

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

ANNEE 2011

N°

THESE

Pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Discipline : Physiologie et Pharmacologie Cardiovasculaire

Soutenue publiquement le 9 décembre 2011

par

Sébastien SALIQUES

Né le 7 septembre 1982 à Villefranche sur Saône

**ETUDE DE LA LONGUEUR DES TELOMERES ET DU
TRANSCRIPTOME LEUCOCYTAIRE
CHEZ DES PATIENTS EN PHASE AIGUE DE L'INFARCTUS DU
MYOCARDE**

Thèse co-dirigée par Mr le Professeur Luc ROCHETTE et Mme le Dr Marianne ZELLER

JURY :

M. le Professeur Patrick DURIEZ

M. le Professeur Athanase BENETOS

M. le Professeur Nicolas MENEVEAU

M. le Professeur Jean Raymond TEYSSIER

M. le Professeur Luc ROCHETTE

Mme le Docteur Marianne ZELLER

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur

Co-Directeur

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales (LPPCE, dirigé par Monsieur le Professeur **Luc ROCHETTE**). Je le remercie d'avoir dirigé ce travail. Je le remercie de m'avoir accueilli dans son équipe, de m'avoir permis de réaliser mon internat dans les meilleures conditions et de m'avoir fait profiter, non seulement de ses grandes connaissances et de son expertise scientifique, mais également de sa grande ouverture d'esprit et de ses qualités humaines. Ses conseils m'ont toujours guidé et encouragé dans cette filière et je tiens à lui exprimer mon plus profond respect.

Je remercie Madame le Docteur **Marianne ZELLER**, co-directrice de thèse. Je tiens à la remercier pour ses remarques et ses encouragements tout au long de ce travail. Je la remercie également pour ses précieux conseils en statistiques et en méthodologie. Je la remercie pour ses qualités humaines et son soutien, qu'elle trouve ici l'expression de mon plus grand respect et de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur **Patrick DURIEZ**, d'avoir accepté d'être rapporteur de mon manuscrit de thèse et de prendre de son temps précieux pour me faire part de son expertise dans le domaine. Qu'il trouve ici mes plus sincères remerciements et mon plus profond respect.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur **Athanase BENETOS**, d'avoir également accepté d'examiner mon travail de thèse en tant que rapporteur de mon manuscrit de thèse. Ses travaux ont toujours été pour moi une profonde source d'inspiration et de motivation. Je le remercie ici vivement une nouvelle fois et lui témoigne toute ma gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur **Nicolas MENEVEAU**, de sa participation pour ce jury de thèse. C'est pour moi un très grand honneur de compter parmi ce jury, un des praticiens les plus renommés de la cardiologie française. Qu'il trouve ici le témoignage de ma grande admiration.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Jean-Raymond TEYSSIER**, d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je le remercie de m'avoir soutenu et aidé tout au long de ces années de thèse. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance et mon plus profond respect pour ses idées, encouragements et ses conseils avisés qui m'auront permis de progresser et apprendre jour après jour.

Je tiens à remercier Madame le Professeur **Catherine VERGELY-VANDRIESSE**. Je la remercie pour ses conseils et ses encouragements mais également pour sa rigueur scientifique, sa disponibilité et son écoute. Qu'elle trouve ici mon plus profond respect et toute ma gratitude.

Je tiens à remercier Le Docteur **Frédéric LIRUSSI**, qui m'a apporté son soutien, ses connaissances et son expérience tout au long de mon internat. Merci de nous avoir fait partager tes passions tant sportives que culinaires. Merci de ton soutien dans les instants les plus durs et de tes encouragements dans les moments de faiblesse. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi. Je tiens à te témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance.

Je remercie le Docteur **Sébastien AMOUREUX**. Je le remercie pour avoir été un de mes mentors et de m'avoir appris beaucoup tant sur le plan scientifique qu'associatif. Je le remercie aussi pour ses qualités d'interne et la formation qu'il m'a donnée. Sans toi, mes gardes auraient été tout à fait différentes. Merci mon ami.

Je remercie également le Docteur **Matthieu PESANT**, qui m'a soutenu et encouragé dans les instants les plus durs et m'a apporté énormément tant sur le plan professionnel que personnel. Je sais que nous finirons par travailler ensemble à l'avenir. Merci mon ami, je connais tes talents en recherche et ai toute confiance en ton avenir.

Je remercie aussi le Docteur **Pierre SICARD**. Je le remercie de m'avoir parrainé à mes débuts et d'avoir fortement contribué à l'initiation de ce travail. Merci mon ami, je sais que nous aurons l'occasion de nous revoir pour collaborer à nouveau.

Je remercie le futur Docteur **Tarik HADI**. Je le remercie pour son aide, sa bonne humeur et son grand esprit scientifique. Son soutien a été sans faille et, même si je n'ai aucun doute quant à la très grande qualité de ta thèse, je te souhaite bonne chance pour la suite et saches que je ne serai jamais loin si tu as besoin.

Je remercie également **Clémentine PTASINSKI**. Je la remercie pour son soutien indéfectible et sa bonne humeur permanente. Je n'ai aucun doute sur tes capacités et j'aurais toujours confiance en toi. Je suis fier de la future interne que tu feras. Garde confiance en toi à chaque instant et sache que je ne serai jamais très loin si tu as toi aussi besoin. Je te souhaite de réussir dans toutes tes entreprises et je n'en doute pas. Merci pour ta complicité, ta joie de vivre et d'avoir pris ma relève.

Je tiens à remercier l'équipe du Laboratoire de Génétique Moléculaire du CHU de Dijon, dirigé par Monsieur le Professeur **Jean-Raymond TEYSSIER**. Je les remercie pour leur aide et leurs conseils, en particulier **Anne DONZEL-JAVOUHEY** et **Sylvianne RAGOT**, pour leur expertise, leur disponibilité et leur bonne humeur permanente.

Je tiens à remercier l'équipe du RICO pour son travail exemplaire et leur aide précieuse dans la réalisation de ce travail, en particulier **Anne-Cécile LAGROST** et **Julianne BERCHOUD**. Je les remercie d'avoir pris grand soin de mes « petits tubes de sang ».

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du LPPCE qui m'ont soutenu et aidé tout au long de ce travail, en particulier **Julie LORIN** et **Ahmed HABBOUT** pour m'avoir supporté dans le même bureau, Madame **Françoise BECHET-ARNOS**, mais aussi **Aurélié, Carole, Maeva, Franck, Karim, Marina** pour leur aide au cours de ces années et je leur souhaite bon courage pour la suite.

Je remercie également l'ensemble des **internes du CHU de Dijon** que j'ai pu côtoyer au cours de ces années, votre bonne humeur et votre aide m'auront été d'un grand réconfort. J'ai été fier de vous représenter durant ces deux dernières années et je vous souhaite bonne chance pour la suite de votre cursus.

A mes frères Christophe, Stéphane et Emmanuel, à ma très chère sœur Evelyne, qui ont traversé avec moi tant d'épreuves et qui ont toujours su m'encourager et me soutenir,

A mes chères belles-sœurs Aurélia, Raphaëlle, Constance et Caroline, mes beaux-frères Gilles, César et Nicolas.

A mes neveux et nièces, Samuel, Romane, Enzo et Lilas, et les futurs....

A mes beaux-parents, qui m'ont accueilli en leur sein et soutiennent à chaque instant,

Je les remercie pour leur affection indéfectible.

Aux deux amours de ma vie,

Ma tendre Jeanne, tu as toujours été là quand j'en avais besoin et su me donner la force d'avancer dans les instants les plus sombres. Tu as toujours su me redonner espoir et confiance en moi. Je te remercie de tout mon cœur,

Ma fille Victoire, tu me donnes chaque seconde envie de me surpasser pour te rendre fière. Tu es ma plus grande fierté et le moteur de mon existence.

Chaque seconde à vos côtés me rend la vie plus douce....

Je vous dédie cette thèse.

Table des matières

I.	Introduction	5
A.	Les télomères	6
	Localisation et fonction des structures télomériques	7
	Régulation de la longueur des télomères	7
B.	Approches méthodologiques	11
	Supports biologiques pour l'estimation de la longueur des télomères	12
	Méthodes de mesure de la longueur des télomères	13
C.	Longueur des télomères et maladies cardiovasculaires	14
	Longueur des télomères et facteurs de risques cardiovasculaire	15
	Longueur des télomères et traitements	18
	Stress oxydatif, inflammation et télomères	19
II.	Objectifs	29
III.	Matériels et Méthodes	31
A.	L'obseRvatoire des Infarctus de Côte-d'Or RICO et population de l'étude	32
B.	Recueil des données épidémiologiques	32
C.	Recueil des données biologiques	33
D.	Mesure de la longueur des télomères leucocytaires (LTL)	33
E.	Extraction des acides ribonucléiques messagers (ARNm) et quantification des transcrits des gènes <i>c-Fos</i> et <i>OGG1</i>	35
F.	Définition des groupes	36
	Analyse en fonction de la prise de statine avant IDM	36
	Analyse en fonction du statut tabagique	36
G.	Analyse statistique	37
	Analyse en fonction de la prise de statine avant IDM	37
	Analyse en fonction du statut tabagique	38
IV.	Résultats	39
A.	Influence des statines sur la longueur des télomères leucocytaires chez des patients en phase aiguë de l'infarctus du myocarde	41
B.	Evolution du niveau de transcription de <i>c-Fos</i> en fonction du statut tabagique chez des patients souffrant de pathologies coronaires	53
V.	Discussion	60
1.	Longueur des télomères leucocytaires et statines	61
2.	Déterminants de la longueur des télomères leucocytaires	63
C.	Niveau d'expression de <i>c-Fos</i> et athérosclérose	65
D.	<i>c-Fos</i> et tabac	66
VI.	Conclusions générales/Perspectives	68
VII.	Références	72
VIII.	Liste des Figures et des Tableaux	80
IX.	Annexes	81

Liste des abréviations et des acronymes

8-oxodG	= 8-oxodéoxyguanosine	MMLV	= Murine moloney leukemia virus
ADO	= Antidiabétique oral	NF-κB	= Nuclear factor κB
ADN	= Acide désoxyribonucléique	OGG1	= oxoguanine glycosylase 1
AP-1	= Activator Protein 1	Pb	= Paire de bases
ARN	= Acide ribonucléique	PI3K	= Phosphoinositol 3 kinase
ASC	= Aire sous la courbe	Q-PCR	= Quantitative polymerase chain reaction
Atf	= Activation transcription factor	Rad54	= Homologue eukaryote de la protéine 54 RecA
ATM	= Ataxia telangiectasia mutated kinase	RB	= Rétinoblastome
BPCO	= Broncho-pneumopathie chronique obstructive	RICO	= Observatoire des infarctus de Côte d'Or
bZIP	= Basic leucine zipper	ROC	= Receiver-operating characteristic
cDNA	= ADN complémentaire	ROS	= Reactive oxygen species
<i>c-fos</i>	= Finkel-Biskis-Jinkins murine osteogenic sarcoma virus.	RT	= Reverse transcription
c-jun	= jun proto-oncogène	SCA	= Syndrome coronarien aigu
CRP	= Protéine C réactive	STEMI	= IDM avec sus décalage du segment ST
CT	= Cholestérol total	TERC	= Telomerase RNA component
Ct	= Cycle threshold	TERRA	= TelRNA = ARN télomériques
DC	= Dyskératose Congénitale	TERT	= Telomerase reverse transcriptase
DNMT	= DNA méthyltransferase	TG	= Triglycérides
ECG	= Electrocardiogramme	TIN2	= TRF1-interacting nuclear protein 2
FdR CV	= Facteurs de risques cardiovasculaires	TNF-α	= Tumor necrosis factor α
FEVG	= Fraction d'éjection ventriculaire gauche	TRAF1	= TNF receptor-associated factor 1
GAPDH	= Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase	TRAF2	= TNF receptor-associated factor 2
HbA1c	= Hémoglobine glyquée	TRF	= Terminal restriction fragment
HDL-C	= High density lipoprotein cholesterol	TRF2	= TATA binding protein related factor 2
HMG-CoA	= Hydroxy-méthyl-glutaryl coenzyme A	USIC	= Unité de soins intensifs cardiologiques
IDM	= Infarctus du myocarde	VLDL	= Very low density lipoprotein
IEC	= Inhibiteur de l'enzyme de conversion	WOSCO	= West of Scotland Coronary Prevention Study
IL	= Interleukine		
IMC	= Indice de masse corporelle		
LDL-C	= Low density lipoprotein cholesterol		
LTL	= Longueur des télomères leucocytaires		

I. Introduction

La pathologie athéromateuse avec ses complications cardio-vasculaires reste aujourd'hui une des principales causes de décès dans les pays développés. Dans la plupart des pays occidentaux, l'amélioration de la prise en charge des patients à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde (IDM) apparaît évidente mais l'ampleur endémique du diabète et de l'obésité ainsi que le vieillissement croissant de la population sont des situations nouvelles qui ont en partie compensé cette amélioration. Dans ce contexte, les bio-marqueurs de la maladie athéromateuse occupent une place importante. Ils doivent fournir des informations sur la physiopathologie et doivent également orienter les stratégies thérapeutiques. Basée sur de solides arguments, l'utilisation de ces marqueurs fait aujourd'hui partie intégrante de l'adaptation de la prise en charge de l'IDM [1, 2]. Ainsi, les bio-marqueurs jouent un rôle majeur dans l'évaluation et la prise en charge des patients atteints d'IDM. En complément des indices cliniques, ils permettent non seulement d'identifier mais aussi de stratifier les patients selon leur niveau de risque. La multiplication du nombre de nouveaux bio-marqueurs potentiels a conduit à la mise en place d'approches systématiques de leur évaluation en clinique humaine, pour tester leur utilité au-delà de celle des outils cliniques préexistants.

Dans ce travail, nous nous proposerons tout d'abord de dresser l'état des lieux concernant deux nouveaux bio-marqueurs circulants d'intérêt croissant dans le domaine cardiovasculaire :

1. La longueur des télomères leucocytaires
2. Le niveau d'expression leucocytaire du proto-oncogène c-Fos.

Dans une seconde partie, nous présenterons les résultats de nos travaux sur ces deux bio-marqueurs appréciés sur les leucocytes circulants au cours de la phase aiguë de l'IDM. Enfin, nous proposerons une réflexion issue de nos travaux sur les intérêts et les limites de ces marqueurs biologiques en pratique clinique.

A. Les télomères

Elizabeth BLACKBURN, Jack SZOSTAK et Carol GREIDER ont récemment été nobélisés pour leurs travaux sur l'élucidation de la structure et le maintien des télomères. Leurs travaux ont été à l'origine de multiples découvertes sur la biologie des télomères et leur implication dans de nombreuses pathologies.

Initialement, les télomères ont été suggérés comme pouvant jouer un rôle dans les pathologies humaines lorsqu'une mutation du gène DKC1 a été détectée dans une forme rare d'insuffisance médullaire appelé Dyskératose Congénitale. Cette pathologie aboutit dans la majorité des cas à une pancytopenie parfois fatale, des insuffisances hépatiques, une fibrose pulmonaire et de nombreuses atteintes vasculaires thrombotiques [3, 4]. Il a également été démontré que la présence de

télomères courts dans les leucocytes circulants était associée à certains types de cancers colorectaux suggérant que la perte de l'intégrité des télomères pourrait engendrer une plus grande instabilité génomique et contribuer au processus tumoral [5]. Le raccourcissement des télomères c'est-à-dire la télotomie est ensuite apparue associée à un grand nombre de pathologies liées au vieillissement comme les maladies cardiovasculaires [6]. Ce point sera développé ultérieurement au cours de cette introduction.

Localisation et fonction des structures télomériques

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques situées à l'extrémité des chromosomes des cellules eucaryotes. Ils permettent la reconnaissance de la terminaison de l'ADN double brin et la préservation de l'intégrité et de la stabilité du génome au cours de sa réplication [7, 8]. Les télomères sont constitués d'une répétition d'un motif de six bases azotées riche en Guanine (TTAGGG). Ce motif est répété sur plusieurs milliers de paires de bases (pb) à l'extrémité 3' de l'ADN (4 à 15 kilos bases (kb) chez l'homme). Dans la plupart des cellules somatiques humaines, la longueur des télomères diminue à chaque division cellulaire de 20 à 200 pb. Cette perte de matériel génétique correspond au phénomène appelé « *problème de fin de réplication* ». L'attrition des télomères, si elle n'est pas réparée, aboutit à terme à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort de la cellule par apoptose [9]. La synthèse d'ADN télomérique nécessite l'activité de complexes enzymatiques spécialisés : **les télomérases**. Ces complexes sont constitués de diverses protéines (TRAF1, TRAF2, Ku86, TIN2, etc.) [10] (Figure 1). Leur fonction consiste à accroître la longueur des télomères par la synthèse de deux motifs supplémentaires TTAGGG à leur extrémité. Typiquement, l'activité des télomérases est réduite, voire absente, au sein des cellules somatiques adultes, à l'exception des populations cellulaires à fort potentiel de division, comme les lymphocytes activés et certains types de cellules souches [11, 12].

Régulation de la longueur des télomères

Le maintien de la longueur des télomères dépend de plusieurs facteurs, la composition en protéines associées, le niveau du stress oxydant dans l'environnement des télomères et le niveau d'activation des télomérases, et la longueur des télomères eux-mêmes [7, 8, 13]. C'est pourquoi la longueur des télomères est très variable d'une espèce à l'autre et d'un individu à l'autre. De plus, il semble que la longueur des télomères soit potentiellement influencée par certains facteurs génétiques liés notamment au chromosome X [14].

Régulation dépendante des télomérases

L'activité des télomérases semble correspondre à l'un des paramètres clés du maintien de l'intégrité des télomères. En effet, les cellules présentant des télomères courts et une absence d'activité

télomérase entrent plus facilement en sénescence et en apoptose que les cellules présentant des télomères suffisamment longs qui ne requièrent pas d'activité télomérase pour survivre [9, 10]. Inversement, des cellules présentant des déficits en **TERC** (ARN complémentaire du motif télomérique), **TERT** (transcriptase inverse du complexe télomérase) et autres protéines nécessaires au fonctionnement des télomérases, en l'occurrence des lignées primaires de lymphocytes B et T issues de patients atteints de Dyskératose Congénitale (DC), peuvent voir leur activité télomérase rétablie et la longueur de leurs télomères accrue par transfection de TERC exogène [15] (Figure 1).

Par ailleurs, le rôle de la protéine Rad54, impliquée dans la réparation de l'ADN, a été récemment mis en évidence dans la régulation de la longueur des télomères. En effet, les souris déficientes en Rad54 présentent une attrition importante de leurs télomères, et ce en l'absence d'une modification de l'activité des télomérases [16]. Ceci tend à démontrer que la protéine Rad54 est impliquée dans un mécanisme de maintien de l'intégrité des télomères indépendant des télomérases (Figure 1).

La régulation de la longueur des télomères dépend également du niveau de méthylation de certaines histones associées aux régions subtélomériques, à savoir les histones H3 et H4. En effet, la méthylation de ces histones diminue l'accessibilité des séquences télomériques et donc diminue l'activité des télomérases [17]. Ainsi, les protéines jouant un rôle dans la régulation de ces méthylations répercutent leurs effets sur la longueur des télomères. Par exemple, les protéines de la famille des rétinoblastomes (RB), en favorisant le recrutement de diverses méthylases, permettent d'augmenter la méthylation des régions subtélomériques (en particulier au niveau des histones H4) et donc de diminuer la longueur des télomères [18]. À l'inverse, la protéine Rbl2, un répresseur de l'activité des DNA méthyltransférases (DNMTs) responsables de la méthylation des régions subtélomériques, permet une régulation positive de la longueur des télomères [19, 20].

Il a été démontré qu'il existait des ARN télomériques appelés TERRA ou TelRNAs, transcrits par la RNA polymérase II. Ces transcrits d'ARN télomérique auraient un impact négatif sur la longueur des télomères [21, 22]. Enfin, un des mécanismes majeurs d'attrition de la longueur des télomères est l'activité des exonucléases 5'-3' [13, 23, 24]. En effet, ces exonucléases ont pour rôle de dégrader l'amorce d'ARN utilisée au cours de la réplication de l'ADN nécessaire à l'activité de l'ADN polymérase. Cette dégradation crée des lésions où l'ADN est présent sous la forme monobrin au sein de la boucle de réplication. Cette présence d'ADN monobrin ne permet pas la formation de fragments d'Okazaki, ni donc l'élongation de l'ADN, mais peut conduire à une augmentation :

1. des dommages de l'ADN,
2. du risque de fusion des extrémités des chromosomes [25],
3. de l'activation des réponses p53 dépendantes de l'ADN endommagé [26].

The diagram illustrates the telomerase holoenzyme complex and its regulation. The complex consists of the protein subunit hTERT and the RNA subunit TERC, along with several associated proteins: TRAF1, TIN2, TRAF2, TRF2, Ku86, Rad 54, ATM, C-Fos, and C-Jun. The holoenzyme is shown adding telomeric DNA repeats (GGGTTAAGGGTTACGGT and CCCAAUCCCA) to a DNA strand. The diagram also shows the role of DNMT in methylating H3 and H4 histones, and the involvement of Rb proteins in this process.

Voie alternative d'élargissement des télomères

Un point cependant mérite d'être abordé en ce qui concerne certaines cellules capables de se diviser normalement, dépourvues d'activité télomérase avec une espérance de vie semblable à celle des cellules exprimant la télomérase. En effet, environ 85 % des cellules cancéreuses humaines surexpriment l'activité télomérase en devenant immortelles, faisant ainsi un axe de recherche majeur dans les thérapies anticancéreuses [27]. Cependant 15 % des cellules cancéreuses sont capables de se diviser sans activité télomérase en utilisant un mécanisme de maintien de la longueur des télomères alternatif couramment appelé ALT pour « Alternative Lengthening telomeres » [28, 29].

Cette voie alternative d'élargissement de la longueur des télomères sans intervention de la télomérase reste encore méconnue cependant, plusieurs théories sont actuellement suggérées pour expliquer ce phénomène. Ce qui est connu actuellement sur ce sujet est que ce type de cellules présente certaines caractéristiques phénotypiques par rapport à une cellule normale. En effet, les cellules ALT+ présentent une forte proportion de structures circulaires d'ADN télomériques double brins appelée « t-circle » [30] et des structures circulaires partiellement double brins appelées C-circle [31]. D'autre part, il semble que les phénomènes de recombinaison de l'ADN soient plus fréquents au sein des cellules ALT+ que dans les cellules présentant une activité télomérase. Deux théories sur l'élargissement de la longueur des télomères par un mécanisme alternatif à la télomérase sont alors possibles :

1. L'échange asymétrique de chromatides sœurs entre télomères ou unequal Telomere sister chromatid exchange (T-SCE). Ce mécanisme résulte en la ségrégation de tous les télomères les plus longs dans une même cellule fille au cours des divisions cellulaires alors que la seconde hérite des télomères les plus courts. Cette différence de longueur de télomères s'expliquerait par une réparation des fourches de réplifications rompues d'un télomère par le matériel du télomère de sa chromatide sœur [32, 33].
2. La recombinaison homologue dépendante de la réplification de l'ADN. L'élargissement de la longueur des télomères résulte dans ce cas présent en une recombinaison passant par la synthèse de nouveaux motifs télomériques en utilisant comme modèle de copie la séquence télomérique d'un chromosome adjacent [34]. Mais ce mécanisme pourrait également fonctionner en utilisant comme modèle de copie non pas la séquence télomérique d'un autre chromosome mais également les structures « t-circle », « C-circle » ou les boucles télomériques formées à leur extrémité par le repli de l'ADN sur lui-même appelées « t-loop » [35].

Il est à noter que la voie alternative d'élongation de la longueur des télomères reste un mécanisme récessif par rapport à celui de la télomérase. En effet, si les deux possibilités coexistent au sein de la même cellule, la voie de la télomérase sera toujours privilégiée, suggérant qu'il existe certains mécanismes de régulation visant à inhiber cette voie alternative [36]. Certains auteurs suggèrent que les protéines TRF2 et POT1 pourraient être impliquées dans ces phénomènes [37, 38] en diminuant les risques de recombinaisons.

Processus de « trimming » ou rétrocontrôle de l'élongation de la longueur des télomères

La longueur des télomères est donc régulée en cas d'attrition trop importante afin de préserver l'intégrité du génome. Cependant, il semble que la longueur des télomères soit également régulée en cas d'allongement trop important. En effet, lorsque les cellules voient leur activité télomérase fortement augmentée ou si les cellules activent la voie alternative d'élongation des télomères, un mécanisme de rétrocontrôle est activé. Il s'agit du « trimming » des télomères. Ce mécanisme a initialement été démontré au sein de cellules tumorales modifiées, les cellules HeLa, par Pickett en 2009 [39]. Au cours de cette étude, il a été mis en évidence que les cellules présentant des télomères fortement allongés par une activation artificielle des télomérases, présentaient des longueurs de télomères non homogènes et la présence de « t-circle » en grande quantité comme dans le cas des cellules ALT+. Le mécanisme qui sera proposé dans ce cas est un raccourcissement de la longueur des télomères les plus longs par la formation de « t-circle » via les boucles terminales des chromosomes, les « t-loop ». Cette étude suggéra également que les complexes MRN et XRCC3 seraient impliqués dans ce phénomène. Très récemment, ces travaux ont été confirmés par la même équipe mais cette fois au sein de lymphocytes activés [40]. Le mécanisme mis en jeu reste cependant spéculatif même si les opportunités thérapeutiques semblent prometteuses (diminution de la longueur des télomères des cellules cancéreuses entraînant leur mort cellulaire, modification de la valeur seuil afin de préserver la longueur des télomères de certains types cellulaires comme les cardiomyocytes en complément d'une activation des télomérases).

B. Approches méthodologiques

La mesure de la longueur des télomères peut être réalisée sur différents types supports biologiques et par des approches expérimentales différentes. Ce paragraphe sera donc consacré aux différents types de supports biologiques disponibles afin de mesurer la longueur de télomères dans un contexte d'étude clinique ainsi qu'aux deux techniques les plus utilisées à l'heure actuelle dans un contexte d'étude clinique.

Supports biologiques pour l'estimation de la longueur des télomères

La mesure de la longueur des télomères peut être réalisée sur tout type de support biologique (tissus, cellules circulantes, progéniteurs et cellules souches). Cependant, pour des raisons éthiques ou techniques, certains supports ne sont que peu (ou pas) utilisés en pratique courante.

Dans la majorité des études cliniques actuelles, la mesure de la longueur des télomères est estimée par la détermination de la longueur des télomères leucocytaires (LTL). Ce type de mesure ne reflète pas forcément la « dynamique » des télomères des tissus réellement concernés par la pathologie, qui peuvent être le myocarde ou encore les vaisseaux coronaires. Cependant, ce qui semble à l'heure actuelle être accepté est le fait que, même si la longueur des télomères des différents types cellulaires n'est pas équivalente [41], la cinétique de raccourcissement semble équivalente. Ainsi, dans de nombreux travaux, la longueur des télomères a été appréciée par l'étude de la LTL. Cette méthode présente deux avantages :

- l'obtention des échantillons est facilitée par une simple prise de sang et permet ainsi une investigation peu invasive
- l'utilisation universelle de la LTL permet une certaine forme de standardisation des études étant donné la forte variabilité inter et intra individuelle de la mesure de la longueur des télomères tissulaires en fonction de l'organe étudié.

Ainsi, la LTL a été utilisée comme un marqueur de substitution de choix à la longueur des télomères tissulaires dans un grand nombre d'études humaines visant à apprécier les répercussions sur la LTL de différentes pathologies chroniques comme les maladies cardiovasculaires.

Les travaux de Wilson et *al.* ont permis de répondre en partie à cette question. Il a été montré une relation significative entre la longueur des télomères leucocytaires et la longueur des télomères au sein du tissu vasculaire, provenant de prélèvement d'anévrisme ascendant d'aortes humaines [42].

Enfin, les travaux de Wong et *al.* parus très récemment ont eu pour but de déterminer si la LTL pouvait également être un reflet de la longueur des télomères dans des cellules non circulantes n'appartenant pas aux diverses cellules de la paroi vasculaire en utilisant des cellules buccales. Cette étude a permis de mettre en évidence que, bien que les longueurs des télomères entre les cellules circulantes et les cellules buccales ne soient pas équivalentes, la cinétique d'attrition des télomères en fonction des différents types cellulaires était équivalente [43]. L'accès à ce support biologique étant facile et peu invasif, il pourrait constituer un support intéressant à l'avenir.

Méthodes de mesure de la longueur des télomères

Il existe différentes techniques afin de mesurer la longueur des télomères.

1. L'hybridation sur réplique ou Southern Blot sur les télomères préalablement isolés.
2. L'utilisation d'un procédé d'amplification in vitro de l'ADN, la PCR quantitative. Elle permet de dénombrer les répétitions coiffant les chromosomes, et d'identifier les bases terminales de l'ADN.
3. L'hybridation in-situ de fluorescence (Q-FISH)
4. L'adaptation du Q-FISH en cytométrie de flux (Flow-FISH)
5. L'analyse de l'élongation d'un seul télomère (STELA)

Mesure de la longueur des télomères par Southern Blot

Il s'agit de la plus ancienne des techniques de mesure de la longueur des télomères, développée en 1990. Elle permet d'estimer le nombre moyen de répétitions terminales portées par l'ensemble des chromosomes. Il s'agit de la méthode la plus largement utilisée.

L'hybridation *in situ* sur réplique sert à caractériser des fragments de restrictions portant des répétitions TTAGGG. Elle consiste à digérer l'ADN télomérique par un ou plusieurs enzymes de restriction puis, les fragments de restrictions sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse en milieu gélifié. Les fragments sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon qui portera une réplique de la position des fragments dans le gel. L'ADN est alors dénaturé, fixé et hybridé avec une sonde radioactive. La position des fragments est alors révélée par radiographie faisant apparaître une ou plusieurs bandes noires. La taille des fragments terminaux est estimée par comparaison entre la distance qu'ils ont parcourue dans le gel et celle couverte par des fragments de longueur connue.

Cette technique présente l'avantage de déterminer la longueur de n'importe quel télomère, quelle que soit sa taille, mais présente l'inconvénient d'être une technique longue, fastidieuse et mettant en jeu l'utilisation de sondes radioactives qui ne sont pas accessibles à toutes les équipes de recherche.

Q-FISH

Il s'agit d'une méthode histochimique basée également sur l'hybridation. Cependant, contrairement au Southern Blot, la sonde n'est pas radioactive mais fluorescente. Cependant, cette méthode n'est que partiellement utilisée car elle requiert une importante quantité d'ADN (entre 2 et 20 µg contre quelques ng pour les techniques basées sur la PCR), ce qui est souvent incompatible avec la majorité des études épidémiologiques de grande taille.

Mesure de la longueur des télomères par PCR quantitative

Il s'agit de l'une des techniques de mesure de la longueur des télomères les plus récentes proposée en 2003 [44]. Elle fournit une mesure précise du nombre de répétitions coiffant les chromosomes. Elle consiste en la détermination par PCR quantitative du nombre de copies du motif télomérique (T) par rapport à un gène simple copie (S) sous la forme d'un ratio (T/S). Le test PCR permet une utilisation plus rapide et aisée dans les études de cohortes.

Flow-FISH

La technique Flow-FISH est une adaptation de la technique Q-FISH utilisant un cytomètre en flux. Cette technique présente l'avantage de déterminer la longueur moyenne d'une population de cellules beaucoup plus aisément et rapidement que la technique Q-FISH. Cependant le coût et l'infrastructure que nécessite cette méthode ralentit son essor même si de plus en plus d'équipes de recherche tendent à s'en équiper. De plus cette technique présente le double avantage de diminuer les étapes de purifications et d'analyser la longueur des télomères dans différents types cellulaires simultanément.

STELA

Cette technique est basée sur l'analyse de l'élongation d'un seul télomère [45]. Elle est également basée sur une mesure PCR, conduisant à une meilleure résolution que la technique Southern Blot. De plus, comme cette technique est basée sur la liaison d'une amorce spécifique, il est possible de mesurer la longueur d'un télomère spécifique (par exemple la longueur des télomères de la paire de chromosomes 21).

Cependant, les techniques basées sur des mesures PCR ne peuvent amplifier des télomères de plus de 25 kb, favorisant ainsi la mesure des télomères les plus courts. Or, dans le cas de la voie alternative d'élongation des télomères, il est possible d'observer des télomères de plus de 50 kb, rendant inutilisables les techniques PCR au profit du Southern Blot.

C. Longueur des télomères et maladies cardiovasculaires

Une réduction et/ou perte des fonctions des cellules constituant le myocarde ou les vaisseaux sont à l'origine de l'installation aiguë et chronique des dysfonctions qui sont observées lors d'un vieillissement normal ou pathologique [46, 47]. Du fait de leur attrition graduelle, en fonction du nombre de cycles cellulaires, les télomères représentent des marqueurs de la sénescence cellulaire [9, 48, 49] en particulier pour les cellules du système cardiovasculaire comme les cellules endothéliales [50].

Indépendamment de l'âge, les télomères seraient impliqués dans l'initiation et/ou la progression des maladies cardiovasculaires. Ainsi, les travaux de Brouillette *et al.* [51] et de Samani *et al.* [52] ont montré que les patients souffrant d'une pathologie coronaire ou d'un infarctus du myocarde précoce présentaient des télomères plus courts que des sujets témoins du même âge et du même sexe [53]. Cette relation a été confirmée par d'autres études [53-55], sans qu'il soit toutefois possible de déterminer si la modification de la longueur des télomères est une cause ou une conséquence de l'apparition de la pathologie coronaire.

Les pathologies coronaires apparaissent, dans bien des cas, dans un contexte d'athéromatose et de sénescence cellulaire, qui font l'objet d'une attention particulière depuis de nombreuses années [47, 56, 57]. Il a été suggéré que la longueur des télomères, au sein des cellules vasculaires, jouerait un rôle déterminant dans le développement des pathologies coronaires, par la mise en place d'un phénotype particulier de sénescence des cellules musculaires lisses et endothéliales [47, 54, 58]. Brouillette *et al.* [59], au sein d'une étude cas-témoin portant sur 104 sujets (45 présentant des antécédents familiaux de pathologie coronaire et 59 sujets témoins), a montré une association entre les antécédents familiaux de pathologies coronaires et le raccourcissement de la longueur des télomères. Ces résultats suggèrent que la présence de télomères courts constituerait l'une des anomalies primaires des pathologies coronaires athéromateuses.

Longueur des télomères et facteurs de risque cardiovasculaires

Age et hérédité

La relation qui existe entre le raccourcissement de la longueur des télomères et le vieillissement a déjà été établie et retrouvée dans de nombreuses études [60-62]. De même, il est clairement établi que la longueur des télomères leucocytaires est un caractère héréditaire dont la composante paternelle semble plus importante [63-66]. Cependant, au fur et à mesure du vieillissement du sujet, l'influence de l'hérédité s'estompe au profit d'une plus grande influence d'autres facteurs environnementaux ou psychosociaux qui seront abordés par la suite [67, 68]. De plus, il semble que la cinétique d'attrition des télomères ne suive pas une dynamique simple. En effet, au cours du vieillissement, la cinétique de la longueur des télomères ne se résume pas à une simple attrition graduelle mais résulte en une succession de phases de raccourcissement, de stase voire d'élongation [62].

De ce fait, bien que l'âge soit un acteur important de l'attrition télomérique et que la longueur des télomères d'un sujet reste quel que soit l'âge corrélée à leur longueur initiale déterminée par l'hérédité, la longueur des télomères au cours de la vie d'un sujet dépend pour beaucoup de son mode de vie et de son environnement.

Tabac

La consommation de tabac est un des facteurs de risques cardiovasculaires majeurs engendrant stress oxydant et inflammation. Ces deux phénomènes participant activement à l'atteinte des télomères humains, plusieurs études se sont penchées sur l'influence que pourrait avoir le statut tabagique sur la longueur des télomères. En effet, le tabagisme en accroissant le stress oxydant favorise l'attrition télomérique. L'une d'entre elles réalisée par Valdes *et al.*, portant sur une population féminine de 1122 sujets, a démontré une association significativement négative entre la longueur des télomères leucocytaires, le passé tabagique des sujets ($r=-0,087$), ainsi que l'index de masse corporelle (IMC) ($r=-0,077$) [69]. L'étude de Morlà *et al.* en 2006 a également confirmé les résultats de Valdes *et al.* de 2005 sur l'effet négatif du tabac sur la longueur des télomères leucocytaires. L'étude préliminaire de Morlà avait pour but de préciser l'influence du tabac sur la longueur des télomères leucocytaires dans l'apparition de broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) (50 fumeurs contre 26 non-fumeurs). Les résultats obtenus n'ont toutefois pas montré de différence significative de la longueur des télomères leucocytaires entre les sujets atteints ou non par une BPCO. Ils ont cependant confirmé les résultats de Valdes *et al.* en démontrant que l'exposition tabagique augmentait l'attrition des télomères leucocytaires ($r=-0,45$) [70]. De même, les travaux de Babizayev ont montré que la longueur des télomères leucocytaires pourrait être considérée comme un marqueur cumulatif du stress oxydant, notamment en lien avec le tabac, chez un individu donné [71].

Statut hormonal et genre

Il est également bien connu que le sexe masculin est en relation avec une augmentation des risques de survenue d'une complication cardiovasculaire. En ce sens, de nombreuses études ont montré que la longueur des télomères leucocytaires des sujets de sexe masculin était plus faible que celle des femmes [51, 72-75]. Cependant, cette augmentation du risque cardiovasculaire chez les hommes par rapport aux femmes tend à disparaître lorsque ces dernières atteignent la ménopause [72, 76]. Cette observation suggère qu'il pourrait exister une influence non négligeable des hormones sur les mécanismes de régulation de la longueur des télomères. En effet, un traitement par du cortisol sur des cellules en culture réduit leur activité télomérase [77], des taux importants d'aldostérone sont en relation avec une attrition télomérique majorée [78] et une déficience ovarienne a été démontré comme associée à une réduction de la longueur des télomères et de l'activité télomérase [79].

Mode de vie

Comme cela a précédemment été énoncé, la dynamique de la longueur des télomères est plus complexe qu'une simple attrition graduelle en fonction de l'âge. En effet, outre les précédents facteurs de risques énoncés précédemment, d'autres peuvent jouer un rôle non négligeable sur la

régulation de la longueur des télomères. Leur importance est bien souvent négligée bien qu'ils présentent l'intérêt d'influencer la longueur des télomères de manière négative mais également positive. Lin et *al.* ont très clairement passé en revue l'ensemble de ces facteurs composant le mode de vie de l'individu dont ce paragraphe sera un bref résumé [80].

- **Stress et facteurs psychosociaux**

Il a été démontré par exemple qu'un stress dans l'enfance d'un sujet pouvait influencer négativement sur la longueur de ses télomères dans le futur. C'est le cas des enfants ayant subi une maltraitance [81, 82] mais également des femmes ayant eu un enfant issu d'un viol [83]. De plus, les mères d'enfants régulièrement malades [67] ou les épouses de sujets Alzheimer [84], présentent des télomères plus courts que les sujets contrôles. Enfin, un syndrome dépressif ou post traumatique semble également en rapport avec une dégradation de l'intégrité des télomères leucocytaires [85]. Ce qui est cependant extrêmement important est qu'une prise en charge adéquate de ces différents stress délétères pour la biologie des télomères pourrait contribuer à améliorer l'espérance de vie en bonne santé de ces sujets.

- **Nutrition et obésité**

Un mode de vie délétère se compose toujours d'une prise alimentaire inappropriée. Ainsi, de nombreuses études ont montré que les taux plasmatiques les plus élevés de vitamine D [86] étaient en relation avec des télomères leucocytaires plus grands, que les taux d'homocystéine, qui est un facteur de risque de type métabolique, apparaissent négativement corrélés à la longueur des télomères leucocytaires [87].

Quant au risque que constitue l'obésité, l'association entre l'IMC et la longueur des télomères a été confirmée par les travaux de Nordfjäll *et al.* en 2008 ; une association négative entre l'IMC et la longueur des télomères leucocytaires étant retrouvée chez les femmes mais curieusement pas chez les hommes ($r=-0,106$) [74].

- **Exercice physique**

L'exercice physique quant à lui, représente un facteur positif facilement influençable de la longueur des télomères. En effet, une activité physique durant son temps libre est en relation avec des télomères plus longs [88] et une diminution du stress et l'attrition télomérique est retrouvée chez les femmes pratiquant en moyenne 75 minutes d'activité physique intense [89].

Diabète

Cette pathologie présente comme caractéristique d'avoir de nombreuses complications cardiovasculaires par atteinte de la microcirculation et une augmentation des phénomènes

d'athérosclérose en lien avec une augmentation du statut inflammatoire et oxydant des sujets atteints. Il semble que les sujets atteints d'un diabète de type 2 présentent des télomères leucocytaires plus courts que les sujets sains [90] alors que dans le cas des sujets atteints d'un diabète de type 1 cette relation semble épisodiquement non retrouvée [91]. Cependant, il semble que la présence de télomères plus courts chez les diabétiques de type 1 soit en relation avec un risque de mortalité, toutes causes confondues, majoré [91].

Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle a également été mise en relation avec une atteinte de la longueur des télomères. Les sujets hypertendus présentent des télomères plus courts que des sujets sains [92]. De plus, Benetos et al. [93] ont examiné la relation existant entre la longueur des télomères leucocytaires et l'athérosclérose des artères carotides chez 163 sujets traités pour hypertension artérielle. Cette étude a montré que la longueur des télomères leucocytaires était significativement réduite chez les sujets hypertendus présentant une plaque carotidienne vs ceux n'en ayant pas (8.17 ± 0.07 vs. 8.46 ± 0.07 kb; $p < 0.01$). Enfin, lors de cette même étude, une analyse multivariée a révélé que, en addition de l'âge, la longueur des télomères leucocytaires prédisait la présence de d'athérosclérose carotidienne.

Longueur des télomères et traitements

Il existe à l'heure actuelle peu de données concernant les possibles stratégies thérapeutiques possibles pouvant permettre une protection de la longueur des télomères ou une élongation de ceux-ci dans le cadre des maladies cardiovasculaires. Cependant, les statines, qui inhibent l'HMG-CoA réductase, réduisent les taux de LDL circulants diminuant ainsi le risque de formation de LDL oxydée favorisant l'athérosclérose [94].

De récentes données, en particulier dans le cadre de l'étude WOSCOPS, ont montré que les statines pourraient avoir un effet bénéfique sur la biologie des télomères, contribuant ainsi, en complément de leur effet hypolipémiant, à préserver l'intégrité de la paroi des vaisseaux des patients à risque, en diminuant la sénescence des cellules constitutives [53, 95]. De plus, il a été démontré que les statines prévenaient l'érosion des télomères de cultures *ex-vivo* de cellules endothéliales de sujets sains ou après 12 mois de traitement intensif par statine de sujets présentant des atteintes coronaires [96, 97]. Nous reprendrons dans la présentation des résultats de notre travail cette relation entre « dynamique » des télomères et traitement par les statines chez des patients présentant un IDM.

Une autre classe pharmacologique semble posséder certaines propriétés bénéfiques sur la biologie des télomères en augmentant l'activité de la télomérase. Il s'agit des antidiabétiques oraux et plus particulièrement la Pioglitazone [98]. Au cours d'une étude récente, Werner et al. ont montré que

cette molécule pouvait augmenter l'activité de la télomérase, réduire les marqueurs de sénescence cellulaire, stimuler la production de protéines stabilisatrices des télomères et diminuer le stress oxydant induit par le LPS sur ces cellules vasculaires. De plus leurs travaux ont permis de suggérer que ce mécanisme de protection des télomères passerait par une up-régulation de TERT.

Actuellement aucune autre classe thérapeutique (fibrates, AINS dont aspirine, corticoïdes, bêtabloquants, insuline, Inhibiteurs de l'enzyme de conversion, antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II etc...) n'a été mise en relation avec un quelconque effet sur la biologie des télomères.

Ainsi, ces différentes molécules ouvrent une piste thérapeutique dans la prévention primaire précoce des maladies cardiovasculaire en agissant directement sur l'un des acteurs du vieillissement cellulaire vasculaire.

Stress oxydatif, inflammation et télomères

Stress oxydatif et atteintes de l'ADN

L'inflammation chronique et le stress oxydant associé représentent des caractéristiques essentielles des pathologies cardiovasculaires. Or, le stress oxydant radicalaire est considéré actuellement comme l'un des acteurs des mécanismes impliqués dans le raccourcissement de la longueur des télomères. En effet, une atteinte oxydative de l'ADN se traduit par la formation d'un adduit de la guanine, la 8-oxo guanine (8-oxodG), qui participe à l'initiation des altérations dans le maintien de la longueur des télomères. Cet adduit oxydé de la guanine est alors, en conditions physiologiques normales, excisé par l'oxoguanine glycosylase 1 (OGG1).

Cette enzyme appartient au complexe de réparation par excision de base (ou BER pour Base excision repair). Il s'agit d'un mécanisme de réparation d'un dommage au niveau d'une base de l'ADN. Un dommage est réparé par simple élimination de la base, suivi du clivage du désoxyribose, puis d'une nouvelle synthèse. Ce complexe est composé de différentes glycosylases spécifiques d'un certain type de base. Dans ce processus, une ADN glycosylase élimine la base endommagée et une endonucléase clive le désoxyribose. Une ADN polymérase remplit à nouveau l'espace libéré en utilisant la base opposée comme matrice. Enfin, une ADN ligase suture le brin réparé. Donc, même si une seule base est endommagée, une série d'enzymes différentes sont nécessaires pour assurer une réparation correcte. La dernière étape de ce processus est également utilisée pour la réparation de simples cassures de la chaîne d'ADN. Le système BER fait intervenir la protéine XRCC1 qui place le système enzymatique à l'endroit où doit se positionner l'ADN glycosylase.

Les espèces réactives de l'oxygène ou Reactive Oxygen Species (ROS), et tout spécialement le radical hydroxyle, induisent des cassures de l'ADN et des altérations de la réparation des bases de l'ADN [99]. Contrairement à l'ensemble du reste du génome, les télomères ne semblent pas pourvus des capacités de réparation de ces cassures monobrin de l'ADN [100]. De ce fait, les télomères sont spécialement sensibles à l'accumulation d'adduits oxydés de la guanine [101, 102]. Cette susceptibilité à l'oxydation des télomères a été mise en évidence dans deux études réalisées par Oikawa *et al.* La première étude en 1999 [103] portait sur l'exposition d'ADN issu de thymus de veau à de l'H₂O₂ associé à du Cu(II). Les résultats démontraient l'existence de lésions préférentielles de l'ADN au niveau de triplet 5'-GGG-3'. La seconde étude, de 2001 [104], a précisé que l'exposition de fibroblastes aux UVA induisait également des dommages accrus objectivés par la présence de 8-oxodG au niveau des télomères. Or, la présence de bases non appariées au sein de la séquence télomérique, interfère avec les mécanismes de réplication de l'ADN nécessaires au maintien de l'intégrité de ses structures. Le stress oxydant, si son niveau est majoré par saturation des mécanismes de défenses anti-oxydantes endogènes, induirait donc un raccourcissement prématuré des télomères indépendamment de l'âge [105]. L'incapacité des télomères à assurer la réparation de l'ADN oxydé amplifierait les dommages causés par les ROS. Petersen *et al.* [100] ont démontré que les lésions provoquées par le peroxyde d'hydrogène étaient lentement réparées, et ce de manière incomplète au niveau des télomères, contrairement au niveau des mini-satellites. Une des hypothèses avancées est que la liaison du TRF2 au niveau des télomères empêcherait l'accès aux enzymes de réparation de l'ADN [106, 107]. De plus, le TRF2 interagit avec la polymérase β , qui agit négativement sur la réparation des dommages de l'ADN [107], et inhibe la phosphorylation de l'ATM kinase intervenant dans les processus d'initiation de réparation de l'ADN [108].

Un point important qui doit toujours être souligné est la concomitance *in-vivo* entre une production accrue d'espèces radicalaires, et le développement d'un processus inflammatoire [109, 110]. Dans ce cadre, les cytokines pro-inflammatoires peuvent agir directement sur l'attrition des télomères. En effet, plusieurs études ont montré que l'activité des télomérases était inversement corrélée au TNF- α . Le TNF- α , par activation des deux facteurs de transcription NF- κ B et AP-1, est responsable de l'augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires [111-113]. Dans ce cadre, les études de Beyne-Rauzy *et al.* [111, 112] ont précisé que la diminution de longueur des télomères, induite par l'exposition de cellules à du TNF- α , mettait en jeu une régulation négative du niveau d'expression de TERT.

Messagers intracellulaires de l'inflammation et télomères

Le facteur de transcription AP-1 pourrait jouer un rôle négatif sur l'intégrité des structures télomériques. Les complexes AP-1 appartiennent à la famille des *basic leucine zipper* (bZIP), et sont

impliqués dans la régulation d'une multitude de processus cellulaires incluant les phénomènes de prolifération et de survie cellulaires, de différenciation, d'apoptose, de migration cellulaire et de transformation cellulaire. Ils présentent une séquence de liaison spécifique à l'ADN et se structurent en divers homo- ou hétéro-dimères formés par *jun* (*c-Jun*, *junB*, *junD*), *fos* (*c-Fos*, *fra-1*, *fra-2*) ou les protéines de la famille *atf*. Souvent, l'augmentation de la transcription d'AP-1 est associée à une augmentation de la transactivation de gènes d'expression cible. La régulation de l'activité d'AP-1 est cruciale pour le sort de la cellule et dépend de nombreux paramètres comme la composition du dimère, les événements transcriptionnels et post-transcriptionnels et les interactions avec d'autres protéines accessoires [114]. Or, il a été démontré que l'induction de la transcription de *c-Fos* pouvait être réalisée par certaines espèces radicalaires dérivées de l'oxygène [115]. De plus, *c-Fos* a été montré comme particulièrement exprimé au sein des monocytes circulants de patients athéromateux. *c-Fos* a été un des premiers composants d'AP-1 identifié comme pouvant jouer un rôle capital dans l'inflammation et la calcification qui s'inscrivent dans le processus athéromateux *via* les molécules chemo-attractives régulées par ce complexe [116-118]. De récentes études ont montré que le niveau de transcription de *c-Fos* pouvait être considéré comme un marqueur plus pertinent que la CRP ultra-sensible dans l'athérosclérose sévère, même si son utilité en pratique clinique reste peu explorée [118, 119]. Néanmoins, une étude récente vient apporter un début de réponse à ce sujet. En effet, les travaux de Kang *et al.* ont montré que l'utilisation d'une thérapie par statine était en mesure de réduire significativement le niveau de transcription de *c-Fos*, et ce indépendamment du niveau de LDL-Cholestérol [120]. Ceci suggère que le niveau de *c-Fos* pourrait être un marqueur de l'activité des statines, indépendant de leur action, sur le niveau lipidique des sujets et pourrait « représenter » une nouvelle cible expliquant une partie des effets pléiotropes de ce type de thérapeutique.

Etant donné que *c-Fos* semble impliqué dans le processus athéromateux, le processus inflammatoire, et que celui-ci est activé par les espèces radicalaires de l'oxygène, il est probable que certains facteurs de risques cardiovasculaires comme le tabac puissent agir sur ce messager. En effet, il apparaît que le gène *c-Fos* est spécialement exprimé au niveau des poumons des sujets fumeurs [121] et que, les cellules musculaires lisses d'aortes de rats adultes ou les fibroblastes de l'adventice exposés à la nicotine, exercent un effet prolifératif sur des cellules vasculaires par augmentation de la synthèse d'ADN par l'angiotensine II et l'expression de *c-Fos* [122].

Les deux gènes précédemment cités, OGG1 et *c-Fos*, pourraient donc intervenir dans les processus de maintien de l'intégrité du génome, en particulier celui des télomères, et de réponse adaptée de la cellule face à un phénomène inflammatoire et son stress oxydant associé. Leurs niveaux d'actions potentiels sont représentés de manière schématique dans la figure 2.

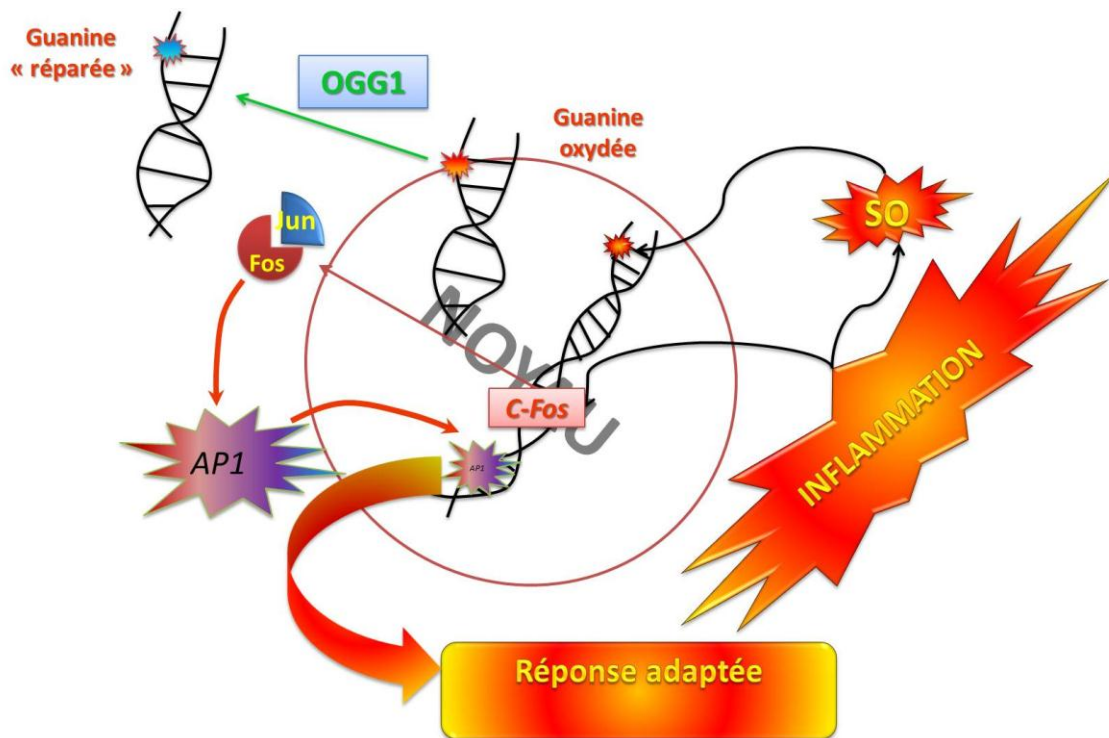


Figure 2: Représentation schématique des niveaux d'intervention des gènes *c-Fos* et OGG1 dans le maintien de l'intégrité du génome télomérique et de l'homéostasie cellulaire liée à une atteinte inflammatoire

Les rappels que nous venons de développer ont fait l'objet d'une revue parue dans Archives of Cardiovascular Diseases en 2010 intégrée dans ce document (pages 23-28).



Available online at
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com



REVIEW

Telomere length and cardiovascular disease

Longueur des télomères et maladies cardiovasculaires

Sébastien Saliques^{a,*}, Marianne Zeller^{a,b},
Julie Lorin^a, Luc Lorgis^{a,b},
Jean-Raymond Teyssier^{a,c}, Yves Cottin^{a,b},
Luc Rochette^a, Catherine Vergely^a

^a IFR Santé-STIC, UFR de médecine et pharmacie, laboratoire de physiopathologie et pharmacologie cardiovasculaires expérimentales (LPPCE), université de Bourgogne, 7, boulevard Jeanne-d'Arc, 21000 Dijon, France

^b Service de cardiologie, CHU de Dijon, 21000 Dijon, France

^c Laboratoire de génétique moléculaire, CHU de Dijon, 21000 Dijon, France

Received 1st June 2010; received in revised form 19 August 2010; accepted 21 August 2010
Available online 25 October 2010

KEYWORDS

Telomere;
Cardiovascular
diseases;
Cardiovascular risk
factors;
Oxidative stress

Summary Telomeres are structures composed of deoxyribonucleic acid repeats that protect the end of chromosomes, but shorten with each cell division. They have been the subject of many studies, particularly in the field of oncology, and more recently their role in the onset, development and prognosis of cardiovascular disease has generated considerable interest. It has already been shown that these structures may deteriorate at the beginning of the atherosclerotic process, in the onset and development of arterial hypertension or during myocardial infarction, in which their length may be a predictor of outcome. As telomere length by its nature is a marker of cell senescence, it is of particular interest when studying the lifespan and fate of endothelial cells and cardiomyocytes, especially so because telomere length seems to be regulated by various factors notably certain cardiovascular risk factors, such as smoking, sex and obesity that are associated with high levels of oxidative stress. To gain insights into the links between telomere length and cardiovascular disease, and to assess the usefulness of telomere length as a new marker of cardiovascular risk, it seems essential to review the considerable amount of data published recently on the subject.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abbreviations: 8-oxodG, 8-oxo-7,8-dihydroguanine; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; DNA, deoxyribonucleic acid; Rad54, eukaryotic homologue of the prokaryotic RecA protein 54; RNA, ribonucleic acid; ROS, reactive oxygen species; TERC, telomerase ribonucleic acid component; TERT, telomerase reverse transcriptase; TRF2, TATA binding protein-related factor 2.

* Corresponding author. Fax: +33 3 80 39 32 93.

E-mail address: sebastien.saliques@gmail.com (S. Saliques).

1875-2136/\$ — see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

doi:10.1016/j.acvd.2010.08.002

MOTS CLÉS

Télomère ;
Maladies
cardiovasculaires ;
Facteurs de risque
cardiovasculaires ;
Stress oxydatif

Résumé Les télomères sont des structures nucléoprotéiques protégeant l'extrémité des chromosomes, et dont la longueur est susceptible de se raccourcir au cours des divisions cellulaires. Ils ont fait l'objet de très nombreuses études, particulièrement dans le domaine de la cancérologie mais depuis peu, un intérêt croissant est porté sur leur rôle dans l'installation, le développement et le pronostic des maladies cardiovasculaires. En effet, il a déjà été démontré que ces structures sont potentiellement altérées au cours de l'installation du processus athéromateux, dans l'initiation et le développement de l'hypertension artérielle ou encore au cours de l'infarctus du myocarde pour lequel leur longueur pourrait jouer un rôle pronostique. Comme la longueur des télomères constitue par nature un marqueur de la sénescence cellulaire, leur intérêt est certain lorsque l'on étudie l'espérance de vie et le devenir des cellules endothéliales et des cardiomyocytes. De plus, la longueur des télomères semble régulée par différents facteurs, notamment certains facteurs de risque cardiovasculaires comme la consommation de tabac, le genre ou encore l'obésité pour laquelle un stress oxydatif important est rencontré. Pour cela, il est intéressant de réaliser un bilan bibliographique sur les nombreuses données récentes concernant la longueur des télomères dans le cadre des pathologies cardiovasculaires et ainsi d'apprécier leur intérêt en tant que nouveau marqueur de susceptibilité cardiovasculaire.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Background

The length of telomeres, which are located at the ends of chromosomes, reflects the lifespan of a cell. Telomere length decreases with each cell division and this process is necessary for appropriate DNA replication in eukaryotes. The regular shortening of telomere length will eventually lead to exposure of the genome and trigger the expression of proteins involved in apoptosis. These events make up the phenomenon called cellular senescence. Cellular senescence is associated with the onset and development of certain diseases. In this context, it is interesting to explore telomere "dynamics" in ischaemic and non-ischaemic cardiovascular diseases, and to determine whether these structures could be potential pharmacological targets (destroyed to treat a tumour or restored in the case of heart failure to preserve the integrity of myocardial cells).

Telomere biology

Location and function of telomeres

Telomeres are composed of nucleotides and are located at the end of chromosomes in eukaryotic cells. They cap the termination of the double strands of DNA and thus preserve the integrity and stability of the genome during replication [1]. Telomeres are made up of a repetitive sequence of six nitrogenous bases rich in guanine (TTAGGG). This sequence is repeated over several thousand base pairs at the 3' end of DNA (4 to 15 kilobases in humans). In most human somatic cells, the length of the telomeres decreases by 20 to 200 base pairs with each cell division. This loss of genetic material corresponds to the phenomenon called "the end replication problem". If this shortening of telomeres is not repaired, it eventually leads to cessation of the cell cycle and cell death by apoptosis [2]. The synthesis of telomere DNA requires the activity of specialized enzyme complexes: telomerases. These complexes are made up of

various proteins (TRAF1, TRAF2, Ku86, TIN2, etc.) [3]. Their function is to lengthen telomeres by the synthesis of two supplementary TTAGGG sequences at their ends. Typically, telomerase activity is diminished or even absent in most adult somatic cells, the exception being cells with a strong potential for division, like active lymphocytes and certain types of stem cells [4].

Regulation of telomere length

The maintenance of telomere length depends on several factors, including the composition in associated proteins, the level of oxidative stress and the level of telomerase activation as well as telomere length itself [1,5]. This is why telomere length varies considerably from one species to another and from one individual to another. Moreover, it seems that telomere length may be affected by certain genetic factors, notably linked to chromosome X [6]: this was shown in a study by Nawrot et al. in 2004 involving a cohort of families.

Telomerase activity, however, seems to be one of the key elements in the maintenance of telomere integrity. Indeed, cells with short telomeres and an absence of telomerase activity become senescent and go into apoptosis more quickly than do cells with telomeres that are long enough not to require telomerase activity to survive [2,3]. Inversely, some cells are deficient in TERC, TERT and other proteins necessary for telomerase function. This is illustrated by the transfection of primary B and T lymphocytes from patients with dyskeratosis congenita with exogenous TERC, which restored telomerase activity and increased telomere length [7].

Moreover, the role of the Rad54, which is involved in DNA repair, in the regulation of telomere length was brought to light recently. Indeed, Rad54-deficient mice presented severe telomere shortening, and this in the absence of any modification in telomerase activity [8]. These findings tend to show that Rad54 protein is involved in a mechanism

that maintains the integrity of telomeres independently of telomerases.

The regulation of telomere length also depends on the level of methylation of certain histones, namely histones H3 and H4, associated with subtelomeric regions. The methylation of these histones decreases access to telomere sequences and thus diminishes telomerase activity [9]. Therefore, proteins that play a role in the regulation of these methylations have an impact on telomere length. For example, proteins of the retinoblastoma family increase the methylation of subtelomeric regions and thus diminish telomere length [10]. In contrast, retinoblastoma protein 2, which depresses the activity of DNA methyltransferase, responsible for the methylation of subtelomeric regions, plays a role in increasing telomere length [11,12].

The existence of telomeric RNA (called TERRA or TelRNA), which is transcribed by RNA polymerase II, has been shown recently. These telomeric RNA transcriptions may have a negative impact on telomere length [13]. Finally, one of the major mechanisms of telomere shortening is the activity of exonucleases 5'-3' [5,14]. Indeed, the role of these exonucleases is to degrade the RNA primer used in the replication of the DNA necessary for DNA polymerase activity. This deterioration creates lesions in which the DNA is in the single strand form within the replication loop. The presence of single-strand DNA prevents the formation of Okazaki fragments and thus elongates the DNA, but can lead to an increase in: damage to DNA; the risk of fusion of chromosome extremities [15]; and the activation of p53-dependent responses to DNA damage [16].

The maintenance of telomere length within eukaryotic cells is thus a complex phenomenon that involves a wide range of factors. Several mechanisms acting in a synergistic fashion thus appear to stabilize telomere length. The different mechanisms mentioned above involved in the regulation of telomere length are shown schematically in Fig. 1.

Oxidative stress

One of the principal mechanisms involved in telomere shortening is represented by the level of free radical oxidative stress. Oxidative damage to telomeric DNA appears as the formation of an adduct of guanine, 8-oxodG, which is involved in the initiation of disturbances in the maintenance of telomere length. Moreover, ROS, and especially the hydroxyl radical, induce breaks in DNA and deteriorate DNA base repair [17]. Unlike the rest of the genome, telomeres seem to be unable to repair breaks in single-strand DNA [18]. Because of this, telomeres are particularly sensitive to the accumulation of the guanine oxide adduct [19]. This sensitivity to oxidation in telomeres was revealed by Oikawa et al. in two studies. The first, in 1999 [20], concerned the exposure of DNA from calf thymus to hydrogen peroxide associated with copper (II). The results showed the presence of DNA lesions especially at the level of the 5'-GGG-3' triplet. The second study, in 2001 [21], showed that the exposure of fibroblasts to ultraviolet A also induced damage, highlighted by the presence of 8-oxodG localized at telomeres. Moreover, the presence of non-matched bases within the telomeric sequence interferes with the DNA replication mechanisms necessary for the maintenance of structure

integrity. Oxidative stress may thus induce premature shortening of telomeres independently of age [22]. Telomeres are unable to repair oxidized DNA, which therefore accentuates the damage caused by ROS. Petersen et al. [18] showed that lesions caused by hydrogen peroxide were repaired slowly and incompletely at the level of the telomeres, which is not the case at the level of the mini-satellites. One of the hypotheses put forward is that TRF2 binding at the level of the telomere could prevent DNA repair enzymes from reaching the site [23]. Moreover, TRF2 interacts with polymerase β and thus has a potential negative effect on the repair of DNA damage [23]. TRF2 also inhibits ataxia telangiectasia mutated kinase phosphorylation, which is involved in the initiation process of DNA repair [24].

One important point, which must always be underlined, is the *in vivo* concomitance between increased production of ROS and the development of an inflammatory process [25]. In this context, the proinflammatory cytokines produced can cause telomere shortening directly. In this field, several studies have shown that telomerase activity correlated inversely with levels of tumour necrosis factor alpha. The latest, via the activation of two transcription factors (nuclear factor-kappa B and activator protein 1), is responsible for an increase in the expression of proinflammatory genes [26,27]. In this context, the studies of Beyne-Rauzy et al. [26] showed that the reduction in telomere length induced by exposure of cells to tumour necrosis factor alpha brought about a negative regulation in the level of expression of human TERT.

Telomeres and cardiovascular disease in humans

A reduction in and/or loss of function in cells that make up the myocardium or vessels is at the root of both acute and chronic onset of dysfunction that occurs during normal or pathological ageing [28]. Because they shorten gradually according to the number of cell cycles, telomeres can be considered markers of the cellular senescence [29].

Atherothrombosis and cardiovascular risk factors

Independently of age, telomeres may be involved in the initiation and/or progression of cardiovascular disease. The studies of Brouillette et al. [30] and Samani et al. [31] showed that patients with CAD or early myocardial infarction had shorter telomeres compared with control subjects of the same age and sex [32]. This relationship was confirmed in other studies [32,33], although it was not possible to determine whether the shortening of telomere length was a cause or a consequence of the onset of the CAD. The aim of these studies was to determine telomere length in circulating cells, such as white cells, which does not necessarily reflect telomere "dynamics" in tissues that are affected directly by the disease (e.g., the myocardium and the coronary vessels). Recently, a study by Wilson et al. answered this question in part; they showed a significant relationship between telomere length in leukocytes and telomere length in vascular tissues, in this case in vascular cells from a human ascending aorta aneurysm [34].

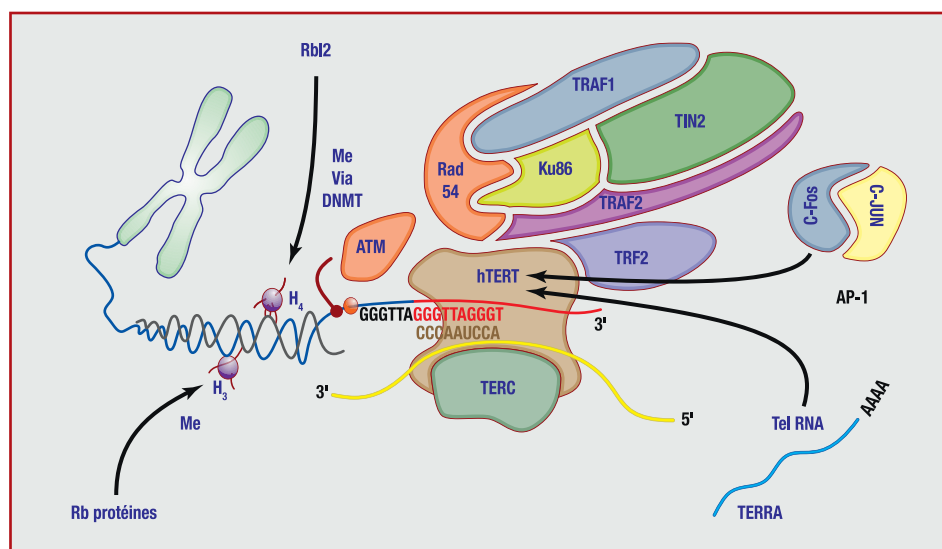


Figure 1. Schematic representation of telomere structure in the eukaryotic cell and the principal mechanisms involved in the regulation (positive or negative) of telomere length. AP-1: activator protein 1; ATM: ataxia telangiectasia mutated; c-Fos: cellular proto-oncogene belonging to the immediate early gene family of transcription factors; c-Jun: a gene, which in combination with c-Fos, forms the AP-1 early response transcription factor; DNMT: DNA methyltransferase; h-TERT: human telomerase reverse transcriptase; Me: methyl; Rad54: eukaryotic homologue of the prokaryotic RecA protein 54; Rb: retinoblastoma; RbL2: retinoblastoma protein 2; RNA: ribonucleic acid; TERC: telomerase RNA component; TERRA or TelRNA: telomeric RNA; TIN2: TATA binding protein-related factor 1 (TRF1)-interacting nuclear protein 2; TRAF1: tumour necrosis factor receptor-associated factor 1; TRAF2: tumour necrosis factor receptor-associated factor 2; TRF2: TATA binding protein-related factor 2.

In many cases, CAD appears in the context of atherothrombosis and cellular senescence, both of which have been the subject of many studies in recent years [28]. It has been suggested that telomere length in vascular cells may play a critical role in the development of CAD, by setting up a particular phenotype of senescence in smooth muscle cells and endothelial cells [28,33]. Brouillette et al. [35], in a case-control study of 104 subjects (45 presenting with a family history of CAD and 59 control subjects), showed an association between a family history of CAD and telomere shortening. These results suggest that the presence of short telomeres is a principal anomaly in atherosclerotic coronary diseases. With regard to hypertensive patients, a recent study showed that such patients had shorter telomeres than healthy subjects [36].

Other cardiovascular risk factors also appear to be associated significantly with leukocyte telomere length in humans. In a cohort of 1122 women, Valdes et al. showed a significant negative association between leukocyte telomere length, a history of smoking ($r = -0.087$) and BMI ($r = -0.077$) [37]. As for metabolic-type risk factors, it appears that the level of homocysteine correlates negatively with leukocyte telomere length. This was studied by Richards et al. in 2008 in a cohort of 1319 subjects [38]. Concerning the effect of smoking, the study by Morla et al. in 2006 [39] confirmed the results of Valdes et al. in 2005 [37] on the negative effect of smoking on leukocyte telomere length. The aim of the preliminary study by Morla et al. was to determine the impact of smoking on leukocyte telomere length in the onset of chronic obstructive pulmonary disease (50 smokers vs 26 non-smokers). The results, however, showed no difference in leukocyte telomere length between subjects with chronic obstructive pulmonary disease and those without. They confirmed the results of Valdes et al. by showing that

exposure to cigarette smoke shortened leukocyte telomeres ($r = -0.45$). With regard to the risk induced by obesity, the association between BMI and telomere length was confirmed recently in a study by Nordfjall et al. in 2008 [40]. There was a negative association between BMI and leukocyte telomere length in women but not in men ($r = -0.106$).

Going beyond the hypothesis that telomere shortening could be involved in the onset and development of CAD, recent studies have shown that telomere length is also associated with increased mortality, independently of other cardiovascular risks factors in patients with stable CAD [41]. This suggests that, on the one hand, telomere length could be used in risk stratification, and on the other hand, leukocyte telomere length is a marker that incorporates a wide range of environmental and genetic factors, which alone or in combination cause cellular stress. One study has shown that telomere length, although correlating with mortality, was in no way associated with other markers such as C-reactive protein, BMI or the taking of supposedly protective treatments such as inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (statins) [41]. These results, however, are not in keeping with other recently published studies [32,37].

To summarize, at the present time, it is still difficult to define with any degree of certainty the role of telomeres in and the impact of telomere length on the atherosclerotic process. It is, however, accepted that the degree of telomere shortening is related to the likelihood of developing atherosclerotic plaques and is a predictor of mortality in CAD patients.

Heart failure

Another field of interest for the study of telomere length in CAD is chronic or ischaemic heart failure. Indeed, cer-

tain studies have tended to show that patients presenting with chronic heart failure have shorter leukocyte telomeres than do healthy subjects (ratio T/S respectively 0.64 vs 1.05, $p < 0.001$). In addition, this association seems to be more marked in more severe forms of heart failure, according to the study of Van der Harst et al. [42]. Moreover, telomere length was inversely proportional to the grade of heart failure according to the New York Heart Association classification (ratio T/S of 0.67 for grade II, 0.63 for grade III and 0.55 for grade IV, $p < 0.05$). These studies also showed that the presence of ischaemic aetiologies (coronary, cerebral or peripheral artery disease) reinforced this association (ratio T/S 0.72 for subjects with no ischaemic aetiologies, 0.65 for one aetiology, 0.48 for two aetiologies and 0.43 for three aetiologies, $p < 0.001$).

In an RNA telomeric Terc-deficient (*Terc*^{-/-}) mouse model, which has decreased telomere length [43], an association was found between the apparition of heart failure and telomere shortening [44] from the fifth generation of knockout mice onwards. This suggests that the mechanisms that lead to the onset of heart failure and telomere shortening are closely linked. In the same way, the studies by Van der Harst et al. [42] brought to light a hereditary component of telomere length suggesting the existence of a phenotype that was predisposed to the onset of heart failure.

Another study conducted in a population of individuals over 85 years of age (the Newcastle 85+ study, reported by Collerton et al.), showed a positive association between left ventricular function and telomere length [29]. This association also seems to be independent of a history of ischaemia or any other cardiovascular risk factor.

Although the mechanisms thought to be involved in the association between telomere shortening and heart failure have not yet been elucidated totally, apoptotic phenomena have to be considered, and cell ageing as well as oxidative stress probably play a key role in these pathophysiological cardiovascular processes.

Cellular senescence and the vascular endothelium

Vascular ageing, which involves endothelial cells, has been the subject of many studies since physiological function is deteriorating [45]. Indeed, this endothelial dysfunction is found in young subjects who present cardiovascular disease [46]. At the cellular level, the ageing of healthy endothelial cells leads to a state of "stasis", which is characterized by metabolic activity over several months, but the inability of the cell to respond to mitotic stimuli [47]. This cellular senescence may be accelerated by successive cell divisions via the progressive and cumulative shortening of the telomere. When telomere length falls below a certain threshold, cells go into senescence and a process of apoptosis [35]. However, these phenomena of cellular senescence may occur prematurely in the wake of exposure to various factors, including oxidative stress [48].

Further perspectives of research

Lessons from experimental studies have shown that oxidative stress induces telomeric DNA base damage, and could

represent a major pathway of telomere attrition in vitro. However, the physiopathological mechanisms linking levels of oxidative stress and telomere homeostasis are far from being elucidated fully. Moreover, it is not known whether ROS-induced 8-oxoguanine lesions or other oxidative guanine lesions could accumulate in telomeres in vivo. Interesting studies in 8-oxoguanine glycosylase null (*OGG1*^{-/-}) mice have suggested recently that oxidative damage can arise in telomeric DNA, and that repairing guanine oxidative damage is required in the maintenance of telomere integrity in mammals [49]. Furthermore, emerging data suggested paradoxically a beneficial role for the oxidation product of guanine under given conditions (low levels of oxidative stress) [50]. As telomere shortening has been linked to human ageing, cancer and cardiovascular diseases, whether these phenomena could be involved in such pathologies remains a major challenge for future research. Moreover, observational and randomized studies analysing the influence of treatments interfering with oxidative stress, such as statin therapy or lifestyle intervention (e.g., Mediterranean diet or physical activity), on telomere length are required to better understand the pathophysiology of CAD and the role of biological ageing.

Conclusion

In conclusion, telomeres provide an overall index of global exposition of the body to inflammatory and oxidative phenomena. The mechanisms that link the onset and/or progression of cardiovascular disease to the integrity of telomeres need further investigation. At the moment, there is insufficient evidence to validate the associations and determine whether telomere shortening is a cause or consequence of disease. The non-specific modulation of telomere length by modifiable and non-modifiable risk factors suggests a limited potential as a "biomarker" of cardiovascular disease.

Conflict of interest statement

There is no conflict of interest to disclose.

References

- [1] Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001;106:661–73.
- [2] Edo MD, Andres V. Aging, telomeres, and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2005;66:213–21.
- [3] Collins K. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:378–83.
- [4] Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, et al. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5147–52.
- [5] Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, et al. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008;44:235–46.
- [6] Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, et al. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* 2004;363:507–10.
- [7] Kirwan M, Beswick R, Vulliamy T, et al. Exogenous TERC alone can enhance proliferative potential, telomerase activity and telomere length in lymphocytes from dyskeratosis congenita patients. *Br J Haematol* 2009;144:771–81.

- [8] Jaco I, Munoz P, Goytisolo F, et al. Role of mammalian Rad54 in telomere length maintenance. *Mol Cell Biol* 2003;23:5572–80.
- [9] Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 2007;8:299–309.
- [10] Schoeftner S, Blasco MA. A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J* 2009;28:2323–36.
- [11] Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, et al. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:998.
- [12] Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998;19:219–20.
- [13] Azzalin CM, Reichenbach P, Khoraiuli L, et al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 2007;318:798–801.
- [14] von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:99–110.
- [15] van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998;92:401–13.
- [16] Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, et al. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999;283:1321–5.
- [17] Fotiadou P, Henegariu O, Sweasy JB. DNA polymerase beta interacts with TRF2 and induces telomere dysfunction in a murine mammary cell line. *Cancer Res* 2004;64:3830–57.
- [18] Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1998;239:152–60.
- [19] Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1019:278–84.
- [20] Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett* 1999;453:365–8.
- [21] Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* 2001;40:4763–8.
- [22] von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002;27:339–44.
- [23] Richter T, Saretzki G, Nelson G, et al. TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 2007;128:340–5.
- [24] Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, et al. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2004;2:E240.
- [25] Floyd RA, Hensley K, Jaffery F, et al. Increased oxidative stress brought on by pro-inflammatory cytokines in neurodegenerative processes and the protective role of nitron-based free radical traps. *Life Sci* 1999;65:1893–9.
- [26] Beyne-Rauzy O, Prade-Houdellier N, Demur C, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits hTERT gene expression in human myeloid normal and leukemic cells. *Blood* 2005;106:3200–5.
- [27] Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, et al. Oxidative stress and TNF- α induce histone acetylation and NF- κ B/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol Cell Biochem* 2002;234–235:239–48.
- [28] Matthews C, Gorenne I, Scott S, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 2006;99:156–64.
- [29] Collerton J, Martin-Ruiz C, Kenny A, et al. Telomere length is associated with left ventricular function in the oldest old: the Newcastle 85+ study. *Eur Heart J* 2007;28:172–6.
- [30] Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, et al. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:842–6.
- [31] Samani NJ, Boulton R, Butler R, et al. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001;358:472–3.
- [32] Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 2007;369:107–14.
- [33] Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:546–50.
- [34] Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, et al. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J* 2008;29:2689–94.
- [35] Brouillette SW, Whittaker A, Stevens SE, et al. Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis. *Heart* 2008;94:422–5.
- [36] Lung FW, Ku CS, Kao WT. Telomere length may be associated with hypertension. *J Hum Hypertens* 2008;22:230–2.
- [37] Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005;366:662–4.
- [38] Richards JB, Valdes AM, Gardner JP, et al. Homocysteine levels and leukocyte telomere length. *Atherosclerosis* 2008;200:271–7.
- [39] Morla M, Busquets X, Pons J, et al. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006;27:525–8.
- [40] Nordfjall K, Eliasson M, Stegmayr B, et al. Telomere length is associated with obesity parameters but with a gender difference. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:2682–9.
- [41] Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, et al. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1379–84.
- [42] van der Harst P, van der Steege G, de Boer RA, et al. Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1459–64.
- [43] Wong LS, Oeseburg H, de Boer RA, et al. Telomere biology in cardiovascular disease: the TERC-/- mouse as a model for heart failure and ageing. *Cardiovasc Res* 2009;81:244–52.
- [44] Leri A, Franco S, Zacheo A, et al. Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *EMBO J* 2003;22:131–9.
- [45] Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor- κ B. *Circ Res* 2007;100:1659–66.
- [46] Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1995;38:105–28.
- [47] Chen J, Goligorsky MS. Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1729–39.
- [48] Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 2000;35:927–45.
- [49] Wang Z, Rhee DB, Lu J, et al. Characterization of oxidative Guanine damage and repair in mammalian telomeres. *PLoS Genet* 2010;6:e1000951.
- [50] Radak Z, Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2010;49:587–96.

II. Objectifs

En introduction, nous avons rappelé l'implication de la longueur des télomères dans les mécanismes physiologiques et pathologiques touchant la sphère cardiovasculaire. Nous avons par ailleurs évoqué les travaux récents qui ont précisé que les statines pourraient avoir un effet « bénéfique » sur la longueur des télomères. Toutefois, les conclusions tirées de ces études restent fragmentaires.

Il a été envisagé par ailleurs que les statines pouvaient avoir une action sur le niveau d'expression de certains marqueurs de stress oxydant liés à l'inflammation comme le niveau de transcription du gène *c-Fos*. Or, le gène *c-Fos* constitue également un marqueur lié à certains facteurs de risques cardiovasculaires comme l'athérosclérose humaine et le tabagisme.

Il apparaissait donc intéressant de développer des travaux dans ce domaine.

1. Dans un premier temps, nous nous sommes proposés de tester l'hypothèse selon laquelle la longueur des télomères leucocytaires pourrait être affectée par le traitement par des statines en association à une modification du niveau d'expression de deux gènes d'intérêt (*c-Fos* et *OGG1*),
2. Dans un second temps, il nous est apparu intéressant d'analyser les relations possibles entre le statut tabagique et le niveau de transcription du gène *c-Fos* au sein des cellules leucocytaires circulantes chez des patients souffrant d'une pathologie coronaire.

Au cours de notre travail, nous nous sommes placés dans un contexte à très haut risque cardiovasculaire, en ciblant des patients en phase aigüe de l'infarctus du myocarde, dont on connaissait par l'Observatoire des Infarctus de Côte d'Or (RICO) les composantes cliniques, fonctionnelles et thérapeutiques.

Nous développerons dans le chapitre suivant les caractéristiques de la population étudiée, les caractéristiques et objectifs du RICO ainsi que les techniques mises en œuvre pour ce travail.

III. Matériels et Méthodes

A. L'obseRvatoire des Infarctus de Côte-d'Or RICO et population de l'étude

Notre étude a été réalisée en utilisant la population recensée au sein de l'obseRvatoire des Infarctus de Côte-d'Or (RICO) dont les modalités de fonctionnement ont précédemment été publiées [123]. Brièvement, cet observatoire recueille de manière prospective depuis le 1er Janvier 2001 l'ensemble des données de la prise en charge des patients hospitalisés pour un infarctus du myocarde (IDM) en phase aiguë dans le département de la Côte d'Or. Cet observatoire comprend actuellement plus de 9000 dossiers de patients hospitalisés pour un Infarctus du myocarde (IDM), et repose sur l'inclusion de patients issus de 6 centres différents, pour une région couvrant environ 500 000 habitants. Les données relatives aux IDM sont recueillies par les différents coordonnateurs d'étude au moyen d'un formulaire standardisé de recueil des données. Tous les patients âgés de plus de 18 ans et ayant été admis moins de 24 heures après l'apparition des symptômes sont inclus dans le RICO.

Pour cette étude, seuls les patients, âgés de plus de 18 ans et hospitalisés pour un IDM dans un délai inférieur à 24 heures après l'apparition des symptômes, au sein de l'Unité de Soins Intensifs de Cardiologie (USIC) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Dijon entre le 1^{er} mars et le 30 septembre 2009, ont été inclus, soit 278 patients.

L'IDM a été défini par une cinétique d'élévation de la troponine I associée à des symptômes d'ischémie et/ou des signes électriques sur l'électrocardiogramme (ECG) 12 dérivations, comme défini par le Joint Committee of the European Society of Cardiology et l'American College of Cardiology [124]. Un IDM avec sus décalage du segment ST (STEMI) a été défini comme un sus décalage persistant ≥ 1 mm du segment ST sur au moins 2 dérivations contiguës ou un bloc de branche gauche sur l'ECG.

Les patients sous traitements anti-inflammatoires stéroïdiens ou non, les patients pour lesquels le diagnostic d'IDM a été écarté au profit d'un autre diagnostic après l'admission en USIC (embolie pulmonaire, dissection aortique, péricardite aiguë...) ont été exclus de l'étude, de même que les IDM post-angioplastie ou post pontage aorto-coronarien.

Notre étude se conforme à la déclaration d'Helsinki et a été approuvée par le comité d'éthique du CHU de Dijon. D'autre part, pour chaque patient inclus, un consentement éclairé a été obtenu.

B. Recueil des données épidémiologiques

Pour chaque patient de l'étude, les données démographiques (âge, sexe), les facteurs de risques cardiovasculaires (FdR CV) (antécédents d'hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie, statut

tabagique, Index de Masse Corporelle (IMC) ($\text{poids (kg)} / (\text{taille (m)})^2$), ainsi que les antécédents d'IDM ont été collectés en sus du délai entre l'apparition des symptômes et l'hospitalisation enUSIC et les caractéristiques cliniques de l'IDM.

Une échocardiographie a également été réalisée enUSIC au jour 3 ± 1 après l'admission du patient, par un investigateur local, suivant la méthode de Simpson, en vue apicale, pour calculer la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG).

Les patients ont été questionnés sur la prise de thérapeutiques au long cours avant leur IDM, incluant la prise de statine, leur posologie et le type de molécule utilisée.

C. Recueil des données biologiques

Des échantillons de sang veineux ont été prélevés à l'admission du patient (le temps médian entre l'apparition des symptômes et le prélèvement du patient était de 230 minutes [105-580] minutes).

Les concentrations en homocystéine ont été déterminées par chimiluminescence sur Immulite 2000 analyseur (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, USA).

La concentration plasmatique en protéine C-réactive (CRP), en cholestérol total (CT), en High-Density Lipoprotein cholestérol (HDL-C) et en triglycérides (TG) a été déterminée par immuno-néphélométrie laser sur Dimension analyseur (Dabe Behring, Newark, NE).

La concentration plasmatique en Low-Density Lipoprotein cholestérol (LDL-C) a été calculée en utilisant la formule de Friedewald [125].

La détermination de la glycémie par une méthode enzymatique (glucose oxydase) et le niveau de créatinine plasmatique ont été mesurés sur Vitros 950 analyseur (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA).

L'hémoglobine glyquée (HbA1c) a été mesurée par chromatographie liquide sur résine échangeuse d'ions (HPLC) (Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA).

Ces analyses biologiques ont été réalisées par le Laboratoire de Biochimie du CHU de Dijon dirigé par Monsieur le Professeur Philippe GAMBERT.

D. Mesure de la longueur des télomères leucocytaires (LTL)

En addition des prélèvements réalisés pour la détermination des constantes biologiques par le CHU de Dijon, un prélèvement de sang veineux a été réalisé à l'admission du patient enUSIC sur tube EDTA Vacutainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). L'isolement des leucocytes totaux est

réalisé, dans l'heure suivant le prélèvement, à l'aide d'une solution de lyse des globules rouges (Tris HCL pH 7.5 ; 50 mM ; $MgCl_2$ 25 mM ; NaCl 50 mM). Le culot cellulaire a été alors séparé en deux parties pour la détermination de la LTL (1/3) et pour la quantification du niveau de transcription des gènes *c-Fos* et *OGG1* (2/3) par Retro Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-Q-PCR).

L'acide désoxyribonucléique (ADN) a été extrait du culot leucocytaire en utilisant la technique standardisée de "Salting Out" décrite par Miller [126]. Brièvement, le tampon de lyse détruit les membranes des cellules pour en libérer le contenu, puis les protéines sont dégradées par la protéinase K (0,1%). Cette enzyme est une protéase végétale très active même en présence d'EDTA, et qui n'a aucun effet d'hydrolyse sur les acides nucléiques (ADN). Elle hydrolyse les protéines de toutes origines en quelques heures, avec une préférence pour les liaisons peptidiques situées après les acides aminés hydrophobes (leucine, par exemple). L'extraction et la précipitation de l'ADN est ensuite réalisée par l'ajout de NaCl 5 M et d'éthanol absolu froid, permettant la précipitation de l'ADN sous forme d'une méduse récupérée et lavée par de l'éthanol à 70°. Les méduses d'ADN sont ensuite remises en suspension dans un tampon adéquat (TE = Tris HCL, pH 7,5, 10 mM ; EDTA 1 mM).

La LTL a ensuite été mesurée par Q-PCR selon la méthode décrite par Cawthon en 2002 [44] sur un Rotogene 3000 (Corbett Research, Cambridge, UK). Nous avons alors déterminé le ratio relatif entre le nombre de copies du motif télomérique (T) et la simple copie du gène 36B4 (gène simple copie dans le génome humain, codant pour une phosphoprotéine ribosomal, situé sur le chromosome 12) de tous les échantillons, en le comparant au même ADN de référence.

Cette technique de détermination de la LTL sous forme d'un ratio T/S par Q-PCR a précédemment été décrite comme équivalente au Southern Blot sur Fragments Terminaux de Restriction (TRF) [44, 67, 127].

Pour chaque échantillon, nous avons réalisé 6 passages de Q-PCR : 3 passages pour "T" et 3 passages pour "S". Tous les échantillons ADN ont été analysés en duplicata sur des plaques séparées, mais au niveau de la même position dans la plaque. La détermination des quantités de "T" et de "S" a été réalisée en utilisant un seuil de détection standard sans avoir connaissance des données cliniques et biologiques.

Les séquences des amorces spécifiques pour la détermination de la longueur des télomères étaient les suivantes :

Amorce sens : 5'-GGT TTT TGA GGG TGA GGG TGA GGG TGA GGG TGA GGG T-3'

Amorce anti-sens : 5'- TCC CGA CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA-3'

Celles pour la quantification du gène 36B4 étaient les suivantes :

Amorce sens : 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3'

Amorce anti-sens : 5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3'

E. Extraction des acides ribonucléiques messagers (ARNm) et quantification des transcrits des gènes *c-Fos* et *OGG1*

L'extraction des ARNm totaux a été réalisée par l'utilisation d'un protocole TRIZOL[®] (Invitrogen, Paisley, UK) optimisé par une méthode d'isolement des ARNm pour RétroTranscription Q-PCR (RT-Q-PCR) décrite par Damla D Bilgin [128]. Les ARNm totaux ainsi obtenus ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire (cDNA) par l'utilisation d'une reverse transcriptase murine, la Murine Moloney Leukemia Virus rétro-transcriptase (MMLV) (Invitrogen, Paisley, UK).

Le niveau de transcription des gènes *c-Fos* et *OGG1* a ensuite été apprécié par Q-PCR, et ce en duplicata. Brièvement, pour chaque amplification, des aliquotes de cDNA issus de 50 ng d'ARNm totaux ont été amplifiés par Q-PCR à l'aide d'un kit de Q-PCR utilisant du SYBR green (Quiagen, FR) dans un volume de réaction de 25 µL sur un Rotorgene 3000 (Corbett Research, Cambridge, UK).

Le gène de la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé comme gène de référence après avoir testé l'homogénéité d'expression de trois gènes candidats (GAPDH, Béta-2-Microglobuline, Béta Actine), en utilisant le logiciel geNorm.

Chaque séquence de gènes a été amplifiée en duplicata par 45 cycles sous conditions standards, et les résultats ont été exprimés sous la forme de la moyenne des différents cycles seuils (Ct = nombre de cycles minimum pour obtenir un signal significativement différent du bruit de fond) du gène d'intérêt, normalisés à l'aide du gène de référence, celui de la GAPDH.

Les séquences d'amorces déterminées par le logiciel Primer3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research) sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées en RT-Q-PCR

Gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
c-Fos	GGA GGA CCT TAT CTG TGC GTG A	GAA CAC ACT ATT GCC AGG AAC ACA
OGG1	GCA TCG TAC TCT AGC CTC CAC	AGG ACT TTG CTC CCT CCA C
GAPDH	CAT CTC TGC CCC CTC TGC T	AGC CCT GCT TCA CCA CCT T

F. Définition des groupes

Analyse en fonction de la prise de statine avant IDM

Comme il a été précédemment expliqué, les patients ont été de manière prospective interrogés sur la prise de traitement au long cours avant leur admission en USIC pour suspicion d'IDM. Cet interrogatoire comprenait la prise ou non de statines, ainsi que la posologie et le type de molécule utilisée si la réponse était affirmative. Dans une première partie, nous avons pu définir deux groupes :

- un premier groupe de patients sous traitement chronique par statine, défini comme la mise en place d'une thérapeutique chronique par statine au moins 3 mois avant l'évènement coronaire aigu
- un second groupe comprenant les patients sans thérapie au long cours par statine ou ayant débuté depuis moins de 3 mois.

Les statines rencontrées dans le premier groupe sont les suivantes : pravastatine (29%), simvastatine (26%), atorvastatine (26%), rosuvastatine (17%) et fluvastatine (2%). Ces différentes molécules ont également été classées en fonction de leur caractère hydrophile (l'atorvastatine et la simvastatine sont lipophiles alors que la pravastatine, la rosuvastatine et la fluvastatine sont plus hydrophiles) et, de façon à explorer le rôle potentiel des statines, les différents types et doses de statines ont été convertis en équivalent de dose statine [129].

Analyse en fonction du statut tabagique

Dans un second temps, nous avons réalisé trois groupes de patients en fonction de leur statut tabagique déclaré :

- les patients fumeurs (cigarette, cigare, pipe) au jour de leur admission pour un IDM ou ayant arrêté de fumer depuis moins de 3 mois ont été intégrés dans le premier groupe constituant les « fumeurs actuels »,

- les patients ayant cessé de fumer depuis plus de trois mois ont constitué le second groupe de patients dit « anciens fumeurs »,
- enfin les patients n'ayant jamais fumé au cours de leur ont constitué le troisième groupe, celui des « non-fumeurs ».

G. Analyse statistique

Les données continues sont présentées sous forme de médiane (25^{ème} au 75^{ème} percentile) ou de moyenne $\pm$ erreur standard, ceci en fonction de la distribution de la population. Un test de Kolmogorov-Smirnov a été réalisé pour tester la normalité de la distribution. Pour la comparaison de deux groupes de données, le test de rang de Mann-Whitney ou le test t de Student ont été utilisés.

Pour tester les associations possibles entre les variables continues, nous avons utilisé soit un test de Pearson soit un test de Spearman.

Les données dichotomiques, exprimées sous forme de pourcentages, ont été comparées par le test du Chi square pour les deux groupes.

Analyse en fonction de la prise de statine avant IDM

Une analyse de type régression linéaire multiple descendante a été réalisée en utilisant la LTL comme variable dépendante. Les variables indépendantes intégrées au modèle ont été toutes les données ayant une relation statistiquement significative ($p < 0,05$) avec la variable dépendante en analyse univariée.

Une analyse stratifiée basée sur l'âge médian de la population de l'étude (64 ans) a également été réalisée avec le modèle de régression linéaire multiple décrit précédemment.

Etant donné que la prise de statine au sein de la population d'étude n'a pas été randomisée, un score de propension a été calculé de manière à prendre en compte les potentiels facteurs confondants.

Une analyse par régression logistique multivariée a été construite de manière à prédire l'utilisation chronique de statine et, ainsi, de calculer un score de propension pour l'utilisation de statine vs absence de statine. Toutes les variables listées dans le tableau 2 ont été testées de façon univariée en ce qui concerne leur relation avec la prise de statine au long cours, et ont ensuite été incluses dans un modèle de régression logistique descendant dès lors que le niveau de significativité statistique fixé à $p < 0,05$ a été atteint. Plusieurs approches ont été utilisées de manière à estimer la qualité de l'ajustement réalisé :

- L'aire sous la courbe (ASC) des courbes Receiver-Operating Characteristic (ROC) (courbes comparant les risques d'avoir de vrais positifs et de faux positifs)
- La valeur Hosmer-Lemeshow p(HL) (ce test permet par un test du Chi-deux de déterminer si les valeurs observées et prédites par le score de propension sont similaires)
- Un test de vraisemblance ou Likelihood test (permet de comparer l'ajustement entre deux modèles, dont l'un est un cas particulier de l'autre, ce test est basé sur un score de vraisemblance exprimant combien de fois une donnée se retrouvera dans un modèle plutôt que dans l'autre).

Une fois que la qualité de l'ajustement a été vérifiée, deux groupes de patients ont ainsi été construits, avec un patient sous statine apparié à un patient ne prenant pas de statine, sur la base du score de propension. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Analyse en fonction du statut tabagique

Les trois groupes de patients formés en fonction du statut tabagique des sujets ont été comparés en utilisant une ANOVA pour les données continues, et les données dichotomiques ont été comparées en utilisant le test du Chi-square.

Une analyse par régression linéaire multiple a été réalisée en utilisant le niveau de transcription du gène *c-Fos* comme variable dépendante, afin de déterminer les prédicteurs de son niveau d'expression au sein de la population de l'étude. Les variables introduites dans le modèle ont été celles dont le niveau de significativité statistique fixé à $p < 0,05$ a été atteint en analyse univariée. Le statut tabagique a été introduit sous la forme d'une variable dichotomique (fumeurs vs. Anciens ou non-fumeurs). En conformité avec la correction de Bonferroni, la valeur alpha a été abaissée à 0,02 pour tenir compte du nombre de comparaisons effectuées.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS software package version 13.0 (SPSS Inc.).

IV. Résultats

Dans cette première partie de notre travail, nous avons étudié l'influence que pouvait avoir un traitement par les statines sur la longueur des télomères leucocytaires, dans un contexte clinique particulier que représentent les patients en phase aiguë de l'IDM.

Ainsi, les buts de notre étude ont été

1. de tester le lien entre le traitement par statines et la longueur des télomères leucocytaires chez des patients en phase aiguë de l'IDM
2. d'investiguer les relations pouvant exister entre la prise chronique de statine, la longueur des télomères leucocytaires et le niveau d'expression des gènes *c-Fos* et *OGG1* impliqués dans la réparation des atteintes oxydatives de l'ADN et l'inflammation liée au stress oxydant.

Ce travail a permis d'apporter d'importantes informations quant à l'influence positive du traitement par statine sur la biologie des télomères chez des patients à haut risque cardiovasculaire. Ces résultats sont en adéquation avec d'autres résultats d'études précédemment publiés. Si ces résultats sont confirmés au cours d'une étude longitudinale randomisée, il serait alors possible que les statines possèdent, en plus de leurs effets pléiotropes reconnus, une influence « bénéfique » sur la longueur des télomères leucocytaires chez l'homme. Un des points les plus intéressants de cette étude a été que l'effet positif sur la longueur des télomères leucocytaires du traitement par statine a été retrouvé chez les sujets les plus jeunes de notre groupe d'étude (moins de 64 ans), suggérant l'opportunité d'identifier de nouvelles cibles dans la stratégie thérapeutique de prévention primaire.

De plus, nos résultats mettent en avant de nouveaux marqueurs d'intérêt dans les mécanismes de régulation de la longueur des télomères et dans le cadre du développement des maladies coronaires : ces marqueurs d'intérêts sont les niveaux de transcription leucocytaire des gènes *c-Fos* et *OGG1*.

A. Influence des statines sur la longueur des télomères leucocytaires chez des patients en phase aiguë de l'infarctus du myocarde

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication à paraître dans *Atherosclerosis* qui est intégrée dans ce document de thèse (pages 42-51).



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Circulating leukocyte telomere length and oxidative stress: A new target for statin therapy

Sebastien Saliques^a, Jean-Raymond Teyssier^{a,b}, Catherine Vergely^a, Luc Lorgis^{a,c}, Julie Lorin^a, Michel Farnier^d, Anne Donzel^b, Pierre Sicard^a, Juliane Berchoud^c, Anne-Cécile Lagrost^c, Claude Touzery^c, Sylviane Ragot^b, Yves Cottin^{a,c}, Luc Rochette^a, Marianne Zeller^{a,*}

^a IFR Santé-STIC, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, UFR Médecine, Université de Bourgogne (EA2979), Dijon, France

^b Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Dijon, Dijon, France

^c Service de Cardiologie, CHU Dijon, Dijon, France

^d Le point médical, Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2011

Received in revised form 11 August 2011

Accepted 7 September 2011

Available online xxx

Keywords:

Leukocyte telomere length

Statin

Oxidative stress

ABSTRACT

Objectives: We investigated the relationship between prior statin therapy and leukocyte telomere length (LTL), as well as their interaction with potential new biomarkers of oxidative deoxyribonucleic acid (DNA) lesions and reactive oxygen species-induced inflammation.

Methods and results: From patients admitted for an acute myocardial infarction, LTL was assessed by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR), and leukocyte Finkel-Biskis-Jenkins osteosarcoma (FOS) and 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) messenger ribonucleic acid (mRNA) levels were measured by retrotranscription Q-PCR. Patients under prior chronic statin therapy were compared with patients without statin therapy. Although patients on statin therapy were older, their mean LTL was longer than patients not under statin therapy (1.29 ± 0.11 vs. 1.25 ± 0.11 T/S ratio, $p = 0.008$). In contrast, FOS and OGG1 mRNA levels were similar for the 2 groups. LTL decreased with increasing age, FOS, and OGG1 mRNA levels. Statin therapy remained associated with longer LTL, even after adjustment for confounding factors ($p = 0.001$), and in younger patients (≤ 64 y). Even in groups matched for propensity scores for statin use, LTL was markedly longer in patients under statin therapy.

Conclusions: Our observational study showed that statin therapy was associated with longer LTL. These data bring to light opportunities to identify new targets for early primary preventive treatment strategies. Moreover, our study raised FOS and OGG1 as new relevant biomarkers of LTL.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Telomeres are nucleoprotein structures located at the ends of eukaryotic chromosomes, and made up of several thousand repetitive DNA sequences (TTAGGG) coated by capping proteins. They protect the genome from damage and thus provide chromosome stability. Telomeric repeats shorten with each cell division because of ineffective replication of the 3' end by DNA polymerase, eventually resulting in critically short telomeres, which prompt cellular senescence and ultimately cell death. Thus, telomere length shortening is a biological clock that determines cellular ageing. As telomere shortening is approximately the same in

different tissues, circulating leukocytes from blood cells can be used as an easily accessible surrogate tissue for telomere length assessment in human studies that analyse the systemic effects of chronic diseases, such as cardiovascular disease. Strikingly, individuals with shorter leukocyte telomere length (LTL) present a higher prevalence of cardiovascular (CV) risk factors [1–3] and coronary artery lesions [4], and a higher risk of CV mortality, in particular of acute myocardial infarction (MI) [5–9]. This increased risk seems independent of classical and novel risk factors such as high sensitivity C-reactive protein (CRP) [9], and strongly suggests a link between LTL shortening and coronary artery disease (CAD). Thus, a major issue in the field of telomere research is to understand what factors, in addition to age, influence LTL in humans, and the implications for potential clinical relevance and therapies [10].

Oxidative stress and inflammation are major factors that accelerate age-related telomere shortening, leading to the hypothesis that telomere attrition could serve as a biomarker of the cumulative burden of oxidative stress and inflammation [11,12]. However,

* Corresponding author at: IFR Santé-STIC, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, UFR Médecine, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France. Tel.: +33 380393292; fax: +33 380393293.

E-mail address: marianne.zeller@u-bourgogne.fr (M. Zeller).

the relationship between oxidative stress, inflammation and TL has not been thoroughly investigated *in vivo*. Due to their high guanine content, telomeres are highly sensitive to reactive oxygen species (ROS)-induced damage *in vitro* [13], but the mechanisms of ROS-induced TL shortening have not yet been fully elucidated. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) is involved in a base excision repair pathway that has recently been shown to be active after telomeric DNA oxidative damage, and Finkel-Biskis-Jenkins osteosarcoma (FOS), a ROS-induced transcription factor is specifically involved in atherosclerosis-associated inflammation. FOS and OGG1 have recently come to light as new biomarkers of oxidative damage as well as inflammation processes linked to TL shortening [14–16].

Emerging data suggest that 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, i.e. statin, have a beneficial effect on telomere biology, possibly contributing to the beneficial effects of statin therapy [9,17]. Moreover, statin therapy has been shown to prevent TL erosion of endothelial progenitor cells of healthy subjects or after 12 months of intensive statin therapy in CAD patients [18,19]. However, no study has specifically addressed the potential impact of statin treatment on LTL. Thus, we tested the hypothesis that LTL could be affected by statin treatment and related to the transcript levels of FOS and OGG1, as new biomarkers of TL associated-oxidative stress and inflammation.

We aimed to investigate the relation between prior chronic statin therapy and LTL, and the interactions between LTL and the expression of genes involved in oxidative DNA lesions and ROS-induced inflammation.

2. Experimental procedures

2.1. Patients

All of the consecutive patients aged >18 y and hospitalized <24 h after symptom onset for acute MI in the coronary care unit of Dijon University Hospital between 1st March and 31st July 2009 were included. Among the 298 patients admitted during the inclusion period, 20 patients were excluded from the present study (12 patients with admission delay ≥ 24 h after symptom onset and 8 patients with failed blood sampling), providing a participation rate of 93% (278/298). MI was defined by an increase in serum troponin I ($2 \times$ upper limit of the hospital normal (ULN) range) associated with symptoms of ischemia and/or characteristic ECG signs. STEMI was defined by new ST segment elevation >1 mm or left bundle branch block on the qualifying ECG. The present study complied with the declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee. Each patient gave written consent before participation.

2.2. Data collection

Data on demographics, risk factors [history of hypertension, diabetes, hyperlipidemia, current smoking (active smoking or smoking cessation <3 months), body mass index (BMI)] and prior MI were prospectively collected. Echocardiography was performed at day 3 ± 1 according to the Simpson method to calculate left ventricular ejection fraction (LVEF).

2.3. Biological data

Blood samples were drawn at admission [time delay from symptom onset to blood sampling: 230 (105–580) min] for the assessment of biological variables (see Appendices).

2.4. Telomere length assay

Leukocyte DNA was extracted, and mean telomere length was measured from DNA by Q-PCR-based assay (see Appendices) [20].

2.5. mRNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

The levels of the FOS and OGG1 transcripts were quantified by the relative gene expression analysis method using reverse transcriptase Q-PCR (see Appendices).

2.6. Group definition

Patients were prospectively asked about their current use of pharmacological agents before the MI, including statin therapy, type of molecule and dose. Patients under chronic statin therapy, defined by the ongoing use of any statin therapy initiated >3 months before the index event, were compared with patients not on statin therapy. Statin therapy included pravastatin (29%), simvastatin (26%), atorvastatin (26%), rosuvastatin (17%), and fluvastatin (2%). Statins were also classified according to their hydrophilic properties (atorvastatin and simvastatin are lipophilic, whereas pravastatin, rosuvastatin, and fluvastatin are more hydrophilic). In order to further explore the potential impact of statin, statin doses and types were converted to statin equivalent doses according to Grundy et al. A statin equivalent dose is the dose of currently available statins required to attain a reduction of approximately 30–40% in LDL-C levels (rosuvastatin 5 mg = atorvastatin 10 mg = simvastatin 20 mg = pravastatin 40 mg = fluvastatin 80 mg) [21].

2.7. Statistical analysis

Continuous data are presented as median (25–75th percentiles) or mean $\pm$ SD, as appropriate or as proportion. For continuous variables, a Kolmogorov–Smirnov analysis was performed to test for normality. The Mann–Whitney rank sum test or Student's *t* test was performed to compare the data between the 2 groups. Pearson's or Spearman's rank correlation was applied to test for associations between continuous variables. Dichotomous variables were compared by Chi square tests. Backward multiple linear regression analysis was performed with the LTL as a dependent variable. Variables entered into the models were those with a significant univariate relationship ($p < 0.05$). Given the significant interaction between age and statin, stratified analysis based on median age of the study population (≤ 64 y or > 64 y) was also performed.

The assessment of treatment effects in observational studies may be biased as patients may not be randomly allocated to the experimental or control group. One way to overcome this conceptual shortcoming is to use propensity scores to adjust for differences between the characteristics of patients in the experimental group and those in the control group [22]. Because statin therapy was not randomly assigned in our study population, a propensity score was calculated to account for potentially confounding factors. The propensity score is defined as the probability that a patient received the experimental intervention because of pre-treatment characteristics at baseline. A multivariate logistic regression model was built to predict the chronic use of statin therapy, and to calculate a propensity score for statin therapy (vs. no statin). All the variables listed in Tables 1A and 1B were tested for their univariate relationship with chronic statin use, and were included in a backward logistic regression model on the basis of $p < 0.05$. Several approaches were used to assess the goodness of fit of the logistic regression model: (1) area under curve (AUC) of the receiver-operating characteristic curve, (2) the Hosmer–Lemeshow *p*(HL) value, and (3) $-2\log$ likelihood. Then, two groups were built, with

Table 1APatients characteristics: *n* (%), mean $\pm$ SD or median (25th and 75th percentiles).

	No statin (<i>N</i> = 205)	Statin (<i>N</i> = 73)	<i>p</i>
Risk factors			
Age (y)	64 $\pm$ 14	68 $\pm$ 12	0.015
Female	49(24)	20(27)	0.636
Hypertension	82(40)	55(75)	<0.001
Obesity	36(18)	25(35)	0.005
Diabetes	33(16)	24(33)	0.004
Hypercholesterolemia	60(29)	62(85)	<0.001
Smoking	84(41)	14(19)	<0.001
Prior MI	13(6)	16(22)	0.001
Chronic treatments			
ACE inhibitor	28(14)	34(47)	<0.001
Aspirin	21(10)	27(37)	<0.001
Beta-blocker	36(18%)	28(38%)	0.001
Fibrate	11(5%)	0(0%)	0.072
Oral antidiabetic	20(10%)	17(23%)	0.008
Clinical data and delay			
Anterior wall MI	70(34)	28(38)	0.569
LVEF (%)	55(45–60)	53(45–60)	0.601
STEMI	117(57)	36(49)	0.275
Time to admission (min)	220(120–570)	173(90–394)	0.020
Biological data on admission			
Glucose (mmol/L)	7.0(5.9–8.5)	7.0(5.9–9.2)	0.571
HbA1c (%)	5.7(5.4–6.1)	5.9(5.6–6.9)	0.003
Creatinine clearance (ml/min)	83.3 $\pm$ 40.1	76.8 $\pm$ 36.6	0.227
CRP (mg/L)	5.1(2.9–13.4)	5.6(2.9–11.9)	0.903
Homocysteine (μ mol/L)	12(9–17)	12(10–18)	0.672
HDL-cholesterol (mg/dL)	44 $\pm$ 12	43 $\pm$ 10	0.716
LDL-cholesterol (mg/dL)	131 $\pm$ 44	101 $\pm$ 32	<0.001
Total-cholesterol (mg/dL)	205 $\pm$ 49	176 $\pm$ 43	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	129(82–197)	128(94–191)	0.580
Leukocytes ($\times 10^3$ /mm ³)	10.4(8.6–12.9)	9.3(7.8–11.9)	0.011
LTL, T/S	1.25 $\pm$ 0.11	1.29 $\pm$ 0.11	0.008
FOS, UA	0.91 $\pm$ 0.10	0.91 $\pm$ 0.11	0.905
OGG1, UA	0.86 $\pm$ 0.14	0.87 $\pm$ 0.15	0.774

one patient on statin therapy matched with one patient not on statin therapy, based on the propensity score. Two-sided *p* values <0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using SPSS software package version 13.0 (SPSS Inc, IBM).

3. Results

3.1. Characteristics

Baseline characteristics of the study population according the use of statin are shown in Table 1A. Patients on statin therapy were older, with a higher risk profile, including hypertension, obesity, diabetes, hypercholesterolemia and prior MI, than patients not on statin therapy. The time to admission was slightly lower in the statin group. Statin therapy was also more frequently associated with other CV drugs. Clinical characteristics, such as anterior wall

MI, LVEF, STEMI or delay between symptom onset and admission, were similar for the 2 groups. In addition, there was no difference between the statin and no-statin groups for the mortality rate (4(5%) vs. 7(3%), respectively, *p* = 0.437).

In statin group, chronic glycaemia was less well controlled and, as expected, LDL-cholesterol and total cholesterol levels were dramatically lower (about 30%) compared with those in patients without statin treatment (*p* < 0.001). Leukocyte count was slightly lower in statin-treated patients. Other biological parameters were similar for the 2 groups.

One major finding of our study, which lends further support to our hypothesis, was that, although patients under statin therapy were markedly older, their mean LTL was strikingly increased when compared with patients not on statin therapy (1.29 $\pm$ 0.11 vs. 1.25 $\pm$ 0.11 T/S ratio, *p* = 0.008) (Fig. 1A). In contrast, mRNA levels of FOS and OGG1 were similar for the 2 groups (0.91 $\pm$ 0.10 vs. 0.91 $\pm$ 0.11, *p* = 0.905 and 0.86 $\pm$ 0.14 vs. 0.87 $\pm$ 0.15, *p* = 0.774, respectively) (Fig. 1A). LTL in patients on hydrophilic statin (*n* = 32(45%)), including pravastatin and rosuvastatin, was similar to that in patients on lipophilic statin (1.31 $\pm$ 0.11 vs. 1.27 $\pm$ 0.11, *p* = 0.161). When the impact of statin was analysed by statin equivalent doses, the impact of statin on LTL was similar across the range of statin doses (*p* = 0.125).

3.2. Determinants of leukocyte telomere length

All the parameters listed in Table 1A were tested by univariate analysis for their relationship with LTL. Only 3 variables, in addition to statin treatment, were significantly associated with LTL: age, and FOS and OGG1 mRNA levels. LTL gradually decreased with increasing age (*r* = −0.124, *p* = 0.004), with increasing FOS (*r* = −0.199, *p* = 0.039), and OGG1 mRNA levels, which showed the strongest relationship with LTL (*r* = −0.235, *p* < 0.001) (Fig. 2). Interestingly, neither gender, nor lipid parameters (LDL-cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol or total cholesterol), or classical systemic inflammation markers (white cell count, or CRP), or risk factors were significantly associated with LTL.

Another set of stratified analyses showed that men and women share the same relationship of OGG1 transcripts levels with LTL. However, FOS and statin were only associated with LTL in men, while age and creatinine clearance were significantly related to LTL only in women. This was probably due to their older mean age (women: 70 $\pm$ 16 vs. men: 63 $\pm$ 13 y).

In multivariate analysis, age, FOS, and OGG1 mRNA, in addition to statin treatment, remained independent predictors of LTL (*R*² = 0.13) (Table 1B). In particular, statin therapy was strongly associated with longer LTL, even after adjustment for the confounding factors (*p* = 0.001).

Given the presence of a significant interaction between statin and age (*p* = 0.010), we further performed linear regression in stratified analyses to determine whether factors of LTL were similar in younger vs. older patients. The study population was divided into 2 equal groups (*n* = 139 for each group), based on the median age (=64 y). Surprisingly, correlation analysis showed that the effect of age on LTL was different in the two groups: in the younger group (mean age = 53 $\pm$ 7 y), LTL did not diminish with age (*r* = +0.081, *p* = 0.340) (Fig. 3). In multivariate analysis, in younger patients ($\leq$ 64 y), statin therapy was a strong and independent factor associated with longer LTL (*p* = 0.005) (Table 1B). In contrast, in older patients (mean age 77 $\pm$ 7 y), there was a significant fall in T/S ratio with increasing age (*r* = −0.225, *p* = 0.008) (Fig. 3). In older patients (>64 y), multivariate analysis showed that age was the strongest independent determinant of LTL, while there was no significant association with statin therapy (Table 1B). In both age groups, an

Table 1BPredictors for leukocyte telomere length by multivariate linear regression analysis in the whole study population (*n* = 278) and stratified by median age ($\leq$ or >64 y).

Variables	<i>B</i>	SE	<i>p</i>
Whole study population (<i>n</i> = 278)			
Statin	+0.054	0.016	0.001
Age	−0.157	0.074	0.035
OGG1	−0.159	0.050	0.002
FOS	−0.144	0.069	0.037
Stratified by median age			
$\leq$64 y (<i>n</i> = 139)			
Statin	0.069	0.024	0.005
OGG1	−0.158	0.078	0.046
FOS	−0.171	0.089	0.056
>64 y (<i>n</i> = 139)			
OGG1	−0.178	0.063	0.060
Age	−0.613	0.263	0.022

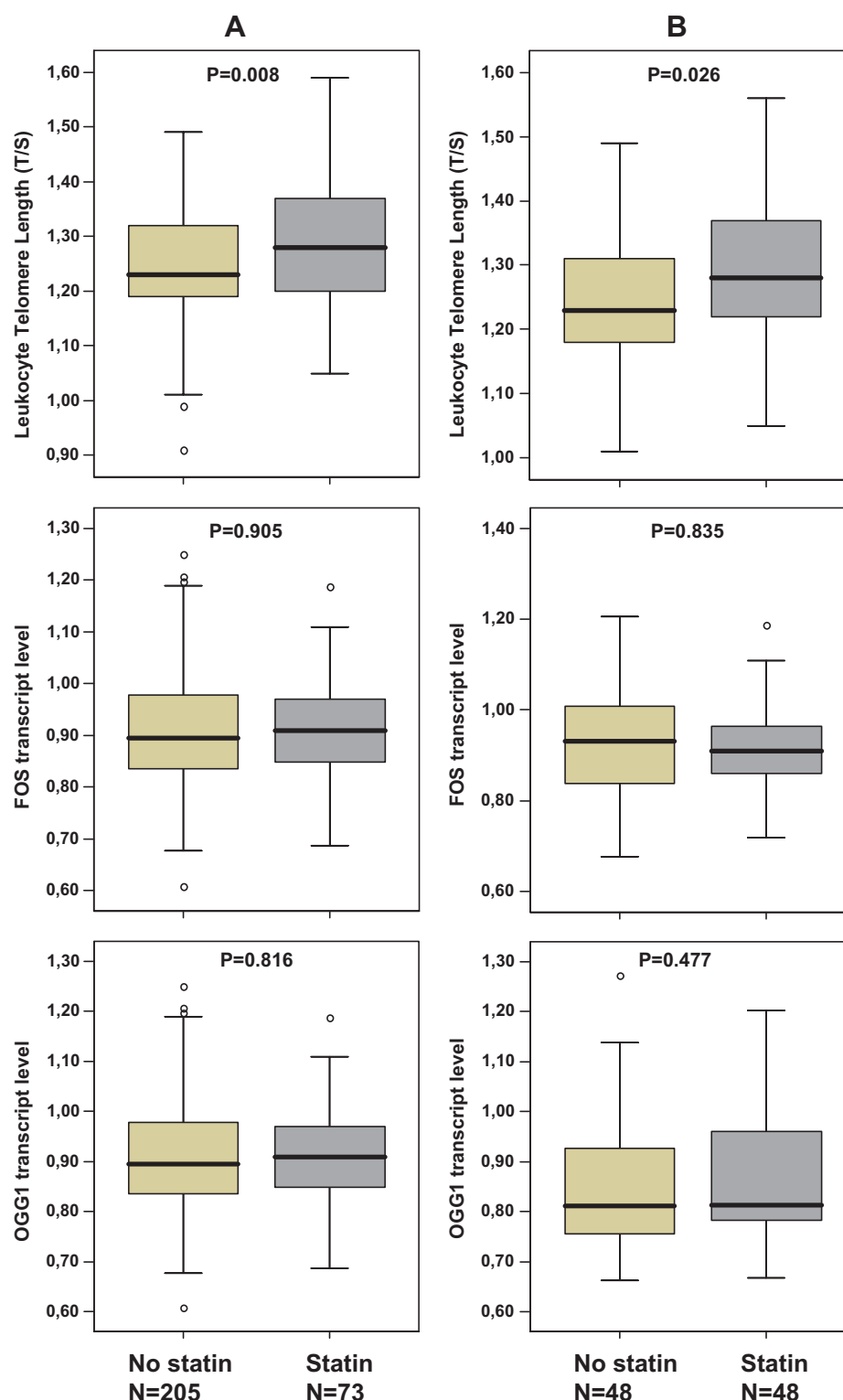


Fig. 1. Statin treatment, leukocyte telomere length and levels of FOS and OGG1 transcripts in (A) whole study population ($n = 278$) and (B) population matched on propensity score for statin treatment ($n = 48$ for each matched group).

increased OGG1 mRNA level was a major factor independently associated with reduced LTL (Table 1B).

3.3. Propensity score analysis

Because statin therapy was not randomly assigned in the study population, a propensity score was calculated to account

for potentially confounding factors by using multivariate logistic regression analysis. Backward multivariate analyses to predict the use of statin therapy included all the variables listed in Table 1A that were associated with statin therapy in univariate analysis (i.e. smoking, diabetes, hypercholesterolemia, leukocyte count, obesity, hypertension, treatments, time to admission, prior MI and age). The final model showed that only age (OR=1.03; IC

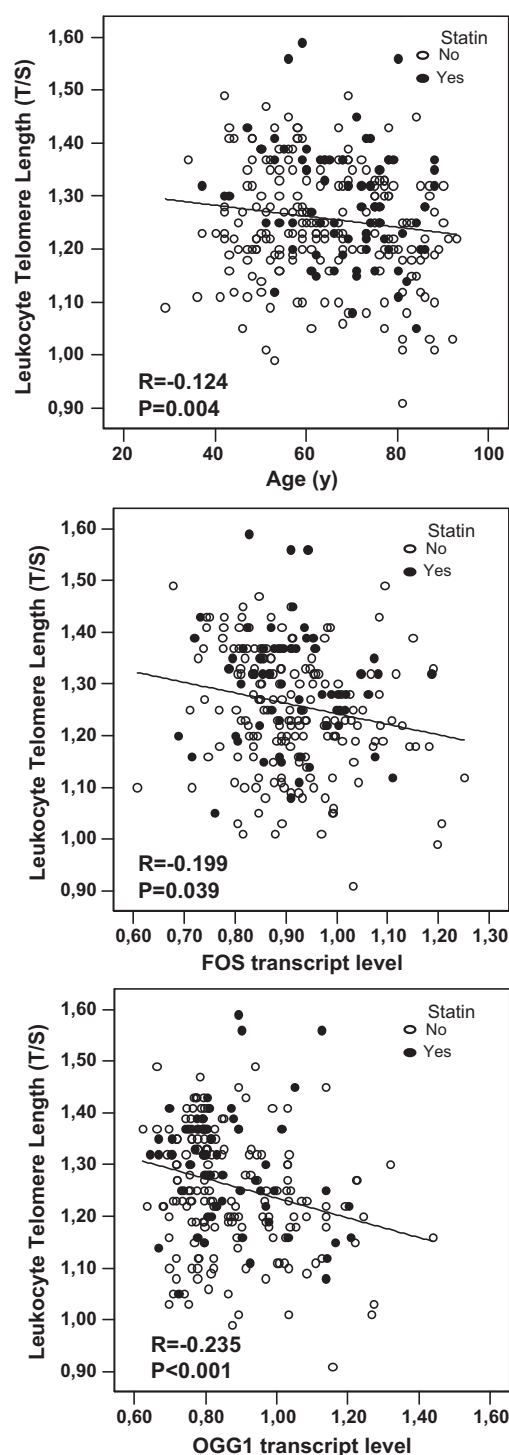


Fig. 2. Relationship between leukocyte telomere length and age, FOS and OGG1 transcript levels.

95% [1.00–1.05]; $p=0.031$), hypercholesterolemia (OR=20.90; IC 95% [8.93–48.92]; $p<0.001$) and prior MI (OR=9.37; IC 95% [3.15–27.91]; $p<0.001$) were independently associated with the chronic use of statin. The goodness of fit of the model was tested and the p value for the Hosmer–Lemeshow test was >0.05 , indicating that the quality of the model's performance was satisfactory (AUC: 0.85 ± 0.03 , $p<0.001$ and $p(\text{HL})=0.141$).

In order to further limit the potential imbalances between patients taking vs. those not taking statin, two groups were created with one patient on statin matched with one patient not on

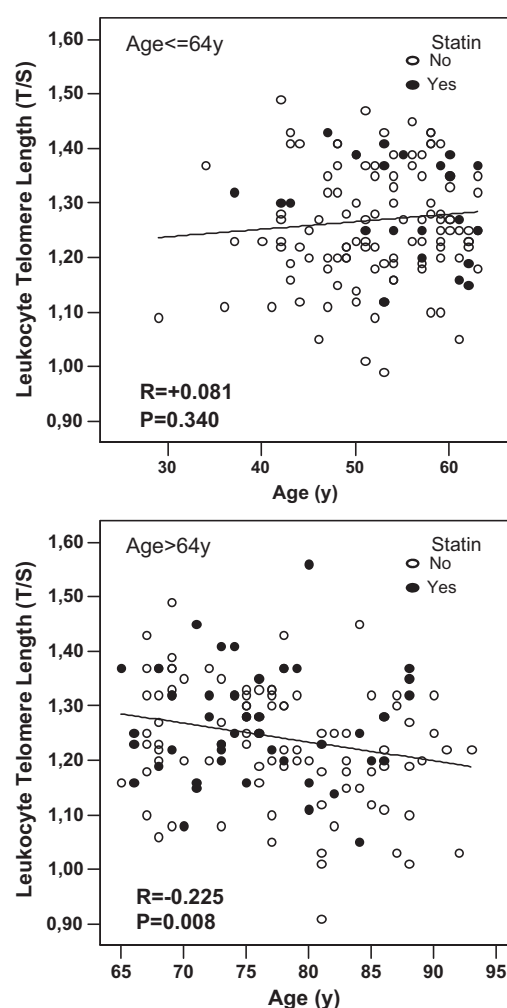


Fig. 3. Relationship between leukocyte telomere length and age, classified by age group (≤ 64 y or >64 y).

statin. The matching procedure was based on the propensity score ($n=48$ for each group). Both groups had similar demographic and clinical characteristics (Table 2), and risk factors. Patients on statin therapy were more often treated with ACE inhibitors or aspirin. As expected, LDL-cholesterol and total cholesterol were lower in patients on statin therapy.

Again, in these groups matched for the propensity score, LTL was markedly longer in patients under statin therapy (1.29 ± 0.10 vs. 1.24 ± 0.11 T/S ratio, $p=0.026$), and there was no significant effect of statin treatment on either FOS (0.91 ± 0.10 vs. 0.92 ± 0.12 , $p=0.835$) or OGG1 mRNA levels (0.87 ± 0.14 vs. 0.85 ± 0.13 , $p=0.477$) (Fig. 1B).

4. Discussion

Statin therapy has demonstrated its efficacy in reducing CAD mortality in primary and secondary intervention trials [23,24]. It has been suggested that part of this beneficial effect could be linked to TL preservation, but this hypothesis not been clearly assessed [9]. Our conclusion was supported by multivariate adjustments that included many demographic and biological variables, and confirmed by the comparison of 2 groups of patients matched for a propensity score for statin use. Our study showed for the first time that in high-risk patients: (1) Statin treatment was associated with longer telomere length, an effect which was independent of systemic inflammation and oxidative stress. (2) This association, which

Table 2

Patients characteristics in the population matched for propensity score for statin treatment; *n* (%), mean $\pm$ SD or median (25th and 75th percentiles).

	No statin (<i>N</i> = 48)	Statin (<i>N</i> = 48)	<i>p</i>
Risk factors			
Age (y)	67 $\pm$ 16	66 $\pm$ 11	0.668
Female	17(35)	13(27)	0.509
Hypertension	26(54)	34(71)	0.140
Obesity	8(17)	17(36)	0.061
Diabetes	13(27)	18(37)	0.383
Hypercholesterolemia	39(81)	37(77)	0.802
Smoking	15(31)	13(27)	0.823
Prior MI	6(12)	8(17)	0.773
Chronic treatments			
ACE inhibitor	10(21)	22(46)	0.017
Aspirin	6(12)	17(35)	0.016
Propensity score	0.44 $\pm$ 0.19	0.44 $\pm$ 0.18	0.651
Biological data on admission			
Glucose (mmol/L)	7.08(6.21–8.81)	6.55(5.23–8.68)	0.211
HbA1c (%)	5.8(5.5–6.3)	6.0(5.6–7.0)	0.137
Creatinine clearance (ml/min)	74.1 $\pm$ 39.5	81.4 $\pm$ 35.9	0.346
CRP (mg/L)	7.5(3.0–26.9)	6.1(2.9–21.0)	0.409
HDL-cholesterol (mg/L)	47 $\pm$ 12	42 $\pm$ 9	0.028
LDL-cholesterol (mg/L)	141 $\pm$ 37	97 $\pm$ 34	<0.001
Total-cholesterol (mg/L)	220 $\pm$ 46	169 $\pm$ 45	<0.001
Triglycerides (mg/L)	119(78–194)	128(93–185)	0.527
Leukocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	10.9 $\pm$ 3.3	10.0 $\pm$ 2.7	0.153
LTL, T/S	1.24 $\pm$ 0.11	1.29 $\pm$ 0.10	0.026
FOS, UA	0.92 $\pm$ 0.12	0.91 $\pm$ 0.10	0.835
OGG1, UA	0.85 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.14	0.477
Clinical data and delay			
Anterior wall MI	15(31)	17(35)	0.829
LVEF (%)	53 $\pm$ 13	53 $\pm$ 11	0.989
STEMI	28(58)	19(40)	0.102
Time to admission (min)	289(163–555)	180(88–450)	0.035

was only found in younger patients, may have a major clinical impact, since they may extensively benefit from statin therapy. (3) Our study also extends to humans the recent findings on the link between DNA-oxidative damage and telomere shortening found in yeast and mice, suggesting that the repair of oxidative guanine damage plays a role in maintaining telomere integrity [14,15].

4.1. Leukocyte telomere length and statin

Although the interaction between telomere length and statin has not been specifically addressed in humans, recent studies, including randomized clinical trials, have suggested a potential therapeutic impact of statin on telomere biology. To the best of our knowledge, only Brouillette et al. [9], in the WOSCOPS trial, have addressed the relationship between LTL and chronic statin therapy: they found that patients with an increased risk based on LTL were more likely to benefit from statin treatment for primary prevention of CAD. As in our study, this effect was not related to lipid levels or CRP as a classical marker of inflammation. Hence, our data add to the findings of these studies, which used only pravastatin 40 mg/d, by including various types and doses of statin therapy, and in the setting of routine clinical practice. Whether this relationship depends on a specific molecule, on the dose or on the lipophilic nature of the molecule deserves further investigation. Moreover, our results identifying younger patients (≤ 64 y) as more specifically relevant to target for prevention therapy, are also consistent with those of the WOSCOPS trial which included only middle-aged patients (45–64 y, mean age 55 y).

Although the underlying mechanism is not known, it could constitute a new pleiotropic effect of statin. To bring support to this hypothesis, in a small randomized trial involving CAD patients, intensive lipid lowering therapy for 12 months prevented telomere erosion of endothelial progenitor cells [19]. Statins exert multiple actions on vascular and inflammatory cells, including the reduction

of inflammation and associated oxidative stress, which could contribute to the pleiotropic non-LDL-dependent effects of statin. In cultured human atherosclerotic plaque vascular smooth muscle cells, atorvastatin treatment delayed cell senescence and inhibited telomere shortening, an effect unrelated to a reduction in oxidative stress [25]. In our work, statin therapy had no impact on biomarkers of ROS-induced oxidative damage. Taken together, these data indicate that the effect of statin on TL is at least partly independent of oxidative stress. Atorvastatin dose-dependently inhibited the onset of senescence in ex vivo cultured endothelial progenitor cells, independently of ROS [17]. Statin exerts such beneficial effects via the geranylgeranyl pathway, and various cell cycle-promoting proteins are up regulated on mRNA and protein levels via the PI3K/Akt pathway, but with no change in telomerase activity [18]. Alternatively, statin treatment could also act by a posttranscriptional mechanism, via an increase in telomere capping protein TRF-2 [17].

4.2. Determinants of leukocyte telomere length

Surprisingly, in our study, we found no significant relationship between LTL and age in MI patients younger than 64 y (mean age 53 y). In contrast, in the older age group (mean age 76 y) there was a strong inverse correlation between the 2 parameters, suggesting that in older MI patients, TL is mostly influenced by ageing-related processes. In younger patients, the apparent lack of a significant association may be linked to the weak statistical power of the sample ($n = 139$), since most studies that reported a significant relationship between LTL and age in CAD patients had far more subjects [4,26]. Nevertheless, our work, further supported by other studies, strongly suggests that in younger patients with MI, LTL is only weakly influenced by age, and that other factors that interfere with telomere biology such as oxidative stress or heredity have a much stronger impact. In a cross-sectional study of a cohort of young adults aged ~ 20 y, Chen et al. found that age accounted for only 2.5% or less of variations in LTL and that the effects of risk factors on LTL in this cohort were far stronger [27]. Moreover, an interesting study by Frenck et al. showed that rate of telomere attrition varied markedly at different ages [28]. LTL attrition in young children is rapid and followed by an apparent plateau in young adults, then by gradual attrition later in life, suggesting that the loss of telomeric repeats in hematopoietic cells is a dynamic process that occurs at different rates in younger and older individuals. These data are consistent with our findings, which show variations in slopes according to the age group. In our study, we found no association between telomere length and demographic characteristics, treatments or traditional risk factors including LDL-cholesterol, white cell count, and CRP. Most prevention studies showed no or only modest association with risk factors [8,9,29]. Instead, the present study identified new major determinants of circulating LTL, i.e. FOS and OGG1, thus providing a new hypothesis for telomere regulation.

Previous studies in humans have demonstrated the involvement of ROS and inflammation in LTL variations. Demissie et al. reported that systemic oxidative stress, assessed by urinary 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$, was associated with reduced LTL in hypertensive subjects [30]. In a random population sample of 216 subjects, a higher level of circulating oxidized-LDL was associated with shorter telomeres ($p = 0.0006$) and to a lesser degree, with increased stiffness of the carotid artery ($p = 0.05$), as an index of vascular ageing [31]. Moreover, in a large population of middle-aged men and women free of overt CV disease, TL was shorter in subjects with high interleukin 6 [29]. In agreement with previous findings in type 2 diabetes, chronic obstructive pulmonary disease or in postmenopausal women, our data confirmed the lack of an independent association between LTL and plasma CRP [32]. Our study confirmed these data and established that reduced LTL was significantly associated with increased levels of new biomarkers of oxidative stress,

independently of age. FOS, a ROS-induced transcription factor, involved in a number of signalling pathways which is more sensitive and specific to disease severity than CRP, could play a direct role in atherosclerosis [16,33]. Although the mechanisms remain to be explored, our findings importantly suggest that the leukocyte FOS transcript is a major biomarker associated with LTL variation, with more clinical relevance than traditional inflammation markers, including CRP, for exploring the relationship between telomere length and CAD. This relationship was only significant in younger patients.

One of the main findings of our study is that the OGG1 mRNA level was a major determinant of LTL, independent of age. Our data confirm and extend to MI patients some recent experimental data obtained in yeast and mice, further supporting the hypothesis that the base excision repair pathway actively contributes to oxidative base repair to maintain telomere integrity [14,15].

4.3. Study limitations

The main strength of this study is the use of an observational design, reflecting daily clinical practice in patients with acute MI. This study, however, suffers from the usual limitations of non-randomized studies and determines correlations rather than causal relationships. The influence of lifestyle factors, such as healthy diet or physical activity that may modulate LTL was not assessed. However, there were twice as many obese patients in the statin group as in the group without statin treatment. These data strongly suggest that diet and physical activity were far from optimal in the statin group and therefore that such lifestyle factors may not have had a major impact on LTL. However, we cannot exclude the possibility that these were confounding factors. Moreover, the linear regression model only explained 13% of LTL variance, suggesting that other unknown factors have influenced LTL in such patients. However, in order to limit the influence of such factors, we employed several analytical strategies: (1) We performed the analysis by testing a very wide range of possible confounding factors, including demographics, risk factors, medical history, treatments and biological factors, etc. to limit the risk of confounding in our conclusions. (2) Secondly, a propensity score for the use of statin was calculated, and a matching procedure based on the propensity score was used in order to further limit the potential imbalances between patients receiving statin and those not receiving statin. Hence, although we cannot exclude the impact of other unmeasured confounding factors, we believe that the observed effects of statin on LTL, which are consistent with earlier hypotheses, are robust and reliable. However, although these statistical approaches help to evaluate the comparability of patients in the two groups, obviously, bias due to unmeasured confounding cannot be fully corrected for. There were major differences between the two groups for the type of medication (e.g. ACE inhibitor or aspirin), and these could have affected the findings. Therefore, we rigorously tested the relationship between each type of treatment and all of the possible treatment combinations (two or more) on LTL. We found that the type of medications in monotherapy or combined therapy had no impact on LTL. These findings on the lack of significant impact of such treatments on LTL are in agreement with most studies on CAD patients. However, given the observational design of the study, we cannot unequivocally exclude the possibility that the type of medication did have an impact on the findings. Also, the lack of information on the duration of statin treatment and the diversity in the doses and types of statin used make it difficult to interpret the results clearly. Further longitudinal or randomized studies are needed to validate these hypotheses. As our results on TL were obtained from circulating leukocytes, we can only presume that these findings can be extrapolated to vascular cells. However, a strong correlation between LTL and aortic vascular wall cells was recently established [34]. Given

the strength of this association, irrespective of the presence of overt vascular wall disease, we believe that the findings reported in the present study in circulating white blood cells may translate to vascular cells.

5. Conclusion

Our observational study provides important information on the positive impact of chronic statin therapy on telomere biology in high-risk patients. The findings are consistent with earlier hypotheses. If these data are confirmed in longitudinal and randomized studies, it could indicate a new pleiotropic effect of such molecules. Interestingly, the beneficial effect of statin therapy on LTL was significant in younger individuals (<64 y). Given the compelling evidence that vascular ageing, as indicated by telomere shortening, plays a causal role in CAD, these data suggest opportunities to identify new targets for early primary preventive treatment strategies. Moreover, our findings provide new insights into a mechanism that may affect telomere length, and that mRNA FOS and OGG1 could be new relevant biomarkers of leukocyte telomere length in the setting of CAD.

Conflict of interest

No conflicts of interest to disclose that could inappropriately influence the present work.

Acknowledgements

This work was supported by the University Hospital of Dijon, the Association de Cardiologie de Bourgogne and by grants from the Union Régionale des Caisses d'Assurance Maladie de Bourgogne (URCAM), Agence Régionale d'Hospitalisation (ARH) et Agence Régionale de Santé (ARS) de Bourgogne, Conseil Régional de Bourgogne and Fédération Française de Cardiologie (FFC). We wish to thank Jean-Claude Beer, Edith Fusier and Martine Jeanningros for research assistance and Philip Bastable for English assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.011](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.011).

References

- [1] Benetos A, Gardner JP, Zureik M, et al. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertension* 2004;43:182–5.
- [2] Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005;366:662–4.
- [3] Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 2005;111:2171–7.
- [4] Panayiotou AG, Nicolaides AN, Griffin M, et al. Leukocyte telomere length is associated with measures of subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010;211:176–81.
- [5] Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:546–50.
- [6] Samani NJ, Boulby R, Butler R, et al. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001;358:472–3.
- [7] Fuster JJ, Andres V. Telomere biology and cardiovascular disease. *Circ Res* 2006;99:1167–80.
- [8] Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, et al. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:842–6.
- [9] Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 2007;369:107–14.
- [10] Salpea KD, Humphries SE. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* 2010;209:35–8.
- [11] Babizhayev MA, Savel'yeva EL, Moskvina SN, et al. Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent

- predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior. *Am J Ther* 2010.
- [12] Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, et al. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 2008;44:235–46.
 - [13] Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1019:278–84.
 - [14] Lu J, Liu Y. Deletion of Ogg1 DNA glycosylase results in telomere base damage and length alteration in yeast. *EMBO J* 2010;29:398–409.
 - [15] Wang Z, Rhee DB, Lu J, et al. Characterization of oxidative Guanine damage and repair in mammalian telomeres. *PLoS Genet* 2010;6:e1000951.
 - [16] Patino WD, Mian OY, Kang JG, et al. Circulating transcriptome reveals markers of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3423–8.
 - [17] Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, et al. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation* 2004;110:3136–42.
 - [18] Assmus B, Urbich C, Aicher A, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res* 2003;92:1049–55.
 - [19] Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, et al. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:827–35.
 - [20] Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e47.
 - [21] Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 2004;110:227–39.
 - [22] Heinze G, Juni P. An overview of the objectives of and the approaches to propensity score analyses. *Eur Heart J* 2011;32:1704–8.
 - [23] Thavandiranathan P, Bagai A, Brookhart MA, et al. Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2006;166:2307–13.
 - [24] Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267–78.
 - [25] Mahmoudi M, Gorenne I, Mercer J, et al. Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2008;103:717–25.
 - [26] Willeit P, Willeit J, Brandstätter A, et al. Cellular aging reflected by leukocyte telomere length predicts advanced atherosclerosis and cardiovascular disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1649–56.
 - [27] Chen W, Kimura M, Kim S, et al. Longitudinal versus cross-sectional evaluations of leukocyte telomere length dynamics: age-dependent telomere shortening is the rule. *J Gerontol A: Biol Sci Med Sci* 2011;66:312–9.
 - [28] Frenck Jr RW, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5607–10.
 - [29] Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell* 2007;6:639–47.
 - [30] Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 2006;5:325–30.
 - [31] Nawrot TS, Staessen JA, Holvoet P, et al. Telomere length and its associations with oxidized-LDL, carotid artery distensibility and smoking. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010;2:1164–8.
 - [32] Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC, et al. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:283–9.
 - [33] Lavezzi AM, Milei J, Grana DR, et al. Expression of c-fos, p53 and PCNA in the unstable atherosclerotic carotid plaque. *Int J Cardiol* 2003;92:59–63.
 - [34] Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, et al. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J* 2008;29:2689–94.

La seconde partie de notre travail a porté sur l'évolution du niveau de transcription du proto-oncogène *c-Fos* au sein d'une population souffrant de pathologies coronaires à la phase aiguë de l'IDM.

En effet, compte tenu des résultats obtenus au cours de nos précédents travaux, le niveau de transcription de *c-Fos* au sein des leucocytes circulants apparaît intimement lié aux mécanismes de sénescence des cellules pouvant intervenir dans les processus athéromateux.

A ce jour, seules quelques études ont montré que le niveau de transcription de *c-Fos* pouvait être considéré comme un marqueur de la maladie athéromateuse [118, 119], que celui-ci était également en lien avec une utilisation de certaines thérapeutiques cardio-protectrices comme les statines [120], puisque *c-Fos* est impliqué dans de nombreux processus intervenant au cours de l'inflammation et des changements phénotypiques liés au processus athéromateux.

Dans ce contexte, notre étude a eu pour objectif de déterminer s'il pouvait exister une relation entre l'exposition tabagique et le niveau de transcription de *c-Fos* au niveau circulant chez des patients présentant une pathologie coronaire.

Notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois que l'exposition tabagique était associée à une augmentation du niveau de transcription circulant de *c-Fos*. Ces résultats suggèrent que *c-Fos* pourrait être considéré comme un bio-marqueur de l'exposition tabagique étant donné que l'augmentation du niveau de transcription de *c-Fos* est proportionnelle au temps d'exposition au tabagisme. Etant donné que *c-Fos*, au vu de résultats de la littérature, a été impliqué comme participant au processus athéromateux, il est possible de penser qu'il pourrait être un médiateur impliqué dans la toxicité tabagique dans les maladies coronaires.

B. Evolution du niveau de transcription de *c-Fos* en fonction du statut tabagique chez des patients souffrant de pathologies coronaires

Le manuscrit de notre travail dans ce domaine est accepté pour publication dans Atherosclerosis.

Nous l'avons intégré dans ce document de thèse (pages 54-59)



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Smoking and FOS expression from blood leukocyte transcripts in patients with coronary artery disease

Sebastien Saliques^a, Jean-Raymond Teyssier^b, Catherine Vergely^a, Luc Lorgis^{a,c}, Julie Lorin^a, Anne Donzel^b, Pierre Sicard^a, Juliane Berchoud^c, Sylviane Ragot^b, Claude Touzery^c, Yves Cottin^{a,c}, Luc Rochette^a, Marianne Zeller^{a,*}

^a IFR 100 Santé-STIC, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, UFR Médecine, Université de Bourgogne (EA2979), France

^b Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Dijon, France

^c Service de Cardiologie, CHU Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2011

Received in revised form 12 August 2011

Accepted 11 September 2011

Available online xxx

Keywords:

Smoking

Blood leukocyte transcriptome

c-Fos

Coronary artery disease

ABSTRACT

Objective: Analysis of the leukocyte transcriptome, in particular the Finkel-Biskis-Jenkins Osteosarcoma (*c-Fos*) gene, which has a prominent role in inflammation, provides new insights into atherosclerosis mechanisms. Although smoking is a major risk factor, the links between smoking status and coronary artery disease (CAD) remains unclear. We aimed to analyze the relationship between smoking status and *c-Fos* expression in circulating leukocytes of patients with CAD.

Methods: *c-Fos* expression was measured by RT-Q-PCR, from blood leukocytes of 239 consecutive patients after acute myocardial infarction (MI). The patients were asked about their smoking status and stratified into 3 groups: current smokers (CS) ($N=85$), past smokers (PS) ($N=78$) and never smokers (NS) ($N=76$). **Results:** NS had a higher risk profile including hypertension, and CS were younger than PS and NS (–13 years and 17 years respectively). There was only a trend towards lower CRP levels in NS and PS than in CS. The mean *c-Fos* transcript level was slightly higher in CS than in PS and NS (0.924 vs. 0.908 and 0.861 AU, respectively; $p=0.005$). By univariate analysis, neither age, nor sex, nor CRP nor white blood cell count was associated with *c-Fos* transcript levels. By multivariate analysis, CS (vs. PS + NS) was the strongest predictor of the *c-Fos* transcript level, ($B=0.042 \pm 0.014$, $p=0.003$), even after adjustment for confounding factors (i.e. hypertension, chronic medication, family history of CAD, and prior MI).

Conclusion: Our work suggests that *c-Fos* transcript level in blood leukocyte could be considered a cumulative biomarker of smoking. As the *c-Fos* gene has been put forward as a new factor in the progression and severity of atherosclerosis, it could be considered a novel potential pathway of tobacco toxicity in coronary artery disease.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Smoking is a major avoidable cause of cardiovascular disease worldwide [1] and was responsible for around 100 million deaths during the 20th century. This could rise to 1 billion deaths during the 21st century [2]. Smoking is associated with circulatory and vascular alterations, including atherosclerosis [3], endothelial dysfunction [4], altered blood lipid profile [5], increased platelet aggregation [6] and oxidative stress-associated biomarkers of inflammation [7]. However, the mechanisms by which smoking

influences atherosclerosis, and in particular coronary artery disease (CAD), are still not completely understood.

Finkel-Biskis-Jenkins Osteosarcoma (*c-Fos*) stress-induced transcription factors, which respond to and integrate many signaling pathways, are involved in inflammation and pathogenic changes in atherosclerosis [8]. *c-Fos* has been shown to be strongly expressed in the leukocytes of patients with atherosclerosis and has been described as a better marker of atherosclerosis than CRP [8]. Moreover, circulating *c-Fos* transcripts have also been shown to provide additional insights into the biology of cardiovascular (CV) diseases, suggesting that *c-Fos* expression in the blood could serve as a sensitive marker to improve treatment outcome [9]. However, there are very few data on the impact of smoking on this key oncogene. Comprehensive gene expression profiles reveal that *c-Fos* is specifically expressed in the lung tissue of smokers [10]. In adult rat aortic VSMC and adventitial fibroblasts, exposure to nicotine, a major component of cigarette smoke, exerts growth-promoting effects

* Corresponding author at: Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, UFR Médecine, 7Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France. Tel.: +33 380393292; fax: +33 380393293.

E-mail address: marianne.zeller@u-bourgogne.fr (M. Zeller).

on vascular cells through the enhancement of angiotensin-induced DNA synthesis and *c-Fos* expression [11].

In a prospective study, we aimed to analyze the relationship between smoking status and *c-Fos* mRNA expression in the blood leukocytes of patients with CAD.

2. Methods

2.1. Patients

All consecutive patients aged >18 years and hospitalized <24 h after symptoms onset for acute myocardial infarction (MI) in the coronary care unit of Dijon University Hospital between 1st March and 31st July 2009 were included. Patients with malignancy were excluded from the study. MI was defined by an increase in serum troponin I ($2\times$ upper limit of the hospital normal range) associated with symptoms of ischemia and/or characteristic electrocardiographic (ECG) signs. The present study complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of University Hospital of Dijon. Each patient gave written consent before participation.

2.2. Data collection

For each patient, data on demographics, risk factors (history of hypertension, diabetes, hyperlipidemia, obesity {defined as a body mass index (BMI) ≥ 30 }), a family history of CAD [i.e. parental history of premature (<55 years for men and <65 years for women) CAD in first degree relative] and prior MI were prospectively collected. Clinical data, including hemodynamic parameters on admission, left ventricular ejection fraction (LVEF) and location of infarction were recorded. LVEF was determined by echocardiography at 2 ± 1 days after admission.

2.3. Angiographic data

The coronary angiography was performed via the femoral or radial approach. The number of diseased vessels (stenosis >50%) was determined. The angiograms were analyzed by 2 expert investigators blinded to the clinical and biological data. Among the study population ($n=239$), 15(6%) patients did not undergo coronary angiography.

2.4. Biological data

Blood samples were drawn at admission [time from symptom onset to blood sampling: 240(160–579) min] to assess biological variables.

Homocysteine concentrations were determined by chemiluminescence on an Immulite 2000 analyzer (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA), C-reactive protein (CRP), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglyceride (TG) concentrations were measured on a Dimension analyzer (Dade Behring, Newark, NE) using immunonephelometry assay. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were calculated using the Friedewald formula [12]. Plasma glucose concentrations [enzymatic method (glucose oxidase)] and creatinine levels were measured on a Vitros 950 analyzer (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY). The MDRD (Modification of the Diet in Renal Disease) level was calculated as $186.3 \times (\text{Cr}) - 1.154 \times (\text{age}) - 0.203 \times (0.742 \text{ if female}) \times (1.21 \text{ if African American})$ [13]. Glycated hemoglobin A1C (HbA1c) was measured with ion exchange HPLC (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Creatine kinase (CK) peaks were assessed by sampling every 8 h during the first two days after admission (Dimension Vista Intelligent Lab System, Siemens). Plasma N-terminal pro B-type

natriuretic peptide (NT-proBNP) was determined by ELISA with an Elecsys NT-proBNP sandwich immunoassay on Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Peak creatine kinase (CK) was assessed by sampling every 8 h during the first two days after admission (Dimension Vista Intelligent Lab System, Siemens).

2.5. mRNA extraction and Quantitative RT-PCR

Blood samples were salted-out in a lysing solution (Tris HCL pH 7.5; 50 mM; MgCl₂ 25 mM; NaCl 50 mM) to obtain a total leukocyte pellet. mRNA were obtained using a TRIZOL® (Invitrogen, Paisley, UK) extraction assay protocol on the leukocyte pellet, and reverse transcribed using Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen, Paisley, UK).

The levels of the transcripts were quantified by the relative gene expression analysis method using Q-PCR technique, in duplicate at least two or three times. Briefly, for each amplification, aliquots of cDNA from 50 ng of total RNA were amplified by the Q-PCR technique on the Rotorgene 3000 (Corbett Research, Cambridge, UK), using the Quantifast SYBR Green PCR kit (Qiagen S.A., France) in a 25 μ L reaction volume. PCR amplification was run on a Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, France). The GAPDH gene was selected as the reference (normalizing) gene after testing the homogenous expression of three genes (GAPDH, B2M and ACTB) using geNorm software. Each gene sequence was amplified in triplicate for 45 cycles under standardized conditions and the results were expressed as the mean of the three Cycle Threshold (Ct) values. The reaction mixture contained 200 ng of each primer and the PCR cycle parameters were: 94° for 15 s, 60° for 1 min, 72° for 40 s. The sequences of the primers selected by the Primer3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research) were tested for their specificity by obtaining the melting curves at the end of each PCR. The *c-Fos* specific primers were: forward 5'-GGA GGA CCT TAT CTG TGC GTG A-3', and reverse 5'-GAA CAC ACT ATT GCC AGG AAC ACA-3'. The GAPDH specific primers were: forward 5'-CAT CTC TGC CCC CTC TGC T-3', and reverse 5'-ACG CCT GCT TCA CCA CCT T-3'. The PCR efficiency was established at 0.95 by the standard curve. RT-PCR was normalized by measuring the average Ct ratio in the investigated genes and in the control gene, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

2.6. Group definition

Patients were rigorously asked about their self-reported smoking status by structured interviews conducted at the time of their hospital admission. Current smokers and patients who had stopped smoking <3 months earlier were classified as current smokers. Patients who had stopped smoking ≥ 3 months earlier were classified as past smokers and those who had never smoked were classified as never smokers.

2.7. Statistical analysis

Continuous variables are presented as medians (25–75th percentile) or means $\pm$ SD, as appropriate or as proportions. For continuous variables, a Kolmogorov–Smirnov analysis was performed to test normality. One Way ANOVA was performed to compare the 3 groups (current, past and never smokers). Dichotomous variables, expressed as numbers (%), were compared by Chi-square tests for the 3 groups. For the comparison between 2 groups (univariate predictor of *c-FOS* level, Table 2), Pearson's or Spearman's rank correlation was used for continuous variables, and Student *t* test or Wilcoxon test was used for dichotomous variables. Multiple linear regression analysis was performed with the *c-Fos* transcript level as a dependent variable, to test the independent predictors of *FOS* expression. Variables entered into the model

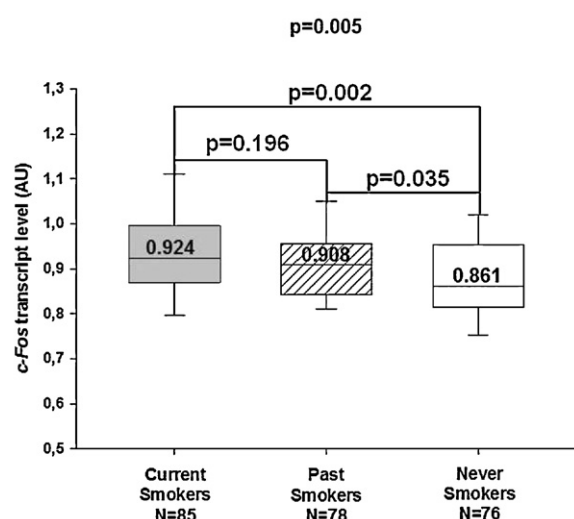


Fig. 1. *c-Fos* transcript level according to smoking status (AU). Patients who currently smoke or had stopped smoking <3 months were classified as current smokers ($n = 85$). Patients who had stopped cigarette consumption ≥ 3 months were classified as past smokers ($n = 78$) and those who had never smoked were classified as never smokers ($n = 76$).

were those with a significant relationship ($p < 0.05$) in univariate analysis. Given that only CS, but not PS or NS, is expected to be associated with the risk of MI, we focused our multivariate analysis on CS for more clinical relevance. Smoking was then entered as a dichotomous variable (current smoking vs. past or never smokers). In accordance with the Bonferroni correction, the alpha value was lowered to 0.02 to account for the number of comparisons being performed.

3. Results

3.1. Characteristics of the study population

During the inclusion period, 239 patients were included in the study. Baseline characteristics of the population according to the smoking status are shown in Table 1. As expected, never smokers were the oldest and current smokers the youngest.

Furthermore, never smokers had a higher risk profile, including hypertension and hypercholesterolemia. CS were younger than PS and NS (-13 years and 17 years respectively) and more likely to be male. Cardiovascular drugs, except aspirin, were more frequently used in the PS and NS groups. Blood glucose levels were lower for CS. Kidney function as assessed by MDRD gradually deteriorated from current to never smokers, as age increased. CRP levels was similar for the 3 groups.

One major finding of our study was that the mean *c-Fos* transcript level in CS was markedly higher than that in PS and the difference was even greater for NS (0.924 [0.869 – 0.997] AU vs. 0.908 [0.841 – 0.955] AU and 0.861 [0.817 – 0.958] AU, respectively, $p = 0.005$) (CS vs. PS: $p = 0.196$; PS vs. NS: $p = 0.035$; CS vs. NS: $p = 0.002$) (Fig. 1).

3.2. Determinants of *c-Fos* transcript level

All of the parameters listed in Table 1 were tested for their relationship with the *c-Fos* transcript level, and the results are presented in Table 2. The *c-Fos* transcript level gradually increased with HbA1c and homocysteine levels ($p = 0.125$ and $p = 0.168$ respectively). Neither blood lipids (LDL-cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol or total cholesterol), nor systemic inflammation

markers (leukocyte count or CRP) were significantly associated with the *c-Fos* transcript level.

In contrast, *c-Fos* transcript levels tended to be higher in hypertensive patients ($p = 0.188$). Interestingly, patients with a family history of CAD or prior MI had a lower *c-Fos* transcript level ($p = 0.070$ and $p = 0.064$, respectively). No clinical parameter was significantly associated with the biomarker. The *c-Fos* transcript level was slightly lower in patients under ACE inhibitors ($p = 0.174$) or beta blockers ($p = 0.067$), which could explain the lower level of *c-Fos* in patients with prior MI. The frequency of diabetes in patients with prior MI was similar to that in patients without prior MI ($9(31\%)$ vs. $48(19\%)$, $p = 0.110$). Moreover, the levels of homocysteine and HbA1c were similar in patients with and without prior MI (14.6 ± 6.8 $\mu\text{mol/L}$ vs. 13.6 ± 6.3 $\mu\text{mol/L}$, $p = 0.440$ and 6.2 ± 1.1 vs. 6.1 ± 1.2 , $p = 0.572$, respectively).

We further performed linear regression analyses to test the predictors of *c-Fos* transcript levels. Four variables showed a significant association with *c-Fos* transcript levels by univariate analysis ($p < 0.05$) (i.e. current smoking, family history of CAD, prior MI, treatment with ACE inhibitors or beta blockers. In order to avoid multicollinearity between prior MI and chronic treatment with ACE inhibitors or beta blockers, only prior MI was introduced into the model. The multivariate model showed that only smoking status and a family history of CAD remained independent predictors of the *c-Fos* transcript level ($\beta = 0.042$, $\text{SE} = 0.014$, $p = 0.003$ and $\beta = -0.036$, $\text{SE} = 0.015$, $p = 0.016$, respectively; $R^2 = 0.075$). Current smoking was the strongest predictor of elevated levels of *c-Fos* transcripts ($p = 0.003$). Given the major difference in risk factors among the 3 smoking status groups, in particular for age, gender, hypertension, diabetes and hypercholesterolemia, we performed a series of additional analyses by including each of these variables in the multivariate linear regression model. These risk factors were included as forced individual variables, with prior MI, a familial history of CAD and current smoking as covariates. Neither age ($p = 0.202$), female gender ($p = 0.697$), hypertension ($p = 0.292$), diabetes ($p = 0.862$) nor hypercholesterolemia ($p = 0.397$) were significantly associated with FOS. These additional analyses did not alter the strength of the predictive value of smoking on the *c-Fos* transcript levels. Patients on chronic therapy with ACEi or Betablockers showed a trend towards lower levels of FOS ($p = 0.174$ and $p = 0.067$, respectively (Table 2)). Treatments such as ACEi or betablockers may therefore have affected FOS transcript levels. In a comprehensive univariate linear regression analysis, we tested treatments with ACEi or betablockers for their relationship with FOS levels. The use of betablockers or ACEi was associated with only a trend towards lower levels of FOS ($\beta = -0.032$, $\text{SE} = 0.017$, $p = 0.057$; $\beta = -0.017$, $\text{SE} = 0.017$, $p = 0.310$). Only the use of the combined variable [betablocker or ACEi] was significantly associated with lower FOS transcript levels ($\beta = -0.032$, $\text{SE} = 0.015$, $p = 0.027$). When included in the multivariate model including familial history and smoking, this combined variable was not independently associated with FOS transcript levels ($\beta = -0.025$, $\text{SE} = 0.015$, $p = 0.089$). Prior MI was not included in this model to avoid multicollinearity.

4. Discussion

Our prospective study in patients with CAD shows for the first time a strong association between *c-Fos* gene transcript levels in blood leukocytes and smoking. Our data further suggest that this association is strikingly independent of classical inflammation markers such as CRP or white blood cells (WBC). *c-Fos* is a transcription factor involved in many signaling pathways, and given its prominent role in atherosclerosis severity, our study suggests that it may be implicated in a novel pathophysiological mechanism that underlies the biological effects of smoking.

Table 1
Patients characteristics. *n*(%), mean $\pm$ SD or median (IQR).

	Current smokers, N = 85	Past smokers, N = 78	Never smokers, N = 76	<i>p</i>
Risk factors				
Age, years	55 $\pm$ 10	68 $\pm$ 13	72 $\pm$ 12	<0.001
Female	13(20)	6(8)	40(52)	<0.001
Hypertension	27(32)	42(54)	48(63)	<0.001
Obesity	16(19)	16(21)	19(26)	0.619
Diabetes	15(18)	11(14)	22(29)	0.056
Hypercholesterolemia	29(34)	39(50)	36(47)	0.089
Family history of CAD	28(33)	20(26)	21(34)	0.566
Prior MI	6(7)	10(13)	8(11)	0.467
Clinical data				
LVEF, %	54 $\pm$ 12	54 $\pm$ 12	54 $\pm$ 12	0.128
Systolic blood pressure, mmHg	138 $\pm$ 30	139 $\pm$ 28	141 $\pm$ 31	0.815
Diastolic blood pressure, mmHg	82 $\pm$ 19	82 $\pm$ 19	78 $\pm$ 17	0.429
Heart rate, b/min	76 $\pm$ 21	76 $\pm$ 15	82 $\pm$ 20	0.053
Anterior wall location	27(31%)	27(35%)	31(42%)	0.349
Chronic treatments				
ACE inhibitor	11(12)	21(27)	21(28)	0.033
Statin	13(15)	26(33)	23(30)	0.017
Aspirin	15(18)	15(19)	13(17)	0.955
Betablocker	10(12)	18(23)	26(34)	0.002
Fibrate	3(4)	0(0)	6(8)	0.032
Oral antidiabetic drug	8(9)	8(10)	15(20)	0.086
Biological data				
Time to sampling, min	230(140–530)	240(169–639)	206(170–560)	0.267
Glucose, mmol/L	6.5(5.5–8.0)	7.2(6.0–8.5)	7.2 (6.2–10.0)	0.017
HbA1c, %	5.7(5.5–6.1)	5.7(5.5–6.2)	5.8(5.5–6.3)	0.394
MDRD, mL/min	86.0(70.9–100.4)	73.0(56.8–89.9)	66.4(51.6–77.7)	<0.001
CRP, mg/L	4.6(2.9–9.75)	5.0(2.9–11.9)	6.0(2.9–24.9)	0.468
Homocysteine, μ mol/L	12(9–18)	12(9–15)	12(9–16)	0.421
HDL-cholest, g/L	0.43(0.32–0.49)	0.42(0.36–0.50)	0.45(0.38–0.53)	0.129
Triglycerides, g/L	1.40(0.93–2.11)	1.35(0.89–1.87)	1.15(0.80–1.80)	0.120
LDL-cholest, g/L	1.24(0.97–1.52)	1.22(0.97–1.51)	1.21(0.93–1.46)	0.730
Total-cholest, g/L	1.99 $\pm$ 0.51	1.97 $\pm$ 0.45	1.97 $\pm$ 0.52	0.978
Leukocyte count, 10 ³ /mm ³	11.0(9.3–13.6)	9.3(7.8–11.4)	10.1(8.6–12.6)	<0.001
CK peak, IU/L	692.5(207.5–1639.5)	473.5(159.3–1430.0)	541.5(224.0–1828.5)	0.397
Angiographic data				
Number diseased vessels	N = 84	N = 73	N = 67	0.009
0	1(1%)	4(5%)	2(3%)	
1	41(49%)	27(37%)	28(42%)	
2	34(40%)	21(29%)	16(24%)	
3 or LM	8(9%)	21(29%)	21(31%)	

ACE, inhibitor; angiotensin-converting enzyme inhibitor; CAD, coronary artery disease; CK: creatine kinase; CRP, C-reactive protein; LM, left main; LVEF, left ventricular ejection fraction; MDRD, Modification of the Diet in Renal Disease; MI, myocardial infarction; CAD, coronary artery disease; MI, myocardial infarction; LVEF, left ventricular ejection fraction; STEMI: ST segment elevation MI.

Circulating leukocytes, which are exposed to the systemic environment including risk factors, are directly involved in low-grade inflammation related to atherosclerosis, may be useful to improve phenotype of the patient. Furthermore, using new techniques it is possible to explore the leukocyte transcriptome to assess the systemic consequences of CV risk factors, including smoking [14]. A recent large community-based cohort study demonstrated the clinical correlates of gene expression, and the results were consistent with the hypothesis that leukocyte inflammatory transcripts play a role in the pathogenesis of CAD and its risk factors [15].

4.1. *c-Fos* and atherosclerosis

The *c-Fos* gene is rapidly activated in the presence of different stimuli, resulting in a mitogenic effect, which has been shown in many proliferative processes, particularly during embryonic development and in some types of tumor [16,17]. The *c-Fos* gene is also known to regulate the growth, differentiation, and migration of a variety of vascular and non-vascular cells, and to regulate matrix degradation [18]. A panel of genes, including *c-Fos*, that were differentially expressed in microarray analysis, was clearly able to identify acute ischemic stroke patients from healthy subjects [19]. Immunohistological analyses have shown that *c-Fos* expression characterizes the initial phases of the destabilization

of unstable atherosclerotic carotid plaques [20]. Moreover, *c-Fos* is highly expressed and collocated with macrophage CD14+ immunoreactivity in human coronary artery plaque, suggesting its potential involvement in pathogenesis [8]. *c-Fos* overexpression may also promote early atherosclerotic coronary lesions by causing the proliferation of smooth muscle cells of the media [21]. Interestingly, an association between early atherosclerosis and *c-Fos* transcription was found in arterial biopsies of prenatal infants and infants with mothers who smoked [22].

4.2. *c-Fos* and smoking

Our study, which was supported by multivariate adjustments that included many demographic and biological variables, showed for the first time that in CAD patients, *c-Fos* transcript levels were associated with smoking status, independently of classical markers of inflammation, such as CRP or WBC. These findings are consistent with data from the literature, which show that conventional markers of inflammation are not significantly higher in smokers than in non-smokers. In a large contemporary randomized prospective clinical trial of current smokers, smoking intensity was not associated with CRP levels, and smoking cessation did not reduce CRP levels [23]. The effect of smoking reported in the present study seems specifically targeted to the blood

Table 2Univariate predictors of *c-Fos* transcript levels (AU).

		Median	IQR	<i>r</i>	<i>p</i>
Risk factors					
Age				+0.005	0.943
Female	Yes	0.900	0.837–0.969		0.703
	No	0.900	0.838–0.980		
Hypertension	Yes	0.891	0.827–0.957		0.188
	No	0.906	0.848–0.993		
Obesity	Yes	0.900	0.584–0.970		0.980
	No	0.897	0.835–0.980		
Diabetes	Yes	0.909	0.840–0.970		0.993
	No	0.891	0.837–0.981		
Hypercholesterolemia	Yes	0.925	0.839–0.987		0.274
	No	0.891	0.836–0.963		
Family history of CAD	Yes	0.891	0.805–0.953		0.070
	No	0.907	0.848–0.990		
Prior MI	Yes	0.891	0.824–0.925		0.064
	No	0.908	0.840–0.987		
Clinical data on admission					
LVEF				+0.007	0.919
Systolic blood pressure				−0.083	0.205
Diastolic blood pressure				−0.093	0.158
Heart rate				0.073	0.268
Anterior wall	Yes	0.910	0.847–0.984		0.326
	No	0.834	0.691–0.975		
Chronic treatments					
ACE inhibitor	Yes	0.886	0.823–0.943		0.174
	No	0.908	0.845–0.982		
Statin	Yes	0.909	0.848–0.973		0.796
	No	0.895	0.836–0.979		
Aspirin	Yes	0.900	0.855–0.946		0.775
	No	0.901	0.836–0.991		
Betablocker	Yes	0.893	0.814–0.935		0.067
	No	0.909	0.846–0.989		
Fibrate	Yes	0.979	0.821–1.055		0.226
	No	0.897	0.838–0.975		
Oral antidiabetic	Yes	0.900	0.837–0.978		0.397
	No	0.925	0.838–0.979		
Biological data					
Onset to sampling				+0.084	0.213
Glucose				+0.003	0.969
HbA1c				+0.106	0.125
MDRD				+0.067	0.302
CRP				+0.012	0.852
Homocysteine				+0.098	0.168
HDL-cholest				+0.066	0.329
Triglycerides				−0.015	0.829
LDL-cholest				−0.004	0.949
Total-cholest				−0.004	0.952
CK peak				+0.009	0.895
NT-proBNP				+0.038	0.568
Leukocyte count				−0.019	0.711
Angiographic data					
Number of diseased vessels					0.465
	0	0.848	0.811–0.908		
	1	0.889	0.825–0.979		
	2	0.909	0.856–0.991		
	3 or LM	0.899	0.837–0.958		

ACE, inhibitor: angiotensin-converting enzyme inhibitor; CAD, coronary artery disease; CK, creatine kinase; CRP, C-reactive protein; LVEF, left ventricular ejection fraction; MDRD, Modification of the Diet in Renal Disease; MI, myocardial infarction.

leukocyte transcriptome such as *c-Fos*. The results of the multivariate analysis also showed that the lower use of treatments such as betablocker or ACEi does not explain, or only partly explains the elevated levels of FOS in the CS group. There was a gradual increase in expression according to smoking status. Past smokers had a significantly higher level of *c-Fos* transcript than never smokers but a lower level than that in current smokers. This reversible relationship is consistent with the known reversible CV risk associated with tobacco use and suggests that the *c-Fos* transcript level could be considered a cumulative biomarker of exposure to cigarette smoke. The underlying mechanism of the high levels of *c-Fos* induced by smoking remains unclear. Cigarette smoke is a complex mixture of >4000 chemical substances

that are distributed in particulate and gaseous phases. It has been difficult to identify the pathophysiologically relevant components of cigarette smoke. Nicotine combustion products, the major psychoactive component in tobacco smoke, could promote the activation of genes such as *c-Fos*, further promoting other genes involved in smooth muscle cell proliferation and/or apoptosis. Nicotine-induced *c-Fos* immunostaining has been reported in rat brain [24], and the co-administration of nicotine and Ang II induced DNA synthesis and *c-Fos* expression in adult rat aortic VSMC and adventitial fibroblasts [11]. Whether smoking is also associated with increased expression of pro-apoptosis genes, such as p53 or p16Ink4a, in such high risk patients remains to be determined.

4.3. Study limitation

This study suffers from the usual limitation of non-randomized studies in that it determined correlations rather than causal relationships. Moreover, no assessment of smoking intensity or carbon monoxide levels was performed. However, the main strengths of this work are the use of a prospective design and a comprehensive analysis of a large number of confounding variables to analyze factors that affect the circulating leukocyte transcriptome. Moreover, we did not assess either smoking intensity or biological markers of exposure to tobacco smoke. Because biomarkers of exposure to cigarette smoke, such as cotinine levels, are highly specific to tobacco products, previous epidemiologic studies have used biomarkers of exposure to cigarette smoke to verify the accuracy of self-reported smoking. Quantitative biomarker data provide significantly more detailed and objective information on tobacco smoke exposure than does smoking history. It has been shown that self-reported smoking history markedly underestimates exposure to cigarette smoke in high risk patients [25]. A strong association between systemic inflammatory response and cotinine levels to measure second-hand exposure [26], or active smoking [27] has also been reported. However, both smokeless tobacco and nicotine replacement therapy, which may have been used by the high risk patients of our study, can raise nicotine levels, potentially confounding the interpretation of markers of exposure to cigarette smoke. Moreover, there is no gold standard to measure exposure to cigarette smoke, and, historically, self-reported smoking remains the standard for comparison in the real world setting.

5. Conclusion

The results of our investigation offer insights into cigarette-smoke related pathophysiologic processes by determining for the first time that smoking status is significantly associated with elevated levels of circulating *c-Fos* transcripts. If these findings are confirmed in larger prospective studies, our work suggests that the level of *c-Fos* transcripts could be considered as a biomarker of cumulative exposure to tobacco smoke. As *c-Fos* has been implicated in the progression and severity of atherosclerosis, it could be considered a potential pathway for tobacco toxicity in coronary artery disease.

Conflict of interest

No conflicts of interest to disclose that could inappropriately influence the present work.

Acknowledgements

This work was supported by the University Hospital of Dijon, the Association de Cardiologie de Bourgogne and by grants from the Union Régionale des Caisses d'Assurance Maladie de Bourgogne (URCAM), Agence Régionale d'Hospitalisation (ARH) et Agence Régionale de Santé (ARS) de Bourgogne, Conseil Régional de Bourgogne and Fédération Française de Cardiologie (FFC). We wish to thank Jean-Claude Beer, Edith Fusier and Martine

Jeanningros for research assistance and Philip Bastable for English assistance.

References

- [1] Teo KK, et al. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* 2006;368(9536):647–58.
- [2] Mackay J, Ericksen M. The Tobacco atlas. Geneva: World Health Organization; 2002.
- [3] Nishi K, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1649–54.
- [4] Schindler TH, et al. Coronary vasoregulation in patients with various risk factors in response to cold pressor testing: contrasting myocardial blood flow responses to short- and long-term vitamin C administration. *J Am Coll Cardiol* 2003;42(5):814–22.
- [5] Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ* 1989;298(6676):784–8.
- [6] Calapai G, et al. A cross-sectional investigation of biomarkers of risk after a decade of smoking. *Inhal Toxicol* 2009;21(13):1138–43.
- [7] Yanbaeva DG, et al. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007;131(5):1557–66.
- [8] Patino WD, et al. Circulating transcriptome reveals markers of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(9):3423–8.
- [9] Kang JG, et al. FOS expression in blood as a LDL-independent marker of statin treatment. *Atherosclerosis* 2010;212(2):567–70.
- [10] Ning W, et al. Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(41):14895–900.
- [11] Li JM, et al. Nicotine enhances angiotensin II-induced mitogenic response in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(1):80–4.
- [12] Warnick GR, et al. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem* 1990;36(1):15–9.
- [13] Levey AS, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130(6):461–70.
- [14] Ardigo D, Gaillard CA, Braam B. Application of leukocyte transcriptomes to assess systemic consequences of risk factors for cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(9):1109–20.
- [15] Freedman JE, et al. Relation of platelet and leukocyte inflammatory transcripts to body mass index in the Framingham heart study. *Circulation* 2010;122(2):119–29.
- [16] Dony C, Gruss P. Proto-oncogene *c-fos* expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature* 1987;328(6132):711–4.
- [17] Joseph P, et al. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of *c-fos*, *c-jun*, and *c-myc* proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 2001;61(2):295–303.
- [18] Goetze S, et al. TNF α induces expression of transcription factors *c-fos*: *Egr-1*, and *Ets-1* in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* 2001;159(1):93–101.
- [19] Moore DF, et al. Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation. *Circulation* 2005;111(2):212–21.
- [20] Lavezzi AM, et al. Expression of *c-fos*: p53 and PCNA in the unstable atherosclerotic carotid plaque. *Int J Cardiol* 2003;92(1):59–63.
- [21] Milei J, et al. Perinatal and infant early atherosclerotic coronary lesions. *Can J Cardiol* 2008;24(2):137–41.
- [22] Maturri L, et al. Intimal preatherosclerotic thickening of the coronary arteries in human fetuses of smoker mothers. *J Thromb Haemost* 2003;1(10):2234–8.
- [23] Asthana A, et al. Effects of smoking intensity and cessation on inflammatory markers in a large cohort of active smokers. *Am Heart J* 2010;160(3):458–63.
- [24] Seppa T, et al. Induction of Fos-immunostaining by nicotine and nicotinic receptor antagonists in rat brain. *Neuropharmacology* 2001;41(4):486–95.
- [25] Hsieh SJ, et al. Biomarkers increase detection of active smoking and secondhand smoke exposure in critically ill patients. *Crit Care Med* 2011;39(1):40–5.
- [26] Jefferies BJ, et al. Secondhand smoke (SHS) exposure is associated with circulating markers of inflammation and endothelial function in adult men and women. *Atherosclerosis* 2010;208(2):550–6.
- [27] Bazzano LA, et al. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med* 2003;138(11):891–7.

V. Discussion

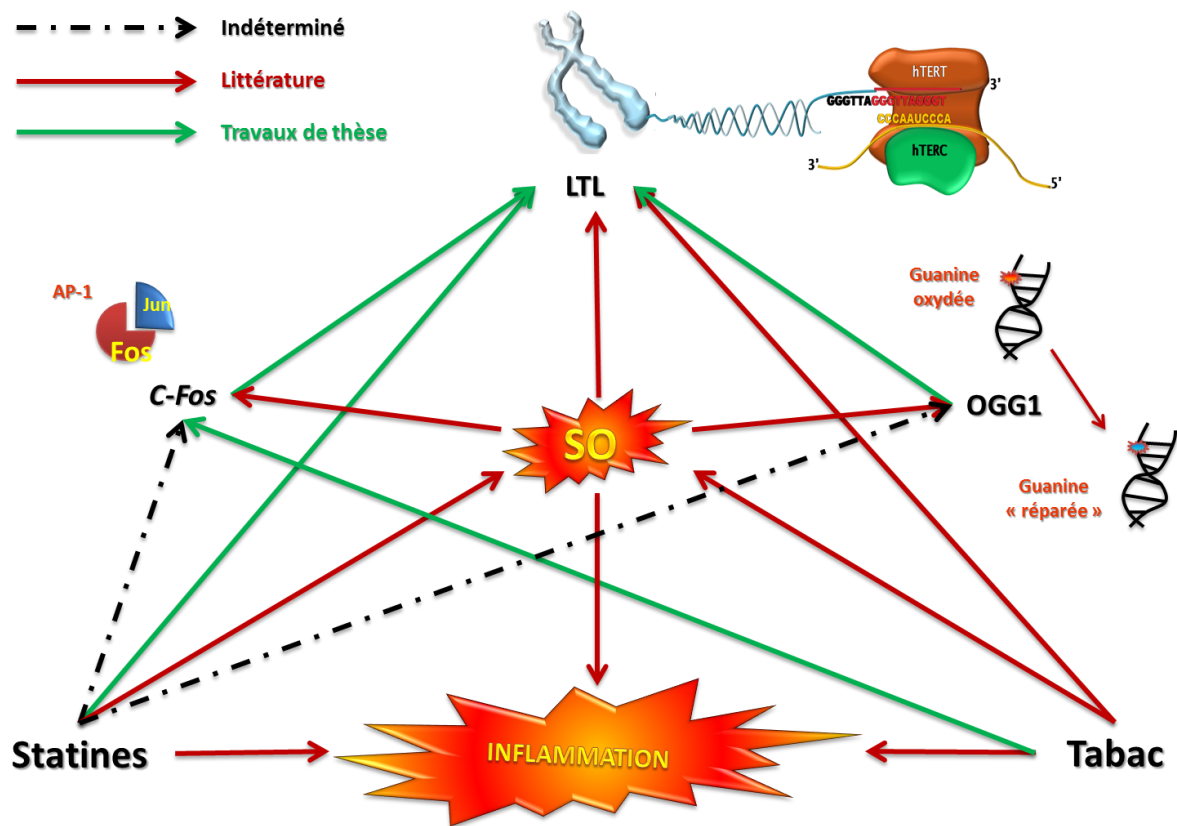


Figure 3: Schéma récapitulatif des différentes relations mises en évidence entre le stress oxydant (SO), la LTL, les niveaux d'expression des gènes *c-Fos* et *OGG1*, la prise de statine et le statut tabagique au cours de ce travail et dans la littérature actuelle.

L'originalité de notre travail a été d'étudier l'évolution de nouveaux bio-marqueurs circulants au cours de la phase aiguë de l'IDM. L'objectif de ce travail était de mettre en évidence une modification de ces marqueurs en relation avec certains phénotypes cliniques particuliers.

La première partie de notre travail a porté sur la relation existant entre la prise de statine et la longueur des télomères leucocytaires. L'objectif était de mettre en évidence une préservation de ceux-ci par ce type de thérapeutique pouvant ainsi permettre d'entrevoir un indicateur de l'efficacité plus globale de ces molécules en complément de leur activité hypocholestérolémiante.

Notre étude a été basée sur un ajustement multiparamétrique incluant de nombreuses variables biologiques et démographiques. Elle a également été renforcée par la comparaison de deux cohortes de patients ajustées par rapport à un score de propension sur l'utilisation de statine.

Nos résultats démontrent pour la première fois que, chez des patients à très haut risque :

- **Le traitement par statine était associé à une LTL plus importante** et que cet effet était indépendant d'un effet anti-inflammatoire systémique ou antioxydant global ;
- L'association entre la LTL et la prise de statine, qui n'a été retrouvée qu'au sein de **la population la plus jeune de l'étude** est susceptible d'avoir une importance capitale d'un point de vue clinique puisque les sujets jeunes pourraient bénéficier pleinement d'un effet protecteur par une statine, et ce précocement ;
- Les récentes données concernant le lien possible entre les atteintes oxydatives de l'ADN et le raccourcissement de la longueur des télomères mis en évidence chez la levure et la souris pourraient être transposées à l'espèce humaine et ainsi, mettre en avant le rôle majeur de la réparation de la guanine oxydée dans le maintien de l'intégrité de la longueur des télomères [130, 131].

1. Longueur des télomères leucocytaires et statines

Alors que la nature de l'association entre la longueur des télomères et les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase n'a pas encore été clairement décrite chez l'homme, des travaux récents, comprenant des études cliniques randomisées sur un grand nombre de sujets, ont suggéré la potentielle influence du traitement par statine sur la biologie des télomères. L'étude la plus marquante en la matière est celle réalisée par Brouillette *et al* en 2007, au cours de l'étude WOSCOPS. Celle-ci a mis en évidence une relation notable entre la longueur des télomères leucocytaires et la prise régulière de statine. Cette équipe a montré que les patients présentant un risque cardiovasculaire plus important, sur la base d'une longueur de télomères leucocytaires amoindrie, bénéficiaient également plus souvent d'une thérapeutique par statine dans le cadre d'une prévention primaire d'atteinte coronaire [53]. Tout

comme nous l'avons également montré dans nos travaux, l'effet des statines sur la LTL n'était en aucun cas relié au statut lipidique (triglycérides, LDL ou HDL cholestérol) ou inflammatoire du patient (en se basant sur un marqueur global et usuel d'inflammation qu'est la CRP).

Ainsi, notre étude confirme ces données en présentant l'originalité de ne pas être fondée uniquement sur un seul type de statine (les travaux de Brouillette *et al* n'ont porté que sur la pravastatine à la dose de 40 mg/jour), mais sur un panel plus important de molécules utilisées à des posologies différentes, dans un contexte clinique réaliste tel qu'il est observé par les cliniciens au sein de leur pratique courante.

De plus amples investigations seraient toutefois nécessaires afin de déterminer si l'effet sur la LTL dépend ou non de l'utilisation de certaines molécules, ou si l'effet protecteur des statines est conditionné par un effet dose ou un statut physicochimique particulier de la molécule (statine hydrophile ou lipophile).

Un second résultat majeur de notre étude a été de mettre en évidence que la relation entre la LTL et la prise de statine n'existait que chez les sujets jeunes. En effet, ce résultat corrobore les données de l'étude WOSCOPS de Brouillette. Cette étude portait sur une population d'âge moyen (45-64 ans ; moyenne d'âge 55 ans) tout comme notre cohorte de sujets jeunes basée sur l'âge médian de la population globale (<64 ans ; moyenne d'âge 53 ans).

Les résultats dans ce domaine conduisent à envisager un nouvel effet « pléiotrope » des statines.

De manière à approfondir cette hypothèse, il convient de revenir plus en avant sur la bibliographie récente. En effet, une étude randomisée réalisée chez des patients présentant une maladie coronarienne a récemment démontré que l'utilisation d'une thérapeutique visant à réduire de manière significative le taux de lipides circulants durant 12 mois pouvait prévenir l'érosion des télomères des cellules progénitrices endothéliales [97]. De plus, cette étude a montré que l'effet sur la longueur des télomères était dépendant de la dose utilisée in-vitro.

Ainsi, en plus de leur effet sur la réduction de la mortalité liée aux maladies coronaires de par leur effet réducteur sur le taux de lipides circulants, les statines possèdent donc de nombreux effets annexes sur les cellules vasculaires, les cellules impliquées dans les phénomènes inflammatoires et les processus pro-oxydants associés. Ces effets sont actuellement considérés comme des mécanismes d'action possibles des effets bénéfiques pléiotropes des statines indépendants de leur effet propre sur le taux de LDL-Cholestérol.

Au sein de cultures de cellules musculaires lisses issues de vaisseaux athéromateux humains, l'atorvastatine a été décrite comme protectrice vis-à-vis de la sénescence cellulaire et du processus d'attrition des télomères [132]. Cependant, cet effet n'a pas été relié à une activité réductrice de l'atorvastatine sur le stress oxydant.

Nos travaux, au cours de cette étude, n'ont également pas démontré de relation significative entre le traitement par les statines et certains marqueurs leucocytaires d'atteintes oxydatives liées à la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Conjointement, ces données permettent de penser que l'effet des statines sur la longueur des télomères serait au moins en partie indépendant du stress oxydant, d'autant plus que les travaux de Spyridopoulos et al ont démontré que l'effet dose-dépendant inhibiteur de l'atorvastatine sur la sénescence de cellules progénitrices endothéliales mises en culture était également indépendant de la production de ROS [95].

D'autres voies d'action des statines sont envisagées, ainsi l'effet des statines sur la longueur des télomères pourrait impliquer des actions sur la voie du géranylgeranyl, ou celle impliquant le couple PI3K/Akt, sachant que de nombreuses protéines mises en jeu dans les processus du cycle cellulaire sont positivement régulées par ces voies. Toutefois, l'étude publiée par Assmus et al en 2003 n'avait pas mis en évidence de changement dans l'activité télomérase [96]. Il serait alors possible que le traitement par une statine puisse interagir avec la longueur des télomères par un mécanisme post-traductionnel en augmentant l'expression de la protéine régulatrice TRF-2 comme cela a été suggéré par l'équipe de Spyridopoulos et al en 2004 [95].

2. Déterminants de la longueur des télomères leucocytaires

Au cours de notre travail, nous avons démontré qu'il n'y avait pas de relation statistiquement significative entre la longueur des télomères leucocytaires et les caractéristiques démographiques de notre population d'étude, les traitements autres que statines ou les traditionnels facteurs de risques incluant le LDL-Cholestérol, le taux de leucocytes totaux ou encore la CRP. De nombreuses études de préventions primaires ou secondaires ont précédemment montré une faible (voire une absence de) relation entre la longueur des télomères leucocytaires et les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels [51, 53, 133].

A l'inverse, notre présente étude a permis d'identifier de nouveaux déterminants majeurs de la LTL que sont les niveaux d'expression des gènes *c-Fos* et *OGG1*, permettant ainsi d'élaborer de nouvelles hypothèses mécanistiques quant à l'influence des statines sur la LTL chez des patients à haut risque cardiovasculaire.

Comme nous l'avons développé dans nos rappels bibliographiques, il est admis que des liens existent entre la « dynamique » des télomères et leur environnement, en particulier les niveaux des processus inflammatoires et oxydatifs. L'inflammation chronique et le stress oxydant associé sont deux caractéristiques intrinsèques des pathologies cardiovasculaires. Or, le stress oxydant est considéré actuellement comme l'un des acteurs initiateurs des mécanismes impliqués dans le raccourcissement de la longueur des télomères. En effet, une atteinte oxydative de l'ADN télomérique se traduit par la formation de 8-oxodG qui participe à l'initiation des désordres dans le maintien de la longueur des télomères.

Par exemple, les travaux de Demissie et al ont rapporté qu'un stress oxydant systémique, déterminé par la quantification urinaire de la 8-epi-prostaglandine F2 α , était associé à une réduction de la LTL chez des sujets présentant une hypertension artérielle [134]. De plus, au sein d'une importante cohorte d'hommes et de femmes d'âge moyen, exempts de maladies cardiovasculaires, les télomères leucocytaires étaient plus courts chez les sujets présentant les plus hauts niveaux de production d'Interleukine 6 (IL-6), qui est considérée comme un excellent marqueur de stress oxydant et d'inflammation ($p < 0,001$) [133]. Notre étude n'a pas mis en évidence de relation indépendante entre la LTL et le taux de CRP (marqueur classique et universel d'inflammation). Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux rapportés dans plusieurs études réalisées chez les patients présentant un diabète de type 2, une broncho-pneumopathie obstructive ou chez les femmes ménopausées [135-138].

Notre étude permet en revanche d'établir que la réduction de la LTL est significativement associée à l'augmentation de nouveaux bio-marqueurs de stress oxydant et ce indépendamment de l'âge. Le gène *c-Fos*, un gène de réponse précoce impliqué dans de nombreuses voies de signalisation et décrit comme marqueur plus sensible de la maladie que la CRP, a été retrouvé surexprimé dans la plaque d'athérome et pourrait jouer un rôle important dans l'athérosclérose [118, 119]. Même si la nature de la relation entre le niveau d'expression de *c-Fos* et la LTL nécessite de plus amples investigations, notre étude suggère que le niveau de transcription du gène *c-Fos* au sein des leucocytes est un bio-marqueur majeur de la LTL et de ses variations, en présentant l'avantage d'être plus sensible et plus pertinent que d'autres marqueurs d'inflammation plus traditionnels, comme la CRP. Cependant, il convient de rappeler qu'au cours de notre étude, cette relation n'a été retrouvée qu'au sein de la population la plus jeune.

Enfin, le dernier résultat marquant de notre étude a été que le niveau de transcription du gène OGG1 était un déterminant majeur et indépendant de la LTL. Nos données ont montré que cette forte relation inverse est constante quel que soit l'âge des sujets.

Ainsi, ces résultats pourraient confirmer chez l'homme, et plus précisément chez les sujets présentant un IDM, les précédentes données retrouvées chez la souris ou la levure démontrant la possible participation active du système d'excision réparation de l'ADN oxydé dans le maintien de la longueur des télomères [130, 131]. (Figure 3)

Dans un second temps, notre travail a porté sur l'évolution d'un paramètre déjà mis en évidence comme pouvant jouer un rôle majeur dans l'athérosclérose humaine, le niveau de transcription leucocytaire du gène *c-Fos* [118-120]. Nos travaux développés plus haut, ont permis de mettre en évidence que le transcriptome leucocytaire était en étroite relation avec d'autres paramètres circulants. Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution de ce paramètre lorsque celui-ci était associé à un facteur de risque cardiovasculaire majeur, le tabac.

En effet, le niveau d'expression du gène *c-Fos* a déjà été impliqué par le passé dans de nombreuses voies de signalisation. Notre étude chez des patients atteints de maladie coronaire a montré pour la première fois une très forte association entre le niveau de transcription du gène *c-Fos* au sein des leucocytes et le statut tabagique de la population étudiée. De plus nos travaux suggèrent que cette association ne serait pas liée à des marqueurs classiques de l'inflammation comme le niveau de CRP circulant. Nos travaux tendent à démontrer ainsi, que le niveau de transcription du gène *c-Fos* pourrait être impliqué dans les mécanismes physiopathologiques liés aux méfaits du tabac.

C. Niveau d'expression de *c-Fos* et athérosclérose

Les cellules circulantes comme les leucocytes, sont exposées à l'environnement systémique ce qui inclut les différents facteurs de risques. De ce fait, ils sont directement impliqués dans l'inflammation à bas-bruit rencontrée au cours de l'athérosclérose humaine, et ce phénomène peut être très utile dans la stratification des patients en fonction d'un phénotype particulier. De plus, avec l'utilisation de nouvelles techniques utilisables en pratique clinique courante il est possible d'explorer aisément le transcriptome leucocytaire de façon à estimer les conséquences systémiques de certains facteurs de risques cardiovasculaires comme le tabac [139]. En effet, une étude récente réalisée au sein d'une importante cohorte de sujets a montré que la clinique pouvait être corrélée à l'expression génique, et les résultats ont montré également que le transcriptome leucocytaire pouvait jouer un rôle crucial au sein de la physiopathologie des maladies coronaires et ses facteurs de risques [140].

Le gène *c-Fos* est très rapidement activé en présence de différents *stimuli*. Son activation a pour conséquence d'engendrer un état mitotique au sein de la cellule. Ce phénomène a déjà été démontré, particulièrement durant l'embryogénèse et dans certains types tumoraux [141, 142]. *c-Fos* est également connu pour sa participation dans les phénomènes de prolifération, différenciation

et de migration de nombreux types cellulaires qu'ils soient vasculaires ou non ainsi que dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire [143]. Plusieurs gènes, incluant *c-Fos*, ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés au cours de l'accident ischémique cérébral [144]. Une analyse immunohistologique a également démontré que le niveau d'expression de *c-Fos* était caractéristique des phases initiales de déstabilisation de la plaque d'athérome instable [118]. De plus, *c-Fos* est hautement exprimé et colocalise avec les macrophages CD14+ au sein des plaques d'athérosclérose humaine, suggérant que la présence de *c-Fos* au sein des plaques serait intimement liée au développement de cette pathologie [119]. Une surexpression de *c-Fos* pourrait aussi promouvoir précocement les lésions athéromateuses en initiant la prolifération des cellules musculaires lisses de la média [145]. Enfin, une association entre le développement précoce de plaques d'athérome et le niveau d'expression de *c-Fos* a été trouvée au sein de biopsies d'artères prénatales d'enfants nés de mères tabagiques [146].

D. *c-Fos* et tabac

Les résultats de ce travail montrent pour la première fois que chez les patients atteints de pathologies coronaires, le niveau de transcription du gène *c-Fos* est associé au statut tabagique, et ce indépendamment des marqueurs classiques d'inflammation circulante comme la CRP ou le taux de leucocytes.

Ces données sont tout à fait cohérentes avec d'autres résultats précédemment obtenus par d'autres équipes, montrant que les marqueurs conventionnels d'inflammation ne sont pas significativement différents entre les sujets fumeurs et non-fumeurs. Par exemple, dans un essai clinique récent sur des sujets fumeurs, l'intensité tabagique n'était pas associée aux niveaux de CRP circulants et, l'arrêt du tabac n'entraînait en aucun cas une diminution de ces taux de CRP [147].

Les effets du tabac rapportés au cours de notre travail semblent principalement associés au transcriptome leucocytaire et en particulier *c-Fos*.

Nous avons constaté une augmentation graduelle du niveau d'expression de *c-Fos* en fonction du statut tabagique. Les anciens fumeurs présentent une augmentation significative du niveau de transcription leucocytaire de *c-Fos* comparativement aux sujets n'ayant jamais fumé mais significativement réduite par rapport aux sujets fumeurs. Cette relation est cohérente par rapport aux données relatives à la réversibilité des facteurs de risques liés au tabac et suggère que le niveau d'expression de *c-Fos* au niveau leucocytaire pourrait être un bon marqueur cumulatif d'exposition tabagique. Cependant, les mécanismes reliant les hauts niveaux d'expression du gène *c-Fos* induits par le tabac restent à éluder. En effet, la fumée de tabac est un mélange d'une extrême complexité,

composé de plus de 4000 substances réparties dans les phases gazeuses et particulaires. De ce fait, il est très difficile d'identifier quel composant joue un rôle physiopathologique majeur. Les produits de combustion de la nicotine, le plus important composant psychoactif de la fumée de tabac, peuvent activer la transcription de certains gènes comme *c-Fos*, mais également promouvoir d'autres gènes impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses et/ou leur apoptose. Ce que l'on sait actuellement, c'est que l'induction de la transcription de *c-Fos* par la nicotine s'établit dans des cerveaux de rats [148], et que la co-administration de nicotine et d'angiotensine II peut induire une synthèse d'ADN et une augmentation de l'expression de *c-Fos* au sein de cellules musculaires lisses vasculaires d'aortes de rats adultes et de fibroblastes de l'adventice [122]. (Figure 3)

VI. Conclusions générales/Perspectives

Nos deux études apportent d'importantes informations concernant deux bio marqueurs d'intérêt dans le domaine cardiovasculaire : la longueur des télomères leucocytaires circulants et le niveau d'expression du gène *c-Fos*.

Nous avons montré que la longueur des télomères leucocytaires pouvait apporter une piste sur le suivi de l'efficacité des statines dans la prévention des maladies cardiovasculaires et que la préservation de la longueur des télomères leucocytaires par les statines pourrait représenter un nouvel effet pléiotropes de ces dernières ; cette action s'ajouterait à leurs effets hypocholestérolémiant, antioxydant et anti-inflammatoire.

Les résultats de notre première étude ont mis en avant l'utilisation potentielle de deux nouveaux bio-marqueurs d'intérêt dans la biologie des télomères à savoir *c-Fos* et OGG1. L'étude de la dynamique de ces marqueurs pourrait apporter des données intéressantes dans la compréhension de l'initiation des maladies cardiovasculaires en lien avec la sénescence cellulaire vasculaire. Dans ce cadre, le raccourcissement de la longueur des télomères leucocytaires peut être considéré comme un reflet de certains événements nucléaires. Bien évidemment, ces résultats méritent d'être confortés par de plus amples investigations au travers d'une étude longitudinale randomisée.

La seconde étude réalisée au cours de ce travail a permis de mettre en évidence que les mécanismes délétères du tabac concernant la maladie athéromateuse pourraient passer, en partie, par le niveau d'expression de *c-Fos*. Ce gène de réponse précoce impliqué dans de nombreuses voies de signalisation pourrait être lui aussi considéré comme un marqueur cumulatif d'exposition tabagique si les résultats obtenus sont confirmés par de plus grandes études, en particulier des études randomisées de sevrage tabagique. De plus, l'impact des substituts nicotiniques sur ce paramètre reste à déterminer.

Notre travail présente cependant certaines limites qu'il convient de soulever. La très grande variabilité interindividuelle mais également (et sans doute la plus problématique) intra-individuelle impose d'être prudent sur les résultats obtenus [62]. Comme ceci a déjà été suggéré dans nos rappels bibliographiques, la longueur des télomères ne suit pas une dynamique rectiligne et celle-ci résulte à un instant « t », d'une succession de phases d'attrition, de stase et d'élongation. De plus, bien que la longueur des télomères soit en partie déterminée par l'hérédité individuelle [149], cet héritage ne perdure pas entièrement car le contexte environnemental joue un rôle majeur dans la détermination de la longueur des télomères.

De plus, il semble que la longueur des télomères leucocytaires dépende également de la méthode de mesure. En effet, les différentes techniques dont nous disposons ne sont pas toujours utilisables sur

les mêmes types de support, et les méthodes de mesure pour une même technique peuvent varier d'une équipe de recherche à une autre de par la nature de la question posée. En effet, si une seule paire de chromosomes est étudiée, le Q-FISH ou l'analyse STELA peut apporter de précieuses informations. Si les échantillons sont sous forme de coupes tissulaires, la méthode Q-FISH est à privilégier alors que pour des cellules en suspension, la méthode de référence sera le Flow-FISH. Pour de l'ADN extrait de cellules, le Southern Blot et la PCR quantitative seront deux techniques utilisables.

Comme il a été rappelé en introduction, les méthodes PCR, compte tenu des limites d'amplification inhérentes à cette technique, tendent à privilégier la mesure de télomères courts de moins de 25 kb alors que les techniques d'hybridations ne sont pas limitées par la taille des télomères. De même, la détermination de la longueur des télomères par ces différentes techniques demande certains ajustements qui ne sont généralement pas suffisamment décrits, ce qui rend impossible toute standardisation des différentes techniques entre les différents laboratoires. Ces différences de techniques limitent la comparaison entre les différents travaux et expliquent les écarts de valeurs obtenus pour une estimation de la longueur des télomères leucocytaires au sein de populations équivalentes.

Il est également important de signaler que la longueur des télomères comme marqueur de malignité est controversée [150]. En effet, en fonction du type tumoral, la valeur pronostique de la longueur des télomères est différente. Par exemple, il a été démontré que des télomères courts étaient associés à un mauvais pronostic dans le cas des cancers de la prostate [151] ou le cancer du sein [152], alors qu'au contraire, la présence de télomères courts était associée à un meilleur pronostic dans le cas des cancers colorectaux [153] ou les carcinomes hépatocellulaires [154]. Enfin, dans le cas des cancers du poumon [155] ou les neuroblastomes [156, 157], la longueur des télomères a été démontrée comme pouvant être de bon ou de mauvais pronostic. Ces différences de longueurs de télomères en fonction du type tumoral peuvent en partie s'expliquer par la voie alternative d'élongation des télomères. En effet, certains types tumoraux sont plus enclins à utiliser cette voie que d'autres, expliquant le mauvais pronostic des tumeurs présentant des télomères longs. De plus, les différences de longueurs de télomères peuvent aussi être attribuées aux composants ou médiateurs associés aux différents types tumoraux. En effet, certaines cellules tumorales peuvent sécréter des interleukines n'ayant pas les mêmes effets sur la biologie des télomères : par exemple l'IL-2 va activer les télomérases [158] alors que le TNF- α aura pour effet d'accélérer le raccourcissement des télomères [111, 112].

De plus, il n'est pas aberrant de penser que la dynamique des télomères soit différente en fonction du type de leucocyte considéré. En effet, la formation, la durée de vie et les fonctions des différents types cellulaires qui composent les leucocytes totaux (polynucléaires neutrophiles, monocytes, lymphocytes etc.) laissent à penser que les cellules dites mémoires comme les lymphocytes B, soient moins sensibles à un stress ponctuel que les cellules de l'immunité immédiate comme les monocytes circulants dont le « turn-over » est rapide. Ainsi, il est probable que les différents types de leucocytes présentent des longueurs de télomères différentes. Il serait donc extrêmement intéressant d'étudier de manière séquentielle la cinétique d'attrition des télomères des différents types cellulaires composant les leucocytes totaux, de leur formation hématopoïétique à leur mort. Ceci pourrait nous apporter de nouveaux marqueurs plus spécifiques de certaines pathologies ou mettre en avant une sous population particulière pouvant constituer un biomarqueur plus pertinent.

Dans notre cas présent, il est évident que les populations lymphocytaires et monocytaires sont activées par l'explosion inflammatoire et oxydante liée à l'IDM. Il est donc difficile d'interpréter les mesures observées. Cependant les travaux de Spyridopoulos et *al.* [95] ont montré que chez des sujets coronariens stables, la longueur des télomères leucocytaires était corrélée à celle des progéniteurs de la moelle osseuse, suggérant que la mesure circulante des télomères resterait un bon reflet de la dynamique systémique.

Enfin, même si l'implication de télomères courts comme facteur causal de maladie cardiovasculaire reste à démontrer, une nouvelle étude de Calvert et *al.* suggère que des télomères leucocytaires courts pourraient favoriser la rupture des plaques à haut risque en activant les macrophages pro-inflammatoires résidents des plaques [159].

En ce qui concerne le niveau d'expression de *c-Fos* en relation avec le statut tabagique, même s'il est très probable que les effets néfastes de la fumée de cigarette soient médiés en partie par ce messager [160], il n'en demeure pas moins que l'ensemble des mécanismes mis en jeu reste à découvrir. En effet, *c-Fos* est impliqué dans un très large panel de voies de signalisations et de ce fait, son association avec l'exposition tabagique nécessite de plus amples investigations. En ce sens, il conviendrait de déterminer la valeur pronostique de ce paramètre sur les complications liées au tabac.

D'autres travaux sont donc nécessaires afin de mieux préciser l'implication des télomères et de facteurs du transcriptome leucocytaire comme *c-Fos* dans l'initiation et le développement des maladies cardiovasculaires et leurs liens avec les facteurs de risques cardiovasculaires.

VII. Références

1. Anderson, J.L., et al., *ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction)* developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(7): p. e1-e157.
2. Morrow, D.A., et al., *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2007. **115**(13): p. e356-75.
3. Alter, B.P., et al., *Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita*. *Blood*, 2007. **110**(5): p. 1439-47.
4. Calado, R.T., et al., *A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations*. *PLoS One*, 2009. **4**(11): p. e7926.
5. Hastie, N.D., et al., *Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing*. *Nature*, 1990. **346**(6287): p. 866-8.
6. Calado, R.T. and N.S. Young, *Telomere diseases*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(24): p. 2353-65.
7. Blasco, M.A., *Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging*. *Eur J Cell Biol*, 2003. **82**(9): p. 441-6.
8. Blackburn, E.H., *Switching and signaling at the telomere*. *Cell*, 2001. **106**(6): p. 661-73.
9. Edo, M.D. and V. Andres, *Aging, telomeres, and atherosclerosis*. *Cardiovasc Res*, 2005. **66**(2): p. 213-21.
10. Collins, K., *Mammalian telomeres and telomerase*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**(3): p. 378-83.
11. Hiyama, K., et al., *Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells*. *J Immunol*, 1995. **155**(8): p. 3711-5.
12. Liu, K., et al., *Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(9): p. 5147-52.
13. Houben, J.M., et al., *Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress?* *Free Radic Biol Med*, 2008. **44**(3): p. 235-46.
14. Nawrot, T.S., et al., *Telomere length and possible link to X chromosome*. *Lancet*, 2004. **363**(9408): p. 507-10.
15. Kirwan, M., et al., *Exogenous TERC alone can enhance proliferative potential, telomerase activity and telomere length in lymphocytes from dyskeratosis congenita patients*. *Br J Haematol*, 2009. **144**(5): p. 771-81.
16. Jaco, I., et al., *Role of mammalian Rad54 in telomere length maintenance*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(16): p. 5572-80.
17. Blasco, M.A., *The epigenetic regulation of mammalian telomeres*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(4): p. 299-309.
18. Schoeftner, S. and M.A. Blasco, *A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs*. *EMBO J*, 2009. **28**(16): p. 2323-36.
19. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. *Nat Genet*, 1998. **19**(3): p. 219-20.
20. Benetti, R., et al., *A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases*. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(3): p. 268-79.
21. Azzalin, C.M., et al., *Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends*. *Science*, 2007. **318**(5851): p. 798-801.
22. Luke, B., et al., *The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, 2008. **32**(4): p. 465-77.

23. von Zglinicki, T., *Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **908**: p. 99-110.
24. Makarov, V.L., Y. Hirose, and J.P. Langmore, *Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening*. Cell, 1997. **88**(5): p. 657-66.
25. van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions*. Cell, 1998. **92**(3): p. 401-13.
26. Karlseder, J., et al., *p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2*. Science, 1999. **283**(5406): p. 1321-5.
27. Shay, J.W. and S. Bacchetti, *A survey of telomerase activity in human cancer*. Eur J Cancer, 1997. **33**(5): p. 787-91.
28. Hakin-Smith, V., et al., *Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 836-8.
29. Henson, J.D., et al., *A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(1): p. 217-25.
30. Wang, R.C., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres*. Cell, 2004. **119**(3): p. 355-68.
31. Henson, J.D., et al., *DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(12): p. 1181-5.
32. Blagoev, K.B. and E.H. Goodwin, *Telomere exchange and asymmetric segregation of chromosomes can account for the unlimited proliferative potential of ALT cell populations*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(2): p. 199-204.
33. Wilson, D.M., 3rd and L.H. Thompson, *Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange*. Mutat Res, 2007. **616**(1-2): p. 11-23.
34. Dunham, M.A., et al., *Telomere maintenance by recombination in human cells*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 447-50.
35. Muntoni, A., et al., *Telomere elongation involves intra-molecular DNA replication in cells utilizing alternative lengthening of telomeres*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(6): p. 1017-27.
36. Perrem, K., et al., *Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids*. Oncogene, 1999. **18**(22): p. 3383-90.
37. He, H., et al., *POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination*. EMBO J, 2006. **25**(21): p. 5180-90.
38. Poulet, A., et al., *TRF2 promotes, remodels and protects telomeric Holliday junctions*. EMBO J, 2009. **28**(6): p. 641-51.
39. Pickett, H.A., et al., *Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles*. EMBO J, 2009. **28**(7): p. 799-809.
40. Pickett, H.A., et al., *Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming*. Hum Mol Genet, 2011: p. 9.
41. Takubo, K., et al., *Telomere lengths are characteristic in each human individual*. Exp Gerontol, 2002. **37**(4): p. 523-31.
42. Wilson, W.R., et al., *Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease*. Eur Heart J, 2008. **29**(21): p. 2689-94.
43. Wong, L.S., et al., *Telomere length of circulating leukocyte subpopulations and buccal cells in patients with ischemic heart failure and their offspring*. PLoS One. **6**(8): p. e23118.
44. Cawthon, R.M., *Telomere measurement by quantitative PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(10): p. e47.
45. Baird, D.M., et al., *Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells*. Nat Genet, 2003. **33**(2): p. 203-7.
46. Torella, D., et al., *Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 514-24.

47. Matthews, C., et al., *Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress*. *Circ Res*, 2006. **99**(2): p. 156-64.
48. Capogrossi, M.C., *Cardiac stem cells fail with aging: a new mechanism for the age-dependent decline in cardiac function*. *Circ Res*, 2004. **94**(4): p. 411-3.
49. Collerton, J., et al., *Telomere length is associated with left ventricular function in the oldest old: the Newcastle 85+ study*. *Eur Heart J*, 2007. **28**(2): p. 172-6.
50. Giannotti, G., et al., *Impaired endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in prehypertension: relation to endothelial dysfunction*. *Hypertension*, 2010. **55**(6): p. 1389-97.
51. Brouillette, S., et al., *White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 842-6.
52. Samani, N.J., et al., *Telomere shortening in atherosclerosis*. *Lancet*, 2001. **358**(9280): p. 472-3.
53. Brouillette, S.W., et al., *Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study*. *Lancet*, 2007. **369**(9556): p. 107-14.
54. Ogami, M., et al., *Telomere shortening in human coronary artery diseases*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(3): p. 546-50.
55. Cawthon, R.M., et al., *Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older*. *Lancet*, 2003. **361**(9355): p. 393-5.
56. Davies, M.J., et al., *Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries*. *Br Heart J*, 1988. **60**(6): p. 459-64.
57. Burring, K.F., *The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(6): p. 1678-89.
58. Minamino, T., et al., *Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2002. **105**(13): p. 1541-4.
59. Brouillette, S.W., et al., *Telomere length is shorter in healthy offspring of subjects with coronary artery disease: support for the telomere hypothesis*. *Heart*, 2008. **94**(4): p. 422-5.
60. Frenck, R.W., Jr., E.H. Blackburn, and K.M. Shannon, *The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(10): p. 5607-10.
61. Iwama, H., et al., *Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals*. *Hum Genet*, 1998. **102**(4): p. 397-402.
62. Svenson, U., et al., *Blood cell telomere length is a dynamic feature*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21485.
63. Slagboom, P.E., S. Droog, and D.I. Boomsma, *Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups*. *Am J Hum Genet*, 1994. **55**(5): p. 876-82.
64. Jeanclos, E., et al., *Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial*. *Hypertension*, 2000. **36**(2): p. 195-200.
65. Nordfjall, K., et al., *Telomere length and heredity: Indications of paternal inheritance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(45): p. 16374-8.
66. Nordfjall, K., et al., *Large-scale parent-child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length*. *Eur J Hum Genet*, 2009. **18**(3): p. 385-9.
67. Epel, E.S., et al., *Accelerated telomere shortening in response to life stress*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(49): p. 17312-5.
68. Puterman, E., et al., *The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10837.
69. Valdes, A.M., et al., *Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women*. *Lancet*, 2005. **366**(9486): p. 662-4.
70. Morla, M., et al., *Telomere shortening in smokers with and without COPD*. *Eur Respir J*, 2006. **27**(3): p. 525-8.

71. Babizhayev, M.A., et al., *Telomere Length is a Biomarker of Cumulative Oxidative Stress, Biologic Age, and an Independent Predictor of Survival and Therapeutic Treatment Requirement Associated With Smoking Behavior*. Am J Ther, 2010.
72. Benetos, A., et al., *Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity*. Hypertension, 2001. **37**(2): p. 381-5.
73. Hjelmborg, J.V., et al., *Leukocyte telomere length is inversely correlated with plasma Von Willebrand factor*. Thromb Res, 2010. **125**(6): p. e339-42.
74. Nordfjall, K., et al., *Telomere length is associated with obesity parameters but with a gender difference*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(12): p. 2682-9.
75. Fitzpatrick, A.L., et al., *Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. **66**(4): p. 421-9.
76. Chen, Y.F., *Sexual dimorphism of hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 1996. **5**(2): p. 181-5.
77. Choi, J., S.R. Fauce, and R.B. Effros, *Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol*. Brain Behav Immun, 2008. **22**(4): p. 600-5.
78. Benetos, A., et al., *Aldosterone and telomere length in white blood cells*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2005. **60**(12): p. 1593-6.
79. Butts, S., et al., *Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(12): p. 4835-43.
80. Lin, J., E. Epel, and E. Blackburn, *Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging*. Mutat Res, 2011.
81. Kananen, L., et al., *Childhood adversities are associated with shorter telomere length at adult age both in individuals with an anxiety disorder and controls*. PLoS One. **5**(5): p. e10826.
82. Tyrka, A.R., et al., *Childhood maltreatment and telomere shortening: preliminary support for an effect of early stress on cellular aging*. Biol Psychiatry, 2010. **67**(6): p. 531-4.
83. Humphreys, J., et al., *Telomere Shortening in Formerly Abused and Never Abused Women*. Biol Res Nurs, 2011.
84. Damjanovic, A.K., et al., *Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer's disease patients*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4249-54.
85. Lung, F.W., N.C. Chen, and B.C. Shu, *Genetic pathway of major depressive disorder in shortening telomeric length*. Psychiatr Genet, 2007. **17**(3): p. 195-9.
86. Richards, J.B., et al., *Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1420-5.
87. Richards, J.B., et al., *Homocysteine levels and leukocyte telomere length*. Atherosclerosis, 2008. **200**(2): p. 271-7.
88. Cherkas, L.F., et al., *The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length*. Arch Intern Med, 2008. **168**(2): p. 154-8.
89. Puterman, E., et al., *The power of exercise: buffering the effect of chronic stress on telomere length*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10837.
90. Tentolouris, N., et al., *White blood cells telomere length is shorter in males with type 2 diabetes and microalbuminuria*. Diabetes Care, 2007. **30**(11): p. 2909-15.
91. Astrup, A.S., et al., *Telomere length predicts all-cause mortality in patients with type 1 diabetes*. Diabetologia, 2010. **53**(1): p. 45-8.
92. Lung, F.W., C.S. Ku, and W.T. Kao, *Telomere length may be associated with hypertension*. J Hum Hypertens, 2008. **22**(3): p. 230-2.
93. Benetos, A., et al., *Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects*. Hypertension, 2004. **43**(2): p. 182-5.
94. Thavendiranathan, P., et al., *Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Intern Med, 2006. **166**(21): p. 2307-13.

95. Spyridopoulos, I., et al., *Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells*. *Circulation*, 2004. **110**(19): p. 3136-42.
96. Assmus, B., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes*. *Circ Res*, 2003. **92**(9): p. 1049-55.
97. Satoh, M., et al., *Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **116**(11): p. 827-35.
98. Werner, C., et al., *Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis*. *Atherosclerosis*, 2011. **216**(1): p. 23-34.
99. Fotiadou, P., O. Henegariu, and J.B. Sweasy, *DNA polymerase beta interacts with TRF2 and induces telomere dysfunction in a murine mammary cell line*. *Cancer Res*, 2004. **64**(11): p. 3830-7.
100. Petersen, S., G. Saretzki, and T. von Zglinicki, *Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts*. *Exp Cell Res*, 1998. **239**(1): p. 152-60.
101. von Zglinicki, T. and C.M. Martin-Ruiz, *Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases*. *Curr Mol Med*, 2005. **5**(2): p. 197-203.
102. Kawanishi, S. and S. Oikawa, *Mechanism of telomere shortening by oxidative stress*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1019**: p. 278-84.
103. Oikawa, S. and S. Kawanishi, *Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening*. *FEBS Lett*, 1999. **453**(3): p. 365-8.
104. Oikawa, S., S. Tada-Oikawa, and S. Kawanishi, *Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening*. *Biochemistry*, 2001. **40**(15): p. 4763-8.
105. von Zglinicki, T., *Oxidative stress shortens telomeres*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(7): p. 339-44.
106. Ohki, R. and F. Ishikawa, *Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(5): p. 1627-37.
107. Richter, T., et al., *TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts*. *Mech Ageing Dev*, 2007. **128**(4): p. 340-5.
108. Karlseder, J., et al., *The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response*. *PLoS Biol*, 2004. **2**(8): p. E240.
109. Floyd, R.A., et al., *Increased oxidative stress brought on by pro-inflammatory cytokines in neurodegenerative processes and the protective role of nitron-based free radical traps*. *Life Sci*, 1999. **65**(18-19): p. 1893-9.
110. Clermont, G., et al., *Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass*. *Anesthesiology*, 2002. **96**(1): p. 80-7.
111. Beyne-Rauzy, O., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits hTERT gene expression in human myeloid normal and leukemic cells*. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3200-5.
112. Beyne-Rauzy, O., et al., *Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(45): p. 7507-16.
113. Rahman, I., et al., *Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation*. *Mol Cell Biochem*, 2002. **234-235**(1-2): p. 239-48.
114. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(11): p. 859-68.
115. Amstad, P.A., G. Krupitza, and P.A. Cerutti, *Mechanism of c-fos induction by active oxygen*. *Cancer Res*, 1992. **52**(14): p. 3952-60.
116. Wang, Z.Q., et al., *Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos*. *Nature*, 1992. **360**(6406): p. 741-5.

117. Doherty, T.M., et al., *Genetic determinants of arterial calcification associated with atherosclerosis*. Mayo Clin Proc, 2004. **79**(2): p. 197-210.
118. Lavezzi, A.M., et al., *Expression of c-fos, p53 and PCNA in the unstable atherosclerotic carotid plaque*. Int J Cardiol, 2003. **92**(1): p. 59-63.
119. Patino, W.D., et al., *Circulating transcriptome reveals markers of atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3423-8.
120. Kang, J.G., et al., *FOS expression in blood as a LDL-independent marker of statin treatment*. Atherosclerosis, 2010. **212**(2): p. 567-70.
121. Ning, W., et al., *Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14895-900.
122. Li, J.M., et al., *Nicotine enhances angiotensin II-induced mitogenic response in vascular smooth muscle cells and fibroblasts*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 80-4.
123. Zeller, M., et al., *Prevalence and impact of metabolic syndrome on hospital outcomes in acute myocardial infarction*. Arch Intern Med, 2005. **165**(10): p. 1192-8.
124. Alpert, J.S., et al., *Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(3): p. 959-69.
125. Warnick, G.R., et al., *Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints*. Clin Chem, 1990. **36**(1): p. 15-9.
126. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
127. Grabowski, P., et al., *Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4807-12.
128. Bilgin, D.D., E.H. DeLucia, and S.J. Clough, *A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2009. **4**(3): p. 333-40.
129. Grundy, S.M., et al., *Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines*. Circulation, 2004. **110**(2): p. 227-39.
130. Lu, J. and Y. Liu, *Deletion of Ogg1 DNA glycosylase results in telomere base damage and length alteration in yeast*. EMBO J, 2010. **29**(2): p. 398-409.
131. Wang, Z., et al., *Characterization of oxidative Guanine damage and repair in mammalian telomeres*. PLoS Genet, 2010. **6**(5): p. e1000951.
132. Mahmoudi, M., et al., *Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2008. **103**(7): p. 717-25.
133. Bekaert, S., et al., *Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease*. Aging Cell, 2007. **6**(5): p. 639-47.
134. Demissie, S., et al., *Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study*. Aging Cell, 2006. **5**(4): p. 325-30.
135. Sampson, M.J., et al., *Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(2): p. 283-9.
136. Adaikalakoteswari, A., et al., *Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy*. Atherosclerosis, 2007. **195**(1): p. 83-9.
137. Aviv, A., et al., *Menopause modifies the association of leukocyte telomere length with insulin resistance and inflammation*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(2): p. 635-40.
138. Houben, J.M., et al., *Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Med, 2009. **103**(2): p. 230-6.

139. Ardigo, D., C.A. Gaillard, and B. Braam, *Application of leukocyte transcriptomes to assess systemic consequences of risk factors for cardiovascular disease*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(9): p. 1109-20.
140. Freedman, J.E., et al., *Relation of platelet and leukocyte inflammatory transcripts to body mass index in the Framingham heart study*. Circulation, 2010. **122**(2): p. 119-29.
141. Dony, C. and P. Gruss, *Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue*. Nature, 1987. **328**(6132): p. 711-4.
142. Joseph, P., et al., *Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species*. Toxicol Sci, 2001. **61**(2): p. 295-303.
143. Goetze, S., et al., *TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2*. Atherosclerosis, 2001. **159**(1): p. 93-101.
144. Moore, D.F., et al., *Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation*. Circulation, 2005. **111**(2): p. 212-21.
145. Milei, J., et al., *Perinatal and infant early atherosclerotic coronary lesions*. Can J Cardiol, 2008. **24**(2): p. 137-41.
146. Maturri, L., et al., *Intimal preatherosclerotic thickening of the coronary arteries in human fetuses of smoker mothers*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(10): p. 2234-8.
147. Asthana, A., et al., *Effects of smoking intensity and cessation on inflammatory markers in a large cohort of active smokers*. Am Heart J, 2010. **160**(3): p. 458-63.
148. Seppa, T., et al., *Induction of Fos-immunostaining by nicotine and nicotinic receptor antagonists in rat brain*. Neuropharmacology, 2001. **41**(4): p. 486-95.
149. Nordfjall, K., et al., *The individual blood cell telomere attrition rate is telomere length dependent*. PLoS Genet, 2009. **5**(2): p. e1000375.
150. Svenson, U. and G. Roos, *Telomere length as a biological marker in malignancy*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(4): p. 317-23.
151. Donaldson, L., et al., *Association between outcome and telomere DNA content in prostate cancer*. J Urol, 1999. **162**(5): p. 1788-92.
152. Heaphy, C.M., et al., *Telomere DNA content predicts breast cancer-free survival interval*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(23): p. 7037-43.
153. Garcia-Aranda, C., et al., *Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma*. Cancer, 2006. **106**(3): p. 541-51.
154. Oh, B.K., et al., *Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis*. J Hepatol, 2003. **39**(5): p. 786-92.
155. Hirashima, T., et al., *Prognostic significance of telomeric repeat length alterations in pathological stage I-IIIa non-small cell lung cancer*. Anticancer Res, 2000. **20**(3B): p. 2181-7.
156. Hiyama, E., et al., *Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics*. Jpn J Cancer Res, 1992. **83**(2): p. 159-64.
157. Ohali, A., et al., *Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma*. Cancer, 2006. **107**(6): p. 1391-9.
158. Kawauchi, K., K. Ihjima, and O. Yamada, *IL-2 increases human telomerase reverse transcriptase activity transcriptionally and posttranslationally through phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt, heat shock protein 90, and mammalian target of rapamycin in transformed NK cells*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5261-9.
159. Calvert, P.A., et al., *Leukocyte telomere length is associated with high-risk plaques on virtual histology intravascular ultrasound and increased proinflammatory activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(9): p. 2157-64.
160. Swenson, W.G., B.R. Wuertz, and F.G. Ondrey, *Tobacco carcinogen mediated up-regulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis*. Mol Carcinog, 2011. **50**(9): p. 668-79.

VIII. Liste des Figures et des Tableaux

Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'un télomère de cellule eucaryote ainsi que des principaux acteurs intervenant dans la régulation de leur longueur.	9
Figure 2: Représentation schématique des niveaux d'intervention des gènes <i>c-Fos</i> et OGG1 dans le maintien de l'intégrité du génome télomérique et l'homéostasie cellulaire liée à une atteinte inflammatoire.....	22
Figure 3: Schéma récapitulatif des différentes relations mises en évidence entre le stress oxydant (SO), la LTL, les niveaux d'expressions des gènes <i>c-Fos</i> et OGG1, la prise de statine et le statut tabagique au cours de ce travail et dans la littérature actuelle.	60
Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées en RT-Q-PCR.....	36

IX. Annexes

A. Publications scientifiques :

« Telomere length and cardiovascular disease. »

Saliques S, Zeller M, Lorin J, Lorgis L, Teyssier JR, Cottin Y, Rochette L, Vergely C.

Arch Cardiovasc Dis. 2010 Aug-Sep;103(8-9):454-9. Epub 2010 Oct 25.

« Circulating leukocyte telomere length and oxidative stress : a new target for statin therapy »

Saliques S, Teyssier JR, Vergely C, Lorgis L, Lorin J, Farnier M, Donzel A, Sicard P, Berchoud J, Lagrost C, Touzery C, Ragot S, Cottin Y, Zeller M.

Atherosclerosis. 2011 Sep 16. [Epub ahead of print]

« Smoking and Fos expression from blood leukocyte transcripts in patients with coronary artery disease »

Saliques S, Teyssier JR, Vergely C, Lorgis L, Lorin J, Donzel A, Sicard P, Berchoud J, Ragot S, Touzery C, Cottin Y, Rochette L, Zeller M

Atherosclerosis. 2011

B. Communications orales :

Saliques S, Teyssier JR, Vergely C, Lorgis L, Lorin J, Farnier M, Donzel A, Sicard P, Berchoud J, Lagrost AC, Touzery C, Ragot S, Cottin Y, Rochette L, Zeller M. Circulating Leukocyte Telomere Length and Oxidative Stress: a New Target for Statin Therapy.

Dijon, 2011; 17^{ème} Forum Jeunes Chercheur

Lorin J, **Saliques S**, Donzel A, Vergely C, Zeller M, Teyssier JR, Cottin Y, Rochette L. Etude de la longueur des télomères leucocytaires chez des patients présentant un infarctus du myocarde.

Nantes 2010; Printemps de la Cardiologie

Saliques S, Zeller M, Amoureux S, Sicard P, Wolf JE, Lorin J, Lagrost AC, Berchoud J, Donzel A, Cottin Y, Teyssier JR, Rochette L. Circulating Leukocyte Telomere Length Reflects the Burden of Oxidative Stress and Inflammation in Patients With Acute Myocardial Infarction

Orlando 2009; Annual congress of the American Heart Association AHA

Saliques S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Sicard P, Donzel A, Teyssier JR, Rochette L. Etude de facteurs fonctionnels, biologiques et géniques, associés à la longueur des télomères leucocytaires chez des patients présentant un infarctus du myocarde.

Dijon, 2008; 1^{ère} journée de l'IFR 100 Santé STIC

C. Communications affichées :

Saliques S, Teyssier JR, Vergely C, Lorgis L, Lorin J, Farnier M, Donzel A, Sicard P, Berchoud J, Lagrost AC, Touzery C, Ragot S, Cottin Y, Rochette L, Zeller M. Circulating Leukocyte Telomere Length and Oxidative Stress: a New Target for Statin Therapy.

Paris 2011; Annual congress of the European Society of Cardiology

Saliques S, Lorin J, Vergely C, Donzel A, Berchoud J, Lagrost AC, Ragot S, Teyssier JR, Cottin Y, Rochette L, Zeller M. Leukocyte Telomeres are shorter in patients with altered left ventricular ejection fraction in patients with acute myocardial infarction.

Lyon 2011; Printemps de la Cardiologie

Saliques S, Lorin J, Sicard P, Donzel A, Vergely C, Zeller M, Teyssier JR, Cottin Y, Rochette L. In the acute phase of myocardial infarction, the length of leukocytes telomeres depends on the patient's cardiological history and determines their future.

Nantes 2010; Printemps de la Cardiologie

Saliques S, Lorin J, Vergely C, Donzel A, Berchoud J, Lagrost AC, Teyssier JR, Cottin Y, Rochette L, Zeller M. Leukocyte telomere length and left ventricular ejection fraction in patients with acute myocardial infarction.

Stockholm 2010; Annual congress of the European Society of Cardiology

Saliques S, Zeller M, Vergely C, Amoureux S, Sicard P, Wolf JE, Lorin J, Lagrost AC, Berchoud J, Donzel A, Cottin Y, Teyssier JR, Rochette L. Determinants of leukocyte telomere length in patients with acute myocardial infarction.

Barcelone 2009; Annual congress of the European Society of Cardiology

Amoureux S, Deloy L, Sicard P, **Saliques S**, Zounib O, Menetrier F, Vergely C, Rochette L. Etude du BDNF vasculaire et du stress oxydatif au cours du développement de l'hypertension chronique chez des rats SHR.

Nancy 2009; Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire GRRC

Saliques S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Sicard P, Wolf JE, Donzel A, Teyssier JR ; Rochette L. La longueur des télomères leucocytaires est associée à la variation de paramètres fonctionnels, biologiques et géniques chez des patients présentant un infarctus du myocarde.

Nancy 2009; Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire GRRC

Saliques S, Zeller M, Vergely C, Amoureux S, Sicard P, Wolf JE, Lorin J, Lagrost AC, Berchoud J, Donzel A, Cottin Y, Teyssier JR, Rochette L. Determinants of leukocyte telomere length in patients with acute myocardial infarction.

Dijon 2009; 15^{ème} Forum Jeunes Chercheurs

TITRE DE LA THESE :

ETUDE DE LA LONGUEUR DES TELOMERES ET DU TRANSCRIPTOME LEUCOCYTAIRES CHEZ DES PATIENTS EN PHASE AIGUË DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE

AUTEUR : Sébastien SALIQUES

RESUME :

La pathologie athéromateuse avec ses complications cardio-vasculaires reste aujourd'hui une des principales causes de mortalité dans les pays développés. Dans ce contexte, l'élaboration de nouveaux bio-marqueurs de la maladie athéromateuse occupe une place importante. Les objectifs de ces bio-marqueurs sont :

- de définir les populations les plus à risque de développer une complication cardio-vasculaire,
- de stratifier les groupes de patients de manière à optimiser leur prise en charge clinique et thérapeutique
- de dévoiler de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la pathologie.

Dans ce contexte, nous avons ciblé trois bio-marqueurs d'intérêt à savoir la longueur des télomères leucocytaires (LTL) et le niveau d'expression leucocytaire des gènes *c-Fos* (impliqué dans les processus inflammatoires et oxydatifs) et OGG1 (nécessaire à la réparation des lésions oxydatives de l'ADN).

Nous avons donc dans une première partie de ce travail voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle la LTL pouvait être préservée par la prise régulière de statine, une thérapeutique ayant déjà démontré ses bienfaits en terme de prévention primaire et secondaire des maladies cardio-vasculaires. De plus, nous nous sommes intéressés aux possibles relations entre les niveaux d'expression des gènes *c-Fos* et OGG1 et la LTL. Nous nous sommes placés dans un contexte de patients à haut risque cardiovasculaire que représentent les patients en phase aigüe de l'infarctus du myocarde (IDM). Ce travail a permis de montrer que la prise régulière de statine pouvait préserver la longueur des télomères leucocytaires et ce particulièrement chez les sujets les plus jeunes (moins de 64 ans), suggérant un nouvel effet « pléiotrope » des statines. Ce travail a également permis d'identifier les gènes *c-Fos* et OGG1 comme étant des acteurs potentiels du maintien de l'intégrité des télomères.

La seconde partie de notre travail a porté sur une étude plus approfondie du niveau de transcription du gène *c-Fos* en relation avec l'un des principaux facteurs de risque de la maladie athéromateuse que représente le statut tabagique chez des patients présentant une maladie coronaire. Ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois une relation entre le niveau d'expression de *c-Fos* et le statut tabagique des sujets, suggérant que l'une des voies possibles de toxicité du tabac pourrait faire intervenir les voies de signalisations impliquant *c-Fos*.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence trois bio-marqueurs intéressants dans le domaine de la pathologie athéromateuse :

1. La longueur des télomères leucocytaires qui peut être une des voies d'action bénéfique des statines en prévention précoce des maladies cardio-vasculaires
2. Le niveau d'expression du gène OGG1 comme étant un des acteurs potentiels du maintien de l'intégrité des télomères
3. Le niveau d'expression du gène *c-Fos* comme marqueur cumulatif d'exposition tabagique et potentiel acteur des effets délétères du tabac

Restent à préciser les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu et ainsi développer des stratégies thérapeutiques adéquates afin d'optimiser la prise en charge des patients souffrant de pathologies athéromateuses.

MOTS-CLES : Bio-marqueurs, Stress oxydatif, Infarctus du myocarde, Longueur des télomères leucocytaires, *c-Fos*, OGG1, Statines, Pathologies athéromateuses, Tabac, Inflammation.