.

Les radicaux libres sont donc fort probablement des médiateurs majeurs de la réponse épigénétique face aux stimuli environnementaux tels un débalancement de l'équilibre rédox.

#### **4.3 Les modifications épigénétiques en réponse aux stimuli environnementaux sont-elles stables ?**

En comparant les résultats de nos études, on observe que la réponse épigénétique à l'exercice n'est pas reproductible d'un modèle à l'autre : alors que l'exercice renverse l'hypométhylation de *Sod2* observée chez des souris sédentaires âgées de 12 mois, l'exercice n'a pas d'effet stable à long terme sur la méthylation de *Gpx1* chez des souris athérosclérotiques. Dans la première étude, les effets sont intuitifs et concordent avec notre hypothèse : les effets antioxydants de l'exercice chronique permettent de renverser les effets du stress oxydant liés à l'âge, en accord avec l'hyperméthylation de *Sod2* suite à l'exercice. Cependant, dans notre deuxième étude, bien que l'expression génique de Gpx1 soit augmentée suite à l'exercice physique, ceci ne s'accompagne pas de changements de méthylation à long terme, alors que la dyslipidémie sévère induit une

hyperméthylation de *Gpx1* et une diminution de son expression, toutes deux détectables à long terme. Ceci suggère une sensibilité accrue ou une réponse plus importante de la méthylation de *Gpx1* face à la dyslipidémie comparativement à l'exercice. Les travaux de Barrès et al. (Barres *et al.* 2012) ont démontré, grâce à des biopsies de muscle squelettique humain suite à une séance d'exercice et à des expériences chez le rat de contractions *ex vivo* du muscle squelettique isolé, que les changements épigénétiques peuvent être transitoires. En s'inspirant de ces travaux, nous avons mesuré la méthylation de *Gpx1* tout de suite après l'effort physique et non plusieurs heures après (les souris étant actives la nuit et non le jour) et avons constaté que l'exercice physique induit une réponse épigénétique temporaire dans notre modèle. Cette réponse transitoire pourrait être induite par la production aiguë et transitoire de ROS provenant des mitochondries du muscle squelettique suite à l'augmentation de la demande métabolique accompagnant l'effort physique. Cependant, comment peut-on expliquer l'absence d'effet à long terme sur la méthylation de *Gpx1* chez des souris dyslipidémiques à l'opposé de (1) l'hyperméthylation stable de *Sod2* suite à l'exercice chez des souris âgées et (2) l'hyperméthylation soutenue et non-transitoire de *Gpx1* en lien avec la dyslipidémie?

L'absence de changements épigénétiques de *Gpx1* chez les souris dyslipidémiques soumises à l'exercice à long terme pourrait être expliquée par l'intensité, la chronologie et la durée de la stimulation. Dans la première étude, les souris WT étaient exposées à l'exercice pour une durée de 9 mois et ce, dès le sevrage. En revanche, dans la deuxième étude, les souris athérosclérotiques n'étaient exposées à l'exercice que pour une période de 3 mois à partir de l'âge de 3 mois. Il y a donc une différence de 6 mois sur la durée ainsi qu'une différence de l'âge des souris lors de l'exposition à l'exercice. Il semble que 9 mois d'exercice soient suffisants pour induire des changements épigénétiques à long terme et que plus l'exercice est initié tôt, plus l'impact est important. Un raisonnement similaire peut être appliqué pour expliquer le contraste observé dans la deuxième étude sur la réponse épigénétique à l'exercice par rapport à la dyslipidémie sévère. En effet, chez la souris ATX malade sédentaire, l'exposition à la dyslipidémie sévère se fait de manière chronique, de la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois, alors que l'exercice représente une stimulation intermittente de courte durée et ce, pour une durée totale de 3 mois. Ainsi, le contexte environnemental que représente la dyslipidémie sévère, lorsque comparé à l'exercice, est initié plus tôt, pour une plus longue durée et représente une stimulation continue et permanente. Pour

ces raisons, la dyslipidémie exerce un stress environnemental plus important que l'exercice, ce qui engendre des changements épigénétiques plus importants et permanents.

Les changements épigénétiques en réponse à l'environnement peuvent donc être à la fois stables et temporaires. Le degré de stabilité, notamment par rapport à la méthylation de *Gpx1*, dépend de l'importance et l'intensité des stimuli environnementaux: plus ces derniers sont importants, plus les changements épigénétiques seront maintenus, du moins pour les gènes que nous avons étudiés. Ceci dit, existe-t-il d'autres paramètres que l'intensité ou la durée du stimulus environnemental pouvant modifier la réponse épigénétique à l'exercice ?

Puisque l'étude des effets de l'exercice sur un modèle animal peut se faire par divers modèles expérimentaux, il est important de considérer le type d'exercice auquel les souris sont exposées. Les approches expérimentales les plus communes sont l'utilisation d'un tapis roulant ou d'une roue d'exercice. Bien que ces deux méthodes aboutissent à un effort physique sous forme de course, un facteur non-négligeable différencie ces deux approches : le stress. En effet, des études ont démontré que lorsque l'animal est forcé à courir sur un tapis roulant, le stress engendré peut générer des résultats différents, voire opposés, comparativement aux données obtenues chez un animal exposé au mode d'exercice volontaire par l'entremise d'une roue d'exercice. En étudiant les effets de l'exercice pour le traitement d'un modèle murin de colite, une maladie inflammatoire du colon, une équipe de chercheurs a formulé l'hypothèse que l'exercice, tant via un tapis roulant que via une roue d'exercice, améliorerait les symptômes de la maladie et réduirait l'inflammation dans le colon. Contrairement à leurs prédictions, l'exercice forcé a exacerbé les symptômes de la maladie en plus d'augmenter l'expression de marqueurs inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$  et IL-17) dans le colon, en plus d'être associé à un taux de mortalité plus élevé (Cook *et al.* 2013). À l'opposé, l'exercice volontaire a contribué à la réduction de l'inflammation et a atténué la maladie (Cook *et al.* 2013). Cette dichotomie pourrait être en partie due à des altérations dans la flore intestinale, puisque l'exercice volontaire peut, par exemple, réduire le nombre de bactéries liées à la réponse immunitaire et aux maladies intestinales (Allen *et al.* 2015). Les auteurs soutiennent que l'utilisation d'un tapis roulant peut produire des effets bénéfiques dans plusieurs autres contextes pathologiques inflammatoires tels que rapporté par plusieurs études, incluant les leurs : ils proposent que la nature du tissu étudié puisse être à l'origine de ces observations, puisque le

stress psychologique a notamment des effets néfastes sur les intestins (Reber *et al.* 2006; O'Malley *et al.* 2011). Cette dichotomie entre l'exercice forcé et l'exercice volontaire a également été observée ailleurs, tel que dans le cerveau (Leasure & Jones 2008; Liu *et al.* 2009; Yuede *et al.* 2009) et le myocarde (Melo *et al.* 2009). Ces études démontrent que les effets engendrés par l'exercice peuvent différer en fonction de la nature de l'exercice et la présence ou non de stress. Bien qu'aucune étude ne se soit penchée sur la comparaison des effets sur la méthylation de l'ADN engendrés par l'exercice physique volontaire *versus* l'exercice physique forcé, il est évident qu'il existe des différences dans les voies moléculaires activées en fonction de la nature de l'exercice physique. Dans un cadre épigénétique, une différence dans l'approche expérimentale de l'étude des effets de l'exercice physique induira certainement des variations dans la méthylation des gènes : il serait par exemple possible de détecter des changements épigénétiques en réponse à un exercice forcé, changements qui seraient absents en réponse à de l'exercice volontaire.

Ainsi, une attention particulière est requise dans le choix de l'approche expérimentale pour l'étude de la méthylation avec les modèles animaux : des variations subtiles dans la durée et l'intensité de la stimulation par le contexte environnemental peuvent induire des effets différentiels sur l'ADN, ces effets pouvant même être transitoires.

#### **4.4 Quels sont les effets des stimuli environnementaux sur la régulation épigénétique de l'ANGPTL2?**

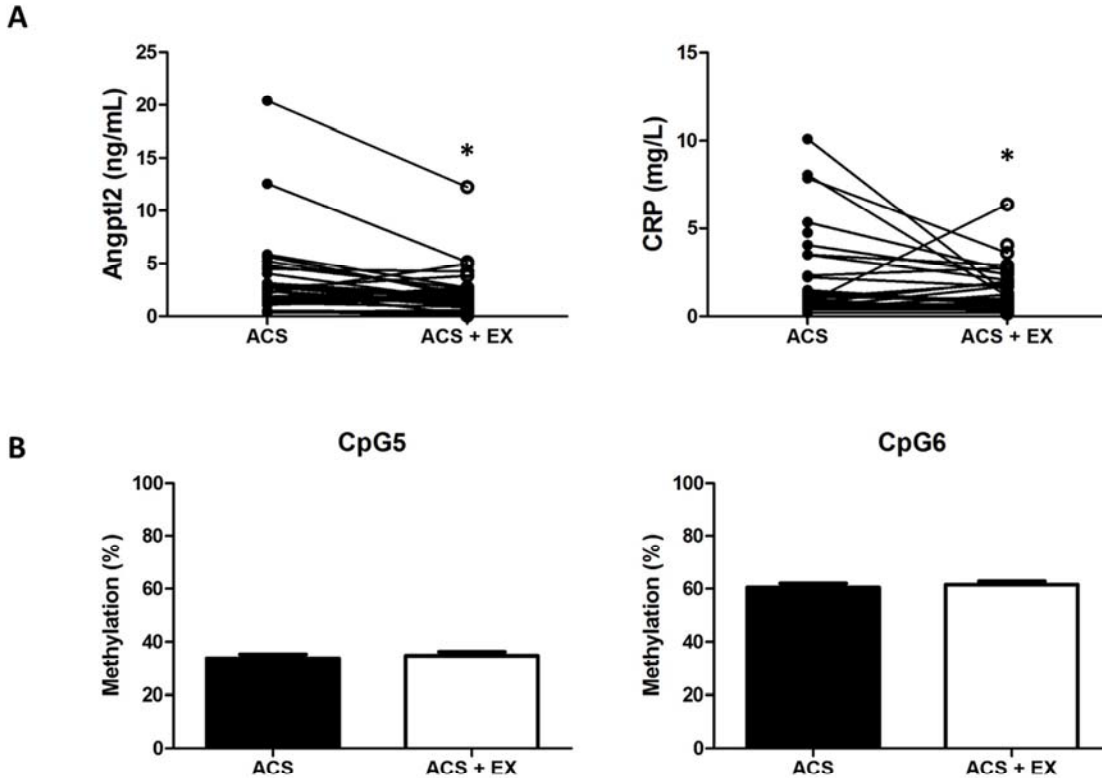
Nous avons étudié la régulation épigénétique de l'ANGPTL2 en fonction de l'âge, en comparant des sujets jeunes à des sujets âgés en bonne santé, et en fonction de la maladie, en comparant des patients atteints de MCV à des sujets sains du même âge. Premièrement, l'absence de variation dans la méthylation de l'ANGPTL2 avec l'âge est à première vue surprenante, puisque nous avons observé une déméthylation de *Sod2* avec l'âge chez la souris (étude #1). Cependant, il est important de noter que le groupe de participants âgés et en santé est composé de sujets physiquement actifs et dont les concentrations circulantes d'Angptl2 et du marqueur inflammatoire CRP sont similaires à celles mesurées chez les sujets jeunes et en santé (Larouche *et al.* 2015). Ceci suggère que l'environnement inflammatoire est similaire entre les sujets en santé jeunes et âgés et que par conséquent, le niveau de stress oxydant est inchangé. L'absence de variation dans la méthylation

de l'*ANGPTL2* avec l'âge respecte donc notre énoncé voulant que la méthylation du gène *ANGPTL2* soit dépendante des ROS et du contexte inflammatoire et rédox. Comparés aux sujets âgés sains, chez les patients coronariens exposés à des facteurs de risque cardiovasculaires, on observe une augmentation des taux circulants d'Angptl2 et de CRP, qui s'accompagne d'une diminution de la méthylation du gène *ANGPTL2*, au niveau de deux sites distincts, que nous avons nommés CpG5 et CpG6. Cette observation est également en accord avec notre hypothèse voulant que la régulation épigénétique de l'*ANGPTL2* soit sensible à l'état inflammatoire, incluant la signalisation des ROS qui lui est associée. Ainsi, la mesure de la méthylation de l'*ANGPTL2* à certains sites spécifiques permettrait d'évaluer le contexte inflammatoire et pourrait représenter un biomarqueur potentiel de la gravité de l'état pathologique d'un patient coronarien de manière proportionnelle au pourcentage de méthylation. De plus, la déméthylation de l'*ANGPTL2* pourrait représenter un mécanisme moléculaire par lequel l'expression de l'Angptl2 serait activée dans les leucocytes circulants, favorisant en retour leur transformation en macrophages. En effet, bien que l'expression d'Angptl2 est indétectable dans les leucocytes circulants (Farhat *et al.* 2013), les macrophages expriment et sécrètent l'Angptl2 (Tazume *et al.* 2012). De plus, une forte concentration d'Angptl2 est détectée au niveau des plaques athéromateuses riches en macrophages (Farhat *et al.* 2013). Ainsi, la conséquence physiologique de la déméthylation de l'*ANGPTL2* pourrait se traduire par la production d'Angptl2 par les macrophages au niveau des lésions athéromateuses, ce qui favoriserait l'inflammation vasculaire et exacerberait la progression de la maladie coronarienne.

Ayant démontré que l'hypométhylation de l'*ANGPTL2* est uniquement observée chez les patients coronariens en présence d'un changement dans l'état inflammatoire et d'un déséquilibre rédox, nous avons également testé les effets d'une intervention anti-inflammatoire et antioxydante, soit l'exercice physique chronique, sur la régulation épigénétique de l'*ANGPTL2* chez ces mêmes patients coronariens (données non publiées). Selon nos données démontrant des changements épigénétiques en réponse à l'exercice, notre hypothèse était qu'un programme d'exercice chronique devrait s'accompagner d'un renversement de l'hypométhylation de l'*ANGPTL2*. Cette hypothèse est en accord avec l'observation d'une diminution transitoire de la concentration circulante d'Angptl2 chez des patients coronariens en réponse à un effort physique aigu (Larouche *et al.* 2015). Notons que nous n'avons considéré l'effet de l'exercice sur la méthylation de

*ANGPTL2* que dans le groupe de patients coronariens puisque les sujets en santé, jeunes ou âgés n'expriment que très faiblement l'Angptl2 (Larouche *et al.* 2015). De plus, chez les sujets en santé, une seule séance d'exercice physique n'influence ni les taux circulants d'Angptl2 (Larouche *et al.* 2015), ni la méthylation de l'*ANGPTL2* (résultats non publiés). Ceci suggère que dans un environnement sain, l'exercice n'a pas d'effet sur la régulation génique de l'Angptl2, du moins en ce qui concerne la méthylation de son gène à long terme.

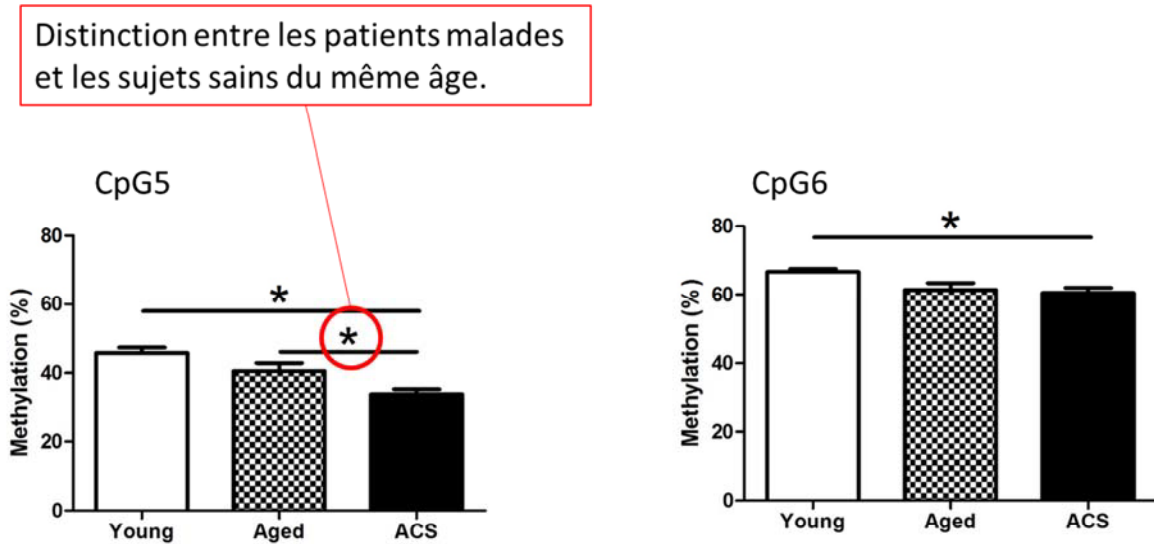
Chez des patients coronariens, un programme d'entraînement supervisé et contrôlé d'une durée de 3 mois a permis de réduire les taux circulants d'Angptl2 et de CRP (Figure 23A), reflétant donc un contexte inflammatoire et oxydant atténué. Cependant, contrairement à ce qui était attendu, l'exercice n'a pas eu d'effet sur la méthylation de l'*ANGPTL2* au niveau des CpG5 et CpG6 (Figure 23B). Il est possible que les changements de méthylation n'aient été que transitoires, ou que le programme d'entraînement de 3 mois, bien qu'ayant généré des effets bénéfiques physiologiques (amélioration du profil inflammatoire et de la capacité pulmonaire), n'est peut-être pas suffisant pour induire des changements épigénétiques à long terme au niveau des CpG étudiés. De plus, il est possible que le temps écoulé entre l'effort physique, la prise de sang et l'extraction de l'ADN soit trop long pour permettre la détection de modifications de méthylation sur ces CpG.



**Figure 23.** L'effet de l'exercice sur le profil inflammatoire et la méthylation de l'*ANGPTL2* chez des patients coronariens. (A) La concentration circulante d'Angptl2 et de CRP a été mesurée chez des patients coronariens avant (ACS) et après (ACS + EX) un programme d'entraînement physique; on observe une diminution des deux marqueurs inflammatoires suite à l'exercice. (B) Pourcentage de méthylation pour les sites CpG5 et CpG6 chez ces patients; aucune différence de méthylation suite au programme d'exercice chronique n'a été observée. \*:  $p < 0,05$  versus ACS ;  $n=21$ .

Les résultats de méthylation observés au niveau des sites CpG5 et CpG6 suggèrent également que la sensibilité aux stimuli environnementaux puisse varier d'un site de méthylation à l'autre. En effet, nous avons conclu que CpG5 est plus sensible que CpG6 à l'environnement inflammatoire, puisqu'il était possible de détecter une différence de méthylation entre le groupe malade et le groupe en santé du même âge seulement au niveau de CpG5 (Figure 24). Il serait donc possible de spéculer qu'un site potentiel de méthylation, différent de CpG5 et CpG6, puisse être sensible à l'exercice. Une approche expérimentale permettant d'interroger tous les sites CpG associés au gène *ANGPTL2* permettrait de confirmer ou de contredire cette possibilité. Nos travaux sur

l'Angptl2 représente la première démonstration de la régulation de l'*ANGPTL2* par la méthylation dans un cadre de MCV.



**Figure 24.** Méthylation du gène *ANGPTL2* au niveau des sites CpG5 et CpG6. Pourcentage de méthylation pour les sites CpG5 et CpG6 chez des sujets sains jeunes (Young) et âgés (Aged) ainsi que des patients coronariens (ACS). La méthylation au niveau de ces deux sites permet de distinguer les deux groupes aux extrémités (jeunes en santé *versus* patients coronariens), alors que seul CpG5 permet de distinguer les deux groupes du même âge, l'un en santé (Aged) et l'autre malade (ACS). \*:  $p < 0,05$ ;  $n=12-21$ .

En résumé, l'ensemble de nos travaux a permis d'identifier des sites de méthylation avec un potentiel régulateur, dont le taux de méthylation varie avec l'âge, la maladie (dyslipidémie et MCV) et l'exercice physique. Les effets de l'âge et de la maladie semblent induire des effets épigénétiques plus robustes et permanents comparativement aux changements transitoires induits par l'exercice physique. Nous avons également établi un lien entre la variation de la méthylation des CpG avec un changement de l'activité transcriptionnelle du gène ciblé. La modulation ainsi décrite de médiateurs antioxydants (Sod2 et Gpx1) et inflammatoires (Angptl2) peut induire des effets biologiques propres au vieillissement et aux MCV. Nos études contribuent donc à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la régulation et de la dérégulation des voies signalétiques en réponse aux stimuli environnementaux.



## 5. LIMITES DES ÉTUDES

Dans le cadre de nos trois études, la quantification de la méthylation de l'ADN a été effectuée suite à l'extraction de l'ADN de trois tissus différents: nous avons isolé l'ADN à partir de l'artère fémorale, du muscle squelettique et des leucocytes circulants. Cependant, les tissus étudiés sont composés d'une multitude de types cellulaires différenciés: l'artère fémorale est constituée d'un mélange de cellules endothéliales, de VSCM et des fibroblastes. Le muscle gastrocnémien et soléaire contiennent majoritairement des cellules musculaires squelettiques et également des cellules vasculaires composant les capillaires sanguins irrigant le muscle. Les leucocytes circulants sont composés d'une grande variété de cellules immunitaires telles que les neutrophiles, éosinophiles, basophiles, lymphocytes et monocytes. Ainsi, bien que les résultats obtenus soient spécifiques des tissus étudiés, ils ne tiennent pas compte des sous-populations cellulaires. Ceci représente une limite, puisque la régulation épigénétique pour un même gène peut varier d'un type cellulaire à un autre, la méthylation de l'ADN étant un mécanisme de régulation spécifique au type cellulaire. En effet, le profil de méthylation des gènes exprimés dans les cellules endothéliales est différent comparativement à des cellules où ces gènes ne sont pas exprimés (Shirodkar *et al.* 2013): c'est le cas pour le gène *NOS3* codant pour la eNOS qui est exprimée dans les cellules endothéliales, dont la région promotrice est hypométhylée dans les cellules endothéliales vasculaires alors qu'elle est hyperméthylée dans des VSMC qui n'expriment pas la eNOS (Chan *et al.* 2004). Une différence de régulation épigénétique a également été observée dans nos études: dans le cas de *Sod2* par exemple, bien que sa méthylation soit détectable à la fois dans l'artère fémorale dans la première étude et dans le muscle squelettique dans la deuxième étude, des changements de méthylation n'ont été détectés que dans l'artère fémorale. Il faut cependant préciser que les conditions expérimentales n'étaient pas les mêmes entre les deux études: *Sod2* est hypométhylé avec l'âge dans l'artère fémorale alors que la méthylation de ce gène ne varie pas dans le muscle squelettique, ni avec la dyslipidémie, ni avec l'exercice. Une autre limite provenant de l'hétérogénéité des types cellulaires est que même étant à l'intérieur d'un même tissu, les différents types cellulaires peuvent être exposés à différents stimuli et conséquemment manifester une réponse épigénétique différente. Ceci est particulièrement vrai dans le cadre de la deuxième étude: l'échantillon de muscle extrait contient un mélange de cellules musculaires squelettiques et de cellules vasculaires. Les cellules musculaires sont principalement exposées à la production de

radicaux libres provenant de l'abondance de mitochondries, particulièrement suite à une hausse de la demande métabolique déclenchée durant l'exercice physique. Parallèlement, les cellules vasculaires et particulièrement les cellules endothéliales sont quant à elles en contact avec la circulation sanguine et exposées, d'une part, à une panoplie de facteurs circulants impliqués dans la réponse inflammatoire et la régulation de l'homéostasie vasculaire dont l'équilibre est perturbé avec la dyslipidémie sévère et d'autre part, des stimuli physiques causés par le flux sanguin tels que les contraintes de cisaillement. Le stress environnemental se manifeste par différents messagers moléculaires pouvant agir de manière compartimentée et donc, la réponse épigénétique peut varier en fonction du type cellulaire étudié. De plus, à l'intérieur d'un même type cellulaire, une fraction des cellules pourrait inclure des cellules sénescents ou apoptotiques, diversifiant encore davantage le profil épigénétique. L'hétérogénéité des types cellulaires à l'intérieur d'un même tissu fait donc en sorte que la réponse épigénétique quantifiée face au contexte environnemental représente la moyenne des changements de méthylation provenant de l'ensemble des cellules, tous types cellulaires confondus. Une approche de quantification de l'ADN à partir d'une seule cellule pourrait résoudre ce problème (Kantlehner *et al.* 2011). Pour l'étude de la méthylation de l'ADN extrait à partir du sang, il serait pertinent d'ajuster le signal épigénétique global avec les variations de sous-populations de cellules leucocytaires présentes, à l'aide de modèles bio-informatiques (Zhong *et al.* 2016), normalisant ainsi le signal épigénétique global par rapport à la composition des leukocytes. Conséquemment, l'étude des mécanismes épigénétiques dans les cellules en culture permet de mettre en évidence des voies signalétiques potentielles, mais pas forcément réelles compte tenu du stress que représente la mise en culture des cellules.

L'approche expérimentale pour la quantification de la méthylation de l'ADN utilisée dans nos études nécessite une conversion de l'ADN au bisulfite (Ehrich *et al.* 2005). Brièvement, cette réaction chimique déamine les cytosines non-méthylées de l'ADN, laissant intact les cytosines méthylées, générant des résidus uraciles eux-mêmes remplacés par des résidus thymines lors de l'amplification du brin d'ADN. Cependant, toute approche d'analyse dépendante de la conversion de l'ADN au bisulfite pour différencier les cytosines méthylées des cytosines non-méthylées ne permet pas de discerner les groupements hydroxyméthyles (Nestor *et al.* 2010). Bien que la fonction des groupements 5hmC ne soit pas bien caractérisée, le 5hmC représente néanmoins une étape dans la déméthylation des 5mC et des différences fonctionnelles importantes pourraient

exister entre les 5mC et des 5hmC. Notre approche expérimentale ne permet pas de distinguer ces deux groupements et la quantification de la méthylation de l'ADN est en réalité la somme des 5mC et des 5hmC. Il est tout de même important de noter que la réponse cumulative serait majoritairement dépendante des 5mC puisque l'abondance des 5hmC est relativement limitée comparativement aux 5mC, représentant au plus 30% des 5mC dans le cerveau de la souris adulte (Lister *et al.* 2013) et peut même être indétectable dans divers types cellulaires humains (Nestor *et al.* 2012). Néanmoins, de nouvelles approches expérimentales permettant la quantification spécifique des 5hmC ont récemment été développées (Plongthongkum *et al.* 2014).

L'essai *in vitro* de méthylation a permis d'attribuer des conséquences fonctionnelles aux modifications épigénétiques observées, c'est-à-dire de prédire une diminution d'expression en lien avec une hyperméthylation de l'ADN. Cependant, une limite majeure de cette technique réside dans la séquence insérée dans le plasmide. En effet, la séquence insérée correspondant à la région d'intérêt du gène peut contenir plusieurs sites CpG avoisinant le site d'intérêt. Par conséquent, l'effet de la méthylation sur l'activité transcriptionnelle est le produit de la méthylation de plusieurs CpG et non uniquement du CpG ciblé. Dans l'étude 3, il a été possible de générer une séquence assez courte pour ne contenir que le CpG d'intérêt. Cette limitation s'applique surtout aux études 1 et 2 puisqu'il n'a pas été possible de générer une séquence assez courte pour simultanément isoler le CpG désiré en préservant une activité transcriptionnelle.

## 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthylation de l'ADN est un mécanisme régulateur de l'expression génique sensible au contexte environnemental et son implication dans le développement de diverses maladies, incluant les MCV est indéniable. Dans un contexte pathologique, une méthylation aberrante de certains gènes induit un débalancement de l'homéostasie dépendante de ces gènes qui se traduit par l'aggravation de la maladie. Dans le contexte des MCV, un déséquilibre pro-inflammatoire et pro-oxydant est favorisé par une production exagérée de cytokines pro-inflammatoires et de ROS en lien avec des modifications de l'ADN au niveau des gènes médiateurs de l'inflammation et de la régulation pro- et antioxydante. Il est important d'identifier les gènes dérégulés en lien avec ce mécanisme épigénétique.

Nous avons identifié pour la première fois des régions régulatrices via la méthylation de l'ADN dans les gènes impliqués dans la réponse antioxydante *Sod2*, dans le cadre du vieillissement, et *Gpx1*, en lien avec l'athérosclérose et l'exercice. Ces travaux ont confirmé l'implication d'une modification épigénétique, la méthylation de l'ADN, dans le déséquilibre pro-oxydant du vieillissement et de l'athérosclérose ainsi que dans la réponse antioxydante de l'exercice. Plus précisément, la fonction endothéliale, sensible au stress oxydant généré avec l'âge, est préservée par l'induction de la MnSOD endogène impliquant un mécanisme de déméthylation de *Sod2*. Dans le muscle squelettique, l'expression de *Gpx1* est diminuée en lien avec une hyperméthylation de *Gpx1*, en contexte de dyslipidémie sévère et ce, en absence de dysfonction endothéliale globale et d'accumulation de stress oxydant. Nous avons également révélé un mécanisme potentiel de régulation de l'Angptl2 dépendant de la méthylation au niveau de son gène *ANGPTL2* et ce, pour la première fois en lien avec les MCV. Cette étude contribue à la compréhension de la régulation de l'Angptl2 et de son implication dans les MCV en plus de proposer la mesure de la méthylation de l'*ANGPTL2* comme biomarqueur de l'état inflammatoire chez des patients souffrant du syndrome coronarien aigu. Cette approche apporte deux principaux avantages comparativement à la mesure de la concentration circulante de la protéine Angptl2 puisque premièrement, la quantification de l'Angptl2 circulante ne peut tenir compte des niveaux intracellulaires de la protéine et deuxièmement, des mécanismes de régulation post-traductionnels pourraient masquer l'expression totale de la protéine. Ces arguments sont à prendre en considération puisqu'il a été

démontré que l'Angptl2 pouvait agir au niveau intracellulaire, notamment en participant au recyclage du récepteur AT1 se liant au domaine cytosolique du récepteur AT1 (Guo *et al.* 2003). Il est également important de considérer le potentiel trafic intracellulaire de l'Angptl2 se traduisant par exemple par son stockage dans des vésicules de sécrétion ou sa dégradation par des lysosomes, mécanismes généralement régis par des modifications post-traductionnelles. La mesure des changements de méthylation de l'*ANGPTL2* semble donc plus précise que celle de la protéine circulante.

Un des aspects importants à élucider dans l'étude de la régulation épigénétique dépendante des facteurs environnementaux est la signalisation moléculaire impliquée dans le transfert du signal extracellulaire vers un effet épigénétique spécifique. L'hypothèse commune à nos travaux est que la réponse épigénétique soit, du moins en partie, dépendante de la signalisation induite par les ROS, puisque le vieillissement, la dyslipidémie sévère et l'exercice sont caractérisés par une production accrue de ROS et une augmentation du stress oxydant dans des compartiments cellulaires distincts. Nous avons abordé ce sujet dans notre première étude en démontrant que l'utilisation d'un antioxydant bloque la réponse épigénétique. Il serait intéressant d'observer la réponse épigénétique dans des contextes pathologiques en présence d'un antioxydant, particulièrement chez l'humain. En effet, les études cliniques sur la supplémentation avec des antioxydants chez des patients souffrant de MCV ne semblent pas produire les effets anticipés: les bénéfices observés dans les modèles animaux ne sont pas reproduits chez l'humain (Goszcz *et al.* 2015). Il serait donc intéressant de voir si l'utilisation d'un antioxydant dans un contexte pathologique chez l'humain parvient, ou pas, à renverser les effets épigénétiques associés à la maladie. Ce type d'étude fournirait des indices expliquant pourquoi les antioxydants échouent en clinique. En lien avec l'activité physique, bien que les mécanismes moléculaires responsables de ses effets bénéfiques soient peu connus, un nombre croissant d'évidences supporte que certaines réponses cellulaires à l'exercice soient dépendantes de la production de ROS. Ceci a d'ailleurs été démontré dans une étude chez l'humain, révélant que certains des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique induits suite à un entraînement physique étaient complètement abolis par la prise concomitante d'antioxydants (Vitamine C et E) (Ristow *et al.* 2009). L'étude des mécanismes épigénétiques dans un contexte d'exercice et d'antioxydants permettrait d'identifier

lesquels des changements moléculaires associés à l'exercice sont dépendants de la production de radicaux libres, particulièrement dans une population de patients atteints de MCV.

L'étude de l'épigénétique et des mécanismes de méthylation de l'ADN ouvre la porte à des nouvelles avenues thérapeutiques, notamment illustrées par l'apparition de médicaments « épigénétiques » ciblant entre autres les enzymes de méthylation. Cependant, le plus gros obstacle dressé face à cette stratégie est le manque de spécificité; il est difficile de cibler les cellules et les gènes dysfonctionnels et, d'autre part, des variations de méthylation globales ne sont pas désirables. Ainsi, la caractérisation de gènes dont le patron de méthylation est aberrant dans un contexte pathologique permet d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, mais la technologie limite l'application pratique de ces découvertes. Une des applications cliniques potentielles est représentée par un nombre croissant d'études s'intéressant à l'utilisation de la signature épigénétique comme un outil diagnostique (Zhong *et al.* 2016). En effet il est intéressant d'étudier le potentiel de biomarqueurs sur le profil épigénétique de gènes spécifiques ou simplement du génome entier, l'épigénome. À ce sujet, des travaux récents effectués par Horvath *et al.* (Horvath 2013) proposent l'application d'un algorithme compilant le profil de méthylation de 353 CpG candidats qui permet de générer un âge « épigénétique ». Cette valeur calculée prédit avec précision l'âge chronologique d'un individu, tout en représentant un indice du vieillissement biologique, ce qui permettrait de l'utiliser comme biomarqueur du vieillissement accéléré et de la maladie (Horvath 2013). Une approche similaire serait fort avantageuse dans le contexte de MCV: la génération d'un indice de risque cardiovasculaire permettant de juger la santé cardiovasculaire d'un patient avant l'apparition d'événements cardiovasculaires à partir d'un seul échantillon de sang simplifierait grandement la prévention clinique des MCV. Les tests conventionnels actuels nécessitent une panoplie de tests spécifiques de différents marqueurs tels que les marqueurs inflammatoires dont fait partie le CRP et les interleukines, les marqueurs de dysfonction endothéliale tels que les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 et autres tels que le peptide cérébral natriurétique (BNP; *brain natriuretic peptide*) et le taux de cholestérol, pour ne nommer que ceux-ci. À l'opposé, la génération d'un profil de méthylation d'envergure génomique, ou méthylome, ne nécessite qu'un échantillon de sang contenant de l'ADN et prédirait avec précision la santé cardiovasculaire.

Selon nos connaissances actuelles, les mécanismes régulateurs épigénétiques sont donc un facteur d'avant-plan dans la pathogénèse des MCV et représentent de nouvelles avenues thérapeutiques avec un potentiel inégalé.

## RÉFÉRENCES

- Afanas'ev I (2014). New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. *Aging Dis.* **5**, 52-62.
- Alagona P, Jr., Ahmad TA (2015). Cardiovascular disease risk assessment and prevention: current guidelines and limitations. *Med Clin North Am.* **99**, 711-731.
- Allen JM, Berg Miller ME, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, White BA, Fryer JD, Woods JA (2015). Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol (1985).* **118**, 1059-1066.
- Allfrey VG, Mirsky AE (1964). Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Science.* **144**, 559.
- Alp NJ, Channon KM (2004). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**, 413-420.
- Alp NJ, McAteer MA, Khoo J, Choudhury RP, Channon KM (2004). Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**, 445-450.
- Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, Ito T, Hirakawa S, Ihn H, Oike Y (2011). Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res.* **71**, 7502-7512.
- Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Ogata A, Horiguchi H, Odagiri H, Masuda T, Fukushima S, Jinnin M, Hirakawa S, Sawa T, Akaike T, Ihn H, Oike Y (2014). Angiopoietin-like protein 2 accelerates carcinogenesis by activating chronic inflammation and oxidative stress. *Mol Cancer Res.* **12**, 239-249.
- Aran D, Toperoff G, Rosenberg M, Hellman A (2011). Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Hum Mol Genet.* **20**, 670-680.
- Arber W, Dussoix D (1962). Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J Mol Biol.* **5**, 18-36.
- Ascensao A, Rebelo A, Oliveira E, Marques F, Pereira L, Magalhaes J (2008). Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clin Biochem.* **41**, 841-851.
- Baccarelli A, Rienstra M, Benjamin EJ (2010). Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circ Cardiovasc Genet.* **3**, 567-573.
- Bachmeier B, Nerlich AG, Iancu CM, Cilli M, Schleicher E, Vene R, Dell'Eva R, Jochum M, Albini A, Pfeffer U (2007). The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. *Cell Physiol Biochem.* **19**, 137-152.
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell.* **87**, 13-20.
- Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM (2009). Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol.* **27**, 361-368.
- Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z, Reuf J, Horaist C, Lebovitz R, Hunter GC, McIntyre K, Runge MS (2002). Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation.* **106**, 544-549.



- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH (2001). A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem.* **276**, 37594-37601.
- Barengo NC, Hu G, Lakka TA, Pekkarinen H, Nissinen A, Tuomilehto J (2004). Low physical activity as a predictor for total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women in Finland. *Eur Heart J.* **25**, 2204-2211.
- Barja G, Herrero A (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* **14**, 312-318.
- Barnes PJ, Adcock IM, Ito K (2005). Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J.* **25**, 552-563.
- Barres R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K, Krook A, Zierath JR (2009). Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab.* **10**, 189-198.
- Barres R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, Caidahl K, Krook A, O'Gorman DJ, Zierath JR (2012). Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab.* **15**, 405-411.
- Basu S (2010). Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2 $\alpha$ ) and F(2)-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells.* **30**, 383-391.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 1620-1624.
- Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **87**, 245-313.
- Bekkering S, Quintin J, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Riksen NP (2014). Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **34**, 1731-1738.
- BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C, Gorkach A (2007). NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* **42**, 446-459.
- Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 11891-11896.
- Bell B, Rose CL, Damon A (1966). The Veterans Administration longitudinal study of healthy aging. *Gerontologist.* **6**, 179-184.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* **23**, 781-783.
- Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, Hinoue T, Ramjan Z, Liu Y, Noushmehr H, Lange CP, van Dijk CM, Tollenaar RA, Van Den Berg D, Laird PW (2012). Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet.* **44**, 40-46.
- Berry JD, Willis B, Gupta S, Barlow CE, Lakoski SG, Khera A, Rohatgi A, de Lemos JA, Haskell W, Lloyd-Jones DM (2011). Lifetime risks for cardiovascular disease mortality by cardiorespiratory fitness levels measured at ages 45, 55, and 65 years in men. The Cooper Center Longitudinal Study. *J Am Coll Cardiol.* **57**, 1604-1610.

- Biel M, Wascholowski V, Giannis A (2005). Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl.* **44**, 3186-3216.
- Bjornsson HT, Fallin MD, Feinberg AP (2004). An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet.* **20**, 350-358.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* **385**, 729-733.
- Blair SN, Kampert JB, Kohl HW, 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Jr., Gibbons LW (1996). Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA.* **276**, 205-210.
- Blake GJ, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2003). Blood pressure, C-reactive protein, and risk of future cardiovascular events. *Circulation.* **108**, 2993-2999.
- Blam ME, Stein RB, Lichtenstein GR (2001). Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *Am J Gastroenterol.* **96**, 1977-1997.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ, AtheroGene I (2003). Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* **349**, 1605-1613.
- Bock C, Walter J, Paulsen M, Lengauer T (2007). CpG island mapping by epigenome prediction. *PLoS Comput Biol.* **3**, e110.
- Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, Des Rosiers C, Tardif JC, Thorin E (2011). Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **301**, H2081-2092.
- Boveris A (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* **105**, 429-435.
- Brandes RP, Takac I, Schroder K (2011). No superoxide--no stress?: Nox4, the good NADPH oxidase! *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **31**, 1255-1257.
- Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND, Scandura JM (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One.* **6**, e14524.
- Broxmeyer HE, Srouf EF, Cooper S, Wallace CT, Hangoc G, Youn BS (2012). Angiotensin-like-2 and -3 act through their coiled-coil domains to enhance survival and replating capacity of human cord blood hematopoietic progenitors. *Blood Cells Mol Dis.* **48**, 25-29.
- Buga AM, Margaritescu C, Scholz CJ, Radu E, Zelenak C, Popa-Wagner A (2014). Transcriptomics of post-stroke angiogenesis in the aged brain. *Front Aging Neurosci.* **6**, 44.
- Buijsse B, Lee DH, Steffen L, Erickson RR, Luepker RV, Jacobs DR, Jr., Holtzman JL (2012). Low serum glutathione peroxidase activity is associated with increased cardiovascular mortality in individuals with low HDLc's. *PLoS One.* **7**, e38901.
- Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA (2007). 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**, 435-439.

- Byvoet P, Shepherd GR, Hardin JM, Noland BJ (1972). The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* **148**, 558-567.
- Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG (2007). Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia.* **9**, 1111-1121.
- Cao-Lei L, Massart R, Suderman MJ, Machnes Z, Elgbeili G, Laplante DP, Szyf M, King S (2014). DNA methylation signatures triggered by prenatal maternal stress exposure to a natural disaster: Project Ice Storm. *PLoS One.* **9**, e107653.
- Carbone C, Piro G, Fassan M, Tamburrino A, Mina MM, Zanotto M, Chiao PJ, Bassi C, Scarpa A, Tortora G, Melisi D (2015). An angiopoietin-like protein 2 autocrine signaling promotes EMT during pancreatic ductal carcinogenesis. *Oncotarget.* **6**, 13822-13834.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell.* **143**, 1084-1096.
- Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EE, Ravasco P, Camilo ME, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I (2003). Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem.* **49**, 1292-1296.
- Caulin-Glaser T, Falko J, Hindman L, La Londe M, Snow R (2005). Cardiac rehabilitation is associated with an improvement in C-reactive protein levels in both men and women with cardiovascular disease. *J Cardiopulm Rehabil.* **25**, 332-336; quiz 337-338.
- Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, Gaetano C (2013). Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci.* **14**, 17643-17663.
- Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, Lin S, Robb GB, Teichert AM, Karantzoulis-Fegaras F, Keightley A, Steer BM, Marsden PA (2004). The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem.* **279**, 35087-35100.
- Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT (2000). Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol.* **165**, 1013-1021.
- Chen B, Lu Y, Chen Y, Cheng J (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol.* **225**, R83-99.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell.* **103**, 263-271.
- Chi P, Allis CD, Wang GG (2010). Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer.* **10**, 457-469.
- Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE (2003). Intra-arterial tumor necrosis factor-alpha impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**, 695-701.
- Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute YV, Chen PY, Stroud H, Yu Y, Hetzel JA, Kuo F, Kim J, Cokus SJ, Casero D, Bernal M, Huijser P, Clark AT, Kramer U, Merchant SS, Zhang X, Jacobsen SE, Pellegrini M (2010). Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature.* **466**, 388-392.

- Choi JK (2010). Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biol.* **11**, R70.
- Chow CK, Jolly S, Rao-Melacini P, Fox KA, Anand SS, Yusuf S (2010). Association of diet, exercise, and smoking modification with risk of early cardiovascular events after acute coronary syndromes. *Circulation.* **121**, 750-758.
- Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubbs M, World M, Deanfield JE (1999). Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol.* **33**, 1379-1385.
- Collier SR, Kanaley JA, Carhart R, Jr., Frechette V, Tobin MM, Hall AK, Luckenbaugh AN, Fernhall B (2008). Effect of 4 weeks of aerobic or resistance exercise training on arterial stiffness, blood flow and blood pressure in pre- and stage-1 hypertensives. *J Hum Hypertens.* **22**, 678-686.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* **30**, 1073-1081.
- Congrains A, Kamide K, Katsuya T, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto K, Ohishi M, Rakugi H (2012). CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. *Biochem Biophys Res Commun.* **419**, 612-616.
- Conraads VM, Pattyn N, De Maeyer C, Beckers PJ, Coeckelberghs E, Cornelissen VA, Denollet J, Frederix G, Goetschalckx K, Hoymans VY, Possemiers N, Schepers D, Shivalkar B, Voigt JU, Van Craenenbroeck EM, Vanhees L (2015). Aerobic interval training and continuous training equally improve aerobic exercise capacity in patients with coronary artery disease: the SAINTEX-CAD study. *Int J Cardiol.* **179**, 203-210.
- Conti AA, Macchi C, Molino Lova R, Conti A, Gensini GF (2007). Relationship between physical activity and cardiovascular disease. Selected historical highlights. *J Sports Med Phys Fitness.* **47**, 84-90.
- Cook MD, Martin SA, Williams C, Whitlock K, Wallig MA, Pence BD, Woods JA (2013). Forced treadmill exercise training exacerbates inflammation and causes mortality while voluntary wheel training is protective in a mouse model of colitis. *Brain Behav Immun.* **33**, 46-56.
- Cortazar D, Kunz C, Selfridge J, Lettieri T, Saito Y, MacDougall E, Wirz A, Schuermann D, Jacobs AL, Siegrist F, Steinacher R, Jiricny J, Bird A, Schar P (2011). Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature.* **470**, 419-423.
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell.* **146**, 67-79.
- Critchley JA, Capewell S (2003). Mortality risk reduction associated with smoking cessation in patients with coronary heart disease: a systematic review. *JAMA.* **290**, 86-97.
- Cunningham GM, Roman MG, Flores LC, Hubbard GB, Salmon AB, Zhang Y, Gelfond J, Ikeno Y (2015). The paradoxical role of thioredoxin on oxidative stress and aging. *Arch Biochem Biophys.* **576**, 32-38.
- Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, Sakkinen P, Popper JS, Yano K, Tracy RP (2003). C-reactive protein and the future risk of thromboembolic stroke in healthy men. *Circulation.* **107**, 2016-2020.

- Dawber TR, Meadors GF, Moore FE, Jr. (1951). Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health*. **41**, 279-281.
- Dayton S, Pearce ML (1969). Diet and cardiovascular diseases. *Lancet*. **1**, 51-52.
- De Sousa E, Lechene P, Fortin D, N'Guessan B, Belmadani S, Bigard X, Veksler V, Ventura-Clapier R (2002). Cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure: beneficial effects of voluntary activity. *Cardiovasc Res*. **56**, 260-268.
- Deary IJ, Gow AJ, Pattie A, Starr JM (2012). Cohort profile: the Lothian Birth Cohorts of 1921 and 1936. *Int J Epidemiol*. **41**, 1576-1584.
- Denham J, O'Brien BJ, Marques FZ, Charchar FJ (2015). Changes in the leukocyte methylome and its effect on cardiovascular-related genes after exercise. *J Appl Physiol (1985)*. **118**, 475-488.
- Deodati A, Inzaghi E, Liguori A, Puglianiello A, Germani D, Brufani C, Fintini D, Cappa M, Barbetti F, Cianfarani S (2013). IGF2 methylation is associated with lipid profile in obese children. *Horm Res Paediatr*. **79**, 361-367.
- DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, Seals DR (2000). Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation*. **102**, 1351-1357.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*. **399**, 491-496.
- Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, Fegan PE, Sigmund CD, Faraci FM (2002). Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. *Circ Res*. **91**, 938-944.
- Dikalova AE, Gongora MC, Harrison DG, Lambeth JD, Dikalov S, Griendling KK (2010). Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **299**, H673-679.
- DiMauro S, Schon EA (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. **348**, 2656-2668.
- Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Takahashi O, Mukai N, Hata J, Iwase M, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y (2013). Angiotensin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama study. *Diabetes Care*. **36**, 98-100.
- Donkin I, Versteyhe S, Ingerslev LR, Qian K, Mehta M, Nordkap L, Mortensen B, Appel EV, Jorgensen N, Kristiansen VB, Hansen T, Workman CT, Zierath JR, Barres R (2016). Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab*. **23**, 369-378.
- Doroshov JH, Davies KJ (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem*. **261**, 3068-3074.
- Douglas G, Bendall JK, Crabtree MJ, Tatham AL, Carter EE, Hale AB, Channon KM (2012). Endothelial-specific Nox2 overexpression increases vascular superoxide and macrophage recruitment in ApoE(-)/(-) mice. *Cardiovasc Res*. **94**, 20-29.
- Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folian BJ, Donato AJ, Lesniewski LA (2009). Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J Physiol*. **587**, 3271-3285.
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. **300**, 455.

- Ehrlich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, Cantor CR, Field JK, van den Boom D (2005). Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 15785-15790.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. **10**, 2709-2721.
- El Eter E, Al-Masri AA (2015). Peroxiredoxin isoforms are associated with cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res*. **48**, 465-469.
- Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Masuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, Oike Y (2012). Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer Res*. **72**, 1784-1794.
- Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H, Oike Y (2014). Serum ANGPTL2 levels reflect clinical features of breast cancer patients: implications for the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Int J Biol Markers*. **29**, e239-245.
- Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA*. **289**, 1799-1804.
- Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG (1998). Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*. **58**, 4515-4518.
- Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res*. **60**, 4366-4371.
- Fan W, Luo J (2010). SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. *Mol Cell*. **39**, 247-258.
- Fan X, Shi P, Dai J, Lu Y, Chen X, Liu X, Zhang K, Wu X, Sun Y, Wang K, Zhu L, Zhang CC, Zhang J, Chen GQ, Zheng J, Liu J (2014). Paired immunoglobulin-like receptor B regulates platelet activation. *Blood*. **124**, 2421-2430.
- Fang L, Moore XL, Dart AM, Wang LM (2015). Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J Geriatr Cardiol*. **12**, 305-312.
- Farhat N, Thorin-Trescases N, Mamarbachi M, Villeneuve L, Yu C, Martel C, Duquette N, Gayda M, Nigam A, Juneau M, Allen BG, Thorin E (2013). Angiopoietin-like 2 promotes atherogenesis in mice. *J Am Heart Assoc*. **2**, e000201.
- Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, Carrier M, Thorin E (2008). Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol*. **86**, 761-769.
- Fedorova E, Zink D (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta*. **1783**, 2174-2184.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. **301**, 89-92.

- Felice C, Lewis A, Armuzzi A, Lindsay JO, Silver A (2015). Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* **41**, 26-38.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR, International Vidaza High-Risk MDSSSG (2009). Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* **10**, 223-232.
- Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol.* **12**, 1052-1058.
- Fischer CP (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev.* **12**, 6-33.
- Fish JE, Yan MS, Matouk CC, St Bernard R, Ho JJ, Gavryushova A, Srivastava D, Marsden PA (2010). Hypoxic repression of endothelial nitric-oxide synthase transcription is coupled with eviction of promoter histones. *J Biol Chem.* **285**, 810-826.
- Ford ES (2002). Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. *Epidemiology.* **13**, 561-568.
- Ford ES, Galuska DA, Gillespie C, Will JC, Giles WH, Dietz WH (2001). C-reactive protein and body mass index in children: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Pediatr.* **138**, 486-492.
- Fraile-Bermudez AB, Kortajarena M, Zarrazquin I, Maquibar A, Yanguas JJ, Sanchez-Fernandez CE, Gil J, Irazusta A, Ruiz-Litago F (2015). Relationship between physical activity and markers of oxidative stress in independent community-living elderly individuals. *Exp Gerontol.* **70**, 26-31.
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* **15**, 1583-1606.
- Fukao K, Shimada K, Naito H, Sumiyoshi K, Inoue N, Iesaki T, Kume A, Kiyonagi T, Hiki M, Hirose K, Matsumori R, Ohsaka H, Takahashi Y, Toyoda S, Itoh S, Miyazaki T, Tada N, Daida H (2010). Voluntary exercise ameliorates the progression of atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory effects in apolipoprotein E-deficient mice. *J Atheroscler Thromb.* **17**, 1226-1236.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**, 373-376.
- Gal-Yam EN, Jeong S, Tanay A, Egger G, Lee AS, Jones PA (2006). Constitutive nucleosome depletion and ordered factor assembly at the GRP78 promoter revealed by single molecule footprinting. *PLoS Genet.* **2**, e160.
- Gao L, Ge C, Fang T, Zhao F, Chen T, Yao M, Li J, Li H (2015). ANGPTL2 promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* **30**, 396-404.
- Gendron ME, Thorin-Trescases N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Theoret JF, Mehri Y, Thorin E (2012). Time-dependent beneficial effect of chronic polyphenol treatment with catechin on endothelial dysfunction in aging mice. *Dose Response.* **10**, 108-119.
- Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, Yan Z (2010). PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* **298**, C572-579.

- Gerrits EG, Alkhalaf A, Landman GW, van Hateren KJ, Groenier KH, Struck J, Schulte J, Gans RO, Bakker SJ, Kleefstra N, Bilo HJ (2014). Serum peroxiredoxin 4: a marker of oxidative stress associated with mortality in type 2 diabetes (ZODIAC-28). *PLoS One*. **9**, e89719.
- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL (2011). The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*. **10**, 38.
- Gill SJ, Friedenreich CM, Sajobi TT, Longman RS, Drogos LL, Davenport MH, Tyndall AV, Eskes GA, Hogan DB, Hill MD, Parboosingh JS, Wilson BJ, Poulin MJ (2015). Association between lifetime physical activity and cognitive functioning in middle-aged and older community dwelling adults: results from the Brain in Motion Study. *J Int Neuropsychol Soc*. **21**, 816-830.
- Gillette TG, Hill JA (2015). Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circ Res*. **116**, 1245-1253.
- Gilmore TD (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. **25**, 6680-6684.
- Giordano FJ (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. **115**, 500-508.
- Gleeson M (2007). Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol (1985)*. **103**, 693-699.
- Go YM, Jones DP (2010). Redox control systems in the nucleus: mechanisms and functions. *Antioxid Redox Signal*. **13**, 489-509.
- Goldhammer E, Tanchilevitch A, Maor I, Beniamini Y, Rosenschein U, Sagiv M (2005). Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. *Int J Cardiol*. **100**, 93-99.
- Gomez-Pinilla F, Zhuang Y, Feng J, Ying Z, Fan G (2011). Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur J Neurosci*. **33**, 383-390.
- Goodrick CL (1980). Effects of long-term voluntary wheel exercise on male and female Wistar rats. I. Longevity, body weight, and metabolic rate. *Gerontology*. **26**, 22-33.
- Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL (2015). Antioxidants in cardiovascular therapy: panacea or false hope? *Front Cardiovasc Med*. **2**, 29.
- Gravina L, Ruiz F, Lekue JA, Irazusta J, Gil SM (2011). Metabolic impact of a soccer match on female players. *J Sports Sci*. **29**, 1345-1352.
- Greer EL, Shi Y (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. **13**, 343-357.
- Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A (2012). Exercise and longevity. *Maturitas*. **73**, 312-317.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. **140**, 883-899.
- Guo DF, Chenier I, Lavoie JL, Chan JS, Hamet P, Tremblay J, Chen XM, Wang DH, Inagami T (2006). Development of hypertension and kidney hypertrophy in transgenic mice overexpressing ARAP1 gene in the kidney. *Hypertension*. **48**, 453-459.
- Guo DF, Chenier I, Tardif V, Orlov SN, Inagami T (2003). Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. **310**, 1254-1265.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. **145**, 423-434.



- Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein CJ, Ho YS, Richardson A (2001). Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21**, 1131-1138.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* **464**, 1071-1076.
- Gupta S, Rohatgi A, Ayers CR, Willis BL, Haskell WL, Khera A, Drazner MH, de Lemos JA, Berry JD (2011). Cardiorespiratory fitness and classification of risk of cardiovascular disease mortality. *Circulation.* **123**, 1377-1383.
- Gutierrez J, Ramirez G, Rundek T, Sacco RL (2012). Statin therapy in the prevention of recurrent cardiovascular events: a sex-based meta-analysis. *Arch Intern Med.* **172**, 909-919.
- Guzik TJ, Chen W, Gongora MC, Guzik B, Lob HE, Mangalat D, Hoch N, Dikalov S, Rudzinski P, Kapelak B, Sadowski J, Harrison DG (2008). Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* **52**, 1803-1809.
- Haddad R, Romero R, Gould BR, Tromp G, Gotsch F, Edwin SS, Zingg HH (2008). Angiogenesis gene expression in mouse uterus during the common pathway of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* **198**, 539 e531-538.
- Hajjar DP, Gotto AM, Jr. (2013). Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases. *Am J Pathol.* **182**, 1474-1481.
- Hambrecht R, Gielen S, Linke A, Fiehn E, Yu J, Walther C, Schoene N, Schuler G (2000). Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA.* **283**, 3095-3101.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **144**, 646-674.
- Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, Wen B, Wu H, Liu Y, Diep D, Briem E, Zhang K, Irizarry RA, Feinberg AP (2011). Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet.* **43**, 768-775.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* **11**, 298-300.
- Hato T, Tabata M, Oike Y (2008). The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med.* **18**, 6-14.
- Hattori F, Murayama N, Noshita T, Oikawa S (2003). Mitochondrial peroxiredoxin-3 protects hippocampal neurons from excitotoxic injury in vivo. *J Neurochem.* **86**, 860-868.
- Haykowsky M, Scott J, Esch B, Schopflocher D, Myers J, Paterson I, Warburton D, Jones L, Clark AM (2011). A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. *Trials.* **12**, 92.
- Haykowsky MJ, Liang Y, Pechter D, Jones LW, McAlister FA, Clark AM (2007). A meta-analysis of the effect of exercise training on left ventricular remodeling in heart failure patients: the benefit depends on the type of training performed. *J Am Coll Cardiol.* **49**, 2329-2336.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science.* **333**, 1303-1307.

- Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 17046-17049.
- Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM (2001). Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21**, 968-970.
- Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia.* **43**, 1435-1438.
- Hellman A, Chess A (2007). Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science.* **315**, 1141-1143.
- Hermann A, Goyal R, Jeltsch A (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem.* **279**, 48350-48359.
- Heyn H, Esteller M (2012). DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* **13**, 679-692.
- Heyn H, Esteller M (2015). An adenine code for DNA: a second life for N6-methyladenine. *Cell.* **161**, 710-713.
- Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 10522-10527.
- Hiltunen MO, Turunen MP, Hakkinen TP, Rutanen J, Hedman M, Makinen K, Turunen AM, Aalto-Setälä K, Ylä-Herttuala S (2002). DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med.* **7**, 5-11.
- Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem.* **279**, 32804-32812.
- Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S (1993). Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.* **334**, 170-174.
- Hokamaki J, Kawano H, Soejima H, Miyamoto S, Kajiwara I, Kojima S, Sakamoto T, Sugiyama S, Yoshimura M, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H (2005). Plasma thioredoxin levels in patients with unstable angina. *Int J Cardiol.* **99**, 225-231.
- Holliday R, Pugh JE (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* **187**, 226-232.
- Holloszy JO (1993). Exercise increases average longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation. *J Gerontol.* **48**, B97-100.
- Holloszy JO, Smith EK, Vining M, Adams S (1985). Effect of voluntary exercise on longevity of rats. *J Appl Physiol (1985).* **59**, 826-831.
- Horiguchi H, Endo M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Odagiri H, Masuda T, Kadomatsu T, Tanoue H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Baba H, Oike Y (2014). Angiopoietin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase-phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. *Cancer Sci.* **105**, 1550-1559.

- Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, Ninomiya T, Horiguchi H, Endo M, Tabata M, Tazume H, Tian Z, Takahashi O, Terada K, Takeya M, Hao H, Hirose N, Minami T, Suda T, Kiyohara Y, Ogawa H, Kaikita K, Oike Y (2014). Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **34**, 790-800.
- Horvath S (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* **14**, R115.
- Hotchkiss RD (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* **175**, 315-332.
- Hu D, Cao P, Thiels E, Chu CT, Wu GY, Oury TD, Klann E (2007). Hippocampal long-term potentiation, memory, and longevity in mice that overexpress mitochondrial superoxide dismutase. *Neurobiol Learn Mem.* **87**, 372-384.
- Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, Liu J, Huang P (2005). Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem.* **280**, 39485-39492.
- Huang CJ, McAllister MJ, Slusher AL, Webb HE, Mock JT, Acevedo EO (2015). Obesity-related oxidative stress: the impact of physical activity and diet manipulation. *Sports Med Open.* **1**, 32.
- Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassegue B, Griendling K, Navab M, Sevanian A, Hsiai TK (2003). Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res.* **93**, 1225-1232.
- Ide S, Toiyama Y, Shimura T, Kawamura M, Yasuda H, Saigusa S, Ohi M, Tanaka K, Mohri Y, Kusunoki M (2015). Angiopoietin-like protein 2 acts as a novel biomarker for diagnosis and prognosis in patients with esophageal cancer. *Ann Surg Oncol.* **22**, 2585-2592.
- Ikushima H, Miyazono K (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* **10**, 415-424.
- Illingworth RS, Bird AP (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* **583**, 1713-1720.
- Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, Matsui H, Gusev O, Cornette R, Okuda T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Suenaga S, Oki M, Sato T, Ozawa T, Clair DK, Majima HJ (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr.* **56**, 1-7.
- Ishibashi T (2013). Molecular hydrogen: new antioxidant and anti-inflammatory therapy for rheumatoid arthritis and related diseases. *Curr Pharm Des.* **19**, 6375-6381.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* **466**, 1129-1133.
- Jang YC, Perez VI, Song W, Lustgarten MS, Salmon AB, Mele J, Qi W, Liu Y, Liang H, Chaudhuri A, Ikeno Y, Epstein CJ, Van Remmen H, Richardson A (2009). Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **64**, 1114-1125.
- Jang YC, Van Remmen H (2009). The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp Gerontol.* **44**, 256-260.
- Jekell A, Hossain A, Alehagen U, Dahlstrom U, Rosen A (2004). Elevated circulating levels of thioredoxin and stress in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* **6**, 883-890.
- Ji LL (2007). Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* **42**, 582-593.
- Ji LL (2008). Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med.* **44**, 142-152.

- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.* **1067**, 425-435.
- Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol.* **7**, 885-887.
- Jiang X, Ning Q (2015). The emerging roles of long noncoding RNAs in common cardiovascular diseases. *Hypertens Res.* **38**, 375-379.
- Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, Jeang KT (1997). Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* **272**, 30952-30961.
- Jones DP, Radi R (2014). Redox pioneer: professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal.* **21**, 2459-2468.
- Jones PA (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* **13**, 484-492.
- Jones PA, Baylin SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* **3**, 415-428.
- Jones PA, Liang G (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* **10**, 805-811.
- Jones PA, Takai D (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* **293**, 1068-1070.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* **19**, 187-191.
- Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, Selemidis S, Dusting GJ, Sobey CG, Drummond GR (2010). Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **298**, H24-32.
- Jurva JW, Phillips SA, Syed AQ, Syed AY, Pitt S, Weaver A, Gutterman DD (2006). The effect of exertional hypertension evoked by weight lifting on vascular endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* **48**, 588-589.
- Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Marklund S, Heegaard NH, Steffensen R, Sillesen H, Jensen G, Nordestgaard BG (2004). Genetically reduced antioxidative protection and increased ischemic heart disease risk: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation.* **109**, 59-65.
- Kadomatsu T, Endo M, Miyata K, Oike Y (2014). Diverse roles of ANGPTL2 in physiology and pathophysiology. *Trends Endocrinol Metab.* **25**, 245-254.
- Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG (1998). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* **273**, 6297-6302.
- Kannel WB, Belanger A, D'Agostino R, Israel I (1986). Physical activity and physical demand on the job and risk of cardiovascular disease and death: the Framingham Study. *Am Heart J.* **112**, 820-825.
- Kannel WB, Feinleib M, McNamara PM, Garrison RJ, Castelli WP (1979). An investigation of coronary heart disease in families. The Framingham offspring study. *Am J Epidemiol.* **110**, 281-290.
- Kantlehner M, Kirchner R, Hartmann P, Ellwart JW, Alunni-Fabbroni M, Schumacher A (2011). A high-throughput DNA methylation analysis of a single cell. *Nucleic Acids Res.* **39**, e44.

- Kanzleiter T, Jahnert M, Schulze G, Selbig J, Hallahan N, Schwenk RW, Schurmann A (2015). Exercise training alters DNA methylation patterns in genes related to muscle growth and differentiation in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **308**, E912-920.
- Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH (2014). Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases.* **2**, 126-132.
- Kasapis C, Thompson PD (2005). The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol.* **45**, 1563-1569.
- Kavanagh T, Shephard RJ (1973). Importance of physical activity in post-coronary rehabilitation. *Am J Phys Med.* **52**, 304-314.
- Kavanagh T, Shephard RJ, Doney H, Pandit V (1973). Intensive exercise in coronary rehabilitation. *Med Sci Sports.* **5**, 34-39.
- Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, McCord RA, Ongaigui KC, Boxer LD, Chang HY, Chua KF (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* **136**, 62-74.
- Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, Thomas K, Presser A, Bernstein BE, van Oudenaarden A, Regev A, Lander ES, Rinn JL (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 11667-11672.
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1996). Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 9114-9119.
- Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I (2008). Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res.* **68**, 5067-5075.
- Kim GH, Ryan JJ, Archer SL (2013). The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal.* **18**, 1920-1936.
- Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY (1999). Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem.* **274**, 26523-26528.
- Kirk EA, Dinauer MC, Rosen H, Chait A, Heinecke JW, LeBoeuf RC (2000). Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**, 1529-1535.
- Kleinschnitz C, Grund H, Winkler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, Barit D, Schwarz T, Geis C, Kraft P, Barthel K, Schuhmann MK, Herrmann AM, Meuth SG, Stoll G, Meurer S, Schrewe A, Becker L, Gailus-Durner V, Fuchs H, Klopstock T, de Angelis MH, Jandeleit-Dahm K, Shah AM, Weissmann N, Schmidt HH (2010). Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol.* **8**, e1000479.
- Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB (1999). C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation.* **99**, 237-242.
- Kojda G, Hambrecht R (2005). Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res.* **67**, 187-197.

- Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H (2016). Tumor necrosis factor-alpha gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. *J Periodontol Res.* **51**, 350-358.
- Kolb WP, Granger GA (1968). Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **61**, 1250-1255.
- Kondo N, Ishii Y, Kwon YW, Tanito M, Horita H, Nishinaka Y, Nakamura H, Yodoi J (2004). Redox-sensing release of human thioredoxin from T lymphocytes with negative feedback loops. *J Immunol.* **172**, 442-448.
- Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ (2014). NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal.* **20**, 2794-2814.
- Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R, Schernthaner G (2003). Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**, 1042-1047.
- Kornberg RD, Lorch Y (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* **98**, 285-294.
- Kostrominova TY (2010). Advanced age-related denervation and fiber-type grouping in skeletal muscle of SOD1 knockout mice. *Free Radic Biol Med.* **49**, 1582-1593.
- Kubota Y, Oike Y, Satoh S, Tabata Y, Niikura Y, Morisada T, Akao M, Urano T, Ito Y, Miyamoto T, Watanabe S, Suda T (2005). Isolation and expression patterns of genes for three angiopoietin-like proteins, Angptl1, 2 and 6 in zebrafish. *Gene Expr Patterns.* **5**, 679-685.
- Kurdistani SK, Grunstein M (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 276-284.
- Kwak HB, Lee Y, Kim JH, Van Remmen H, Richardson AG, Lawler JM (2015). MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **70**, 533-544.
- Lahart IM, Metsios GS, Nevill AM, Carmichael AR (2015). Physical activity, risk of death and recurrence in breast cancer survivors: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Acta Oncol.* **54**, 635-654.
- Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG (2002). Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension.* **40**, 511-515.
- Langbein H, Hofmann A, Brunssen C, Goettsch W, Morawietz H (2015). Impact of high-fat diet and voluntary running on body weight and endothelial function in LDL receptor knockout mice. *Atheroscler Suppl.* **18**, 59-66.
- Lara Fernandes J, Serrano CV, Jr., Toledo F, Hunziker MF, Zamperini A, Teo FH, Oliveira RT, Blotta MH, Rondon MU, Negrao CE (2011). Acute and chronic effects of exercise on inflammatory markers and B-type natriuretic peptide in patients with coronary artery disease. *Clin Res Cardiol.* **100**, 77-84.
- Larouche JF, Yu C, Luo X, Farhat N, Guiraud T, Lalonde J, Gayda M, Juneau M, Lambert J, Thorin-Trescases N, Thorin E, Nigam A (2015). Acute high-intensity intermittent aerobic exercise reduces plasma Angiopoietin-like 2 in patients with coronary artery disease. *Can J Cardiol.* **31**, 1232-1239.
- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1

- mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res.* **88**, 888-894.
- Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **288**, H2031-2041.
- Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, Bohm M, Nickenig G (2005). Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**, 809-814.
- Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ (2012). The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **302**, H10-23.
- Laukkanen MO, Mannermaa S, Hiltunen MO, Aittomaki S, Airenne K, Janne J, Yla-Herttuala S (1999). Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit ec-sod gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**, 2171-2178.
- Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* **20**, 320-331.
- Laurindo FR, Pedro Mde A, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL (1994). Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res.* **74**, 700-709.
- Lavie CJ, Lee DC, Sui X, Arena R, O'Keefe JH, Church TS, Milani RV, Blair SN (2015). Effects of running on chronic diseases and cardiovascular and all-cause mortality. *Mayo Clin Proc.* **90**, 1541-1552.
- Lawrence T (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **1**, a001651.
- Leasure JL, Jones M (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience.* **156**, 456-465.
- Leblond F, Nguyen A, Bolduc V, Lambert J, Yu C, Duquette N, Thorin E (2013). Postnatal exposure to voluntary exercise but not the antioxidant catechin protects the vasculature after a switch to an atherogenic environment in middle-age mice. *Pflugers Arch.* **465**, 197-208.
- Lee IM, Hsieh CC, Paffenbarger RS, Jr. (1995). Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. *JAMA.* **273**, 1179-1184.
- Lee S, Kim SM, Lee RT (2013). Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal.* **18**, 1165-1207.
- Lee S, Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee JH, Lee YS, Seo D, Han JY, Kim HJ (2012). Identification of genes underlying different methylation profiles in refractory anemia with excess blast and refractory cytopenia with multilineage dysplasia in myelodysplastic syndrome. *Korean J Hematol.* **47**, 186-193.
- Lerman A, Zeiher AM (2005). Endothelial function: cardiac events. *Circulation.* **111**, 363-368.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* **69**, 915-926.
- Li L, Choi JY, Lee KM, Sung H, Park SK, Oze I, Pan KF, You WC, Chen YX, Fang JY, Matsuo K, Kim WH, Yuasa Y, Kang D (2012). DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *J Epidemiol.* **22**, 384-394.
- Li Q, Gong W, Yang Z, Lu B, Yang Y, Zhao W, Hu R (2013). Serum Angptl2 levels are independently associated with albuminuria in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* **100**, 385-390.

- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol.* **22**, 480-491.
- Lillicrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC (2005). Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr.* **135**, 1382-1386.
- Lillicrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC (2008). 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.* **100**, 278-282.
- Lillicrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC (2007). 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**, 1064-1073.
- Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR (2013). Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science.* **341**, 1237905.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* **462**, 315-322.
- Liu X, Yu X, Xie J, Zhan M, Yu Z, Xie L, Zeng H, Zhang F, Chen G, Yi X, Zheng J (2015). ANGPTL2/LILRB2 signaling promotes the propagation of lung cancer cells. *Oncotarget.* **6**, 21004-21015.
- Liu YF, Chen HI, Wu CL, Kuo YM, Yu L, Huang AM, Wu FS, Chuang JI, Jen CJ (2009). Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol.* **587**, 3221-3231.
- Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG, D'Agostino RB, Beiser A, Wilson PW, Wolf PA, Levy D (2006). Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation.* **113**, 791-798.
- Lob HE, Vinh A, Li L, Blinder Y, Offermanns S, Harrison DG (2011). Role of vascular extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension.* **58**, 232-239.
- Lochmann TL, Thomas RR, Bennett JP, Jr., Taylor SM (2015). Epigenetic modifications of the PGC-1alpha promoter during exercise induced expression in mice. *PLoS One.* **10**, e0129647.
- Loiseau C, Ali A, Itzykson R (2015). New therapeutic approaches in myelodysplastic syndromes: Hypomethylating agents and lenalidomide. *Exp Hematol.* **43**, 661-672.
- Lubos E, Loscalzo J, Handy DE (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* **15**, 1957-1997.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **389**, 251-260.
- Lumey LH, Stein AD, Susser E (2011). Prenatal famine and adult health. *Annu Rev Public Health.* **32**, 237-262.



- Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, Ballestar E, Esteller M, Zaina S (2004). DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem.* **279**, 29147-29154.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**, 29-38.
- Madrigal-Matute J, Fernandez-Garcia CE, Blanco-Colio LM, Burillo E, Fortuno A, Martinez-Pinna R, Llamas-Granda P, Belouqui O, Egido J, Zalba G, Martin-Ventura JL (2015). Thioredoxin-1/peroxiredoxin-1 as sensors of oxidative stress mediated by NADPH oxidase activity in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* **86**, 352-361.
- Maeda S, Tanabe T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Miyauchi T, Kuno S, Ajisaka R, Matsuda M (2004). Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res.* **27**, 947-953.
- Maier W, Cosentino F, Lutolf RB, Fleisch M, Seiler C, Hess OM, Meier B, Luscher TF (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* **35**, 173-178.
- Maiorana A, O'Driscoll G, Dembo L, Goodman C, Taylor R, Green D (2001). Exercise training, vascular function, and functional capacity in middle-aged subjects. *Med Sci Sports Exerc.* **33**, 2022-2028.
- Maiti A, Drohat AC (2011). Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem.* **286**, 35334-35338.
- Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R (2007). FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist.* **12**, 1247-1252.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M (2008). Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* **275**, 3959-3970.
- Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Murphy L, Martin NG, Montgomery GW, Feinberg AP, Fallin MD, Multhaup ML, Jaffe AE, Joehanes R, Schwartz J, Just AC, Lunetta KL, Murabito JM, Starr JM, Horvath S, Baccarelli AA, Levy D, Visscher PM, Wray NR, Deary IJ (2015). DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* **16**, 25.
- Marklund SL (1984). Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest.* **74**, 1398-1403.
- Masuda T, Endo M, Yamamoto Y, Odagiri H, Kadomatsu T, Nakamura T, Tanoue H, Ito H, Yugami M, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Iwase H, Mizuta H, Oike Y (2015). ANGPTL2 increases bone metastasis of breast cancer cells through enhancing CXCR4 signaling. *Sci Rep.* **5**, 9170.
- McDermott KM, Zhang J, Holst CR, Kozakiewicz BK, Singla V, Tlsty TD (2006). p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS Biol.* **4**, e51.
- McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S (1994). Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol.* **267**, H1921-1927.

- Mederle K, Schweda F, Kattler V, Dobliger E, Miyata K, Hocherl K, Oike Y, Castrop H (2013). The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. *Crit Care*. **17**, R130.
- Meissner M, Lombardo E, Havinga R, Tietge UJ, Kuipers F, Groen AK (2011). Voluntary wheel running increases bile acid as well as cholesterol excretion and decreases atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*. **218**, 323-329.
- Meldi KM, Figueroa ME (2015). Cytosine modifications in myeloid malignancies. *Pharmacol Ther*. **152**, 42-53.
- Melo SF, Lunz W, Fontes EP, Dias CM, Carneiro MA, Jr., Moura AG, Del Carlo RJ, Natali AJ (2009). Different levels of Hsp72 in female rat myocardium in response to voluntary exercise and forced exercise. *Arq Bras Cardiol*. **93**, 456-462.
- Meng QX, Wen L, Chen XY, Zhong HJ (2013). Association of serum angiopoietin-like protein 2 and epinephrine levels in metabolically healthy but obese individuals: In vitro and in vivo evidence. *Exp Ther Med*. **5**, 1631-1636.
- Miao L, St Clair DK (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. **47**, 344-356.
- Mikhed Y, Daiber A, Steven S (2015). Mitochondrial oxidative stress, mitochondrial DNA damage and their role in age-related vascular dysfunction. *Int J Mol Sci*. **16**, 15918-15953.
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. **448**, 553-560.
- Miranda TB, Jones PA (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol*. **213**, 384-390.
- Miyamoto S, Sakamoto T, Soejima H, Shimomura H, Kajiwara I, Kojima S, Hokamaki J, Sugiyama S, Yoshimura M, Ozaki Y, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H (2003). Plasma thioredoxin levels and platelet aggregability in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. **146**, 465-471.
- Mohamed J, Nazratun Nafizah AH, Zariyantey AH, Budin SB (2016). Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J*. **16**, e132-141.
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ (1981). Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science*. **211**, 393-396.
- Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schubeler D (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell*. **30**, 755-766.
- Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, Cheshire N, Paleolog E, Feldmann M (2004). Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 5634-5639.
- Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM (2015). Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol*. **31**, 631-641.
- Moore LD, Le T, Fan G (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. **38**, 23-38.

- Morales-Alamo D, Calbet JA (2014). Free radicals and sprint exercise in humans. *Free Radic Res.* **48**, 30-42.
- Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K (2008). The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest.* **118**, 868-878.
- Morris RT, Laye MJ, Lees SJ, Rector RS, Thyfault JP, Booth FW (2008). Exercise-induced attenuation of obesity, hyperinsulinemia, and skeletal muscle lipid peroxidation in the OLETF rat. *J Appl Physiol (1985).* **104**, 708-715.
- Muramoto A, Tsushita K, Kato A, Ozaki N, Tabata M, Endo M, Oike Y, Oiso Y (2011). Angiotensin-like protein 2 sensitively responds to weight reduction induced by lifestyle intervention on overweight Japanese men. *Nutr Diabetes.* **1**, e20.
- Na YK, Hong HS, Lee WK, Kim YH, Kim DS (2015). Increased methylation of interleukin 6 gene is associated with obesity in Korean women. *Mol Cells.* **38**, 452-456.
- Nan X, Cross S, Bird A (1998a). Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp.* **214**, 6-16; discussion 16-21, 46-50.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998b). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* **393**, 386-389.
- Narayan P, Rottman FM (1988). An in vitro system for accurate methylation of internal adenosine residues in messenger RNA. *Science.* **242**, 1159-1162.
- Natali AJ, Fowler ED, Calaghan SC, White E (2015). Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **309**, H421-424.
- Nestor C, Ruzov A, Meehan R, Dunican D (2010). Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. *Biotechniques.* **48**, 317-319.
- Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, Katz E, Dixon JM, Harrison DJ, Meehan RR (2012). Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res.* **22**, 467-477.
- Neugebauer R, Hoek HW, Susser E (1999). Prenatal exposure to wartime famine and development of antisocial personality disorder in early adulthood. *JAMA.* **282**, 455-462.
- Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature.* **467**, 963-966.
- Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA (2001). Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4598-4606.
- Nickenig G, Harrison DG (2002). The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation.* **105**, 393-396.
- Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T, Murzin AG, Murzina NV, Laue ED (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature.* **416**, 103-107.
- Niki D, Katsu K, Yokouchi Y (2009). Ontogeny of angiotensin-like protein 1, 2, 3, 4, 5, and 7 genes during chick embryonic development. *Dev Growth Differ.* **51**, 821-832.

- O'Malley D, Quigley EM, Dinan TG, Cryan JF (2011). Do interactions between stress and immune responses lead to symptom exacerbations in irritable bowel syndrome? *Brain Behav Immun.* **25**, 1333-1341.
- Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka MS, Fukuhara S, Miyamoto T, Kobayashi E, Miyata K, Aoi J, Horiguchi H, Nishimura N, Terada K, Yakushiji T, Manabe I, Mochizuki N, Mizuta H, Oike Y (2014). The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin alpha5beta1, p38 MAPK, and matrix metalloproteinases. *Sci Signal.* **7**, ra7.
- Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Lubos E, Doppler C, Hausding M, Tobias S, Brochhausen C, Li H, Torzewski M, Wenzel P, Bachschmid M, Lackner KJ, Schulz E, Munzel T, Daiber A (2014). Glutathione peroxidase-1 deficiency potentiates dysregulatory modifications of endothelial nitric oxide synthase and vascular dysfunction in aging. *Hypertension.* **63**, 390-396.
- Ogata A, Endo M, Aoi J, Takahashi O, Kadomatsu T, Miyata K, Tian Z, Jinnin M, Fukushima S, Ihn H, Oike Y (2012). The role of angiopoietin-like protein 2 in pathogenesis of dermatomyositis. *Biochem Biophys Res Commun.* **418**, 494-499.
- Ogden LG, He J, Lydick E, Whelton PK (2000). Long-term absolute benefit of lowering blood pressure in hypertensive patients according to the JNC VI risk stratification. *Hypertension.* **35**, 539-543.
- Oh S, Tanaka K, Warabi E, Shoda J (2013). Exercise reduces inflammation and oxidative stress in obesity-related liver diseases. *Med Sci Sports Exerc.* **45**, 2214-2222.
- Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M (2005). Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* **180**, 11-17.
- Oike Y, Tabata M (2009). Angiopoietin-like proteins--potential therapeutic targets for metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Circ J.* **73**, 2192-2197.
- Okada T, Tsukano H, Endo M, Tabata M, Miyata K, Kadomatsu T, Miyashita K, Semba K, Nakamura E, Tsukano M, Mizuta H, Oike Y (2010). Synovial cell-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* **176**, 2309-2319.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* **276**, 38388-38393.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* **99**, 247-257.
- Oladzad Abbasabadi A, Javanian A, Nikkhah M, Meratan AA, Ghiasi P, Nemat-Gorgani M (2013). Disruption of mitochondrial membrane integrity induced by amyloid aggregates arising from variants of SOD1. *Int J Biol Macromol.* **61**, 212-217.
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature.* **448**, 714-717.
- Ornish D, Brown SE, Scherwitz LW, Billings JH, Armstrong WT, Ports TA, McLanahan SM, Kirkeeide RL, Brand RJ, Gould KL (1990). Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? The Lifestyle Heart Trial. *Lancet.* **336**, 129-133.
- Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK (1999). Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* **515 ( Pt 1)**, 287-291.

- Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol.* **508 ( Pt 3)**, 949-953.
- Ozsolak F, Song JS, Liu XS, Fisher DE (2007). High-throughput mapping of the chromatin structure of human promoters. *Nat Biotechnol.* **25**, 244-248.
- Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* **102**, 2165-2168.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Jr., Taubert K, Tracy RP, Vinicor F, Centers for Disease C, Prevention, American Heart A (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* **107**, 499-511.
- Peng Y, Yang PH, Guo Y, Ng SS, Liu J, Fung PC, Tay D, Ge J, He ML, Kung HF, Lin MC (2004). Catalase and peroxiredoxin 5 protect *Xenopus* embryos against alcohol-induced ocular anomalies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**, 23-29.
- Pepys MB, Hirschfield GM (2003). C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* **111**, 1805-1812.
- Perez VI, Lew CM, Cortez LA, Webb CR, Rodriguez M, Liu Y, Qi W, Li Y, Chaudhuri A, Van Remmen H, Richardson A, Ikeno Y (2008). Thioredoxin 2 haploinsufficiency in mice results in impaired mitochondrial function and increased oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* **44**, 882-892.
- Perez VI, Van Remmen H, Bokov A, Epstein CJ, Vijg J, Richardson A (2009). The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell.* **8**, 73-75.
- Perkel JM (2013). Visiting "noncodarnia". *Biotechniques.* **54**, 301, 303-304.
- Peters MJ, Joehanes R, Pilling LC, Schurmann C, Conneely KN, Powell J, Reinmaa E, Sutphin GL, Zhernakova A, Schramm K, Wilson YA, Kobes S, Tukiainen T, Consortium NU, Ramos YF, Goring HH, Fornage M, Liu Y, Gharib SA, Stranger BE, De Jager PL, Aviv A, Levy D, Murabito JM, Munson PJ, Huan T, Hofman A, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, van Rooij J, Stolk L, Broer L, Verbiest MM, Jhamai M, Arp P, Metspalu A, Tserel L, Milani L, Samani NJ, Peterson P, Kasela S, Codd V, Peters A, Ward-Caviness CK, Herder C, Waldenberger M, Roden M, Singmann P, Zeilinger S, Illig T, Homuth G, Grabe HJ, Volzke H, Steil L, Kocher T, Murray A, Melzer D, Yaghootkar H, Bandinelli S, Moses EK, Kent JW, Curran JE, Johnson MP, Williams-Blangero S, Westra HJ, McRae AF, Smith JA, Kardina SL, Hovatta I, Perola M, Ripatti S, Salomaa V, Henders AK, Martin NG, Smith AK, Mehta D, Binder EB, Nylocks KM, Kennedy EM, Klengel T, Ding J, Suchy-Dacey AM, Enquobahrie DA, Brody J, Rotter JI, Chen YD, Houwing-Duistermaat J, Kloppenburg M, Slagboom PE, Helmer Q, den Hollander W, Bean S, Raj T, Bakhshi N, Wang QP, Oyston LJ, Psaty BM, Tracy RP, Montgomery GW, Turner ST, Blangero J, Meulenberg I, Ressler KJ, Yang J, Franke L, Kettunen J, Visscher PM, Neely GG, Korstanje R, Hanson RL, Prokisch H, Ferrucci L, Esko T, Teumer A, van Meurs JB, Johnson AD (2015). The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nat Commun.* **6**, 8570.
- Phillips SA, Das E, Wang J, Pritchard K, Gutterman DD (2011). Resistance and aerobic exercise protects against acute endothelial impairment induced by a single exposure to hypertension during exertion. *J Appl Physiol (1985).* **110**, 1013-1020.

- Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ, ExTra MC (2004). Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ*. **328**, 189.
- Pierce GL, Donato AJ, LaRocca TJ, Eskurza I, Silver AE, Seals DR (2011). Habitually exercising older men do not demonstrate age-associated vascular endothelial oxidative stress. *Aging Cell*. **10**, 1032-1037.
- Plongthongkum N, Diep DH, Zhang K (2014). Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat Rev Genet*. **15**, 647-661.
- Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP (1999). Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. **43**, 985-991.
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*. **274**, 33002-33010.
- Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, Grishin NV, Hyde R, Boerwinkle E, Valenzuela DM, Murphy AJ, Cohen JC, Hobbs HH (2012). Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 19751-19756.
- Quek XC, Thomson DW, Maag JL, Bartonicek N, Signal B, Clark MB, Gloss BS, Dinger ME (2015). lncRNADB v2.0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res*. **43**, D168-173.
- Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*. **7**, 34-42.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*. **266**, 22028-22034.
- Raha S, Robinson BH (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*. **25**, 502-508.
- Ramirez-Carrozzi VR, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR, Black JC, Hoffmann A, Carey M, Smale ST (2009). A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell*. **138**, 114-128.
- Ratel D, Ravanat JL, Charles MP, Platet N, Breuillaud L, Lunardi J, Berger F, Wion D (2006). Undetectable levels of N6-methyl adenine in mouse DNA: Cloning and analysis of PRED28, a gene coding for a putative mammalian DNA adenine methyltransferase. *FEBS Lett*. **580**, 3179-3184.
- Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*. **351**, 173-177.
- Ray R, Murdoch CE, Wang M, Santos CX, Zhang M, Alom-Ruiz S, Anilkumar N, Ouattara A, Cave AC, Walker SJ, Grieve DJ, Charles RL, Eaton P, Brewer AC, Shah AM (2011). Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **31**, 1368-1376.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. **406**, 593-599.
- Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Falk W, Neumann ID (2006). Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology*. **147**, 4968-4976.

- Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ (2001). Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O<sub>2</sub>(<sup>-</sup>) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res.* **89**, 408-414.
- Reynolds PA, Sigaroudinia M, Zardo G, Wilson MB, Benton GM, Miller CJ, Hong C, Fridlyand J, Costello JF, Tlsty TD (2006). Tumor suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* **281**, 24790-24802.
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* **38**, 1543-1552.
- Rideout WM, 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA (1990). 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science.* **249**, 1288-1290.
- Ridker PM (2003). Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* **107**, 363-369.
- Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N (2003). C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation.* **107**, 391-397.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* **336**, 973-979.
- Riggs AD (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* **14**, 9-25.
- Riggs AD, Jones PA (1983). 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res.* **40**, 1-30.
- Riserus U, Basu S, Jovinge S, Fredrikson GN, Arnlov J, Vessby B (2002). Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. *Circulation.* **106**, 1925-1929.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Kloting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Bluher M (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 8665-8670.
- Rizki G, Boyer LA (2015). Lncing epigenetic control of transcription to cardiovascular development and disease. *Circ Res.* **117**, 192-206.
- Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Lorgis L, Cottin Y, Vergely C (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther.* **140**, 239-257.
- Rodrigues GM, Jr., Toffoli LV, Manfredo MH, Francis-Oliveira J, Silva AS, Raquel HA, Martins-Pinge MC, Moreira EG, Fernandes KB, Pelosi GG, Gomes MV (2015). Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: modulation by physical exercise. *Behav Brain Res.* **279**, 123-128.
- Roe ND, Ren J (2012). Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol.* **57**, 168-172.
- Rognmo O, Hetland E, Helgerud J, Hoff J, Slordahl SA (2004). High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* **11**, 216-222.

- Ronn T, Volkov P, Davegardh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, Nilsson E, Tornberg A, Dekker Nitert M, Eriksson KF, Jones HA, Groop L, Ling C (2013). A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet.* **9**, e1003572.
- Roos CM, Hagler M, Zhang B, Oehler EA, Arghami A, Miller JD (2013). Transcriptional and phenotypic changes in aorta and aortic valve with aging and MnSOD deficiency in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **305**, H1428-1439.
- Ross R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* **340**, 115-126.
- Ruddle NH, Waksman BH (1968). Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. I. Characterization of the phenomenon. *J Exp Med.* **128**, 1237-1254.
- Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Tracy RP (2002). C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol.* **55**, 445-451.
- Samjoo IA, Safdar A, Hamadeh MJ, Raha S, Tarnopolsky MA (2013). The effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. *Nutr Diabetes.* **3**, e88.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* **419**, 407-411.
- Sato R, Yamasaki M, Hirai K, Matsubara T, Nomura T, Sato F, Mimata H (2015). Angiopoietin-like protein 2 induces androgen-independent and malignant behavior in human prostate cancer cells. *Oncol Rep.* **33**, 58-66.
- Savoia C, Sada L, Zezza L, Pucci L, Lauri FM, Befani A, Alonzo A, Volpe M (2011). Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *Int J Hypertens.* **2011**, 281240.
- Savoia C, Schiffrin EL (2006). Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **15**, 152-158.
- Savoia C, Schiffrin EL (2007). Reduction of C-reactive protein and the use of anti-hypertensives. *Vasc Health Risk Manag.* **3**, 975-983.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 1412-1417.
- Schriner SE, Linford NJ (2006). Extension of mouse lifespan by overexpression of catalase. *Age (Dordr).* **28**, 209-218.
- Schroder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, Dimmeler S, Shah AM, Brandes RP (2012). Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res.* **110**, 1217-1225.
- Schuler G, Hambrecht R, Schlierf G, Niebauer J, Hauer K, Neumann J, Hoberg E, Drinkmann A, Bacher F, Grunze M, et al. (1992). Regular physical exercise and low-fat diet. Effects on progression of coronary artery disease. *Circulation.* **86**, 1-11.
- Schultz MD, He Y, Whitaker JW, Hariharan M, Mukamel EA, Leung D, Rajagopal N, Nery JR, Urich MA, Chen H, Lin S, Lin Y, Jung I, Schmitt AD, Selvaraj S, Ren B, Sejnowski TJ, Wang W, Ecker JR (2015). Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature.* **523**, 212-216.



- Schultz RL, Kullman EL, Waters RP, Huang H, Kirwan JP, Gerdes AM, Swallow JG (2013). Metabolic adaptations of skeletal muscle to voluntary wheel running exercise in hypertensive heart failure rats. *Physiol Res.* **62**, 361-369.
- Schwarz K, Siddiqi N, Singh S, Neil CJ, Dawson DK, Frenneaux MP (2014). The breathing heart - mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. *Int J Cardiol.* **171**, 134-143.
- Sexton T, Schober H, Fraser P, Gasser SM (2007). Gene regulation through nuclear organization. *Nat Struct Mol Biol.* **14**, 1049-1055.
- Shah N, Sukumar S (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer.* **10**, 361-371.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA, Issa JP (2007). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet.* **3**, 2023-2036.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Cote J, Chua KF, Gozani O (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature.* **442**, 96-99.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* **119**, 941-953.
- Shimomura M, Oyama JI, Takeuchi M, Shibata Y, Yamamoto Y, Kawasaki T, Komoda H, Kodama K, Sakuma M, Toyoda S, Inoue Y, Mine D, Natsuaki M, Komatsu A, Hikichi Y, Yamagishi SI, Inoue T, Node K (2015). Acute effects of statin on reduction of angiotensin-like 2 and glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products levels in patients with acute myocardial infarction: a message from SAMIT (Statin for Acute Myocardial Infarction Trial). *Heart Vessels*, Epub 2015 Dec 23.
- Shimura T, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Kitajima T, Kondo S, Okigami M, Yasuda H, Ohi M, Araki T, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M (2015). Angiotensin-like protein 2 as a predictor of early recurrence in patients after curative surgery for gastric cancer. *Anticancer Res.* **35**, 4633-4639.
- Shin YA, Lee JH, Song W, Jun TW (2008). Exercise training improves the antioxidant enzyme activity with no changes of telomere length. *Mech Ageing Dev.* **129**, 254-260.
- Shirodkar AV, St Bernard R, Gavryushova A, Kop A, Knight BJ, Yan MS, Man HS, Sud M, Hebbel RP, Oettgen P, Aird WC, Marsden PA (2013). A mechanistic role for DNA methylation in endothelial cell (EC)-enriched gene expression: relationship with DNA replication timing. *Blood.* **121**, 3531-3540.
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol.* **71**, 40-56.
- Siu PM, Pei XM, Teng BT, Benzie IF, Ying M, Wong SH (2011). Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol.* **96**, 889-906.
- Smith ZD, Meissner A (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* **14**, 204-220.
- Spisak K, Klimkiewicz-Mrowiec A, Pera J, Dziedzic T, Aleksandra G, Slowik A (2014). rs2070424 of the SOD1 gene is associated with risk of Alzheimer's disease. *Neurol Neurochir Pol.* **48**, 342-345.

- St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, Poirier P, Guay SP, Brisson D, Bouchard L (2012). IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics*. **7**, 1125-1132.
- Stamler J, Stamler R, Neaton JD, Wentworth D, Daviglius ML, Garside D, Dyer AR, Liu K, Greenland P (1999). Low risk-factor profile and long-term cardiovascular and noncardiovascular mortality and life expectancy: findings for 5 large cohorts of young adult and middle-aged men and women. *JAMA*. **282**, 2012-2018.
- Stanley BA, Sivakumaran V, Shi S, McDonald I, Lloyd D, Watson WH, Aon MA, Paolocci N (2011). Thioredoxin reductase-2 is essential for keeping low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission from isolated heart mitochondria. *J Biol Chem*. **286**, 33669-33677.
- Steensma DP (2015). Myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. **90**, 969-983.
- Steyers CM, 3rd, Miller FJ, Jr. (2014). Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci*. **15**, 11324-11349.
- Strahl BD, Allis CD (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*. **403**, 41-45.
- Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T (1997). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. **99**, 41-46.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. **121**, 2094-2101.
- Supinski GS, Callahan LA (2007). Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *J Appl Physiol (1985)*. **102**, 2056-2063.
- Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griending KK (2002). Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **22**, 21-27.
- Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y (2009). Angiotensin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*. **10**, 178-188.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A (1998). Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. **97**, 2222-2229.
- Takac I, Schroder K, Brandes RP (2012). The Nox family of NADPH oxidases: friend or foe of the vascular system? *Curr Hypertens Rep*. **14**, 70-78.
- Takai D, Jones PA (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 3740-3745.
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*. **146**, 1016-1028.
- Tang P, Hung MC, Klostergaard J (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry*. **35**, 8216-8225.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*. **14**, 1025-1040.

- Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN (2000). Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 38-47.
- Taylor RS, Brown A, Ebrahim S, Jolliffe J, Noorani H, Rees K, Skidmore B, Stone JA, Thompson DR, Oldridge N (2004). Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med.* **116**, 682-692.
- Tazi J, Bird A (1990). Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell.* **60**, 909-920.
- Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, Horio E, Tsukano H, Kadomatsu T, Nakashima Y, Kunitomo R, Kaneko Y, Moriyama S, Sakaguchi H, Okamoto K, Hara M, Yoshinaga T, Yoshimura K, Aoki H, Araki K, Hao H, Kawasuji M, Oike Y (2012). Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **32**, 1400-1409.
- Tehrani DM, Wong ND (2015). Cardiovascular disease risk assessment: review of established and newer modalities. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* **17**, 57.
- Thompson D, Pepys MB, Wood SP (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* **7**, 169-177.
- Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R (1995). Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys.* **319**, 491-497.
- Thorin-Trescases N, Thorin E (2014). Angiopoietin-like-2: a multifaceted protein with physiological and pathophysiological properties. *Expert Rev Mol Med.* **16**, e17.
- Thorin E, Thorin-Trescases N (2009). Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res.* **84**, 24-32.
- Tian Z, Miyata K, Tazume H, Sakaguchi H, Kadomatsu T, Horio E, Takahashi O, Komohara Y, Araki K, Hirata Y, Tabata M, Takanashi S, Takeya M, Hao H, Shimabukuro M, Sata M, Kawasuji M, Oike Y (2013). Perivascular adipose tissue-secreted angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury. *J Mol Cell Cardiol.* **57**, 1-12.
- Timp W, Feinberg AP (2013). Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer.* **13**, 497-510.
- Tipton CM (2014). The history of "Exercise Is Medicine" in ancient civilizations. *Adv Physiol Educ.* **38**, 109-117.
- Tobi EW, Goeman JJ, Monajemi R, Gu H, Putter H, Zhang Y, Sliker RC, Stok AP, Thijssen PE, Muller F, van Zwet EW, Bock C, Meissner A, Lumey LH, Eline Slagboom P, Heijmans BT (2014). DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism. *Nat Commun.* **5**, 5592.
- Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, Slagboom PE, Heijmans BT (2009). DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet.* **18**, 4046-4053.
- Toiyama Y, Inoue Y, Shimura T, Fujikawa H, Saigusa S, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Tanaka K, Mohri Y, Kusunoki M (2015a). Serum Angiopoietin-like protein 2 improves preoperative detection of lymph node metastasis in colorectal cancer. *Anticancer Res.* **35**, 2849-2856.
- Toiyama Y, Tanaka K, Kitajima T, Shimura T, Imaoka H, Mori K, Okigami M, Yasuda H, Okugawa Y, Saigusa S, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Goel A, Kusunoki M (2015b). Serum

- angiopoietin-like protein 2 as a potential biomarker for diagnosis, early recurrence and prognosis in gastric cancer patients. *Carcinogenesis*. **36**, 1474-1483.
- Toiyama Y, Tanaka K, Kitajima T, Shimura T, Kawamura M, Kawamoto A, Okugawa Y, Saigusa S, Hiro J, Inoue Y, Mohri Y, Goel A, Kusunoki M (2014). Elevated serum angiopoietin-like protein 2 correlates with the metastatic properties of colorectal cancer: a serum biomarker for early diagnosis and recurrence. *Clin Cancer Res*. **20**, 6175-6186.
- Torzewski M, Ochsenhirt V, Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Li H, Rossmann H, Tsimikas S, Reifenberg K, Cheng F, Lehr HA, Blankenberg S, Forstermann U, Munzel T, Lackner KJ (2007). Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **27**, 850-857.
- Touyz RM (2005). Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **14**, 125-131.
- Tremblay MS, Leblanc AG, Carson V, Choquette L, Connor Gorber S, Dillman C, Duggan M, Gordon MJ, Hicks A, Janssen I, Kho ME, Latimer-Cheung AE, Leblanc C, Murumets K, Okely AD, Reilly JJ, Spence JC, Stearns JA, Timmons BW, Canadian Society for Exercise P (2012). Canadian physical activity guidelines for the early years (aged 0-4 years). *Appl Physiol Nutr Metab*. **37**, 345-369.
- Tremblay MS, Warburton DE, Janssen I, Paterson DH, Latimer AE, Rhodes RE, Kho ME, Hicks A, Leblanc AG, Zehr L, Murumets K, Duggan M (2011). New Canadian physical activity guidelines. *Appl Physiol Nutr Metab*. **36**, 36-46; 47-58.
- Trudel K, Sinnott D, James RW, Delvin E, Amre D, Seidman E, Levy E (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.
- Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. **329**, 689-693.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. **439**, 811-816.
- Turk PW, Laayoun A, Smith SS, Weitzman SA (1995). DNA adduct 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis*. **16**, 1253-1255.
- Uchida S, Dimmeler S (2015). Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circ Res*. **116**, 737-750.
- Ueda S, Matsuoka H, Miyazaki H, Usui M, Okuda S, Imaizumi T (2000). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol*. **35**, 71-75.
- Usui T, Ninomiya T, Nagata M, Takahashi O, Doi Y, Hata J, Fukuhara M, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y (2013). Angiopoietin-like protein 2 is associated with chronic kidney disease in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Circ J*. **77**, 2311-2317.
- Valinluck V, Sowers LC (2007). Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*. **67**, 946-950.
- Van den Bossche J, Neele AE, Hoeksema MA, de Heij F, Boshuizen MC, van der Velden S, de Boer VC, Reedquist KA, de Winther MP (2014). Inhibiting epigenetic enzymes to improve atherogenic macrophage functions. *Biochem Biophys Res Commun*. **455**, 396-402.

- Van Heerebeek L, Meischl C, Stooker W, Meijer CJ, Niessen HW, Roos D (2002). NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol.* **55**, 561-568.
- Vazzana N, Santilli F, Sestili S, Cuccurullo C, Davi G (2011). Determinants of increased cardiovascular disease in obesity and metabolic syndrome. *Curr Med Chem.* **18**, 5267-5280.
- Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA (2002a). Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* **105**, 1890-1896.
- Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ (2002b). A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* **106**, 913-919.
- Vidali G, Gershey EL, Allfrey VG (1968). Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J Biol Chem.* **243**, 6361-6366.
- Viola J, Soehnlein O (2015). Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. *Semin Immunol.* **27**, 184-193.
- Violi F, Pignatelli P, Pignata C, Plebani A, Rossi P, Sanguigni V, Carnevale R, Soresina A, Finocchi A, Cirillo E, Catasca E, Angelico F, Loffredo L (2013). Reduced atherosclerotic burden in subjects with genetically determined low oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **33**, 406-412.
- Violi F, Sanguigni V, Carnevale R, Plebani A, Rossi P, Finocchi A, Pignata C, De Mattia D, Martire B, Pietrogrande MC, Martino S, Gambineri E, Soresina AR, Pignatelli P, Martino F, Basili S, Loffredo L (2009). Hereditary deficiency of gp91(phox) is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study. *Circulation.* **120**, 1616-1622.
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* **282**, 2131-2135.
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E (2008). Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev.* **129**, 261-270.
- Waddington CH (1959). Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature.* **183**, 1654-1655.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**, 45-65.
- Walther C, Mobius-Winkler S, Linke A, Bruegel M, Thiery J, Schuler G, Halbrecht R (2008). Regular exercise training compared with percutaneous intervention leads to a reduction of inflammatory markers and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* **15**, 107-112.
- Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmítko P, Li RK, Mickle DA, Verma S (2003). C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* **107**, 1783-1790.
- Wang HD, Johns DG, Xu S, Cohen RA (2002). Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282**, H1697-1702.

- Wang P, Ba ZF, Chaudry IH (1994). Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol.* **266**, H2535-2541.
- Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C (2014). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature.* **505**, 117-120.
- Wang XL, Adachi T, Sim AS, Wilcken DE (1998). Plasma extracellular superoxide dismutase levels in an Australian population with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **18**, 1915-1921.
- Wang Z, Zheng H, Chen H, Lin X, Chen J, Wang L, Bao W, Lin X, Huang M, Luo Z (2015). Elevated serum Angiopoietin-like protein 2 in patients with acute coronary syndrome. *Arch Med Res.* **46**, 257-264.
- Warburton DE, McKenzie DC, Haykowsky MJ, Taylor A, Shoemaker P, Ignaszewski AP, Chan SY (2005). Effectiveness of high-intensity interval training for the rehabilitation of patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* **95**, 1080-1084.
- Warren TY, Barry V, Hooker SP, Sui X, Church TS, Blair SN (2010). Sedentary behaviors increase risk of cardiovascular disease mortality in men. *Med Sci Sports Exerc.* **42**, 879-885.
- Weber C, Noels H (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* **17**, 1410-1422.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* **39**, 457-466.
- Wei CM, Moss B (1977). Nucleotide sequences at the N6-methyladenosine sites of HeLa cell messenger ribonucleic acid. *Biochemistry.* **16**, 1672-1676.
- Wei Y, Yang CR, Wei YP, Zhao ZA, Hou Y, Schatten H, Sun QY (2014). Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 1873-1878.
- Weitzman SA, Turk PW, Milkowski DH, Kozlowski K (1994). Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 1261-1264.
- Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP, Wu X (2011). Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet.* **378**, 1244-1253.
- Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhofer J, Muller J, Hortmann M, Oelze M, Schulz E, Treiber N, Kawamoto T, Scharffetter-Kochanek K, Munzel T, Burkle A, Bachschmid MM, Daiber A (2008). Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc Res.* **80**, 280-289.
- Williams K, Christensen J, Helin K (2012). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* **13**, 28-35.
- Wind S, Beuerlein K, Armitage ME, Taye A, Kumar AH, Janowitz D, Neff C, Shah AM, Winkler K, Schmidt HH (2010). Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension.* **56**, 490-497.
- Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum O, Haram PM, Tjonna AE, Helgerud J, Slordahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen O, Skjaerpe T (2007). Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate

- continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation*. **115**, 3086-3094.
- Wohlfart P, Xu H, Endlich A, Habermeier A, Closs EI, Hubschle T, Mang C, Strobel H, Suzuki T, Kleinert H, Forstermann U, Ruetten H, Li H (2008). Antiatherosclerotic effects of small-molecular-weight compounds enhancing endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *J Pharmacol Exp Ther*. **325**, 370-379.
- Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. **28**, 32-40.
- Wu H, Zhang Y (2011). Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev*. **25**, 2436-2452.
- Wu Q, Ni X (2015). ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr Drug Targets*. **16**, 13-19.
- Wu SC, Zhang Y (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**, 607-620.
- Xia N, Daiber A, Habermeier A, Closs EI, Thum T, Spanier G, Lu Q, Oelze M, Torzewski M, Lackner KJ, Munzel T, Forstermann U, Li H (2010). Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. **335**, 149-154.
- Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, Guo ZM (2004). Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res*. **95**, 1075-1081.
- Yang H, Zhou L, Wang Z, Roberts LJ, 2nd, Lin X, Zhao Y, Guo Z (2009). Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. **207**, 51-58.
- Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. **38**, 662-674.
- Yara S, Lavoie JC, Beaulieu JF, Delvin E, Amre D, Marcil V, Seidman E, Levy E (2013). Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *PLoS One*. **8**, e63456.
- Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG (2004). Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res*. **64**, 1975-1986.
- Yiew KH, Chatterjee TK, Hui DY, Weintraub NL (2015). Histone Deacetylases and Cardiometabolic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **35**, 1914-1919.
- Yoshida T, Oka S, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J (2003). The role of thioredoxin in the aging process: involvement of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. **5**, 563-570.
- Yoshinaga T, Shigemitsu T, Nishimata H, Takei T, Yoshida M (2015). Angiotensin-like protein 2 is a potential biomarker for gastric cancer. *Mol Med Rep*. **11**, 2653-2658.
- Yoshioka J (2015). Thioredoxin Reductase 2 (Txnrd2) Regulates Mitochondrial Integrity in the Progression of Age-Related Heart Failure. *J Am Heart Assoc*. **4**.
- You T, Arsenis NC, Disanzo BL, Lamonte MJ (2013). Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity : current evidence and potential mechanisms. *Sports Med*. **43**, 243-256.

- Yu C, Luo X, Duquette N, Thorin-Trescases N, Thorin E (2015). Knockdown of angiotensin-like-2 protects against angiotensin II-induced cerebral endothelial dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **308**, H386-397.
- Yu C, Luo X, Farhat N, Daneault C, Duquette N, Martel C, Lambert J, Thorin-Trescases N, Rosiers CD, Thorin E (2014). Lack of angiotensin-like-2 expression limits the metabolic stress induced by a high-fat diet and maintains endothelial function in mice. *J Am Heart Assoc.* **3**.
- Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG (2009). Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* **35**, 426-432.
- Zaina S, Lindholm MW, Lund G (2005). Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? *J Nutr.* **135**, 5-8.
- Zee BM, Levin RS, Xu B, LeRoy G, Wingreen NS, Garcia BA (2010). In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J Biol Chem.* **285**, 3341-3350.
- Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, Lodish HF (2006). Angiotensin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* **12**, 240-245.
- Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Zhang S, Fulda KG, Gonzalez K, Vishwanatha JK, Morabia A, Santella RM (2011). Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. *Epigenetics.* **6**, 293-299.
- Zhang Y, Wang H, Zhou D, Moody L, Lezmi S, Chen H, Pan YX (2015). High-fat diet caused widespread epigenomic differences on hepatic methylome in rat. *Physiol Genomics.* **47**, 514-523.
- Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedoresak P, Huang CM, Li CJ, Vagbo CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, Lu Z, Bosmans RP, Dai Q, Hao YJ, Yang X, Zhao WM, Tong WM, Wang XJ, Bogdan F, Furu K, Fu Y, Jia G, Zhao X, Liu J, Krokan HE, Klungland A, Yang YG, He C (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell.* **49**, 18-29.
- Zheng J, Umikawa M, Cui C, Li J, Chen X, Zhang C, Huynh H, Kang X, Silvany R, Wan X, Ye J, Canto AP, Chen SH, Wang HY, Ward ES, Zhang CC (2012). Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature.* **485**, 656-660.
- Zhong J, Agha G, Baccarelli AA (2016). The role of DNA methylation in cardiovascular risk and disease: methodological aspects, study design, and data analysis for epidemiological studies. *Circ Res.* **118**, 119-131.
- Zhou J, Wang J, Wu S, Zhu S, Wang S, Zhou H, Tian X, Tang N, Nie S (2014). Angiotensin-like protein 2 negatively regulated by microRNA-25 contributes to the malignant progression of colorectal cancer. *Int J Mol Med.* **34**, 1286-1292.
- Zilberman D (2007). The human promoter methylome. *Nat Genet.* **39**, 442-443.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA (2002). Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* **109**, 817-826.