

INRS- INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**ÉTUDE DE LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE MMP-3
PAR DES MÉCANISMES ÉPIGÉNÉTIQUES ET INFLAMMATOIRES**

PAR
JULIE COUILLARD

THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
PHILOSOPHIAE DOCTOR (PH.D.)

JURY D'ÉVALUATION

PRÉSIDENT DU JURY : MICHEL CHARBONNEAU
EXAMINATEURS EXTERNES : RICHARD MOMPALER, JOSÉE DOSTIE
DIRECTEUR DE RECHERCHE : DR. YVES ST-PIERRE

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

MMP-3 est une métalloprotéase de la matrice impliquée dans des processus physiologiques et pathologiques tels que la réparation de blessure, la morphogenèse, le développement du cancer, l'arthrite et l'inflammation. La régulation transcriptionnelle de MMP-3 et des autres MMP est critique pour le développement des maladies. D'ailleurs, les possibilités de thérapies contre le cancer en utilisant des inhibiteurs de MMP n'ont jamais donné les résultats escomptés dû au manque de compréhension dans la régulation de ces enzymes. Les régulateurs classiques comme l'IL-1 β et le facteur de transcription AP-1 jouent souvent des rôles significatifs dans l'induction de l'expression de *MMP-3*. D'autres régulateurs comme la méthylation de l'ADN peuvent changer la réponse de MMP-3 dans certains types cellulaires.

Dans un premier temps, nos résultats indiquent que MMP-3 est régulé par la méthylation, notamment dans les cellules de cancer du colon humain. À l'aide de la lignée cellulaire HCT116/DKO ainsi que des inhibiteurs de méthyltransférases de l'ADN, nous démontrons que l'induction de l'expression des gènes *MMP-3* et *MMP-10* par l'hypométhylation est spécifique au type cellulaire.

Nos résultats suggèrent également que la cytokine inflammatoire IL-1 β induit une hypométhylation du promoteur *MMP-3*. De plus, cette hypométhylation semble spécifique au promoteur *MMP-3* puisque les promoteurs d'autres MMP ne semblent pas affectés par cette voie. L'hypométhylation par l'IL-1 β semble spécifique à cette cytokine car d'autres modulateurs d'inflammation n'induisent pas l'effet coopératif avec les inhibiteurs de méthylation.

L'étude de la régulation de la transcription de *MMP-3* a permis d'identifier des nouveaux mécanismes par lesquels la combinaison d'inhibiteurs de méthylation comme la 5-aza-dC et des régulateurs classiques comme l'IL-1 β peuvent pratiquement abolir le statut de méthylation du promoteur humain *MMP-3* et induire l'expression de *MMP-3*, notamment dans les cellules de cancer du colon. Ces résultats ont également permis d'établir un lien entre les processus inflammatoires et les altérations épigénétiques dans le contrôle de l'expression de gènes *MMP*.

Étudiant

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Yves St-Pierre. Grâce à ses bonnes méthodes pédagogiques, le Dr. St-Pierre a contribué au développement de mon autonomie et aux bonnes pratiques de laboratoire. Je n'oublie pas l'accueil chaleureux dès mon arrivée à la maîtrise. Je n'oublierai également jamais le plaisir de travailler avec lui et les nombreuses opportunités de voyager et de rencontrer des gens influents du milieu scientifique. Merci de m'avoir fait confiance et d'aimer le travail d'équipe!

Je remercie également le Dr. Sriharsa Pradhan et son bras droit, le Dr. Pierre-Olivier Estève de m'avoir accueilli dans leur laboratoire à Boston où j'ai eu beaucoup de plaisir et où j'ai appris énormément en très peu de temps.

Un merci spécial également à Doris Legault et Diane Tremblay. Doris pour toute son expertise et ses nombreux services rendus pendant ma maîtrise et Diane pour avoir relevé le défi de succéder à Doris avec tant de brio. À vous deux, vraiment, bravo!

Merci aussi à tous les étudiants présents et passés dans le laboratoire. Un énorme merci à Mélanie Demers qui m'a prise sous son aile pendant mes débuts et qui, sans elle bien des choses auraient été impossibles! Merci spécial à Geneviève, Carole et Katherine qui ont passé de nombreuses années à m'entendre parler!

Merci à l'ensemble de la communauté de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour la culture scientifique offerte durant le programme de doctorat, les conférences et les séminaires.

Merci à la Fondation Armand-Frappier et aux Instituts de Recherche en Santé du Canada pour leur soutien financier

Finalement, un énorme merci à ma famille, mon conjoint et mes amis qui m'ont toujours encouragé et qui ont cru en moi tout ce temps.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ GÉNÉRAL	ii
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ANNEXES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
CONTRIBUTION DES AUTEURS	xi
 CHAPITRE I.....	 1
Revue de littérature	1
1- Les métalloprotéases de la matrice (MMP)	2
1.1- Historique et fonctions	2
1.2- MMP et développement du cancer	9
1.2.1- Autres processus pathologiques	10
1.3- MMP-3	12
 2- Les facteurs de transcription dans la régulation de MMP-3	 13
2.1- Facteurs de transcription AP-1 et ETS	13
2.2- La régulation transcriptionnelle des MMP	18
2.3- La régulation transcriptionnelle de MMP-3	22
2.3.1- Caractéristiques du promoteur MMP-3	22
2.3.2- Autres facteurs de transcription	26
 3- Régulation transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN	 28
3.1- Historique	28
3.1.1- Autres modifications épigénétiques : modifications post-traductionnelles des histones.....	31
3.2- Mécanismes de méthylation de l'ADN	34
3.3- Fonctions de la méthylation de l'ADN	38
3.4- La méthylation dans les processus pathologiques.....	40
3.5- Techniques de détection de la méthylation	46
3.6- Les rôles de la méthylation dans la régulation des MMP	49
3.5- Mode d'action des agents déméthylants, inflammation, sénescence et réparation de l'ADN	51
 Objectifs généraux de la thèse	 57
 CHAPITRE II	 58
Résumé.....	59
Conclusion	67
 CHAPITRE III	 68

Résumé.....	69
Conclusion	81
 CHAPITRE IV.....	 82
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	82
1- La régulation de l'expression de MMP-3 encore peu explorée.....	83
2- La régulation de MMP-3 et la spécificité cellulaire.....	86
3- Les voies possibles de déméthylation de l'ADN.....	89
4- Modèle hypothétique de la déméthylation du promoteur de MMP-3 par l'IL-1	92
 CHAPITRE V.....	 98
CONCLUSION GÉNÉRALE	98
 ANNEXES	 100
 RÉFÉRENCES.....	 166
 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	 193

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Revue de littérature

Figure 1 : Structure des MMP

Figure 2 : Mécanisme d'activation des proMMP

Figure 3 : Protéines communes du complexe AP-1

Figure 4 : Activations transcriptionnelle et post-traductionnelle d'AP-1

Figure 5 : Structure des protéines ETS

Figure 6 : Éléments cis dans les promoteurs MMP humains

Figure 7 : Caractéristiques du promoteur MMP-3 humain

Figure 8 : Mécanisme de méthylation de l'ADN

Figure 10 : Modèle de l'implication de l'IL-1 dans la déméthylation du promoteur MMP-3

CHAPITRE II

Figure 1 : The HCT116/DKO colon carcinoma model system

Figure 2 : Constitutive expression of mmp-3 in DKO cells

Figure 3 : MMP-3 gene expression in HCT116 following treatment with DNA methylase inhibitors

Figure 4 : Effects on MMP-3 promoter activity by SssI methylase

Figure 5 : MMP-3 and MMP-10 expression following treatment with 5-aza-dC in human B lymphomas

CHAPITRE III

Figure 9 : Promoteur MMP-3 humain et les sites CpG analysés

Figure 1 : IL-1 and 5-aza-dC synergize to induce MMP-3 expression in HCT116 colon carcinoma cells

Figure 2 : IL-1 and 5-aza-dC synergize to demethylate MMP-3 promoter in HCT116 cells

Figure 3 : Cooperative effect of IL-1 and 5-aza-dC on endogenous gene expression in HeLa cells

Figure 4 : The rôle of c-Jun in MMP-3 gene expression in HCT116 cells following treatment with 5-aza-dC

Figure 5 : Effect of 5-aza-dC on C/EBP and ETS-dependant transcriptional activity and MMP-3 gene expression

Figure 6 Effect of 5-aza-dC on ETS-dependant transcriptional activity and MMP-3 gene expression

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau I : Spécificité de substrat et localisation sur les chromosomes humains des MMP

Tableau II : Modifications post-traductionnelles des histones affectant la structure de la chromatine

Tableau III : Maladies humaines associées avec une méthylation aberrante

Tableau IV : Principes majeurs d'analyse de la méthylation de l'ADN

CHAPITRE II

Table 1 : Gene-specific primers used for semi-quantitative RT-PCR

LISTE DES ANNEXES

Annexe A : New role for matrix metalloproteinases in metastasis

Annexe B : Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel targets against cancer and inflammatory diseases

Annexe C : Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation

Annexe D : Expression de MMP-3 dans le cancer du sein

Annexe E : La régulation de l'expression de MMP-3 par 5-aza-dC et c-Jun dans le cancer du sein : spécificité cellulaire

Annexe F : Stromélysines : l'homologie s'arrête à la séquence

Annexe G : TET : mécanisme potentiel de déméthylation par l'IL-1

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Trombospondin Motifs

ADN : Acide déoxyribonucléique

AP-1 : Activator Protein-1

ARN : Acide ribonucléique

5-aza-dC : 5-aza-2'-deoxycytidine

C/EBP : CCAAT Enhancer Binding Protein

ChIP : CHromatin ImmunoPrecipitation

DKO : Double Knock-out

DNMT : DNA Methyltransferase

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

ETS : Erythroblastosis Twenty Six

Gadd45a : Growth arrest and DNA-damage inducible protein 45 alpha

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBD4 : Methyl-CpG binding protein 4

MeCP2 : Methyl CpG binding protein 2

MMP : Matrix Metalloproteinase

MYD88 : Myeloid Différentiation primary response -88

5^{hmc}C : 5-Hydroxymethyl-Cytosine

5^{me}C : 5-methyl-Cytosine

ml : millilitre

mM : millimolaire

NF-κB : Nuclear Factor-KappaB

SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype

TDG : Thymine DNA glycosylase

µg : microgramme

µl : microlitre

µM : micromolaire

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai effectué tous mes travaux de thèse sous la direction du Dr. Yves St-Pierre, réalisé la presque totalité des expériences et rédigé les manuscrits décrits dans les deux premiers chapitres. J'ai aussi effectué les expériences faisant partie des annexes de ma thèse, à l'exception des colorations immunohistochimique de l'annexe D, réalisée par Andrée-Anne Grosset, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr. Yves St-Pierre.

Dans le chapitre traitant de la régulation de l'expression de MMP-3 par la méthylation, j'ai effectué toutes les expériences à l'exception de l'analyse du méthylome du modèle cellulaire HCT116/DKO ainsi que l'analyse d'incorporation de cytosines méthylées dans ce même modèle cellulaire. Ces deux séries d'expériences ont été réalisées par Geneviève Lavoie, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr. Yves St-Pierre. J'ai effectué la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr. Yves St-Pierre.

Dans le chapitre portant sur la collaboration entre l'IL-1 et la 5-aza-dC dans la déméthylation du promoteur MMP-3, j'ai effectué toutes les expériences et la majorité des expériences ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. St-Pierre. J'ai effectué certaines expériences, notamment les immunobuvardages de type western, certains séquençages et les PCR en temps réel dans le laboratoire du Dr. Sriharsa Pradhan (RNA Divisions, New England Biolabs, MA, USA). J'ai rédigé le manuscrit sous la supervision du Dr. Yves St-Pierre et la lecture critique a été réalisée par tous les auteurs.

CHAPITRE I

Revue de littérature

1- Les métalloprotéases de la matrice (MMP)

1.1 Historique et fonctions

Il y a maintenant presque cinquante ans, Jérôme Gross et ses collègues observent la présence d'une « activité » et une habilité à dégrader le collagène lors de la métamorphose d'un têtard [1]. Cette activité s'avérait être une collagénase interstitielle aujourd'hui appelée MMP-1. Cette observation initiale a permis la découverte de plusieurs autres enzymes semblables aujourd'hui faisant toutes partie d'une famille complète d'enzymes dégradant les composantes de la matrice extracellulaire (MEC), les métalloprotéases de la matrice (MMP). Historiquement, les MMP ont été divisées en collagénases, gélatinases, stromélysines et matrilysines en fonction de leurs substrats dans la MEC. Toutefois, à mesure que la liste de substrats grandissait et se diversifiait, le système de classification des MMP s'est adapté, et les MMP sont maintenant classées par rapport à leur structure et leur spécificité de substrat (**Figure 1**). En 1970, John Jeffrey réussit à purifier MMP-1 provenant de peau humaine [2]. Des avancées subséquentes dans la purification d'enzymes permettent de découvrir que les MMP sont sécrétées sous forme latente ou zymogène (appelée pro-MMP).

C'est Hal Van Wart et Henning Birkedal-Hansen qui développent le terme « switch cystéine » en 1990 pour expliquer le mécanisme utilisé par les MMP pour garder sa forme latente. Les MMP sont gardées latentes par une interaction entre un groupe cystéine-sulphydryle dans le domaine propeptide et un ion zinc lié au domaine catalytique. L'activation des MMP requiert donc le retrait protéolytique de ce domaine propeptide (**Figure 2**) [3].

Collagénases

Collagénase-1 (MMP-1)
Collagénase-2 (MMP-8)
Collagénase-3 (MMP-13)

Gélatinases

Gélatinase-A (MMP-2)
Gélatinase-B (MMP-9)

Stromélysines

Stromélysine-1 (MMP-3)
Stromélysine-2 (MMP-10)

Matrylisines

Matrylsine-1 (MMP-7)
Matrylsine-2 (MMP-26)

MMP activées par les furines

Stromélysine-3 (MMP-11)
Épilyse (MMP-28)

MMP-21

MMP Transmembranaires

MT1-MMP (MMP-14)
MT2-MMP (MMP-15)
MT3-MMP (MMP-16)
MT5-MMP (MMP-24)

MT-MMP ancre GPI

MT4-MMP (MMP-17)
MT6-MMP (MMP-25)

MMP Transmembranaire TypII

MMP-23A
MMP-23B

Autres MMP

Métalloélastase (MMP-12)
MMP-19
Énamélysine (MMP-20)
MMP-27

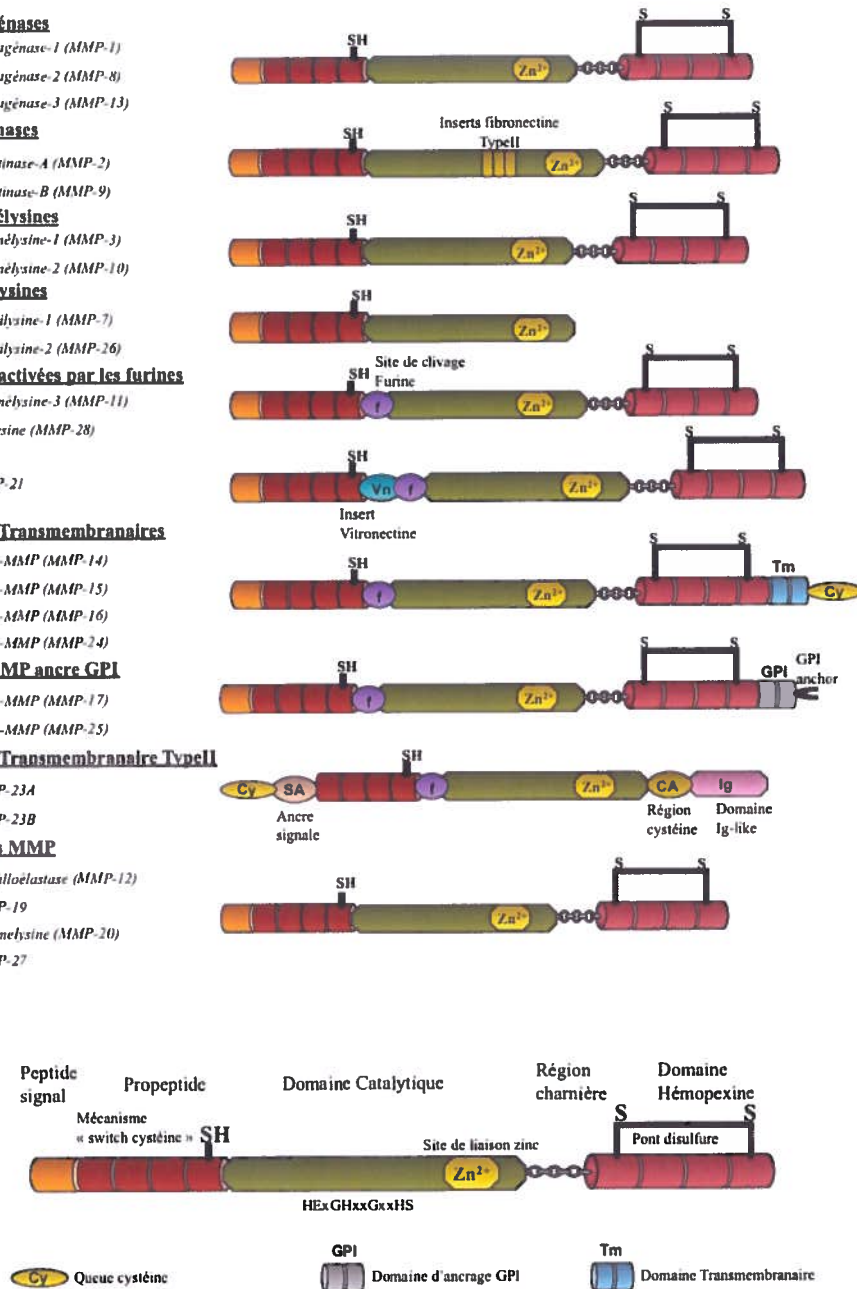


Figure 1 : Représentation schématique de la structure des 24 MMP humaines, classées selon leur homologie de structure et leur spécificité de substrat. La plupart des MMP contiennent un peptide signal (nécessaire à la sécrétion), un propeptide, un domaine catalytique qui se lie au zinc (Zn^{2+}) et un domaine carboxy-terminal hémopexine. Les matrylisines contiennent le domaine d'organisation minimal requis pour la sécrétion, la latence et l'activité catalytique. Les gélatinases contiennent des modules fibronectine de type II qui augmentent l'efficacité de dégradation pour la gélatine et le collagène. Les MMP activées par les furines contiennent un insert dans le propeptide ciblé par les protéases furine-like (site de clivage furine). Les MMP activées par les furines et transmembranaires peuvent être sécrétées ou ancrées à la membrane via une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), des segments transmembranaires de type I ou de type II (TM). MMP-23A et -23B contiennent une région cystéine et un domaine Ig-like. [4].

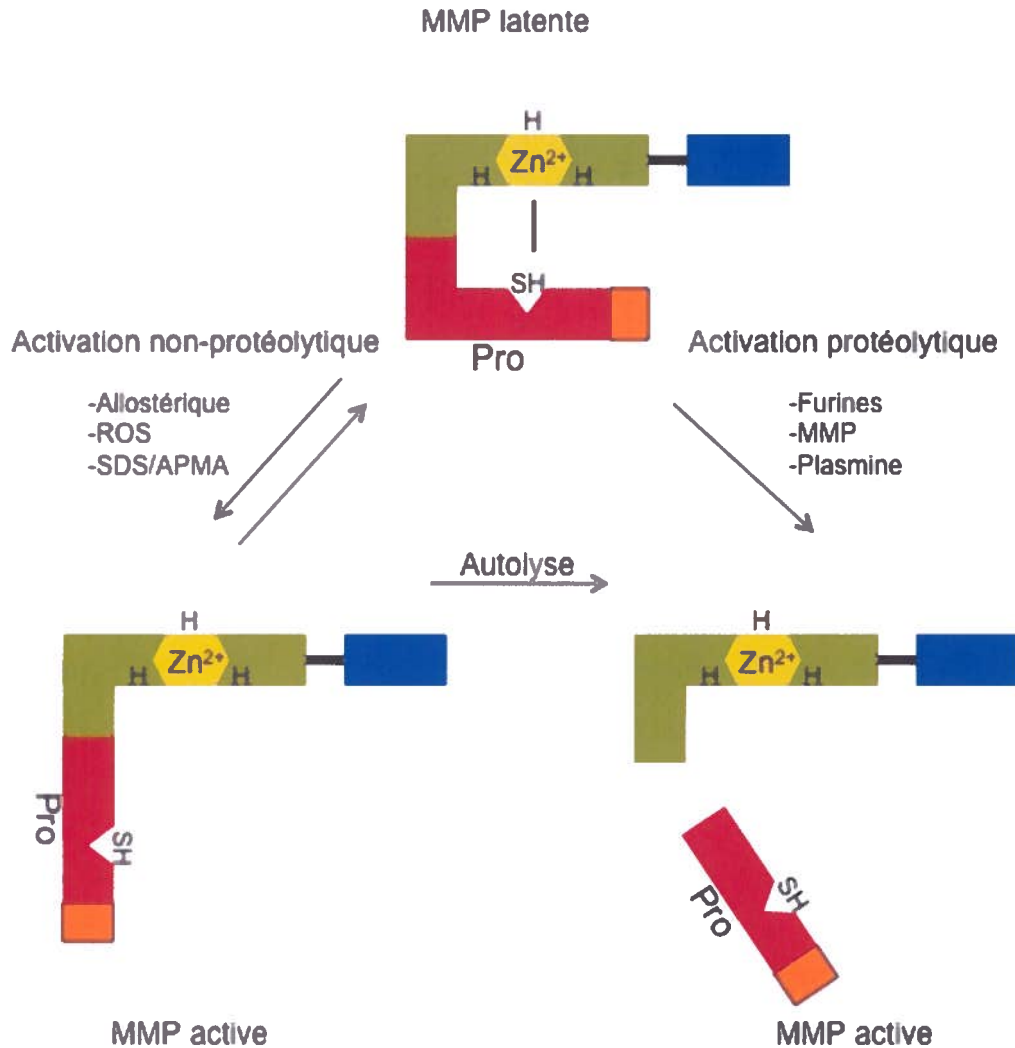


Figure 2 : Mécanismes d'activation des pro-MMP. La latence des MMP (Pro-MMP) est maintenue par une interaction électrostatique entre le groupe thiol libre (SH) d'une cystéine conservée dans le prodomaine [5] avec l'atome de zinc (Zn^{2+}) à l'intérieur de la poche catalytique. À ce stade, le prodomaine couvre la région catalytique et empêche ainsi une interaction avec un substrat protéique. Le clivage protéolytique du prodomaine par des protéases furines ou d'autres protéases (comme les MMP elles-mêmes ou la plasmine) retire le prodomaine et la liaison entre le zinc et le groupe thiol est rompue. Cette liaison Zn-thiol peut aussi être démantelée via des moyens non-protéolytiques. En laboratoire, cette activation peut être faite à l'aide de composés organo-mercuriaux (comme APMA), des oxidants et des détergents. Dans les cellules et les tissus, les pro-MMP peuvent être ancrées à d'autres macromolécules telles que les intégrines et les protéoglycans, et ces interactions peuvent conduire à un démantèlement allostérique du lien Zn-thiol. L'activation finale des MMP implique le clivage du prodomaine qui semble être contrôlé par autolyse.

L'activité des MMP est contrôlée par des inhibiteurs endogènes. C'est en 1979, qu'un groupe de l'université de Washington découvre un inhibiteur endogène de MMP [6]. Les inhibiteurs endogènes les mieux étudiés sont les TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Les TIMP sont composés de quatre membres distincts (TIMP-1,

-2, -3 et -4) et leur domaine N-terminal forme un complexe stœchiométrique 1 :1 réversible avec le zinc catalytique activé dans la métalloprotéase [7]. Le domaine C-terminal des TIMP est pour sa part important dans les interactions protéines-protéines et la liaison aux pro-MMP, régulant ainsi le processus d'activation des MMP [8]. Les quatre membres TIMP humains sont, en général, des inhibiteurs à large spectre des MMP. Cependant, TIMP-1 est plus restrictif en ayant une affinité plus faible pour les MT-MMP et MMP-19 [9]. Il existe également des différences subtiles entre les affinités des différentes TIMP pour d'autres MMP. Par exemple, TIMP-2 et -3 sont de plus faibles inhibiteurs que TIMP-1 pour MMP-3 et -7 [10]. TIMP-3 est unique chez les mammifères pour inhiber, en plus des MMP, plusieurs membres des familles ADAM et ADAMTS [11-16]. À part l'inhibition de l'activité des MMP, les TIMP ont des activités biologiques variées incluant la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion cellulaire et l'inhibition de l'angiogenèse. Les TIMP peuvent également être pro- ou anti-apoptotiques. Ces activités peuvent partiellement provenir de l'inhibition des MMP parce que la régulation du catabolisme de la MEC peut influencer le comportement cellulaire. Cependant, plusieurs de ces activités biologiques sont indépendantes de l'inhibition des MMP parce que les inhibiteurs synthétiques des MMP ou les mutants des TIMP sont capables d'effectuer ces diverses activités biologiques. Il a d'ailleurs été démontré que les TIMP peuvent interagir directement avec des récepteurs de surface pour induire des réponses cellulaires [17]. Des progrès ont été réalisés pour comprendre les mécanismes d'inhibition des TIMP indépendants de celle des MMP. En effet, des récepteurs ont été identifiés dans les mécanismes d'action des TIMP qui contrôlent la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation et l'anti-angiogenèse (CD63 pour TIMP-1, Integrine $\alpha 2\beta 1$ pour TIMP-2 ainsi que VEGFR2 et le récepteur de l'angiotensine II pour TIMP-3) [18]. De nombreux autres exemples continuent d'être identifiés pour les rôles biologiques et physiologiques des TIMP dépendamment ou indépendamment de l'inhibition des MMP, ajoutant ainsi un niveau de complexité supplémentaire dans la biologie et la pathologie des TIMP.

La purification de la structure cristallisée du domaine catalytique de MMP-3 en 1994 a permis également de mieux comprendre le mécanisme de l'activité catalytique des MMP [19]. À l'intérieur du domaine catalytique, la fente de liaison pour le

substrat se trouve dans une niche bien définie et les variations dans les résidus qui forment cette niche peuvent distinguer les MMP les unes des autres (pour la structure voir **Figure 1**). La spécificité des substrats dépend aussi d'autres domaines protéiques des MMP. Gill Murphy et ses collègues ont démontré le rôle du domaine hémapexine carboxy-terminal dans la spécificité pour le collagène de MMP-1, en échangeant les domaines de MMP-1 et MMP-3 [20]. Aujourd'hui, de nombreux nouveaux substrats non-matriciels ont été identifiés et les composantes de la MEC ne sont plus considérées comme étant les seules à être dégradées par les MMP. (**Tableau I**).

Tableau I : Spécificité de substrat des MMP et localisation sur les chromosomes humains

Enzyme	Localisation	Substrats MEC	Substrats non-MEC	Activateur pro-MMP
MMP-1	11	Collagènes (I,II,III,VII,VIII,IX), gélatine, aggrecan, nidogène, entactine, perlecan, tenascine	α 1-antitrypsin, α 1- chymotrypsin, α 2M, MBP, pro-TNF α , L- sélectine, proIL-1 β , sérum amyloïde A, MCP- 1, -3, -4, SDF, IGFBP-2 et -3, α 1-PI	MMP-2 MMP-3 MMP-9
MMP-8	11	Collagènes (I,II,III,V,VII,VIII,X), gélatine, aggrecan, fibronectine, ténascine, entactine	α 1-antitrypsin, α 1- chymotrypsin, α 1- antiplasme, α 2M, MIG, IP-10, pro-TNF α , L- sélectine, MCP-1, SDF, IGFBP, α 1-PI	
MMP-13	11	Collagènes (I,II,III,IV,IX,X), gélatine, aggrecan, perlécan, fibronectine, ténascine, entactine	α 1-antitrypsin, α 1- chymotrypsin, α 2M, PAI- 2, SDF, pro- TNF α , MCP-3	MMP-2 MMP-9
MMP-2	16	Collagènes (I,IV,V,VII,X,XI), gélatine, élastine, fibronectine, aggrecan, decorine, laminine-1 et V	Galectine-3, MBP, pro- TNF α , pro-IL-1 β , amyloïde β , α 1- antitrypsine, IGF, pro- TGF β , FGF-R1, MCP-3, pro-IL-8, SDF-1 α , SDF- 1 β , α 1-PI, α 2M	MMP-9 MMP-13
MMP-9	20	Collagènes (I,IV,V,VII,X,XI), gélatine, aggrecan, élastine, fibronectine, laminine, entactine, caséine	α 1-antitrypsin, galectine- 3, MBP, pro-TNF α , pro- IL-1 β , amyloïde β , plasminogène, FGF-R1, IL-2R α , pro-IL-8, GRO α , CTAPIII, pro- TGF β 1, SDF, ET-1, TFPI, ICAM-1, IP-10, MIG, α 1-PI, α 2M	MMP-2 MMP-13

MMP-3	11	Collagènes (III,IV,V,IX), gélatine, aggrécan, perlécan, décorine, élastine, fibronectine, laminine, entactine, caséine, ténascine, vitronectine	α 1-antitrypsin, α 1-chymotrypsin, antithrombine-III, α_2 M, MBP, pro-TNF α , L-sélectine, proIL-1 β , sérum amyloïde A, fibrinogène, plasminogène, MBP, MCP-1, -2, -3, -4, SDF, IGFBP-3, α 1-PI	MMP-1 MMP-2 MMP-8 MMP-9 MMP-13
MMP-10	11	Collagènes (III,IV,V,X), gélatine, caséine, aggrécan, élastine, entactine, fibronectine, protéoglycans	Fibrinogène	MMP-1 MMP-7 MMP-8 MMP-9
MMP-7	11	Collagènes (IV,V,IX,X,XI), gélatine, aggrécan, décorine, fibronectine, laminine, entactine, élastine, caséine, ténascine, vitronectine	MBP, α 1-antitrypsine, pro-TNF α , plasminogène, L-sélectine, FasL, pro α -défensine, E-cadhérine, β_4 -intégrine, α 1-PI, α_2 M	MMP-1 MMP-2 MMP-8 MMP-9 MMP-13
MMP-26	11	Collagène IV, gélatine, fibronectine	α 1-PI, TACE, IGFBP-1, fibrine, fibrinogène	MMP-9
MMP-11	22	Collagène IV, caséine, laminine, fibronectine, gélatine, aggrécan	α 1-antitrypsine, α_2 M, IGFBP-1, α 1-PI	
MMP-28	17	Caséine		
MMP-21	<i>Xenopus</i>	Collagène IV, gélatine, fibronectine, laminine		
MMP-14	14	Collagènes (I,II,III), gélatine, caséine, élastine, fibronectine, laminine, vitronectine, entactine	α 1-antitrypsine, α_2 M, CD44, MCP-3, tissu transglutaminase, SDF, IL-8, pro-TNF α , α 1-PI, C3, GRO- α , - γ , TIMP-1, LBTP-4S, SKALP, DR-6, EFEMP-1, SLPI, EGF, CTGF, MIF	MMP-2 MMP-13
MMP-15	16	Protéoglycans, fibronectine, laminine-1, gélatine, aggrécan, tascine, nidogène, perlécan, vitronectine	α 1-PI, α_2 M, tissu transglutaminase, pro-TNF α	MMP-2 MMP-13
MMP-16	8	Syndécan, collagènes (I,III), fibronectine, gélatine, caséine, protéoglycans, laminine-1, aggrécan, vitronectine, perlécan	Tissue transglutaminase, pro-TNF α , α_2 M, α 1-PI	MMP-2 MMP-13
MMP-24	20	Protéoglycans, fibronectine, gélatine		MMP-2 MMP-13
MMP-17	12	Gélatine, fibronectine	Fibrine, fibrilline, fibrinogène, pro-TNF α	MMP-2

MMP-25	16	Collagène IV, gélatine, fibronectine, laminine-1, protéoglycans	Fibrine, fibrinogène, α 1-PI	MMP-2 MMP-9
MMP-23	<i>Mus musculus</i>	Gélatine		
MMP-12	11	Collagène IV, gélatine, fibronectine, laminine-1, élastine, protéoglycans	Fibrine, fibrinogène, α 1-PI, MBP, plasminogène, pro-TNF α	
MMP-19	12	Collagène IV, gélatine, aggrecan, COMP, laminine, nidogène, ténascine, fibronectine, entactine	Fibrine, fibrinogène, IGFBP-3	
MMP-20	11	Amélogénine, aggrecan, COMP		
MMP-27	11	Vitronectine		

Tableau 1 : Note : α_2 M : α_2 -Macroglobulin ; α 1-PI : α 1-proteinase inhibitor ; C3 : complement component 3 ; COMP : cartilage oligometric matrix protein ; CTAP-III : connective tissue activating peptide-III ; CTGF : connective tissue growth factor ; DR-6 : death receptor-6 ; EFEMP-1 : EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein-1 ; ET-1 : endothelin-1 ; FGF-R1 : fibroblast growth factor receptor-1 ; IGFBP : insulin-like growth factor-binding protein ; GRO- α : growth-related oncogene- α ; GRO- γ : growth related oncogene-g ; IP-10 : IFN-inducible protein-10 ; LTBP-4S : latent transforming growth factor-binding protein-4S ; MBP : myelin basic protein ; MCP : monocyte-chemoattractant protein ; MIF : macrophage migration inhibitory factor ; MIG : monokine induced by interferon γ ; PAI-2 : plasminogen activator inhibitor-2 ; SDF : stromal cell-derived factor-1 ; SKALP : skin-derived antileukoproteinase ; SLPI : secretory leukocyte protéase inhibitor ; TACE (ADAM-17) : tumor necrosis factor alpha-converting enzyme ; TIMP-1 : tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ; TFPI : tissue factor pathway inhibitor ; TGF : transforming growth factor ; TNF- α : tumor necrosis factor- α

Une fois activées, les MMP possèdent une multitude de rôles dans les processus biologiques. Au début, les études sont plutôt concentrées sur la surexpression des enzymes. Woessner et Jeffrey découvrent, par exemple, que l'augmentation de l'expression de MMP-13 se produit en réponse au besoin de résorption utérine après la grossesse [21-23]. Aujourd'hui, nous savons que les MMP sont impliquées dans l'ovulation et leur expression est coordonnée avec le cycle menstruel. De plus, les MMP participent probablement au modelage continu normal et au remodelage de nos tissus conjonctifs [24]. C'est en 1995 que la première souris MMP-déficiente est générée [25]. De façon surprenante, le modèle de souris MMP-3-déficiente ne démontre aucun défaut embryonnaire ou de reproduction, seule une légère altération dans la réparation de blessure est documentée. Des études similaires avec d'autres souris MMP-déficientes, soit MMP-2 [26], MMP-7 [27], MMP-11 [28] et MMP-12 [29], confirment l'absence de

phénotypes sévères. Une première exception vient des observations de Zena Werb et ses collègues. L'équipe démontre que les souris MMP-9-déficientes expriment une légère déficience dans la croissance osseuse [30]. C'est finalement Ken Holmbeck et Henning Birkedal-Hansen qui découvrent un rôle important pour une MMP durant le développement. La souris MMP-14-déficiente possède un sévère phénotype avec le nanisme, l'ostéopénie, l'arthrite et une synovite fibrotique substantielle. Ces souris ne survivent pas longtemps après la naissance [31]. Néanmoins, la plupart des MMP possède un rôle mineur dans l'embryogenèse, la réparation de blessures et le remodelage de tissus mais il est fort possible que la redondance dans les fonctions des différentes MMP puisse compenser pour la délétion individuelle de ces gènes. En fait, en plus de leurs fonctions de remodelage de tissus, on reconnaît maintenant que les MMP sont des enzymes importantes dans la régulation de la fonction de molécules bioactives incluant les cytokines, chémokines et ligands apoptotiques [32](**Tableau 1**)

1.2 MMP et développement du cancer

Plusieurs études cliniques ont démontré une augmentation de l'expression des MMP dans presque tous les cancers humains [33, 34]. Plusieurs MMP, dont MMP-2, -3, -7, -9 et -14, ont été les premières clonées à partir de tumeurs ou de lignées cellulaires de cancer [35]. L'augmentation de l'expression des MMP a été associée à l'acquisition du phénotype invasif, un stade métastatique avancé et un mauvais pronostic [36]. Ainsi, le rôle des MMP dans la carcinogenèse va au-delà de la dégradation de la MEC. Plusieurs études ont démontré que les MMP peuvent promouvoir l'angiogenèse, stimuler la croissance tumorale, réguler l'immunité innée et posséder des propriétés anti-apoptotiques [35, 37]. L'implication des MMP dans la progression tumorale fut telle que pendant plusieurs années, les MMP ont été la cible de nombreuses avenues thérapeutiques. En effet, les MMP seraient impliquées dans tous les stades de développement du cancer en affectant les signaux de croissance cellulaires, en régulant l'apoptose et l'angiogenèse, en influençant l'invasion tumorale et la métastase et en orchestrant la réponse inflammatoire dans le développement du cancer [38].

La découverte de nouveaux rôles anti-tumoraux de certaines MMP ont freiné les recherches pharmacologiques et ont expliqué, en partie, le faible succès des inhibiteurs

de MMP (MMPI). De plus, les MMPI ont seulement été testés sur des patients souffrant de cancer en stade avancé et la plupart de ces MMPI sont des produits pharmacologiques à large spectre, inhibant ainsi les MMP possédant des capacités anti-tumorales [39, 40]. Les MMP ont des fonctions importantes dans les tissus normaux et les MMPI doivent cibler les MMP plus spécifiques. Par des expériences sur des souris MMP-8-déficientes (collagénase des neutrophiles), la première MMP évaluée comme étant clairement anti-tumorale a été identifiée [41]. De façon étonnante, MMP-9 possède également des capacités à la fois pro- et anti-tumorales, dépendamment du stade d'évolution du cancer [32]. MMP-3 pourrait avoir un effet protecteur contre le carcinome de la peau s'il y a sur-expression de l'enzyme [42] et MMP-12 [43] (MMP des macrophages) peut générer l'angiostatine, en bloquant le processus d'angiogenèse. MMP-14 est aussi une cible d'inhibition à éviter étant donné son importance dans le développement embryonnaire et la courte durée de vie des souris MMP-14-déficientes.

À travers les années, plusieurs MMP ont été identifiées comme étant d'importants médiateurs de processus cellulaires normaux. Les MMP sont impliquées dans les stades plutôt précoces du développement du cancer, expliquant l'échec de nombreux challenges cliniques avec les inhibiteurs de MMP [44]. Une meilleure compréhension dans les mécanismes régulateurs qui contrôlent la transcription, l'activation et l'inhibition des MMP permettrait des interventions thérapeutiques plus efficaces.

1.2.1 Autres processus pathologiques

Étant donné leurs larges fonctions physiologiques, les MMP sont impliquées, en plus du développement du cancer, dans plusieurs autres processus pathologiques. Dans le myocarde humain, plusieurs MMP et les TIMP se retrouvent normalement exprimés. Une situation de débalancement dans les ratios de ces enzymes protéolytiques contribue aux défaillances du myocarde et au développement de troubles cardiaques [45, 46]. L'activité des MMP est aujourd'hui très utilisée pour étudier et comprendre la formation de plaques athérosclérotiques ou le développement de cardiomyopathies. Dans des conditions stables, les processus de construction et destruction de la plaque athérosclérotique sont balancées et la plaque protège le lumen d'un vaisseau sanguin.

Le débalancement dans l'expression de MMP, notamment MMP-3 et -9, conduit à la rupture de cette plaque et peut s'ensuivre d'un blocage du flux sanguin ainsi que les conséquences ultérieures [47]. L'origine de ce débalancement excessif, amenant non seulement les troubles athérosclérotiques mais aussi plusieurs troubles cardiaques en général, est principalement reliée à des polymorphismes des promoteurs, en particulier MMP-3 et -9. En effet, de plus en plus d'évidences démontrent qu'un site de réponse à l'interleukine-1 (SIRE) dans le promoteur MMP-3 possède un polymorphisme 5T/6T amenant une plus grande susceptibilité aux maladies cardiovasculaires dues à une surexpression de MMP-3 [48-50].

Outre les maladies cardiaques, les MMP sont également impliquées dans le développement des troubles arthritiques. La destruction irréversible du cartilage, des tendons et des os, incluant les jonctions synoviales est caractéristique de l'arthrite rhumatoïde et de l'ostéoarthrite. Les cartilages sont composés de protéoglycans et de collagène de type II et les tendons sont composés majoritairement de collagène de type I. L'arthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune affectant les jonctions synoviales à travers le corps, tandis l'ostéoarthrite se développe dans un petit nombre de jonctions [51]. Dans les deux cas, les cytokines inflammatoires interleukine-1 β (IL-1 β) et TNF- α (Tumor Necrosis Factor) stimulent la production des MMP. MMP-1 et -13 jouent des rôles importants dans le développement de ces maladies mais l'expression de MMP-2, -3 et -9 ne sont pas à négliger [52-55]. Ces différentes observations ont conduit au développement de nombreux inhibiteurs de MMP. Cependant, comme pour dans le développement du cancer, aucun de ces inhibiteurs ont démontré une efficacité cliniquement [56-58].

De nombreuses évidences ont démontré que les MMP sont directement reliées dans pratiquement tous les processus biologiques impliquant un remodelage de la matrice à travers la vie d'un mammifère, à partir de l'implantation de l'embryon [59] jusqu'à la mort cellulaire ou la nécrose [32]. Les MMP jouent des rôles importants dans le maintien des tissus normaux (réparation de blessures, cycle menstruel et processus de reproduction et défense immunitaire innée). Par conséquent, une altération de l'expression des MMP a été associée à un grand nombre de pathologies. L'importance et l'étendue des rôles biologiques des MMP suggèrent fortement que ces enzymes sont

impliquées dans plusieurs aspects et développement de nombreuses maladies.

1.3 MMP-3

MMP-3 fait partie du sous-groupe des stromélysines avec MMP-10 et -11. MMP-3 et MMP-10 partagent la plus grande homologie de séquence (82%) parmi toutes les MMP [60]. Toutefois, leur expression est différemment régulée. MMP-3 est stimulée dans plusieurs types cellulaires via les facteurs de croissance, les cytokines, les promoteurs de tumeurs et les oncogènes, tandis que MMP-10 semble peu affectée par ces agents. De plus, des différences existent dans leurs patrons d'expression par les cellules normales et transformées. Alors que MMP-3 est considérée comme une enzyme stromale, MMP-10 est souvent exprimée par les cellules tumorales [61, 62].

MMP-3 a été associée à un potentiel métastatique dans différents types de cellules cancéreuses, incluant les carcinomes de cellules squameuses de la peau et le sarcome endométrial [63, 64]. Plus récemment, des expériences dans notre laboratoire ont démontré que MMP-3 et MMP-10 peuvent accélérer le développement du lymphome thymique [65, 66]. D'autres études avec des modèles transgéniques ont permis d'étudier d'avantage le rôle de MMP-3 dans d'autres types de cancer. En effet, dans des expériences de modèles de carcinomes mammaires, la surexpression de MMP-3 ne module pas le potentiel métastatique de la tumeur primaire [42], ce qui diffère de d'autres expériences dans des conditions de surexpression de MMP-3 où l'enzyme agit plutôt comme promoteur de tumeur [67, 68]. Néanmoins, les résultats obtenus avec les souris déficientes MMP-3 supportent l'hypothèse que MMP-3 protège du développement de types spécifiques de tumeurs. Par exemple, des expériences avec des modèles de carcinomes de cellules squameuses ont démontré que l'absence de MMP-3 augmente le potentiel métastatique suite à une induction par un carcinogène, comparé aux souris témoins [69].

MMP-3 peut dégrader une grande variété de substrats de la MEC, notamment les collagènes de types III, IV et V, les laminines, la fibronectine, l'ostéopontine et les protéoglycans [70]. MMP-3 étend son spectre protéolytique encore plus grand en clivant plusieurs molécules non matricielles impliquées dans divers processus physiologiques, notamment d'autres MMP (MMP-1, -8, -9, -13) [68], FasL [71], E-

cadhérine [72] et IL-1 β [73]. Étant donné que MMP-3 joue un rôle dans le remodelage de la MEC durant les processus physiologiques normaux déjà mentionnés, une régulation stricte, particulièrement au niveau transcriptionnel est donc critique pour l'homéostasie des tissus. Dans le cas contraire une altération dans la régulation de MMP-3 serait associée à des conditions pathologiques telles que l'arthrite rhumatoïde et l'ostéoarthrite [74], l'alzheimer [75], l'invasion tumorale et la métastase [63, 64].

2 Les facteurs de transcription dans la régulation de MMP-3

2.1 Les facteurs de transcription AP-1 et ETS

Le facteur de transcription AP-1

Le facteur de transcription AP-1 (Activator Protein-1) est un complexe dimérique qui comprend les membres des familles de protéines JUN, FOS, ATF (Activating Transcription Factor) et MAF (MusculoAponeurotic Fibrosarcoma). Ces protéines se lient au site consensus TGAg/cTCA, localisé dans la région du promoteur de gènes cibles [76]. Le complexe AP-1 peut ainsi former un grand nombre de combinaisons d'hétéro- et d'homodimères et cette combinaison détermine les gènes qui sont régulés par AP-1.

Les protéines qui composent AP-1 sont des protéines avec fermeture éclair à leucine (*leucine zipper*). Les plus communes dans les cellules de mammifères sont JUN et FOS (**Figure 3**) [77]. Ces protéines ont initialement été identifiées comme oncoprotéines virales (v-Fos et v-Jun) dans le virus ostéosarcome Finkel-Biskis-Jenkins et le virus aviaire sarcome 17 respectivement [78]. D'autres isoformes de JUN et FOS tels que JUNB, JUND, FOSB, FRA1 et FRA2 ont été identifiées depuis [79].

c-JUN est un régulateur positif de la prolifération cellulaire. Pour promouvoir la progression du cycle cellulaire, la protéine c-JUN doit être activée par les kinases amino-terminales JUN (JNK) [80]. Le complexe AP-1 comprenant c-JUN activé peut ensuite induire la transcription de régulateurs positifs du cycle cellulaire, notamment la cycline D1, ou alors inhiber des régulateurs négatifs tels que les suppresseurs de tumeurs p53 et p16 [81, 82]. JUNB et JUND, quant à elles sont souvent considérées comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire et peuvent donc changer l'activation ou la répression médiées par c-JUN.

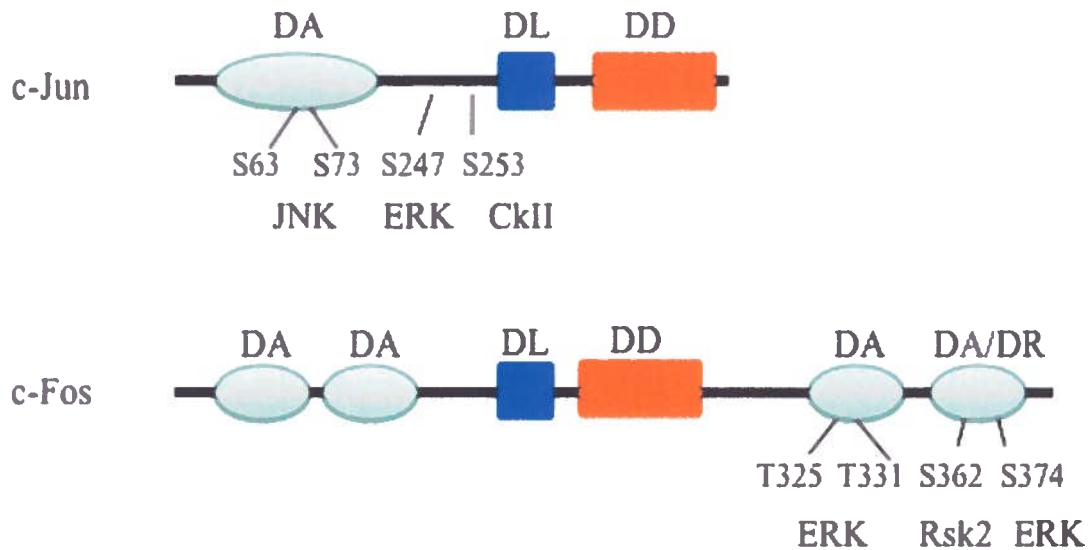


Figure 3 : Les protéines les plus communes qui composent le complexe AP-1. Haut : c-JUN est une protéine nucléaire de 39kDa possédant un domaine N-terminal activateur (DA), une région C-terminale composée du domaine de liaison à l'ADN (DL) suivi du domaine de dimérisation « leucine zipper » (DD). Bas : c-Fos est une protéine nucléaire de 65kDa possédant plusieurs domaines activateurs (DA) dans les régions N- et C-terminale ainsi qu'un domaine de répression (DR) et une région centrale leucine zipper. AP-1 peut former des homodimères entre les protéines de la famille Jun ou des hétérodimères entre les protéines Jun et Fos. La dimérisation est médiée par l'interaction du domaine « leucine zipper » pour former le domaine de liaison à l'ADN. Les sites de phosphorylation pour les kinases Jun (JNK), la kinase régulée par signal extracellulaire, la caséine kinase II (CkII) et la kinase S6 ribosomale (Rsk2) sont indiqués. (Figure adaptée à partir de Ozanne BW, Spence, HJ, oncogène 2007)

La régulation de l'activité d'AP-1 est complexe. Elle se produit à différents niveaux, incluant la composition des dimères, les événements transcriptionnels et post-traductionnels ainsi que les interactions avec d'autres protéines. L'expression d'AP-1 est induite par plusieurs stimuli externes notamment les cytokines, les facteurs de croissance, les signaux de stress et les infections [83]. Ces stimuli augmentent ainsi l'activité kinase activée par mitogène (MAPK) (**Figure 4**). Il est également possible que l'activité de transactivation d'AP-1 soit alimentée par d'autres facteurs de transcription qui coopèrent avec AP-1 pour réguler l'expression des gènes. Les dimères d'AP-1 peuvent s'associer avec d'autres facteurs de transcription par interaction physique

directe entre c-JUN et une petite région en amont du site de liaison à l'ADN [84]. Ces interactions ont été démontrées pour le récepteur glucocorticoïde, le récepteur œstrogène, les protéines de la famille ETS, la famille SMAD et les membres de la famille NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) et NF-AT(Nuclear Factor of Activated T cells) [84-89]. Les nombreuses combinaisons entre les protéines Jun et Fos et les interactions avec d'autres facteurs de transcription offrent un mécanisme par lequel AP-1 peut exercer une régulation sur une large étendue de gènes en réponse à une grande variété de stimuli extracellulaires et de contextes cellulaires.

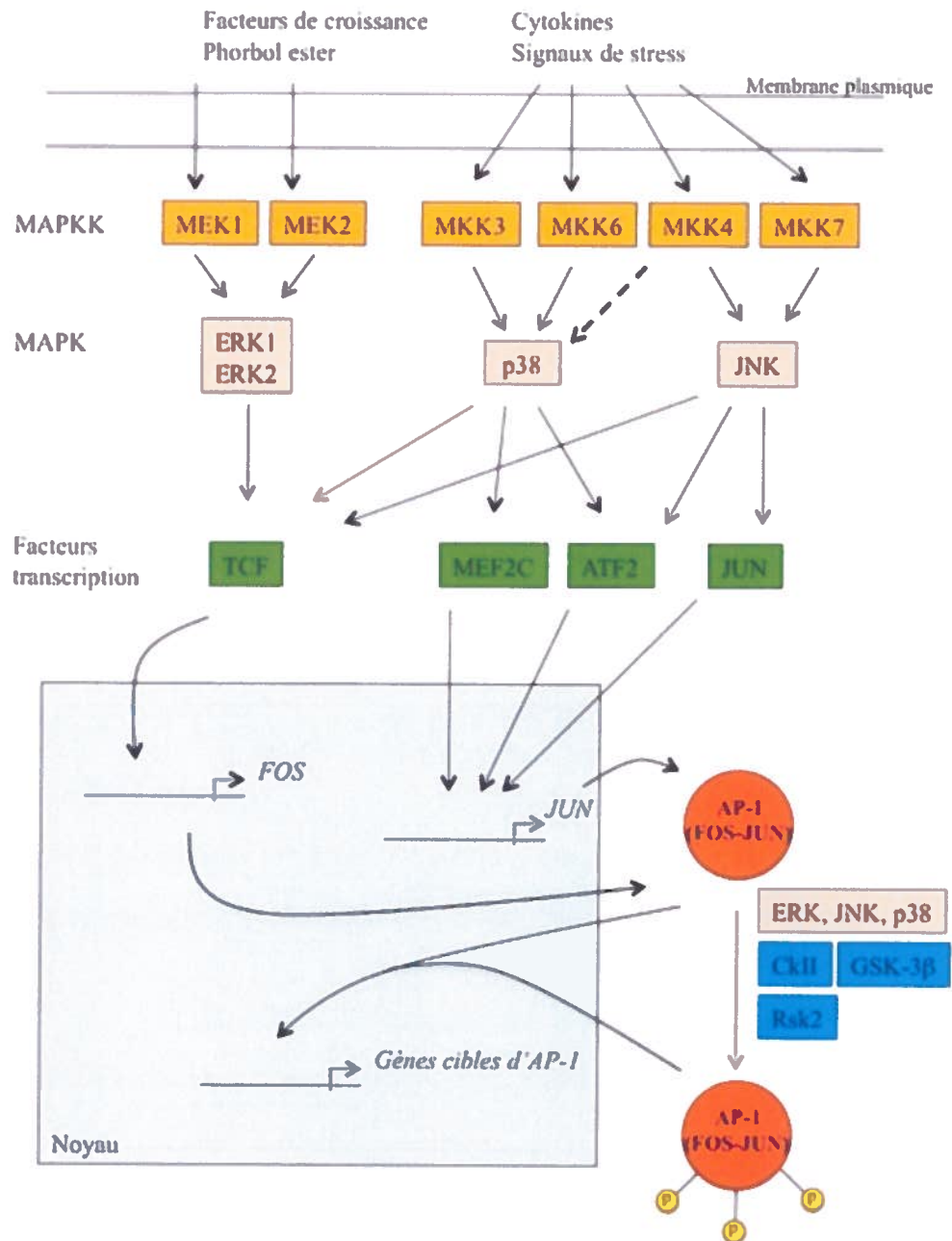


Figure 4 : Activation transcriptionnelle et post-traductionnelle d'AP-1. L'activité AP-1 est stimulée par un réseau de voies de signalisation qui implique les signaux externes (par exemple les facteurs de croissance) et les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) comprenant les kinases régulées par les signaux extracellulaires, p38 et les kinases amino-terminales Jun (JNK). Les MAPK activent une variété de facteurs de transcription (Facteurs complexe tertiaire (TCF), Facteur myocyte-enhancer 2C (MEF2C), Facteur activateur de transcription 2 (ATF2) et JUN) induisant ainsi la transcription de *FOS* et *JUN* et augmentant la quantité de complexes AP-1 et la transcription de gènes ciblés par AP-1. La phosphorylation post-traductionnelle par diverses kinases régulent l'activité d'AP-1, ce qui inclut son potentiel de transactivation, sa capacité à lier l'ADN et la stabilité des composantes d'AP-1. CskII :Casein kinase II ; GSK-3β : glycogen synthase kinase-3β ; MAPKK : MAPK kinase ; Rsk2 : ribosomal S6 kinase 2. (Figure adaptée à partir de Eferl, R and Wagner, EF, nature Rev, 2003)

Le facteur de transcription ETS

En 1983, l'identification de l'oncogène v-ets du virus de leucémie aviaire E26 a conduit à la découverte d'une grande famille de gènes conservés chez la *Drosophile* jusqu'à l'humain [90]. Les protéines ETS (Erythroblastosis Twenty-Six) sont des facteurs de transcription partageant un domaine de liaison à l'ADN à motif hélice-coude-hélice (*hélix-turn-helix*), nommé domaine ETS. Ces domaines reconnaissent la séquence unique GGAA/T [91]. Plusieurs protéines de la famille ETS sont des cibles nucléaires en aval dans les cascades de signaux de transduction. Cette modification post-traductionnelle change souvent leur liaison à l'ADN, leur activité transcriptionnelle, l'association avec des partenaires cellulaires, la localisation cellulaire ou la stabilité de la protéine [92]. Les protéines ETS activent ou inhibent la transcription, en coopération avec d'autres facteurs de transcription et cofacteurs. Ils jouent ainsi des rôles cruciaux dans la régulation d'une variété de fonctions cellulaires incluant la croissance, l'apoptose, le développement, la différenciation et la transformation oncogénique [93-97].

Les protéines de la famille ETS peuvent être divisées arbitrairement en plusieurs sous-familles selon leur structure et leur homologie au niveau des domaines de liaison à l'ADN (**Figure 5**). Les protéines ETS régulent l'expression des gènes par interactions fonctionnelles avec d'autres facteurs de transcription et cofacteurs localisés aux sites de liaison à l'ADN. La collaboration la plus connue est celle entre la famille ETS et les protéines de la famille JUN. D'autres interactions telles que les facteurs de transcription AML-1 (Acute Myeloid Leukemia-1), LEF-1 (Lymphoid Enhancer-binding Factor-1), Sp1, c-Myb, Pax-5 (Paired box gene-5), NF- κ B, STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) et Maf-B ont également été démontrées comme pouvant réguler l'expression de gènes cellules-spécifiques [98]. Les protéines ETS peuvent également s'associer à HDAC-1 (Histone Deacetylase-1) et mSin3A (un co-répresseur faisant partie du complexe de remodelage de la chromatine) [99], suggérant que ETS peut participer à la modification de la chromatine ou au mécanisme de méthylation de l'ADN pour activer ou inhiber la transcription. Les protéines de la famille ETS seraient donc impliquées dans presque toutes les fonctions cellulaires. Des analyses plus élaborées de ces différentes protéines permettront de mieux comprendre les fonctions

normales, mais aussi contrôler les maladies humaines telles que les désordres immunologiques, les problèmes vasculaires et le cancer.

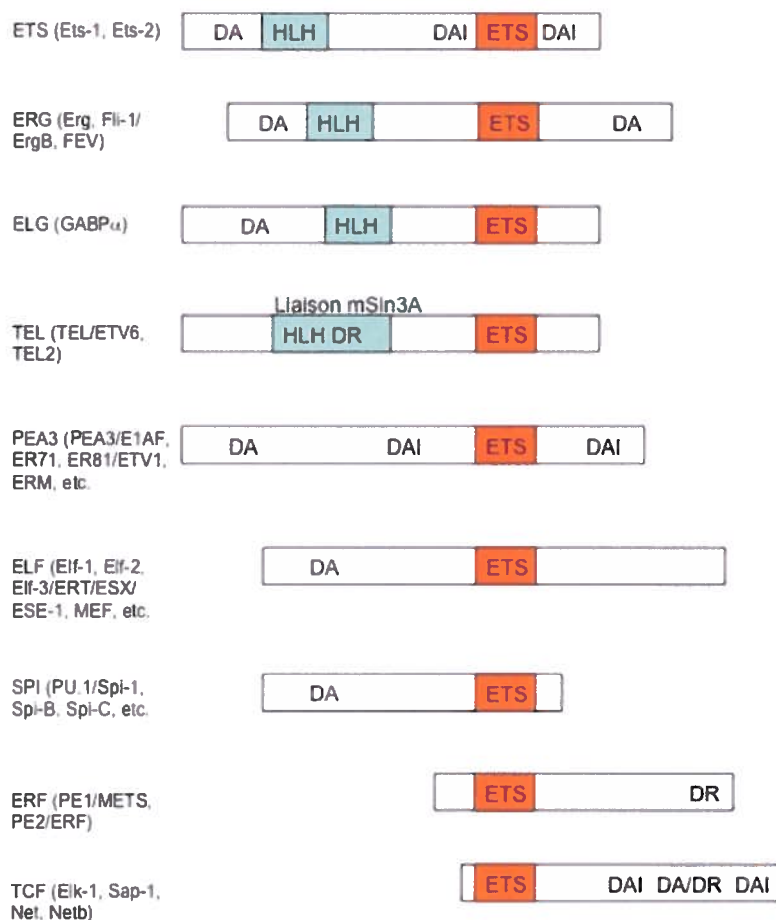
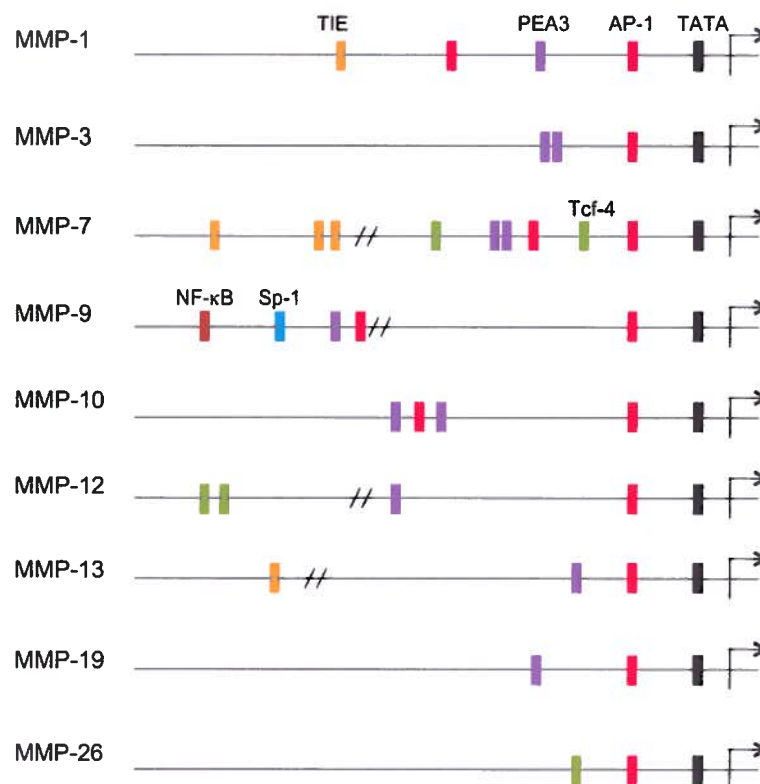


Figure 5 : Structure des membres de la famille de protéines Ets. Les protéines de la famille Ets peuvent être divisées selon leur composition structurale et leurs similarités dans la liaison à l'ADN (domaine ETS localisé en C-terminal pour la plupart). Certaines sous-familles ont un domaine d'interaction protéine-protéine hélice-coude-hélice (HLH). DA : Domaine Activateur ; DAI : Domaine d'Auto-Inhibition ; DR : Domaine de Répression. (Figure adaptée de Dittmer, J and Nordheim, A. *Biochem Biophys Acta*, 1998).

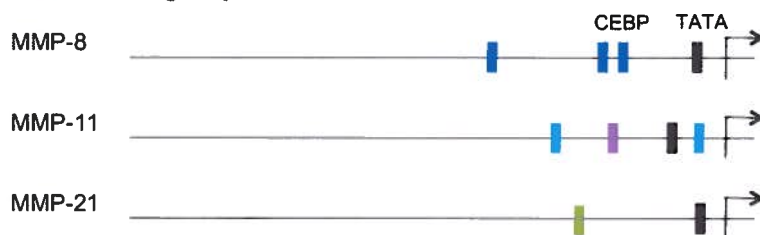
2.2 La régulation transcriptionnelle des MMP

De nombreuses évidences démontrent que l'expression des gènes MMP est régulée surtout au niveau transcriptionnel. Les promoteurs MMP possèdent des éléments *cis* permettant leur régulation via divers trans-activateurs incluant AP-1, PEA3/ETS, Sp-1, β -caténine/Tcf-4 et NF- κ B (**Figure 6**).

Promoteurs groupe 1



Promoteurs groupe 2



Promoteurs groupe 3

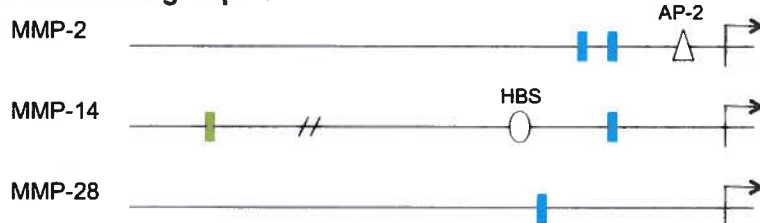


Figure 6 : Éléments cis dans les promoteurs MMP humains : AP-1 :Activator protein-1 ; AP-2 : Activator protein-2 ; CEBP : CCAAT/enhancer binding protein ; HBS : HIF-binding site ; NF-κB : Nuclear Factor-κB ; PEA3/ETS : polyoma enhancer A binding protein-3 ; TATA : TATA box ; Tcf-4 : T-cell factor-4/β-catenin binding site ; TIE : TGF-β inhibitory element. Les éléments cis représentés sont positionnés entre 0 à 500 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (flèche brisée). La coupure permet de représenter des éléments situés plus loin sur les promoteurs. (Figure adaptée à partir de Yan, C and Boyd, D.D, J Cell Physiol, 2007).

Plusieurs promoteurs MMP sont hautement similaires et partagent donc de nombreux éléments *cis*. Basés sur ces éléments *cis* [100], les promoteurs MMP peuvent être divisés en trois groupes. Le premier inclut la majorité des MMP qui possèdent une boîte TATA près du site d'initiation de la transcription ainsi qu'un site de liaison pour le facteur AP-1. La plupart de ces promoteurs contiennent aussi un site de liaison pour le facteur PEA3/ETS, souvent adjacent au site AP-1 où les deux facteurs de transcription peuvent coopérer [101]. Le deuxième groupe de promoteurs (MMP-8, -11 et -21) contient aussi une boîte TATA mais pas de sites AP-1. La régulation de ces promoteurs est relativement simple et distincte du premier groupe. La dernière catégorie de promoteurs inclut MMP-2, -14 et -28 qui ne possèdent pas de boîte TATA. Ces promoteurs possèdent plusieurs sites d'initiation de transcription et leur expression est déterminée par les facteurs de transcription de la famille ubiquitaire Sp-1 qui lient les boîtes GC. L'expression de ces MMP est en majeure partie constitutive [102].

La présence des sites AP-1 dans la plupart des promoteurs MMP rendent ces gènes inductibles à une grande variété de cytokines ou facteurs de croissance incluant les interleukines, les interférons, EGF (Epidermal Growth Factor), KGF (Keratinocyte Growth Factor), NGF (Nerve Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et TGF- β (Transforming Growth Factor- β). Ces stimuli ciblent la signalisation cellulaire atteignant la trans-activation des promoteurs MMP via la convergence des éléments AP-1 et/ou PEA3/ETS [103]. Cette trans-activation via AP-1 et ETS est largement orchestrée par les MAPK mais aussi par l'activation des kinases de p38 qui permettent d'augmenter la transcription de *c-jun* et *c-fos* [104].

En plus des sites AP-1 et ETS, le site Tcf-4 (pour la liaison de β -caténine/LEF) dans les promoteurs MMP-7, -12, -14 et -26, ainsi que le site NF- κ B dans le promoteur MMP-9, sont également des régulateurs pour l'expression des gènes *MMP*. Le site Tcf-4 dirige l'expression des MMP en réponse à la voie de signalisation Wnt [105] via la β -caténine nucléaire. La β -caténine est connue pour sa contribution à la progression tumorale dans le cancer colorectal. Par exemple, l'expression de Wnt-2 augmente l'expression de MMP-7 en stabilisant la β -caténine et amène un phénotype invasif dans

les cellules cancéreuses [106]. De plus, la β -caténine active le promoteur de c-jun [107], fournissant ainsi un mécanisme pour le contrôle de l'expression des gènes *MMP* ne possédant pas de site Tcf-4 dans leur promoteur [107, 108]. Les niveaux de NF- κ B nucléaire sont régulés via les cytokines inflammatoires activées [109], ce qui rend les MMP, comme MMP-9, inductible par TNF- α . Cependant, le suppresseur de métastase KiSS-1 peut bloquer la translocation nucléaire de NF- κ B et inhiber l'expression de MMP-9 dans les cellules de fibrosarcome [110]. La voie NF- κ B régule également l'expression de MMP-1, -3 et -11 [51], même si leur promoteur ne possède pas de site de liaison NF- κ B fonctionnel. Cette induction pourrait donc être une réponse via des éléments *cis* NF- κ B non canoniques ou à cause d'une stimulation indirecte ou intermédiaire de gènes. Une troisième possibilité serait que la stimulation se produise via une interaction de NF- κ B avec d'autres facteurs de transcription [111]. Un mécanisme similaire pourrait également contribuer à l'expression des MMP via la voie de signalisation STAT [112]. Bref, la collaboration entre les facteurs de transcription contribue largement au contrôle de l'expression des MMP. De plus, de nombreux éléments *cis* dans les promoteurs MMP sont d'égale importance dans la régulation de l'expression des gènes *MMP*.

Considérant la forte similarité des promoteurs MMP, il est étonnant de constater que leurs patrons d'expression soient distincts dans les cellules ou tissus spécifiques. Une explication serait que l'expression de facteurs de transcription soit restreinte à un type cellulaire. Par exemple, l'élément Sox-like dirige l'expression de MMP-28 exclusivement dans les cellules germinales [113]. Ou encore, le facteur RunT-2 (Runx-2), exclusivement exprimé dans le cartilage et les os [51], forme un complexe avec AP-1 et limite l'expression de MMP-13 dans les ostéoblastes [114].

Les polymorphismes de l'ADN sont largement rependus à travers le génome humain. Certains se produisent dans la région des promoteurs de gènes et régulent leur expression en altérant les interactions entre les facteurs de transcription et les éléments *cis* dans les promoteurs. Les polymorphismes fonctionnels, issus d'insertions ou substitutions nucléotidiques, ou alors d'instabilité microsatellite ont été identifiés dans plusieurs promoteurs MMP [115]. MMP-3 compte des polymorphismes qui seront discutés dans la prochaine section. Pour ne citer qu'un exemple, un polymorphisme

résultant d'une insertion d'une guanosine à la position -1607, a été identifié dans le promoteur de MMP-1. L'allèle alors composée d'une guanosine supplémentaire forme, avec les nucléotides adjacents, un site de liaison pour le facteur de transcription Ets-1 et augmente l'activité transcriptionnelle et les niveaux protéiques de MMP-1 [116-118]. En plus de MMP-1 et -3, des polymorphismes d'origines diverses ont été identifiés dans les promoteurs de MMP-2, -9 et -12 [119-122], changeant la susceptibilité des porteurs de ces polymorphismes à certaines maladies. La méthylation de l'ADN influence également l'expression des MMP et sera discuté dans le prochain chapitre. Cependant, même si l'expression des MMP est principalement régulée au niveau transcriptionnel, des mécanismes post-transcriptionnels sont aussi impliqués. Par exemple, TGF- β augmente l'expression de MMP-2 et -9 principalement en allongeant la demi-vie des ARNm dans les fibroblastes gingivaux et dans les cellules de cancer de la prostate [123, 124]. TGF- β peut également induire l'expression de MMP-13 à la fois via l'induction de sa transcription et en stabilisant les transcrits dans les ostéoblastes et les fibroblastes de souris [125].

2.3 La régulation transcriptionnelle de MMP-3

2.3.1 Caractéristiques du promoteur MMP-3

La comparaison des séquences du promoteur MMP-3 entre le rat, le lapin et l'humain révèle un haut degré de similarité dans les trois cent soixante-dix paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription, ce qui suggère que cette région peut être critique pour la régulation de MMP-3 [126]. En effet, le site AP-1 est conservé chez ces trois espèces ainsi que chez la souris. AP-1 serait donc indispensable pour l'activation transcriptionnelle de MMP-3 [127-129]. Mis à part AP-1, d'autres sites de régulation ont été étudiés dans le promoteur MMP-3 et peuvent influencer son expression et le degré de son activité. Même s'il est situé à plus de mille paires de bases en amont du site d'initiation, le polymorphisme 5T/6T dans le promoteur MMP-3 est une région impliquée dans le développement de plusieurs troubles de santé ou de maladies. Borghaei et ses collègues ont identifié un site de réponse à l'IL-1⁽⁻¹⁶¹⁴ G(T)TTTTTCCCCCATCAAAG⁻¹⁵⁹⁵) qu'ils appellent SIRE (Stromelysin IL-1 Responsive Element) (**Figure 7**) [130].

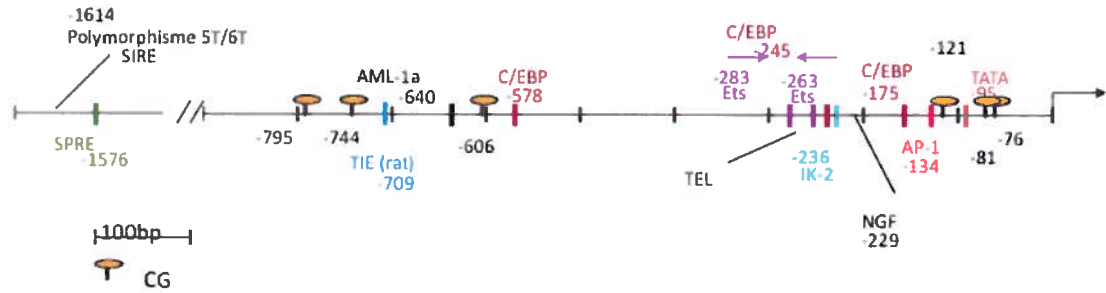


Figure 7 : Caractéristiques du promoteur MMP-3 humain. *MMP-3* fait partie du premier groupe de promoteurs, avec une boîte TATA et au moins un site AP-1 dans la région proximale. AP-1 est le site de liaison central de régulation, sa présence est nécessaire pour l'activation minimale du promoteur et plusieurs facteurs de transcription près du site AP-1 agissent de façon AP-1-dépendante. D'autres sites ont été étudiés chez les homologues du promoteur humain (rat et souris). Le polymorphisme localisé à 1614 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription est impliqué dans le développement et l'incidence de plusieurs maladies. TATA : boîte TATA ; AP-1 : Activator protein-1 ; C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein ; ETS : Erythroblastosis twenty-six ; NGF : Nerve growth factor ; TEL : Translocation-ETS-Leukemia ; IK-2 : Ikaros-2 ; AML-1a : Acute Myeloid Leukemia-1a ; TIE : TGF- β Inhibitory Element ; SPRE : Stromelysin-PDGF Responsive Element ; SIRE : Stromelysin 1L-1 Responsive Element. Les sites CG sont représentés pour les premières 900 paires de bases par des suçons et le site d'initiation de la transcription est représenté par la flèche brisée.

Les expériences de transfections transitoires en utilisant un gène rapporteur dans lequel le promoteur de MMP-3 est muté sur le site SIRE, démontrent que le mutant répond deux fois plus à l'induction par l'IL-1. Ces résultats suggèrent que les protéines qui se lient au site SIRE agissent comme répresseurs de l'expression de MMP-3 induite par les cytokines. Cette même région a également été identifiée comme un site commun de polymorphisme 5T/6T et des évidences démontrent que le répresseur se lie avec une plus grande affinité au site possédant 6T comparé à celui qui en possède 5 [48, 131]. De plus, plusieurs études ont trouvé une association entre le polymorphisme et la susceptibilité à certaines maladies et troubles variés [49, 132-136]. Ces études suggèrent que les faibles et fortes expressions de MMP-3 peuvent avoir d'importantes conséquences pathologiques. Par exemple, les homozygotes pour l'allèle 5T expriment de hauts niveaux de MMP-3 et ont un plus grand risque de développer un infarctus du myocarde et un anévrisme [137-140]. L'allèle 6T, exprimant de faibles niveaux de MMP-3, est

plutôt associée à une sténose et une progression plus rapide de l'athérosclérose [131, 141-144]. Bref, avec toutes ces évidences, le site SIRE joue un rôle important dans le contrôle de l'expression de MMP-3. Récemment, une protéine de liaison au zinc, ZBP-89 a été clonée à partir d'un système de levure simple hybride parce qu'elle possède des habilités à lier le site SIRE [145]. Toutefois, la protéine semble être activatrice plutôt qu'inhibitrice dans des conditions de surexpression de MMP-3 et la protéine se lie à la série de cytosines plutôt qu'aux thymines, contrairement au répresseur potentiel des expériences antérieures. Borghaei et ses collègues démontrent néanmoins que ZBP-89 n'est pas responsable de la répression de MMP-3 sur le site SIRE mais que ZBP-89 est un complexe protéique en compétition avec les composantes p50 et p65 du facteur de transcription NF- κ B. En fait, l'homodimère p50/p50 de NF- κ B serait responsable de la répression de MMP-3 en se liant préférentiellement au site SIRE avec 6T en réponse aux cytokines inflammatoires, tandis que l'hétérodimère serait plutôt activateur. [146]

Près de ce site, se trouve un autre élément de réponse, SPRE (Stromelysin PDGF-Responsive Element), localisé entre -1576 et -1571 en amont du site d'initiation de la transcription. Ce site est nécessaire pour le contrôle de l'expression de MMP-3 suite à une stimulation avec PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) dans les fibroblastes de souris. De plus, PKC ζ est impliqué dans cette stimulation en réponse au PDGF [147]. Des expériences ultérieures démontrent qu'une nouvelle protéine, SPBP (SPRE Binding Protein) lie cette région du promoteur [148].

Un autre site est identifié et répond également à des facteurs de croissance. Un groupe de chercheurs identifie une région (-241 à -229) après le site AP-1 dans le promoteur MMP-3. Cette région répond aux stimuli induits par NGF (Nerve Growth Factor). Dans les fibroblastes, MMP-3 est transcriptionnellement induit par EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF et les phorbol esters [149-151]. Toutefois, dans les fibroblastes de rats, NGF, mais pas EGF ou PDGF, augmente l'expression de MMP-3. Cependant, contrairement aux induction via EGF ou PDGF, la réponse via NGF est indépendante de AP-1, ce qui suggère que des mécanismes de régulation spécifiques aux tissus pourraient être significativement différents [152].

Non loin de cette dernière région, plusieurs études démontrent une coopération entre le facteur ETS et AP-1. Les deux sites ETS palindromiques situés près du site de

liaison pour AP-1 dans le promoteur MMP-3 agissent de façon synergique pour augmenter l'activité du promoteur. Baillat et ses collègues trouvent ensuite qu'un mécanisme d'auto-inhibition existe pour cette région palindromique du promoteur. En effet, l'isoforme p51 de ETS-1 forme un complexe tertiaire ETS-1-ADN-ETS-1. Cette coopération exclusive à la topologie palindromique explique un mécanisme d'auto-inhibition impliquant les résidus 245 à 330 dans la protéine ETS-1. La délétion de ces résidus forme l'isoforme p42 de ETS-1, alors incapable d'engager la coopération et l'augmentation de l'activité de MMP-3 [153]. Par le fait même, cette équipe de chercheurs démontre, par mutagenèse dirigée, l'implication de ETS dans l'augmentation de l'expression de MMP-3 humain.

Sur le même site de liaison pour le facteur ETS, un autre membre de cette famille de protéines peut établir une compétition. TEL (Translocation-ETS-Leukemia) peut diminuer la transcription de MMP-3. La fusion entre le domaine N-terminal de TEL et AML-1 crée un répresseur transcriptionnel. Cette fusion a également permis d'identifier une association avec les co-répresseurs mSin3A et SMRT/N-CoR. En fait, sans mSin3A, TEL ne pourrait avoir son effet répresseur sur l'expression de MMP-3 et ce complexe serait capable de faire compétition à ETS sur le promoteur [154]. De plus, TEL recrute l'histone déacétylase HDAC-3 pour compléter le complexe et la répression de l'expression transcriptionnelle de MMP-3 [155].

L'expression de MMP-3 est également inhibée par l'acide rétinoïque, le dexaméthasone et TGF- β [126, 156-158]. D'ailleurs, dans le promoteur MMP-3 de rat, un élément de répression est localisé à -709 en amont du site d'initiation. Un complexe protéique se lie au site TIE (TGF- β inhibitory element) suite à une stimulation via TGF- β . Ce complexe protéique contient la composante d'AP-1, c-fos et l'induction de c-fos par TGF- β est requise pour les effets répressifs apportés par la suite sur le promoteur MMP-3. De façon surprenante, c-fos est également impliqué dans l'augmentation de l'expression de MMP-3 via EGF dans les fibroblastes de rats. La régulation des membres de la famille de protéines jun pourrait expliquer ce phénomène paradoxal et ainsi déterminer si MMP-3 sera inhibée ou activée au niveau transcriptionnel via les facteurs de croissance [159].

2.3.2 Autres facteurs de transcription

C/EBP

D'autres éléments de liaison à l'ADN sont moins connus pour la régulation de l'expression de MMP-3 mais doivent être mentionnés dû à leur implication dans la régulation d'autres gènes et processus physiologiques. C'est le cas de C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein). Les protéines CEBP comptent 6 membres dont les plus étudiés sont CEBP α et CEBP β et celles-ci ont d'abord été identifiées comme facteurs de transcription exprimés dans le foie, les cellules adipeuses et les tissus pulmonaires. Les deux protéines possèdent des isoformes issues d'initiation de traduction alternative. CEBP α possède les isoformes de 42kDa et 30kDa (p42 et p30 respectivement) et CEBP β se présente sous trois isoformes différentes, p38, p33 et p20, aussi connues sous les noms de LAP* (Liver Activating Protein*), LAP et LIP (Liver Inhibitory Protein) [160]. Ces isoformes contiennent toutes des régions de fermeture éclair à leucine (*leucine zipper*).

La famille de protéines CEBP est impliquée dans diverses réponses cellulaires incluant le contrôle de la croissance et la différenciation cellulaire, les processus inflammatoire et immunitaire et plusieurs maladies [161]. Les protéines CEBP sont également capables de dimériser avec les membres de leur propre famille mais aussi avec les protéines Fos/Jun et ATF/CREB. Les protéines CEBP possèdent également l'habilité d'interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que NF- κ B et Sp-1 [162, 163]. CEBP α est le facteur régulateur par excellence de la granulopoïèse. Cette protéine est exprimée pendant tout le processus de différenciation myéloïde et se lie aux promoteurs de gènes myéloïde-spécifiques [164, 165]. CEBP α joue également un rôle dans la différenciation des adipocytes et est impliqué dans la régulation de gènes hépatiques constitutivement exprimés mais aussi pour les gènes hépatiques impliqués dans la réponse aiguë [166]. En plus de son habilité à *trans* activer les gènes myéloïde-spécifiques, CEBP α peut arrêter la croissance mitotique par trois mécanismes. Le premier étant que CEBP α peut induire l'expression de p21, un inhibiteur de CDK (Cyclin-Dependant Kinase) [167-170]. Deuxièmement, CEBP α peut contrôler la croissance via l'interaction entre CDK2 et CDK4 [171]. Finalement, CEBP α peut interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF et fermer l'accès à

la transcription [165]. CEBP α agit donc en facilitant la sortie du cycle cellulaire mais aussi en induisant l'expression de gènes spécifiques durant tous les stades de différenciation cellulaire. Tandis que CEBP α est considéré comme un suppresseur de tumeur, CEBP β est plutôt impliqué dans la tumorigenèse de la peau [172]. Cependant, de façon similaire à CEBP α , CEBP β est capable d'inhiber la prolifération cellulaire via la répression de gènes régulant les protéines de la famille Rétinoblastome [173, 174]. Somme toute, les deux protéines CEBP α et CEBP β sont relativement similaires. Inhiber une des deux protéines est souvent insuffisant pour annuler leurs fonctions étant donné leur redondance.

L'expression protéique de CEBP est régulée par plusieurs conditions physiologiques et pathologiques via l'action de plusieurs facteurs incluant les cytokines, les mitogènes, les hormones, les nutriments ainsi que les agents causant un stress cellulaire [175-178]. Au niveau de la régulation transcriptionnelle, il est à mentionné que le promoteur de CEBP α est régulé par des facteurs de transcription tels que Sp-1 et NF- κ B [179, 180], mais aussi par la méthylation. En effet, la méthylation du promoteur de CEBP α a été observée dans des cellules provenant de patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës [181]. De plus, dans des cellules de cancer du poumons ainsi que dans des carcinomes de cellules squameuses, l'expression de CEBP α est inhibée par la méthylation de l'ADN [182, 183]. Quant à CEBP β , son induction via l'IL-6 est bien connue. Les facteurs de transcription CREB (cAMP-Response Element Binding protein) et CRE-like contrôlent également cette isoforme [184].

Malgré aucune évidence directe de la régulation de l'expression de MMP-3 par CEBP, il est à mentionné que CEBP β peut réguler l'activité des MMP, notamment MMP-1 via la stimulation par l'IL-1 β dans les cellules de carcinomes du poumon A549. Dans cette même étude, l'inhibition de CEBP β par des ARN antisens, a permis l'inhibition de MMP-1, -3 et -10 suite à une stimulation par IL-1 β [185].

Ikaros

La différenciation et la prolifération à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes jusqu'aux cellules matures du sang est contrôlée durant toute la vie d'un organisme. Ce contrôle est effectué en partie au niveau de la

transcription où un nombre de complexes multi-protéiques régulent de façon coopérative l'expression de gènes appropriés. En 1992, le facteur de transcription Ikaros (connu aussi sous le nom de LyF-1) est découvert chez la souris [186] et plus tard chez l'humain [187]. Ikaros est hautement conservé de la lamproie jusqu'à l'humain [188]. Le gène Ikaros code pour au moins six isoformes (Ik-1 à -6) et se lie au motif GGGA [189]. Les premiers indices concernant les fonctions d'Ikaros sont venus des observations sur les patrons d'expression chez la souris où l'expression du gène est largement étendue durant le développement hématopoïétique. Ikaros est abondant dans les progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires, les thymocytes en développement ainsi que les cellules T et B matures [190].

Une caractéristique importante d'Ikaros est qu'il peut agir comme répresseur ou activateur de transcription. En effet, Ikaros peut interagir avec le co-répresseur CtBP, l'oncoprotéine virale E1A, les complexes répresseur histone déacétylase NURD et SIN3 et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF [188]. Certains gènes contenant un site de liaison pour Ikaros peuvent être relocalisés dans des régions inaccessibles au niveau de la transcription. De cette façon, Ikaros est un facteur participant pleinement aux mécanismes de régulation épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et la modification des histones. Aucune expérience jusqu'à ce jour n'a encore été répertoriée quant à la régulation de MMP-3 par Ikaros mais un site de liaison est situé près du site d'initiation de la transcription du promoteur humain MMP-3.

3 Régulation transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN

3.1 Historique

L'héritage épigénétique est défini comme une information cellulaire, autre que la séquence d'ADN elle-même, transmise durant la division cellulaire. Les phénomènes épigénétiques sont médiés par une variété de mécanismes moléculaires incluant les modifications post-traductionnelles des histones, les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, les complexes de protéines polycomb/trithorax, les petits ARN et ARN non-codants (siRNA et miRNA) et la méthylation de l'ADN. Étant donné que le projet de thèse porte sur la méthylation de l'ADN, les autres mécanismes ne seront que définis brièvement.

Les éléments de base de la chromatine sont les nucléosomes, chacun composé de 146 paires de bases d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones, lui-même composé de deux copies d'histones (H2A, H2B, H3 et H4). La portion N-terminale des queues d'histones est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation et la méthylation. Ces modifications affectent la structure de la chromatine et la transcription. Chaque modification peut affecter l'architecture de la chromatine, mais la combinaison de ces modifications peut être ultimement déterminante dans le statut de la chromatine, lequel gouverne la transcription des gènes [191]. De plus, les protéines qui dirigent ces modifications sont souvent associées à l'intérieur des mêmes complexes que ceux qui régulent la méthylation de l'ADN.

La seule modification épigénétique de l'ADN connue chez les mammifères est la méthylation des cytosines (ou l'ajout d'un groupe méthyle) en 5' méthylcytosines au niveau des dinucléotides CpG, notamment à l'intérieur d'îlots CpG [192]. La perte de la méthylation (hypométhylation) de l'ADN sur des dinucléotides CpG a été la première anomalie épigénétique identifiée dans les cellules de cancer. En 1982, Andrew Feinberg et Bert Vogelstein présentent leurs études sur les différences entre les cellules de cancer et les tissus normaux lors d'un symposium sur l'hétérogénéité des cellules tumorales. Ils utilisent la technique de buvardage de type Southern pour analyser l'ADN digéré préalablement par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation. Leurs résultats démontrent qu'une proportion significative de CpG méthylés dans les tissus normaux, se trouvent non-méthylés dans les cellules cancéreuses [193]. Par la suite, Ehrlich et ses collègues utilisent la chromatographie liquide à haute performance pour montrer que le contenu en cytosines méthylées (5^{me}C) est globalement réduit [194] et l'implication de l'hypométhylation de l'ADN dans les cancers devient évidente. En effet, elle peut amener à l'activation de gènes. Il a été démontré que les dinucléotides CpG peuvent devenir hypométhylés dans les cancers et les gènes avoisinant deviennent activés comme dans le cas de l'oncogène *HRAS* par exemple [195]. L'hypométhylation est également liée à l'instabilité chromosomique et elle est particulièrement sévère dans les séquences satellites péricentromériques et plusieurs cancers présentent souvent des translocations chromosomiques avec des points de cassure dans l'ADN péricentromérique des

chromosomes 1 et 16 [196]. Toutefois, même si le mécanisme de l'hypométhylation a été le premier changement épigénétique identifié dans le cancer, il a été rapidement doublé par l'hyperméthylation pendant plusieurs années. Ce n'est que depuis peu que l'intérêt pour l'hypométhylation connaît une certaine renaissance.

Les chercheurs Stephen Baylin et Barry Nelkin étudient la calcitonine, un marqueur du cancer pulmonaire à petites cellules. C'est en 1986 que ce groupe de chercheurs découvrent une hyperméthylation site-spécifique de la calcitonine associée à la répression de l'expression du gène [197]. Puisque la calcitonine n'est pas un gène suppresseur de tumeurs, le premier lien entre l'hyperméthylation et les gènes suppresseurs de tumeurs s'établira avec les études du gène rétinoblastome (*RB*). Les résultats publiés par les laboratoires de Dryja et Horsthemke sont les premiers à indiquer que la répression transcriptionnelle d'un suppresseur de tumeur peut se produire de manière épigénétique [198, 199]. En 1995, plusieurs groupes de chercheurs confirment par la suite l'hyperméthylation de nombreux promoteurs dans les cellules de cancers, incluant des protéines suppresseurs de tumeurs p16 (*INK4A*), MLH1 (enzyme de réparation de l'ADN), VHL (von Hippel-Lindau) et E-cadherin. Ces résultats supportaient donc le mécanisme d'inactivation de gènes par un moyen épigénétique dans le cancer.

Il est important de noter que la relation de base entre la méthylation d'îlots CpG (région génomique d'environ 1kb ayant un contenu riche en G-C) et l'inactivation des gènes vient d'études antérieures de l'inactivation du chromosome X. Un premier indice provient des études de Mohandas et ses collègues en 1981 qui démontrent que la 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), un inhibiteur de méthylation de l'ADN, pouvait réactiver le chromosome X [200]. Par ailleurs, il été démontré que l'agent déméthylant 5-aza-dC est capable de transformer des cellules en culture [201]. Ces études ont été initiées antérieurement par la découverte de Taylor et Jones démontrant que l'agent 5-aza-dC possédait des effets reproductibles sur la différenciation des cellules dans les tissus en culture [202]. Cet agent pharmacologique est maintenant utilisé dans certaines situations cliniques, notamment en combinaison avec des traitements chimiothérapeutiques pour plusieurs types de cancer, dont le syndrome de myélodysplasie et les leucémies [203]. Ce type de thérapie vise donc essentiellement à

réactiver les gènes suppresseurs de tumeurs, réprimés épigénétiquement, et sont justifiées chez les patients atteints de cancers où les autres stratégies thérapeutiques ont échouées. Des études ont toutefois démontré que l'incorporation de la drogue dans l'ADN pouvait contribuer à des effets cytotoxiques mettant un bémol à ce type de traitement à cause des conséquences indésirables à long terme, en l'occurrence, l'instabilité génomique déclenchée par l'hypométhylation. [204-206].

Il est devenu de plus en plus évident que l'héritage épigénétique est important dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques. Les mécanismes épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN, sont des joueurs importants dans la compréhension des différences entre la croissance, la sénescence et les cellules immortelles, la différenciation des cellules et leur vieillissement.

3.1.1 Autres modifications épigénétiques : modifications post-traductionnelles des histones

Dans les cellules eucaryotes, l'expression des gènes peut être également régulée au niveau de la structure de la chromatine. Plusieurs résidus à l'intérieur des queues d'histones et plusieurs résidus dans certains domaines des histones peuvent être modifiés de différentes façons, comme mentionné plus haut.

Les histones ont été isolées et caractérisées par Albrecht Kossel en 1884. Toutefois, ce n'est pas avant 1950 que Stedman et Stedman [207] identifient des formes multiples d'histones dans le noyau des cellules et avancent l'hypothèse que différents phénotypes cellulaires dans un organisme peuvent émerger de la suppression des gènes via la modification d'histones. Plus tard, Allfrey et ses collègues suggèrent que l'acétylation et la méthylation sont des modifications post-traductionnelles des histones [208]. Le groupe de recherche observe que l'acétylation chimique des histones réduit de façon significative l'effet inhibiteur de la synthèse de l'ARN. Ils avancent alors l'hypothèse que des petites modifications traductionnelles réversibles sur les histones pourraient activer ou désactiver la synthèse de l'ARN à différents loci le long des chromosomes. Depuis ces premières observations, de nombreuses modifications post-traductionnelles ont été identifiées [209]. Il est maintenant bien établi que la position et les propriétés chimiques des modifications d'histones dictent la structure de la

chromatine ainsi que ses fonctions dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN [210]. Tout ceci ayant permis de proposer l'hypothèse du code histone. Cette hypothèse propose plusieurs événements de régulation pour l'interprétation du génome. D'abord, dans un contexte cellulaire et de développement, l'homéostasie dans la modification des histones (le code histone) est conservée grâce à des événements « d'écriture » et « d'abrogation » faits par des enzymes modifiant les histones. L'événement qui « écrit » la modification des histones serait une enzyme (par exemple une histone méthyltransférase) qui catalyse une modification chimique sur un résidu spécifique de l'histone. « L'effaceur » d'une modification d'histone serait une enzyme (par exemple une histone déméthylase) qui retire la modification chimique de l'histone [191, 211, 212]. La deuxième partie de l'hypothèse du code histone est l'interprétation ou la « lecture » du code. Ceci est accompli par les protéines effectrices qui lient une combinaison spécifique de modification d'histones et la traduit en événement biologique concret (activation/suppression de la transcription ou d'autres réponses cellulaires). En plus du recrutement de ces mécanismes *trans*, la modification d'une histone peut également se faire simplement par modulation physique directe de la structure de la chromatine, ou alors par une altération des charges du nucléosome (par exemple, la neutralisation des charges positives des histones par acétylation des lysines) [213]. Tous ces mécanismes de régulation se produisent pour préparer un profil épigénétique qui détermine l'identité cellulaire future durant l'embryogenèse et le développement [214], ainsi que la régulation transcriptionnelle des gènes dans différents contextes.

Même si d'autres résidus peuvent être modifiés, les lysines sont des substrats importants dans la biochimie des histones parce qu'elles peuvent subir plusieurs modifications exclusives incluant l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitylation et la SUMOylation. L'acétylation et la méthylation impliquent des petits groupements chimiques, tandis que l'ubiquitylation et la SUMOylation ajoutent de plus larges fragments qui peuvent apporter des changements plus profonds dans la structure de la chromatine [215]. Un résumé des modifications que peuvent subir les queues d'histones est présenté ici-bas dans le **tableau II**.

Tableau II : Modifications post-traductionnelles des histones affectant la structure de la chromatine

Modification	Sites transcriptionnels	Rôle transcriptionnel
Lysine acétylée (K)	H3 (K9, 14, 18, 56), H4 (K5, 8, 13, 16), H2A, H2B	Répression
Sérines/Thréonines (S/Tph) phosphorylées	H3 (S/Tph3, 10, 28), H2A, H2B	Activation
Arginines méthylées (R)	H3 (R17, 23), H4 (R3)	Activation
Lysines méthylées (K)	H3 (K4, 36, 79)	Activation
Lysines méthylées (K)	H3 (K9, 27), H4 (K20)	Répression
Lysines ubiquitylées (K)	H3 (K120)	Activation
Lysines ubiquitylées (K)	H2A (K119)	Répression
Lysines SUMOylées (K)	H2B (K6/7), H2A (K126)	Répression

La méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones sont des changements épigénétiques reliés dans la régulation des gènes. En utilisant la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), il a été démontré que l'ADN non-méthylé est assemblé dans le nucléosome et contient des histones acétylées. Ces dernières démontrent que la chromatine est « ouverte », ou disponible pour les liaisons d'autres protéines, alors que la présence de groupements méthyles sur les séquences d'ADN identiques corrèle avec des histones H3 et H4 non-acétylées, représentant une chromatine plus compacte [216, 217]. Cette relation entre la méthylation de l'ADN et la modification des histones peut être partiellement dirigée par les protéines de liaison aux méthylcytosines, comme MeCP2 ou MBD2, qui sont capables de recruter les histones déacétylases sur les régions méthylées [218, 219]. Il est également probable que la présence de méthylation sur l'ADN dirige la déméthylation de H3K9, qui représente une marque de chromatine répressive [217]. Cette déméthylation se ferait via l'interaction entre G9a, une méthyltransférase, et DNMT1 dans le complexe de réplication [220].

De nombreux autres exemples démontrent la relation entre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones dans la régulation des gènes. Même si ces modifications semblent avoir leur propre rôle dans la régulation de l'expression des gènes, il est clair qu'il existe un réseau de connexions entre les changements épigénétiques. La présence de groupements méthyles sur l'ADN, par exemple, peut affecter la modification d'histones dans les nucléosomes. Inversement, la présence de certains types d'histones méthylées peut être associée à la méthylation de

l'ADN. Cette connexion pourrait être dirigée via des domaines dans les histones méthyltransférases et les DNMT [221]. Plusieurs détails mécanistiques demeurent encore obscures mais le réseau d'interactions entre les différents types de modifications sert à coordonner ces régulateurs épigénétiques impliqués dans de multiples aspects de la régulation de l'expression des gènes durant le développement.

3.2 Mécanisme de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la seule modification de l'ADN programmée génétiquement chez les mammifères. Cette modification post-répllicative est presque exclusivement trouvée sur la position 5 d'un anneau pyrimidine des cytosines dans un contexte de séquence dinucléotidique CpG [192]. Les 5^{me}C comptent pour environ 1% de toutes les bases, variant légèrement dépendamment du type de tissu et la majorité des dinucléotides CpG (75%) dans les génomes de mammifères sont méthylés [222]. Le métabolisme du carbone, chez les mammifères, fournit le groupement méthyle pour toutes les réactions de méthylation. Ces réactions sont dépendantes des donneurs méthyles (méthionine et choline) et des co-facteurs (acide folique, vitamine B12) afin de synthétiser le donneur méthyle universel, S-adenosyl-L-méthionine (SAM) [223, 224]. Durant la réaction de méthylation, un groupement méthyle est transféré de SAM à l'ADN, laissant le donneur méthyle en S-adenosylhomocystéine. Une concentration élevée de ce dernier inhibe l'action des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN.

Jusqu'à maintenant quatre méthyltransférases de l'ADN ont été identifiées, DNMT1, DNMT2, DNMT3a et DNMT3b ainsi qu'une protéine reliée aux DNMT, DNMT3L [225, 226]. Les DNMT catalysent le transfert d'un groupement méthyle de SAM sur la base cytosine. À l'exception de DNMT2, qui possède une très faible activité méthyltransférase *in vitro* [227], toutes les DNMT sont essentielles à la viabilité embryonnaire [228, 229].

DNMT1 agit comme enzyme de maintenance de la méthylation. DNMT1 préfère l'ADN hémi-méthylé et est localisée dans la fourche de réplication de l'ADN durant la phase S du cycle cellulaire. L'enzyme méthyle le brin nouvellement synthétisé en utilisant le brin parental comme modèle. Conséquemment, DNMT1 passe

l'information épigénétique aux générations cellulaires suivantes. Cette enzyme à également des isoformes incluant DNMT1b [230] et l'isoforme spécifique à l'oocyte, DNMT1o [231]. Cette dernière est synthétisée et stockée dans le cytoplasme de l'oocyte pour ensuite être transloquée au noyau au stade de huit cellules dans l'embryon pré-implanté [232]. Il a été suggéré que DNMT1o maintient les patrons de méthylation des allèles de gènes dits « imprimés » (*imprinted genes*) [233].

Les cellules souches embryonnaires déficientes en DNMT1 sont viables et contiennent un faible pourcentage d'ADN méthylé et d'activité méthyltransférase. En effet, l'ADN de provirus intégré dans des cellules souches embryonnaires infectées par Mo-MuLV devient méthylé à un taux similaire aux cellules de type sauvage, suggérant la présence d'activité méthyltransférase *de novo* [234]. Cette activité méthyltransférase *de novo* est dirigée par DNMT3a et DNMT3b. Il est encore difficile d'évaluer les mécanismes par lesquels DNMT3a et DNMT3b sont recrutées pour cibler des séquences spécifiques d'ADN. Les études provenant de modèles de culture cellulaire suggèrent au moins trois façons possibles par lesquelles la méthylation *de novo* pourrait se produire :

- (1) Les enzymes DNMT3 elles-mêmes pourraient reconnaître l'ADN ou la chromatine via des domaines protéiques spécifiques. Dans des cellules de souris, les enzymes DNMT3 sont partiellement localisées dans les régions péri-centromériques de l'hétérochromatine. Des études fonctionnelles ont démontré qu'un domaine conservé de l'enzyme (PWWP) est requis pour cibler l'activité catalytique de ces régions du génome. Sans ce domaine, la liaison de l'enzyme à la chromatine est abolie [235];
- (2) La deuxième possibilité serait que DNMT3a et DNMT3b pourraient être recrutées via des interactions protéine-protéine avec des répresseurs transcriptionnels ou d'autres facteurs. Par exemple, Brenner et ses collègues ont démontré que la protéine Myc s'associe avec l'activité méthyltransférase et une interaction directe entre DNMT3a et Myc est requise pour une répression efficace du gène cible de Myc, *p21* [236]; [237] Finalement, le système d'interférence médié par l'ARN (RNAi) pourrait cibler la méthylation *de novo* sur des séquences spécifiques d'ADN. Le système RNAi est un processus post-transcriptionnel par lequel les ARN double-brin causent la dégradation d'une séquence spécifique homologue à la séquence d'un ARNm. La possibilité que ce système cible la méthylation *de novo* provient des études sur des souris déficientes en *Dicer*, un gène

essentiel au système RNAi. Les résultats de ces études démontrent une diminution de la méthylation de l'ADN dans les répétitions centromériques [238], impliquant la machinerie RNAi dans le maintien de ces marques de méthylation. Néanmoins, la machinerie de la méthylation de l'ADN ne se résume pas aux enzymes elles-mêmes mais doit être plutôt vue comme un réseau complexe de protéines travaillant de concert.

La méthylation de l'ADN est reliée à la répression transcriptionnelle des gènes [239-242] et de nombreux efforts ont été investis dans l'étude des mécanismes qui supporte cette relation. Deux modèles de base peuvent être élaborés pour expliquer les mécanismes reliant la méthylation à la répression des gènes. Dans le premier modèle, la méthylation de l'ADN inhiberait directement la transcription en bloquant la liaison des activateurs transcriptionnels sur leurs séquences consensus [243]. Dans le deuxième modèle, des protéines de liaison à la méthylation (MBP) reconnaissent l'ADN méthylé et recrutent des co-répresseurs pour inhiber l'expression du gène directement [218, 244] (**Figure 8**). Pour certains promoteurs, la répression médiée par la méthylation de l'ADN est plus efficace dans un contexte de chromatine, ce qui indique que la composante « active » de ce système de répression pourrait reposer sur la modification de la chromatine [241, 245]. D'ailleurs, les MBP s'associent avec les complexes co-répresseurs de remodelage de la chromatine [246-249].

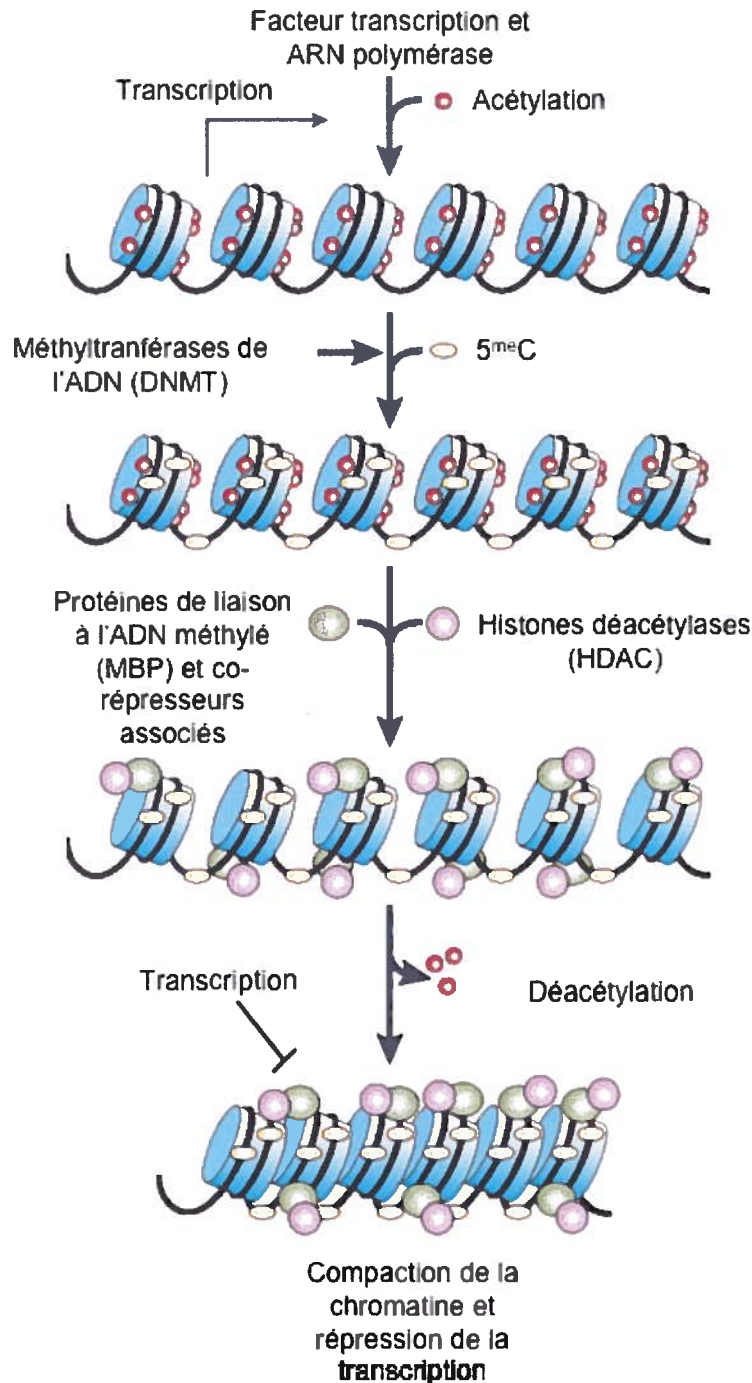


Figure 8 : Mécanisme de méthylation de l'ADN. Une région active transcriptionnellement est ciblée par la répression de la transcription acquiert la méthylation de l'ADN en premier, qui recrute ensuite les protéines de liaison à la méthylation et les co-répresseurs associés ainsi que les histones déacétylases. Comme les DNMT peuvent interagir avec les HDAC, il est également possible que la transcription soit d'abord inhibée par la déacétylation ou d'autres facteurs tels que des protéines de remodelage de la chromatine, suivie par le recrutement de la machinerie de méthylation et des protéines de liaison à la méthylation cimentant ainsi le statut répressif du promoteur. Dans les deux cas, la déacétylation des nucléosomes adopte une structure plus compacte qui empêche la liaison des facteurs de transcription aux sites consensus. (Figure adaptée à partir de Robertson, KD and Wolffe, AP, Nat. Rev. Genetics, 2000).

3.3 Fonctions de la méthylation de l'ADN

La méthylation des cytosines est essentielle au processus d'embryogenèse durant lequel les niveaux de méthylation changent de façon dynamique [250, 251]. Durant le développement et la différenciation, l'organisme crée un nombre d'épigénomes marqués différemment selon le type cellulaire dont l'identité est définie par leur patron respectif de méthylation. Le développement des mammifères est caractérisé par deux vagues de reprogrammation épigénétique globale du génome dans le zygote ainsi que dans les cellules germinales. Chez la souris, le génome devient déméthylé durant la pré-implantation. La majeure partie du génome paternel est activement et rapidement déméthylé, effaçant ainsi les marques de méthylation de la lignée germinale paternelle. Au même moment, le génome maternel demeure méthylé et une fois le premier cycle cellulaire complété, la disparition de la méthylation sur l'allèle maternel se produit jusqu'à la formation du blastocyste. Cette déméthylation enlève toute trace de patron de méthylation pré-existant hérité de l'ADN parental. Vers l'implantation, où les lignées cellulaires commencent à se différencier, les niveaux de méthylation de l'ADN sont rétablis par la méthylation *de novo*. Le deuxième événement de reprogrammation se produit aussi durant l'embryogenèse mais n'est réservé qu'aux cellules germinales primordiales où les patrons de méthylation sont effacés sur tous les gènes à une seule copie (incluant les gènes « imprimés ») et certains éléments répétés [252]. Dépendamment du sexe, les empreintes paternelles sont restaurées rapidement après la naissance tandis que les loci maternels méthylés ont lieu seulement durant les stades tardifs de l'oogenèse. De cette façon, un groupe de gènes est exprimé de façon asymétrique provenant seulement de l'allèle maternel ou paternel de manière spécifique à l'origine des parents dans toutes les cellules somatiques [251]. Un exemple bien étudié est le locus H19/Igf2 qui démontre les contacts physiques entre les différentes régions méthylées contenant des isolateurs, des répresseurs et des activateurs. Ces contacts créent un contrôle dans la structure de la chromatine, permettant la régulation transcriptionnelle des deux gènes [253]. De plus, lors du développement, la répression aléatoire d'un des deux chromosomes sexuels dans les tissus embryonnaires femelles est un autre système permettant un statut épigénétique stable dans les cellules somatiques [254]. Les patrons de modification des histones et de méthylation changent dans le futur

chromosome X inactif et sont nécessaires pour doser et compenser l'expression des gènes.

La méthylation de l'ADN a également une implication dans la recombinaison V(D)J au niveau du développement lymphocytaire. Les loci codant pour les récepteurs antigéniques sont d'abord dans un stade répressif et demeurent ainsi jusqu'à la différenciation lymphoïde, où les groupes méthyles sont enlevés de manière spécifique au stade de différenciation et spécifique au type cellulaire [255, 256]. La méthylation de l'ADN semble affecter majoritairement la régulation du réarrangement plutôt que la transcription locale [257-261]. Cette implication reflète donc le rôle de la méthylation de l'ADN dans le contrôle de l'expression des gènes spécifiques aux tissus mais aussi, de manière à synchroniser des événements physiologiques et biologiques.

La méthylation de l'ADN joue également un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome en réprimant la transcription des séquences d'ADN répétées et des transposons. La méthylation peut prévenir une recombinaison susceptible de se reproduire entre des répétitions non-alléliques causées par leurs éléments génétiques mobiles [262]. Bref, le génome des mammifères, codant pour environ 30 000 gènes, doit pouvoir programmer des patrons d'expression de gènes dans environ 200 types cellulaires différents durant de nombreux stades développementaux. Il est maintenant évident qu'une couche additionnelle d'informations requises pour l'expression des gènes est encodée dans la séquence du génome et excède l'information de quatre bases (A, T, C et G). Ces renseignements additionnels sont dirigés par les modifications épigénétiques qui, dans leur intégralité, forment l'épigénome. Les modifications épigénétiques, incluant la méthylation de l'ADN, changent la structure de la chromatine sans altérer la séquence d'ADN et affecte de par leur rôle primordial, l'expression des gènes. Cependant, malgré les fonctions essentielles apportées par la méthylation de l'ADN, il est maintenant bien établi que de nombreuses anomalies épigénétiques jouent des rôles décisifs dans différentes maladies.

3.4 La méthylation dans les processus pathologiques

La liste de maladies humaines causées par ou impliquant une perturbation dans la méthylation de l'ADN est devenue plutôt longue. L'étude de ces maladies a tout de même permis de découvrir de nouvelles informations quant aux rôles que la méthylation et d'autres modifications épigénétiques possèdent dans le développement et l'homéostasie cellulaire normale.

Méthylation de l'ADN et désordres d'empreinte génomique

La méthylation de l'ADN spécifique à l'allèle est une des marques typiques des régions « imprimées » et est habituellement localisée dans des régions spécifiques du génome. Ces régions incluent des sections de contrôle de l'empreinte qui régulent l'expression des gènes à l'intérieur des domaines imprimés, s'étendant souvent sur de larges distances. Ces régions peuvent être reprogrammées durant le développement mais la méthylation différentielle dans les sections de contrôle de l'empreinte est généralement établie dans les cellules germinales et maintenue durant tout le développement [251]. Le facteur de liaison à CCCTC (CTCF) est une protéine importante dans l'expression des gènes de l'empreinte. CTCF est un isolateur de la chromatine qui sépare le génome en domaines fonctionnels indépendants ou, dans le cas de loci imprimés, qui régule l'habilité d'un enhancer à accéder aux promoteurs sur de longues distances [237]. Dans plusieurs régions de contrôle de l'empreinte, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que CTCF se lie seulement sur l'allèle parentale non méthylée [263, 264], permettant aux gènes, régulés par les régions contrôles de l'empreinte, d'être exprimés de manière allèle spécifique. La perte de l'empreinte génomique (*loss of imprinting; LOI*) est la perturbation des marques épigénétiques via un gain ou une perte de méthylation de l'ADN ou simplement, la perte de l'expression normale d'un gène allèle-spécifique [265]. Les études sur les LOI ont apporté d'importantes informations sur le rôle de la méthylation et aussi sur celui de CTCF comme régulateur de gènes imprimés et les patrons de méthylation. Plusieurs maladies ou désordres chez l'humain se développent via une empreinte génomique aberrante (**Tableau III**).

La méthylation et les séquences répétées

Les défauts de méthylation peuvent également être reliés à des maladies humaines associées à l'instabilité de répétitions. L'élongation des répétitions trinucleotidiques (TNR) durant la gamétogenèse conduit à des mutations ou à la répression de gènes associés avec des conséquences pathologiques [266]. Les causes de l'instabilité demeurent plutôt obscures mais plusieurs hypothèses sont proposées, notamment un dérapage de l'ADN polymérase, des mécanismes de réparations de l'ADN, des défauts de transcription ou dans le positionnement des nucléosomes et une synthèse aberrante des fragments d'okazaki à l'intérieur de ces répétitions [267]. Les troubles associés à cette instabilité sont résumés dans le **Tableau III**.

Défauts spécifiques à la machinerie de la méthylation

Les maladies humaines qui émergent des mutations dans la machinerie de la méthylation de l'ADN ont permis de découvrir d'importants rôles orchestrés par les DNMT. Ces défauts ont également démontré qu'une régulation déficiente de la méthylation de l'ADN peut se produire dans des types cellulaires spécifiques (**Tableau III**).

Méthylation et cancer

Le lien entre la méthylation de l'ADN et le cancer a été initialement suggéré en 1983, lorsque les génomes de cellules cancéreuses ont été comparés aux cellules normales. Le génome des cellules cancéreuses était hypométhylé par rapport à leurs cellules témoins [268]. L'hypométhylation dans les cellules tumorales est majoritairement due à la perte de méthylation des régions répétitives du génome et la conséquence de l'instabilité génomique est une marque typique des cellules tumorales. Les réarrangements qui impliquent une grande partie de l'hétérochromatine péricentromérique sur le chromosome 1, par exemple, sont parmi les instabilités génomiques les plus fréquentes dans plusieurs types de tumeurs [269]. La réactivation des promoteurs de transposons suivant la déméthylation peut également contribuer à la régulation aberrante des gènes dans les cancers par interférence de transcription ou génération de transcrits anti-sens [270]. La perte de la méthylation génomique est un

événement fréquent et précoce dans le cancer et corrèle avec la sévérité de la maladie ainsi que son potentiel métastatique [271]. Des effets d'hypométhylation sur des gènes spécifiques se produisent également. Par exemple, le gène codant pour l'antigène de mélanome *MAGE* est fréquemment déméthylé [272]. La déméthylation accompagnée d'une augmentation de l'expression d'un gène a également été démontrée dans de nombreux types de cancers, par exemple, dans le gène de la protéine de liaison au calcium *S100A4* dans le cancer du colon [273], le gène inhibiteur de sérines protéases *SERPINB5* dans le cancer gastrique [274] et l'oncogène γ -synuclein (*SNCG*) dans les cancers du sein et ovarien [275]. L'hypométhylation globale tôt dans la tumorigenèse prédispose à l'instabilité génomique et à des changements génétiques, tandis que la déméthylation d'un gène spécifique pourrait se produire plus tard et permettre aux cellules tumorales de s'adapter à l'environnement et promouvoir la métastase [276].

Les événements d'hyperméthylation qui se produisent en même temps que l'hypométhylation se localisent sur les îlots CpG, la plupart desquels sont normalement déméthylés dans les cellules somatiques [277, 278]. Il en résulte d'un changement dans la structure de la chromatine, caractérisé par une hypoacétylation des histones et une répression de la transcription des gènes. En effet, un groupe de gènes distincts dans plusieurs types de tumeurs ont été qualifiés de phénotype méthylateur à îlots CpG. Ces gènes doivent avoir une augmentation de 3 à 5 fois dans leur fréquence d'événements d'hyperméthylation aberrante [279]. Les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'invasion tumorale, la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, la signalisation cellulaire, la transcription et l'apoptose sont connus pour être hyperméthylés au niveau de leur promoteur et la répression de leur expression est retrouvée dans pratiquement tous les types de tumeurs. Ces gènes ont été d'abord identifiés à l'aide de la méthode « Restriction Landmark Genomic Scanning » pour analyser le statut de méthylation de 1184 îlots CpG à l'aide de 98 échantillons de tumeurs et il a démontré que la méthylation *de novo* des îlots CpG est répandue dans les cellules tumorales. Dans cette étude, l'étendue de la méthylation varie entre les tumeurs individuelles et les types de tumeurs, et une moyenne de 608 îlots sont hyperméthylés [280]. Même si la cause des défauts de méthylation demeure largement inconnue, l'hyperméthylation des îlots CpG est un événement précoce dans la transformation

cellulaire. Des méthodes peuvent détecter l'ADN méthylé, ce qui représente un biomarqueur potentiel excellent pour une détection précoce du cancer [281].

Tableau III : Maladies humaines associées avec une méthylation aberrante

Type de maladie	Localisation chromosome	Phenotype	Gènes ou Régions affectés	Implication de la méthylation de l'ADN
Désordres d'empreinte génomique				
Perte de l'empreinte (LOI)	11p15.5	Surexpression de facteurs de croissance	<i>IGF2</i>	Méthylation <i>de novo</i> des régions contrôles maternelles; perte de la méthylation sur <i>IGF2</i> ; perte de liaison de CTCF
	Plusieurs	Surexpression de facteurs de croissance, diminution de l'expression d'inhibiteurs de croissance	Autres	Perte méthylation allèle-spécifique ou méthylation <i>de novo</i> d'allèle non-méthylées, dosage des gènes aberrant
Syndrome Beckwith-Wiedemann (BWS)	11p15.5	Hypercroissance fœtale et post-natale, hypertrophie des organes, augmentation de risques de tumeurs, anomalies faciales	<i>IGF2</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>H19</i> , <i>ASCL2</i> , <i>KCNQ1</i> , <i>KCNQ1OT1</i>	LOI sur <i>KCNQ1OT1</i> (perte de méthylation maternelle); LOI sur <i>IGF2/H19</i> (méthylation <i>de novo</i> de l'allèle maternelle); Augmentation de l'expression d' <i>IGF2</i> et diminution de l'expression de <i>H19</i> et <i>CDKN1C</i>
Syndrome Prader-Willi (PWS)	15q11.2	Retard mental, obésité, problèmes de comportement	<i>MKRN3</i> , <i>MAGEL2</i> , <i>NDN</i> , <i>SNURF/SNRPN</i> , <i>IPW</i>	LOI sur <i>PWS</i> (méthylation <i>de novo</i> sur allèle paternelle); délétion de régions contrôles d'empreinte; perte d'expression de gènes paternels
Syndrome Angelman (AS)	15q12	Retard mental sévère, problèmes de la parole et de comportement, anomalies faciales	<i>UBE3A</i> , <i>ATPC10C</i>	LOI sur régions contrôles d'empreinte AS (perte de méthylation maternelle); perte d'expression de

				gènes exprimés chez la mère (cerveau)
Ostéodystrophie héréditaire Albright	20q13	Délai développement al, retard mental, obésité	Locus GNAS : <i>NESP55</i> , <i>XLαs</i> , <i>G_sα</i>	Aucun défaut de méthylation mais relié au statut de l'empreinte du locus. Transmission paternelle des mutations dans le gène codant pour <i>G_sα</i>
Pseudohypoparathyroïdisme de type IA (PHP-IA)	20q13	Comme pour AHO et résistance à plusieurs hormones, incluant hormon parathyroïde	Locus GNAS : <i>NESP55</i> , <i>XLαs</i> , <i>G_sα</i>	Aucun défaut de méthylation mais relié au statut de l'empreinte du locus. Transmission maternelle des mutations dans le gène codant pour <i>G_sα</i>
Pseudohypoparathyroïdisme de type IB (PHP-IB)	20q13	Résistance à l'hormone parathyroïde rénale	Locus GNAS : <i>NESP55</i> , <i>XLαs</i> , <i>G_sα</i>	LOI à l'exon IA de la région différenciellement méthylée (perte de méthylation allèle maternelle); LOI <i>NESP55</i> (méthylation <i>de novo</i> maternelle)
Diabète mellitus transitoire néonatal (TNDM)	6q24	Retard de croissance, taux d'insuline faible durant la vie fœtale et l'enfance, diabète de type 2	<i>PLAGL1</i> , <i>PLAGL1-AS</i> , <i>HYMAI</i>	LOI aux régions contrôles d'empreinte dans <i>HYMAI</i> (perte de méthylation maternelle), augmentation de l'expression de <i>PLAGL1</i>
Troubles dans l'instabilité des séquences répétées				
Syndrome du X fragile (FRAXA)	Xq27.3	Retard mental, macroorchidisme, comportement autistique	<i>FMR1</i>	Extension des répétitions CGG dans la région 5'UTR de <i>FMR1</i> via une transmission femelle, méthylation <i>de novo</i> de la région répétée du promoteur de <i>FMR1</i> ; répression du gène

Dystrophie myotonique (DM1)	19q13.2-q13.3	Faiblesse/perte de membres et muscles faciaux, myotonie, cataractes	<i>DMPK, SIX5, autres</i>	Extension des répétitions CTG dans la région UTR de <i>DMPK</i> , transmission maternelle. Méthylation <i>de novo</i> sur l'îlot CpG adjacent les répétitions, dérégulation de CTCF
Dystrophie musculaire facioscapulohumérale (FSHD)	4q35	Faiblesse/perte des muscles de la région facioscapulohumérale	<i>FRG2, FRG1, SLC25A4(ANT1)</i>	Contraction et hypométhylation des répétitions D4Z4 ou répétitions homologues sur 10q ou d'autres gènes
Troubles impliquant la machinerie de la méthylation et du remodelage de la chromatine				
Lupus érythémateux systémique (SLE)	Plusieurs	Rash, douleurs articulaires, glomérulonéphrite, anticorps anti-ADN, défauts des cellules T	Plusieurs, incluant <i>CD11a, CD70</i>	Hypométhylation globale dans les cellules T et activité DNMT réduite. Déméthylation des régions de promoteurs de <i>CD11a</i> et <i>CD70</i> avec augmentation de leur expression. Déméthylation et ré-expression de HERV.
Syndrome ICF	20q11.2	Immunodéficience, instabilité chromosomique, retard développemental	<i>DNMT3B</i>	Mutations dans <i>DNMT3B</i> inactivant partiellement ses fonctions; hypométhylation des répétitions satellites 2 et 3 sur les chromosomes 1, 9 et 16, les gènes sur le chromosome X inactif et d'autres séquences répétées dans le génome, dérégulation de gènes paternels

Syndrome ATRX	Xq13	Retard mental, anomalies génitales, α -thalassemie	<i>ATRX</i>	Mutations dans <i>ATRX</i> codant pour une enzyme du remodelage de la chromatine, hypométhylation et hyperméthylation de certaines répétitions ADNs
---------------	------	---	-------------	---

Tableau III: *ATPC10C* : ATPase, Classe V, type 10A; *ATRX* : alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked; *CDKN1C* : cyclin-dependent kinase inhibitor 1C; *CTCF* : CCCTC-binding factor; *FRG1* : FSHD region gene 1; *FRG2* : FSHD region gene 2; *FMRI* : Fragile X mental retardation 1; *G α* : sous-unité α de la protéine hétérotrimérique liant la protéine G; *HYMAI* : hydatidiform mole associated and imprinted; *IGF2* : insulin-like growth factor 2; IPW : imprinted in Prader-Willi syndrome; *KCNQ1* : potassium voltage-gated channel; *KCNQ1OT1* : *KCNQ1* overlapping transcript 1; *LOI* : loss of imprinting; *MAGEL2* : MAGE-like 2; *MKRN3* : Makorin, ring finger protein 3; *NDN* : necdin homologue; *NESP55* : neuroendocrine secretory protein 55; *PLAG1* : pleiomorphic adenoma gene-like-1; *SLC25A4*, solute carrier family 25 member 4; *SNRPN* : Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N; *SNURF* : SNRPN upstream Reading frame; *UBE3A* : ubiquitin protein ligase E3A; *XLas* : G-protein *XLas*.

3.5 Techniques de détection de la méthylation

Les patrons de méthylation de l'ADN permettent de comprendre pourquoi certaines régions du génome peuvent être exprimées dans des contextes développementaux spécifiques et comment les changements épigénétiques ont déclenché des patrons d'expressions aberrantes à la base de maladies. L'information sur la méthylation de l'ADN est perdue par les techniques de biologie moléculaire standards, notamment le clonage dans les bactéries et le PCR. L'information de méthylation n'est pas révélée non plus par l'hybridation parce que le groupe méthyle est localisé dans la rainure de l'ADN plutôt que dans les ponts hydrogène [282]. Afin de remédier à ces carences, des pré-traitements de l'ADN dépendants de la méthylation ont été développés pour la présence ou l'absence du groupement dans les résidus cytosines. Les techniques basées sur ces pré-traitements étaient initialement restreintes à de petites régions du génome, mais depuis, plusieurs techniques ont émergées et peuvent analyser le profil de méthylation sur une échelle globale du génome.

Même si l'incursion initiale dans le profil de méthylation de l'ADN a été faite avec des gels électrophorèse à deux dimensions, l'ère de l'épigénomique a vraiment pris son envol avec les adaptations des techniques d'hybridations sur micro-matrices pour l'expression des gènes et des domaines génomiques, les modifications des histones et

des patrons de méthylation de l'ADN [283-290]. Présentement, la révolution dans les technologies de séquençage a récemment ouvert des portes sur l'analyse de la méthylation du génome entier [291-293].

Il existe trois approches principales d'analyse de la méthylation : la digestion par endonucléases, l'enrichissement par affinité et la conversion par le bisulfite. Suite au traitement de l'ADN génomique par une de ces étapes dépendantes de la méthylation, des techniques de biologie moléculaire, incluant l'hybridation par sonde et le séquençage, peuvent être utilisées pour révéler la localisation de résidus 5^mC. La combinaison de différents pré-traitements suivis de différentes étapes analytiques a révélé une abondance de techniques pour déterminer les patrons et les profils de méthylation [281, 292, 294-303].

Digestion par endonucléases

L'origine de cette technique est basée sur le fait que chaque enzyme de restriction spécifique à une séquence est accompagnée d'une méthyltransférase dans le site de reconnaissance par ces endonucléases. Certaines enzymes de restriction sont inhibées par une 5^mC dans le contexte d'une séquence CpG. Ainsi, les patrons de clivage par de telles enzymes peuvent fournir une lecture de la méthylation de l'ADN. Les enzymes de restriction sensibles à la méthylation les plus utilisées pour étudier la méthylation de l'ADN sont HpaII et SmaI, en partie parce qu'elles ont chacune un isoschizomère (MspI pour HpaII) ou un néoschizomère (XmaI pour SmaI) qui ne sont pas inhibés ou sensibles à la méthylation. La digestion par enzymes de restriction sensible à la méthylation suivie d'une amplification par PCR du site de restriction est une technique encore utilisée. Toutefois, elle est très enclin à de résultats faux-positifs causés par une digestion incomplète pour des raisons autres que la méthylation de l'ADN [282].

Enrichissement par affinité

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) suivie d'une hybridation sur micro-matrices (ChIP-chip) ou par un séquençage (ChIP-seq) sont des techniques utiles pour étudier le génome entier et la modification des histones [214, 304-308]. De façon similaire, l'enrichissement par affinité des régions méthylées en utilisant un anticorps

spécifique à 5^{me}C (dans un contexte d'ADN dénaturé) ou en utilisant des protéines de liaison aux groupements méthyles avec une affinité pour l'ADN génomique naissant méthylé, sont des outils fort utiles pour comprendre les mécanismes de la méthylation dans les génomes complexes. La purification par affinité de l'ADN méthylé a d'abord été démontrée avec la protéine de liaison aux groupements méthyles MeCP2. L'enrichissement des régions méthylées par immunoprécipitation de l'ADN génomique dénaturé avec un anticorps spécifique aux cytosines méthylées [309], suivi d'une hybridation sur micro-matrices ont été des techniques très utilisées pour explorer le méthylome des plantes [310, 311], de la souris [309, 312-314] et l'humain [315-317]. Les méthodes basées sur l'affinité permettent une évaluation efficace du génome mais sont limitées pour évaluer l'information d'un seul dinucléotide CpG et requiert des ajustements expérimentaux et bioinformatiques substantiels quant à la densité variable des CpG dans les différentes régions du génome.

Conversion au bisulfite

La découverte que traiter et dénaturer l'ADN avec du bisulfite de sodium pouvait chimiquement désaminer les résidus cytosines non méthylés beaucoup plus rapidement que les 5^{me}C [318, 319] a entraîné une révolution dans l'analyse de la méthylation de l'ADN dans les années 90 [320, 321]. Ce traitement chimique de l'ADN a effectivement converti une différence épigénétique en différence génétique. Les C non-méthylés sont converties en T (uracile), ce qui permet de dériver de nombreuses techniques d'analyses et de détection de la méthylation de l'ADN [281, 294, 296-298, 322]. L'analyse par conversion au bisulfite a d'abord été réalisée par séquençage Sanger de produits PCR clonés provenant de loci individuels [320, 323]. Plusieurs adaptations et avancées ont été développées incluant le séquençage Sanger direct de produits PCR [321] et l'application hautement automatisée de cette approche [324]. Un résumé des différentes techniques se trouve dans le **Tableau IV**.

Tableau IV : Principes majeurs d'analyse de la méthylation de l'ADN

Pré-traitement	Étape analytique			
	Analyse locus-spécifique	Analyse par gel	Analyse par array	Analyse nouvelle génération du séquençage
Digestion par endonucléases	• HpaII	• Southern blot • RLGS • MS-AP-PCR • AIMS	• DMH • MCAM • MethylScope • CHARM • Mmass	• Methyl-seq • MCA-seq • HELP-seq • MSCC
Enrichissement par affinité	• MeDIP-PCR		• MeDIP • mDIP • mCIP • MIRA	• MeDIP-seq • MIRA-seq
Conversion bisulfite	• MethylLight • EpiTYPER • Pyroséquençage	• Sanger BS • MSP • MS-SNuPE • COBRA	• BiMP • GoldenGate • Infinium	• RRBS • BC-seq • BSPP • WGSBS

Tableau IV : AIMS : amplification of inter-methylated sites; BC-seq : bisulphite conversion followed by capture and sequencing; BiMP : bisulphite methylation profiling; BS : bisulphite sequencing; BSPP : bisulphite padlock probes; CHARM : comprehensive high-throughput arrays for relative methylation; COBRA : combined bisulphite restriction analysis; DMH : differential methylation hybridization; HELP : HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR; MCA : methylated CpG island amplification; MCAM : MCA with microarray hybridization; MeDIP, mDIP, mCIP : methylated DNA immunoprecipitation; MIRA : methylated CpG Island recovery assay; Mmass : microarray-based methylation assessment of single samples; MS-AP-PCR : methylation-sensitive arbitrarily primed PCR ; MSCC : methylation-sensitive cut counting; MSP : methylation-specific PCR; MS-SNuPE : methylation-sensitive single nucleotide primer extension; RLGS : restriction Landmark genome scanning; RRBS : reduced representation bisulphite sequencing; -seq : suivi d'un séquençage; WGSBS : whole-genome shotgun bisulphite sequencing.

3.6 Les rôles de la méthylation dans la régulation des MMP

Dans notre laboratoire, une corrélation inverse a été établie entre la méthylation du promoteur MMP-9 et son niveau d'expression dans les lymphomes murins. En effet, le statut de méthylation du promoteur MMP-9 a été comparé entre une lignée de lymphome thymique non agressive parentale 164T2 et sa contrepartie hautement métastatique S19. Les résultats démontrent qu'une hypométhylation est observée dans les cellules S19 près des sites de liaison de facteurs de transcription régulant positivement MMP-9. Cette hypométhylation s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'activité MMP-9 [325]. Outre les résultats obtenus dans notre laboratoire notamment sur l'augmentation de l'expression induite par l'hypométhylation de MMP-3 dans les cellules de cancer du colon HCT116 et de MMP-10 dans les

lymphomes B humains [326], peu de recherches ont été entreprises concernant la régulation des MMP par la méthylation de l'ADN. Shukeir et ses collègues ont testé l'hypothèse que l'invasion des cellules tumorales et la tumorigenèse sont dirigées par l'hypométhylation de gènes impliqués dans la progression tumorale, notamment MMP-2. Ils ont traité la lignée cellulaire hautement invasive du cancer de la prostate PC-3 avec le donneur méthyle SAM ou des oligonucléotides anti-sens pour MBD2. Ces deux traitements ont permis de diminuer l'expression de MMP-2 ainsi que le volume des tumeurs *in vivo*. Les analyses par séquençage suite au traitement au bisulfite ont ensuite révélé que le promoteur MMP-2 devenait méthylé suite aux traitements avec SAM ou MBD2-antisens. Ces études permettent donc d'appuyer l'hypothèse que l'hypométhylation peut contrôler l'activation de certains gènes promoteurs de tumeurs [327].

À l'inverse, une glycoprotéine régulant négativement les MMP, RECK (reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs), pourrait agir comme gène suppresseur de tumeurs. Une équipe de recherche a analysé le statut de méthylation du promoteur de RECK dans des tissus provenant de patients atteints de cancer du poumon. Par la méthode de PCR spécifique à la méthylation, les résultats démontrent que l'expression de RECK corrèle avec une hypométhylation du promoteur. Ils ont également établi une corrélation entre le niveau d'agressivité du cancer et l'hyperméthylation du promoteur de RECK [328]. Plusieurs études démontrent également que la méthylation du promoteur de TIMP-3 est une caractéristique de nombreux types de cancers [329-336].

Dans l'ostéoarthrite, les chondrocytes expriment des niveaux plus élevés de MMP-3, -9 et -13. Roach et ses collègues ont analysé le statut de méthylation des promoteurs de ces MMP dans des échantillons de cartilage de patients atteints d'ostéoarthrite. Leurs études permettent de démontrer que l'augmentation de l'activité des MMP peuvent provenir de changements épigénétiques dans le promoteur de ces enzymes puisque des régions spécifiques étaient déméthylées dans les promoteurs de MMP-3, -9, -13 et ADAMTS-4 chez les patients atteints d'ostéoarthrite avancée comparativement aux tissus normaux [337].

D'autre part, Sato et ses collègues ont démontré, par PCR spécifique à la méthylation, que les promoteurs de *MMP-2*, *-7* et *-9* sont hypométhylés dans des cellules tumorales hautement invasives alors que dans les cellules de cancer pancréatiques moins métastatiques, les promoteurs de ces MMP sont complètement ou partiellement méthylés. Les chercheurs ont également établis une corrélation entre les niveaux d'expression des gènes et le statut de méthylation de leur promoteur [338].

Outre la méthylation de l'ADN, d'autres mécanismes épigénétiques peuvent réguler l'expression des MMP. Par exemple, Pender et son équipe de recherche ont démontré que des inhibiteurs d'histones déacétylases peuvent augmenter l'expression de *MMP-3* induite par *IL-1 β* ou *TNF- α* [339]. Les mêmes inhibiteurs peuvent aussi diminuer l'expression de *MMP-1* et *-9* induite par les mêmes cytokines. Par ailleurs, des inhibiteurs HDAC ont été également testés dans les cellules de souris NIH 3T3 ainsi que dans les fibrosarcomes humains et peuvent diminuer l'expression de *MMP-2* [340, 341]. Au niveau des changements dans la structure de la chromatine, Yan et ses collègues ont démontré que le gène *MTA1* associé à la métastase et composante du complexe répresseur NuRD, se lie à une région spécifique du promoteur *MMP-9*, recrute HDAC2 et par le fait même, diminue l'expression de *MMP-9* [342]. D'autres études démontrent une régulation de plusieurs MMP via l'acétylation des histones et le remodelage de la chromatine [343-347]. Finalement, certains facteurs de transcription régulant l'expression des MMP, sont aussi sujets à la régulation par les niveaux d'acétylation, notamment Sp1, Sp3 et la famille ETS [348-351].

3.7 Mode d'action des agents déméthylants, inflammation, sénescence et réparation de l'ADN

Il y a plus de 40 ans, les analogues de pyrimidine 5-azacytidine (azacytidine, Vidaza) et 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine, Dacogen) ont été développés comme agents cytostatiques classiques [352, 353]. Ultérieurement, il a été démontré que ces composés inhibaient la méthylation de l'ADN dans des lignées cellulaires humaines, permettant ainsi d'apporter une explication mécanistique de leur activité [354]. Ces observations ont ensuite initié le développement d'agents thérapeutiques de nature épigénétiques. Après certains réajustements dans le dosage en essais cliniques, l'azacytidine et la decitabine démontrent maintenant des bénéfices cliniques significatifs

dans le traitement du syndrome myélodysplasique (MDS), une maladie de nature pré-leucémique localisée dans la moelle osseuse [355, 356]. Par conséquent, ces agents pharmacologiques ont maintenant reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement du MDS. Des efforts substantiels sont également en route pour identifier et développer des nouveaux inhibiteurs de méthyltransférases de l'ADN [357, 358]. Toutefois, les composés présentement disponibles ont des effets de réactivation de gènes plus faibles que les deux originaux [359, 360].

De façon surprenante, malgré l'intérêt qu'apportent l'azacytidine et la decitabine, on en connaît très peu sur le mode d'action moléculaire de ces agents. Il est clair que les analogues de nucléosides ont des effets cytotoxiques et qu'ils peuvent causer une déméthylation de l'ADN, mais leurs réponses cliniques respectives n'ont pas encore été établies [361]. L'idée sous-jacente aux thérapies par déméthylation serait reliée à la capacité des inhibiteurs de méthyltransférases de l'ADN à contrer la répression génique des gènes hyperméthylés [362]. Ces gènes hyperméthylés cibles, codent surtout pour des suppresseurs de tumeurs ou d'autres gènes reliés au développement du cancer et qui jouent des rôles importants dans la tumorigenèse [363]. La réversion de ces mutations épigénétiques peut aussi restaurer le contrôle de la prolifération et la sensibilité à l'apoptose et l'identification de ces événements chez les patients en thérapie par déméthylation est particulièrement difficile. La plupart des études dans ce contexte sont concentrées sur le gène suppresseur de tumeur *p15*, connu pour être hyperméthylé dans les MDS et les leucémies myéloïdes aiguës. Ce gène peut être réactivé dans les thérapies par la décitabine [203]. Des observations similaires ont été rapportées dans d'autres études cliniques avec l'azacytidine mais le lien entre la déméthylation/réactivation de *p15* et les réponses cliniques n'a pu être confirmé [222]. Donc, l'identification de gènes hyperméthylés qui deviennent déméthylés et réactivés par le traitement ainsi que l'établissement d'association statistiquement significatives entre les événements de réactivation épigénétique et les réponses des patients devraient être des critères importants d'évaluations futures.

Les analogues de pyrimidines sont considérés comme des produits instables en laboratoire et en clinique. En solution alcaline, les azanucléosides créent

une ouverture rapide de l'anneau 5-azacytosine suivie d'une décomposition irréversible [364, 365]. De plus, plusieurs données ont été rapportées sur les effets suite à la métabolisation de l'azacytidine et la 5-aza-dC (5-aza-2'-deoxycytidine). Les deux produits démontrent une distribution étendue dans les fluides corporels dans les modèles animaux [366]. Quoiqu'il en soit, les composés sont rapidement éliminés de la circulation systémique et cette élimination dépasse le taux de filtration glomérulaire et le flux sanguin rénal total, suggérant un rôle dans d'une élimination provenant d'une autre source que le rein. Dans ce contexte, il a été proposé que la désamination par la cytidine déaminase dans le foie humain et la rate pourrait être une voie empruntée pour éliminer les agents pharmacologiques [367].

Une fois que les analogues de nucléosides sont métabolisés en 5-aza-2'-deoxycytidine-triphosphate, ils deviennent des substrats pour la machinerie de la réplication de l'ADN et seront incorporés dans l'ADN où l'azacytosine sera un substitut de la cytosine. Le dinucléotide azacytosine-guanine est reconnu par les méthyltransférases de l'ADN et l'enzyme peut initier la réaction de méthylation par attaque nucléophile. L'établissement d'un lien covalent entre le carbone 6 dans l'anneau cytosine et l'enzyme sera ainsi créé [368, 369]. De cette façon, l'enzyme reste liée à l'ADN et ses fonctions de méthylation sont bloquées. Une étude démontre également que l'agent déméthylant induit une dégradation protéosomale spécifique de l'enzyme [370]. Ces études suggèrent la possibilité que des voies additionnelles, autres que l'inhibition de l'enzyme proprement dite, peut également contribuer à la déméthylation induite par l'azanucléoside. Il est également intéressant de noter qu'une récente étude a permis d'éclaircir certaines informations à l'effet que la réponse au dommage à l'ADN est induite par la décitabine [371]. Il a été démontré que la décitabine cause la formation de cassures double-brin dans les lignées de cancers humains et que DNMT1 pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse cellulaire au dommage à l'ADN. L'induction de dommage par la décitabine, combiné avec un rôle de DNMT1 dans la réparation de l'ADN [372] indiquent que les patrons de déméthylation induits par ce médicament pourraient être influencés par des mécanismes de réparation de l'ADN.

Les cytokines inflammatoires sont également connues pour induire la réponse aux dommages à l'ADN, en particulier durant le processus de sénescence

cellulaire [373]. L'inflammation chronique est d'ailleurs associée au vieillissement et joue un rôle important dans plusieurs maladies comme le cancer, l'athérosclérose et l'ostéoarthrite [374]. Nous savons que les signes externes de l'inflammation sont causés par la dilatation des vaisseaux sanguins et l'action des phagocytes au site d'une blessure. Les phagocytes en retour, produisent des facteurs pro-inflammatoires comme des cytokines et des chémokines dans le but d'attirer les leucocytes qui pourront se débarrasser des organismes ou particules étrangers. Normalement, cette réponse inflammatoire cesse après quelques jours ou quelques heures. Une fois que les corps étrangers sont éliminés, la réparation des tissus peut commencer. Ce type d'inflammation est appelée inflammation aiguë [373]. L'inflammation chronique, quant à elle, est définie par la présence continue et élevée de facteurs pro-inflammatoires. Les tissus enflammés sont caractérisés par la présence de lymphocytes infiltrants et de macrophages, d'angiogenèse, de fibrose et souvent, de tissus nécrotiques [375, 376]. Ce type d'inflammation est associée au vieillissement et à divers processus pathologiques mais elle contribue aussi à garder une présence continue de facteurs pro-inflammatoires et éventuellement causer l'immunosénescence [377]. En plus de causer l'immunosénescence, certains facteurs pro-inflammatoires peuvent dégrader les tissus du micro-environnement. Par exemple, MMP-3 produite par les cellules sénescents, détruit la morphogénèse des cellules épithéliales mammaires [378]. L'inflammation chronique peut également perturber la fonction des cellules souches directement par les médiateurs inflammatoires induisant la différenciation [379-383], mais aussi indirectement parce que les protéases et l'activité destructrice des cellules immunitaires peuvent détruire les niches des cellules souches [379]. Ces effets peuvent être spécifiques aux tissus ou aux cellules. Par exemple, la présence de cellules souches dans le cancer du sein serait maintenue par une réponse rétro-active dont l'IL-6 est une composante critique [384].

Même si le système immunitaire joue un rôle majeur dans la modulation des niveaux des facteurs pro- et anti-inflammatoires, il n'est pas le seul modulateur de ces facteurs. De récentes évidences dans les cellules épithéliales et les fibroblastes démontrent que la sénescence cellulaire est accompagnée par une multitude d'autres facteurs qui participent dans la signalisation intercellulaire [385-387]. Parmi ces facteurs, on trouve MMP-3, -10 et -1, IL-1 α et β , IL-6, IL-8, ICAM-1 et TIMP-2 [385,

388, 389]. Ces facteurs « participants » sont maintenant nommés protéines du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) [385]. La sénescence est un stade irréversible d'arrêt prolifératif causé par des stress qui peuvent être potentiellement oncogéniques. Un peu comme l'apoptose, la sénescence peut être induite par une grande variété de stimuli incluant un dommage à l'ADN, l'expression de certains oncogènes, le stress oxydatif et les signaux mitogènes [377, 390-393]. Toutefois, contrairement à l'apoptose, les cellules sénescents restent métaboliquement actives et vont entreprendre des changements dans l'expression des gènes incluant les gènes SASP [394].

Les protéines SASP peuvent avoir des effets bénéfiques mais aussi dévastateurs si elles ne sont pas contrôlées. Les cellules sénescents peuvent perturber la structure des tissus normaux et la fonction des glandes mammaires dans les cellules en culture [378], accélérer l'invasion des cellules transformées (essai chambre Boyden) via la transition endothélial-mésenchymal [385], stimuler l'invasion des cellules endothéliales (essai chambre Boyden) et l'angiogenèse dans un modèle de xénogreffe [395] et promouvoir la prolifération des cellules épithéliales malignes dans les cellules en culture et *in vivo* [396, 397]. De plus, les cellules endothéliales sénescents et les fibroblastes sont souvent trouvées adjacentes aux tumeurs malignes chez l'humain [398, 399], et les cellules tumorales peuvent elles-mêmes entrer en sénescence *in vivo* chez les patients traités par des agents chimiothérapeutiques endommageant l'ADN ou chez les souris forcées d'exprimer le suppresseur de tumeur p53 [385, 400].

Il semble que la réponse des SASP soit induite par un stress génotoxique plutôt qu'un arrêt de la prolifération (i.e : les inducteurs génotoxiques comme les radiations ionisantes, l'hyperprolifération causée par un oncogène ou des télomères dysfonctionnels) [385, 401]. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et d'autres protéines de DDR sont requises pour l'expression des facteurs SASP, incluant les cytokines inflammatoires [401]. La DDR est une cascade d'amplification de signaux qui détecte le dommage, induit l'arrêt du cycle cellulaire et initie la machinerie de réparation de l'ADN. Si ce dommage est trop grave, les cellules engageront l'apoptose ou la sénescence, dépendamment du type cellulaire et/ou de la gravité du dommage. Dans le cas d'une sénescence, il y a arrêt de la croissance cellulaire et maintien de signalisation DDR chronique [402]. La réponse DDR n'est pas le seul régulateur de la voie SASP

puisque cette réponse est activée immédiatement après un dommage. Or, la voie SASP se développe lentement, généralement après plusieurs jours suivant le stress génotoxique [385, 401]. La voie p38MAPK a été suggérée comme étant un régulateur accessoire de SASP. Par exemple, il a été démontré que l'inhibition de p38MAPK réduit l'expression de l'IL-8 dans les cellules en sénescence [403] et qu'une activation constitutive de p38MAPK est suffisante pour induire l'arrêt de croissance par sénescence via l'activation de p53 et p16 [404-406].

Même si les SASP sont régulées partiellement par l'activation des facteurs de transcription, le profil d'expression global des gènes acquis à la sénescence entraîne probablement des changements dans la conformation de la chromatine, qui est caractéristique des cellules en sénescence [407-410]. Consistant avec ce concept, plusieurs gènes codant pour les protéines SASP sont physiquement regroupés dans les loci des génomes humain et de souris. Parmi ces groupes de gènes, on compte les gènes MMP (MMP-1, -3, -10 et -12 notamment) ou les membres de la famille de cytokines CXCL et CCL. Ces loci ont la taille d'environ un tour de chromatine, ce qui constitue une unité d'organisation importante de la chromatine et de contrôle transcriptionnel [411].

OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE LA THÈSE

L'objectif général de mon projet de doctorat consistait à étudier la régulation épigénétique du promoteur humain MMP-3.

- Une première évaluation a été réalisée grâce à des constructions plasmidiques de promoteurs MMP-3 (une construction de la région proximale complète et d'autres constructions mutées sur des sites de liaison pour des facteurs de transcription). Avec ces constructions, il a été possible d'abord de confirmer l'importance de certains facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de MMP-3. Ces confirmations ont, par le fait même, permis de valider l'efficacité des promoteurs. Finalement, ces constructions ont permis d'évaluer d'autres facteurs de transcription moins bien connus dans la régulation de la transcription de *MMP-3*.
- À l'aide d'inhibiteur de la méthylation, principalement la 5-aza-2'-déoxycytidine, un 2^{icme} objectif fut d'évaluer la méthylation dans la régulation de l'expression transcriptionnelle de *MMP-3*. La lignée de carcinomes du colon humain HCT116 a servi de modèle d'étude principal pour l'étude de la méthylation sur MMP-3 et la lignée HCT116, où deux DNMT ont été délétées (DKO), a servi de contrôle d'hypométhylation.
- Des inducteurs majeurs de MMP, les cytokines inflammatoires ont, également été étudiées dans la régulation de la transcription de *MMP-3*.
- Finalement, nous avons évalué l'impact d'une hypométhylation avec les facteurs de transcription et les cytokines inflammatoires sur l'expression transcriptionnelle de *MMP-3*.

CHAPITRE II

RÉSUMÉ DU CHAPITRE II

L'hypométhylation globale du génome est un mécanisme critique sous-jacent à la transformation néoplasique. Des gènes réprimés dans les tissus normaux ou dans des types cellulaires spécifiques peuvent s'exprimer de façon aberrante dans différents cancers. Pour déterminer si la méthylation de l'ADN peut moduler l'expression des métalloprotéases de la matrice (MMP), nous avons utilisé une lignée cellulaire génétiquement modifiée dans laquelle les gènes codant pour deux méthyltransférases clés de l'ADN, *Dnmt1* et *Dnmt3b*, ont été enlevés par recombinaison homologue. Nos résultats démontrent que dans les cellules déficientes pour les deux méthyltransférases, l'expression *de novo* de *mmp-3* est induite, mais pas celle de *mmp-1* et *mmp-2*. Un traitement avec les inhibiteurs de méthylation 5'-aza-2 deoxycytidine et zébularine sur les cellules de type sauvage induit également l'expression du gène *mmp-3*. Inversement, la méthylation *in vitro* du promoteur *mmp-3* a permis d'inhiber son activité transcriptionnelle. Finalement, nous avons pu démontrer que l'induction de l'expression des gènes *mmp-3* et *mmp-10* par l'hypométhylation est spécifique au type cellulaire, suggérant que les changements épigénétiques peuvent prédisposer les cellules à exprimer les gènes de stromélysines.

Dans ce chapitre traitant de la régulation de l'expression de MMP-3 par la méthylation, j'ai effectué toutes les expériences à l'exception de l'analyse du méthylome du modèle cellulaire HCT116/DKO ainsi que l'analyse d'incorporation de cytosines méthylées dans ce même modèle cellulaire. Ces deux séries d'expériences ont été réalisées par Geneviève Lavoie, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr. Yves St-Pierre. J'ai effectué la rédaction du manuscrit sous la supervision du Dr. Yves St-Pierre. Note : Dans la figure 1B la légende à la page 62 est inversée. Le losange vide représente les cellules DKO et le carré plein représente les comptes pour les cellules HCT116.

The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression ☆

Julie Couillard, Mélanie Demers, Geneviève Lavoie, Yves St-Pierre *

Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Que., Canada H7V 1B7

Received 17 January 2006

Available online 21 February 2006

Abstract

Genome-wide DNA hypomethylation is a critical mechanism underlying neoplastic transformation. Thus, genes that are suppressed in normal tissues or in specific cell types may become aberrantly expressed in neoplasia. To determine whether DNA methylation can modulate matrix metalloproteinase (mmp) gene expression, we have used a genetically engineered cell line in which both key DNA methyltransferase genes, *Dnmt-1* and *Dnmt-3b*, were removed by homologous recombination. We found that cells bearing a dual knock-out of both *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* genes induced de novo expression of *mmp-3* gene, but not that of *mmp-1* and *mmp-2*. Furthermore, treatment of the wild-type cells with DNA methylase inhibitors 5-aza-dC and zebularine also induced *mmp-3* gene expression. On the other hand, in vitro methylation of the *mmp-3* promoter suppressed its transcriptional activity. Finally, we found that induction of *mmp-3* and *mmp-10* gene expression by hypomethylation was cell-specific, suggesting that epigenetic changes may predispose cells to express stromelysin genes.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Matrix metalloproteinase; DNA methylation; Colon carcinoma; Lymphoma; Transcription; 5-Aza-2'-deoxycytidine; Zebularine; Gene transcription; Cancer biology

Matrix metalloproteinases (MMPs) play a significant role in the disruption of cell and tissue homeostasis induced by faulty signals from the microenvironment during tumorigenesis. MMPs constitute a family of structurally related proteases that contain a zinc ion at the active site of catalysis [1]. Collectively, they can process or degrade all components of the extracellular matrix (ECM). MMPs also have the capacity to cleave a number of adhesion receptors and inflammation mediators, thereby conferring a new dimension to their participation in neoplastic progression [2]. One class of MMPs, stromelysins, are distinct by virtue of their close sequence similarity to one another. Indeed, MMP-3 (stromelysin-1) and MMP-10 (stromelysin-2) are

closely homologous in their amino acid sequence, structure, and substrate specificity. Both of these enzymes cleave a number of substrates in the ECM, such as the proteoglycans, laminin, fibronectin, and collagen type IV. The most significant difference between MMP-3 and MMP-10 resides in their differential patterns of expression by normal and transformed cells [3–5]. Whereas MMP-3 is considered a stromal enzyme, MMP-10 is often expressed by tumor cells. For instance, we have recently found in T cell lymphoma that MMP-10, but not MMP-3, was upregulated upon exposure to IL-10 [6].

Normally, MMPs are considered to be inducible genes, whose expression is transient upon exposure to external stimuli. In cancer, however, tumoral and peritumoral cells constitutively express high levels of MMPs, indicating that additional mechanism(s) are involved in the regulation of MMP gene expression. Epigenetic mechanisms are mostly involved in the propagation of tissue-specific methylation patterns established during mammalian development.

☆ Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinase; DKO, dual knock-out; ECM, extracellular matrix; DNMT, DNA methyl transferase; TNF- α , tumor necrosis-alpha.

* Corresponding author. Fax: +1 450 686 5501.

E-mail address: yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca (Y. St-Pierre).

This occurs by controlling gene transcription via a process known as *gene silencing*. Methylation is usually associated with gene silencing. However, in many types of human cancer, reduction in the level of cytosine DNA methylation is believed to contribute to neoplastic progression [7–9]. In fact, hypomethylation was the first epigenetic abnormality to be identified in cancer cells. DNA hypomethylation has been observed at different stages of numerous types of cancer, including colon carcinomas and leukemia [7,10–12]. In colorectal carcinogenesis, inadequate maintenance of CpG dinucleotide methylation patterns seems to result from a progressive dysregulation of DNA methyl transferase (DNMT)-1 expression [13]. The mechanism by which DNA hypomethylation contributes to cancer progression nonetheless remains unclear.

Recently, Vogelstein's group has developed a cell system with genetically engineered *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* double-deficient HCT116 [14]. DNMT-1 and DNMT-3b cooperatively maintain virtually all methylation in HCT116 cells. Consequently, the DNA methyltransferase activity in the DKO cells is almost completely eliminated, resulting in significant constitutive genomic instability manifested by chromosomal translocations [15]. In the present work, we have used this model system to study the effect of epigenetic mechanisms on MMP expression.

Experimental procedures

Cell lines and reagents. The HEK 293A and the human A172 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle complete medium (DMEM) [supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine, 10 mmol/L Hepes buffer, 0.1 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin]. HCT116 parental and knock-out colon cancer cell lines (dual-knock out cells, DKO) were a generous gift from Dr. Bert Vogelstein (Sidney Kimmel Cancer Center, Johns Hopkins University Medical Institutions, Baltimore, Maryland). DKO passage number indicates the number of cellular passages following genetic knockout. Cells were grown in McCoy's 5A complete medium. The human Burkitt lymphoma Raji and Ramos cell lines were obtained from the ATCC and maintained in RPMI 1640 complete medium supplemented with 55 µmol/L of β-mercaptoethanol. All cell culture products were from Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). Zebularine was purchased from EMD Biosciences (Darmstadt, Germany). All other reagents were purchased from Sigma chemicals (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

Methyl acceptance assay. Genomic DNA was isolated from HCT116 and DKO cells using a genomic DNA purification kit (Invitrogen) and the indicated amount of DNA was incubated with 1 µCi of [methyl-³H]S-adenosyl-L-methionine (AdoMet; specific activity: 15 Ci/mmol; Amersham

Biosciences) and 5 U of SssI methylase (New England Biolabs, Mississauga, Ontario) in SssI assay buffer at 37 °C for 1 h. Samples were subsequently applied on DE-81 filters, washed, dried, and processed for scintillation counting.

Methylation analysis of genomic DNA. Genomic DNA was digested with the restriction enzymes *HpaII* or *MspI* (New England Biolabs) and separated by electrophoresis in 1% agarose gel. The nonspecific degradation of the DNA was controlled by incubating each sample without restriction enzyme.

RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from lymphoma cells and colorectal cancer cells using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Burlington, Ontario, Canada). Two micrograms of total RNA was reverse-transcribed using the Omniscript™ reverse transcriptase (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and PCR-amplified using the following conditions: 94 °C for 0.5 min, 58 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. This was followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. Thirty-five cycles of amplification were done in a thermal cycler (model PTC-100, MJ Research, Watertown, MA). PCR assays using equal amounts of RNAs that were reverse-transcribed and amplified by PCR for 25–40 cycles with gene-specific primers (Table 1) confirmed that the amplification was in the linear range for each gene. As an internal control, amplification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was carried out by RT-PCR using specific primers. Amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels using ethidium bromide staining and UV illumination.

In vitro DNA methylation. The reporter vector pGL3-MMP-3wt encoding the wild-type *mmp-3* promoter (−866/+11) was methylated at 37 °C overnight with 3 U/µg of the recombinant SssI CpG methylase (New England Biolabs, Mississauga, ON) which methylates the CpG dinucleotides in both strands in the presence of 160 µM S-adenosylmethionine. One aliquot (control) was incubated in the same conditions without the SssI CpG methylase. Complete methylation of the fragments was confirmed by the resulting resistance to cleavage by the methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII* (New England Biolabs) (2 µl of methylated and non-methylated vectors was digested with *HpaII*). The reporter was then digested with *SacI* and *HindIII* (New England Biolabs), and the promoter region was gel-purified. Methylated or unmethylated control promoter fragments were religated at an equimolar concentration in the original pGL3 basic vector digested *SacI* and *HindIII*.

Transient transfection and luciferase assay. 293A and HCT116 cells were seeded the day before transfection into a six-well plate at a concentration of 8×10^5 or 4×10^5 cells per well, respectively. Cells were then washed twice with PBS and transfected with 0.5–1.0 µg DNA using LipofectAMINE 2000 according to manufacturer's protocol (Life Technologies). The culture medium was changed to complete DMEM or McCoy's medium 6 h after transfection for 48 h. In the case of Raji cells, transient transfection was carried out by electroporation (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories) using the following conditions: 20 µg of DNA per 10^7 cells in electroporation medium, pH 7.6 (120 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM Hepes, 2 mM MgCl₂); 960 µF; 400 V. Transfection efficiency was monitored by co-transfection with 0.5 µg of the pCMV/β-gal plasmid encoding for β-galactosidase (Promega). Forty-eight hours post-transfection, luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System protocol (Promega) and a luminometer (Lumat LB 9507,

Table 1
Gene-specific primers used for semi-quantitative RT-PCR

Human gene	Sense primer	Antisense primer
MMP-1	5'-aga tgt gga gtg cct gat gt-3'	5'-agc tag ggt aca tca-3'
MMP-2	5'-cac tga ggg ccg cac gga t-3'	5'-ctt gat gtc atc ctg gga ca-3'
MMP-3	5'-aga ggt gac tcc act cac at-3'	5'-ggt ctg tga gtg agt gat ag-3'
MMP-9	5'-caa cat cac cta ttg gat cc-3'	5'-cgg gtg tag agt ctc tgg ct-3'
MMP-10	5'-acc tgg gct tta tgg aga tat tc-3'	5'-atc ttg cga aag gcg gaa ct-3'
TIMP-3	5'-ctt ctg caa ctc cga cat cgt g-3'	5'-tgc cgg atg cag gcg gat tgt tt-3'
GAPDH	5'-cgg agt caa cgg att tgg tgg tat-3'	5'-cag aag tgg tgg tac ctc ttc cga-3'

Berthold). The β -galactosidase activity was detected by a colorimetric enzyme assay using *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as a substrate. The ratio of luciferase activity to β -gal activity in each sample served as a measure of normalized luciferase activity.

Results

Genetic ablation of *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* in HCT116 cells induced the expression of *mmp-3*

The generation of somatic cell knock-outs for *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* through homologous recombination is a powerful tool for unmasking the importance of DNA methylation in cancer [16]. Before using this model system to unmask the role of hypomethylation on the expression

of *mmp* genes, we first validated the model in our culture condition and determined the hypomethylation status of the DKO cells compared to that of the HCT116 parental cells (Figs. 1A and B). Moreover, we also established the effect of the genome-wide DNA hypomethylation induced by genetic ablation of *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* genes on the expression of *Timp-3*, a gene known to be under the control of DNA methylation [14] (Fig. 1C).

Using this model system, we then found that DKO cells constitutively expressed the *mmp-3* gene while the wild-type HCT116 parental cells did not express it (Fig. 2A). The expression of MMP-3 was observed in DKO cells harvested at different passage numbers (passages 8 and 28) after genetic ablation. No such increase was observed in the case of *mmp-1* and *mmp-2* genes (Fig. 2B). Genetic ablation of *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* in HCT116 cells also induced de novo expression of *mmp-9*, a result which is consistent with previous studies by Sato et al. [17] and our group [18] showing that treatment of transformed pancreatic cell lines and lymphoma cells with DNA methyltransferase inhibitors induced the expression of MMP-9. These results show that DNA methylation is an important driving force for the control of *mmp* gene expression.

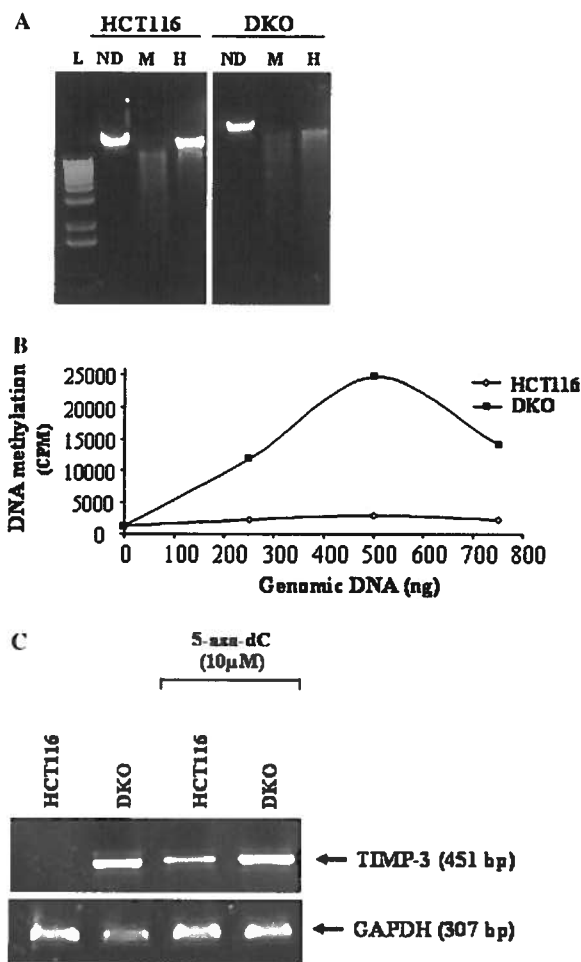


Fig. 1. The HCT116/DKO colon carcinoma model system. (A) Methylation analysis of chromosomal DNA from HCT116 and DKO cells. Genomic DNA was incubated without enzymes (ND) or digested with *MspI* (M) or *HpaII* (H), fractionated with electrophoresis on 1% agarose gel, and visualized by ethidium bromide staining. Molecular weight (MW) was 1 kb DNA ladder. (B) Incorporation of methyl cytosines in genomic DNA isolated from HCT116 and DKO cells showing the hypomethylation state of the DKO cells. (C) Effect of hypomethylation on the mRNA expression of *Timp-3*. Expression of *Timp-3* was determined by RT-PCR analysis of RNA. GAPDH was used as loading and specificity control. Data are representative of at least two independent experiments.

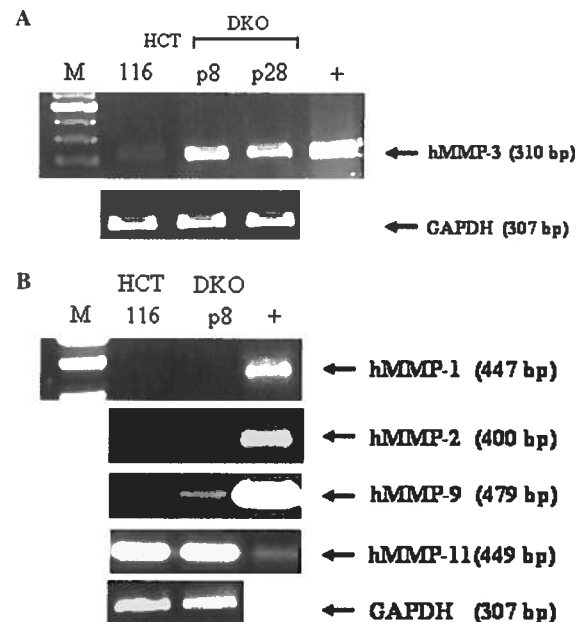


Fig. 2. Constitutive expression of *mmp-3* in DKO cells. (A) MMP-3 mRNA expression in HCT116 and DKO cells. Expression of MMP-3 was determined by RT-PCR analysis of RNA. The number of cellular passages of DKO cells following genetic knock-out is indicated. (B) Expression levels of other members of the MMP family of HCT116 and DKO cells as detected by RT-PCR. For positive controls (+), RNA was either isolated from HT1080 cells, in the case of MMP-1, MMP-3, and MMP-9, A172 human glioma cells in the case of MMP-2, or from Raji B lymphoma cells in the case of MMP-11. MMP-10 was also expressed constitutively in HCT116 and DKO cells (data not shown). GAPDH was used as loading and specificity control. Data are representative of at least three independent experiments. M, molecular weight standards (100-bp ladder).

Expression of MMP-3 induced by DNA methyltransferase inhibitors in colon carcinoma cells

To further establish the importance of DNA methylation in the expression of MMP-3, we used demethylating agents that are reported to reverse the DNA methylation in the genome. HCT116 cells were thus treated with increasing concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) and of Zebularine; the total RNA was then subjected to RT-PCR analysis. Our results showed that both 5-aza-dC and Zebularine induced de novo expression of MMP-3 in HCT116 cells (Fig. 3). No change in the level of MMP-10, another member of the stromelysin subfamily of MMPs, was seen in these cells after treatment with these inhibitors (data not shown).

In vitro methylation of the MMP-3 promoter silences its transcription

To confirm that DNA methylation plays a role in silencing the transcriptional activity of the *mmp-3* promoter in HCT116, in vitro methylation analysis was performed to see whether constitutive active *mmp-3* promoter activity could be inhibited by the methylation of *mmp-3* CpGs. A fragment of the 5' flanking region of the *mmp-3* promoter encompassing the essential consensus sequence for the transcriptional activity of the *mmp-3* promoter was methylated with *SssI* (CpG) methylase and transiently transfected in 293A cells. Our results showed that CpG

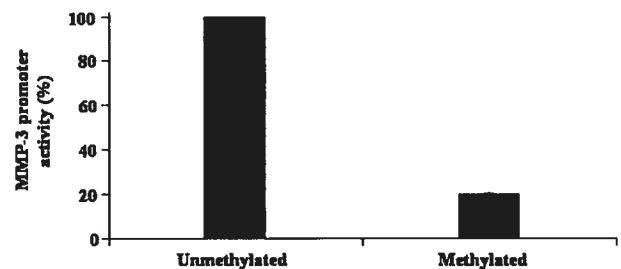


Fig. 4. Effects on MMP-3 promoter activity by *SssI* methylase. After *SssI* treatment, the relative luciferase activity generated by the MMP-3 promoter (containing the -478/+4 promoter region) was markedly inhibited in 293 cells as compared to the unmethylated promoter. Transfection efficiency was monitored by co-transfection with pSV/ β -gal plasmid encoding for β -galactosidase. Results are representative of three independent experiments.

methylation of the *mmp-3* promoter suppressed its transcriptional activity to approximately 20% (Fig. 4), suggesting that the transcriptional silencing of MMP-3 is caused by methylation of CpG in its promoter.

Expression of *mmp-3* and *mmp-10* in tumor cells following 5-aza-dC treatment is cell-specific

After having determined the role of DNA methylation in the triggering of MMP-3 HCT116 colon carcinoma cells, we next examined whether DNA methylation could also induce stromelysin gene expression in other tumor cell types, most notably in B cell lymphoma, since gene expression of stromelysins has previously been reported to be expressed in high grade non-Hodgkin's lymphoma [14]. Our results showed that treatment of human non-Hodgkin Raji B lymphoma cells with 5-aza-dC was not sufficient to induce MMP-3 expression. In contrast, however, MMP-10 expression was induced in a dose-dependant manner with the same treatment (Fig. 5A). Similar results were obtained with different concentrations of the Zebularine pharmacological agent (data not shown). We also found that treatment of the human Ramos B lymphoma cells with the same concentrations of 5-aza-dC (0, 1, 5 and 10 μ M) did not induce a detectable expression of MMP-3 in these cells (Fig. 5B). As for MMP-10, its expression was induced in a dose-dependent manner following treatment with 5-aza-dC, in a pattern similar to that observed in Raji cells. Taken together, these findings show that the effects of demethylation on the transcriptional activity on the *mmp-3* and *mmp-10* promoters are cell-specific.

Discussion

In the present work, we have shown that: (1) genetic ablation of *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* genes induced the expression of MMP-3 human carcinoma cells; (2) treatment with DNA methyltransferase inhibitors 5-aza-dC and Zebularine induced *mmp-3* and *mmp-10* gene expression; this increase in expression was, however, cell-specific; and (3)

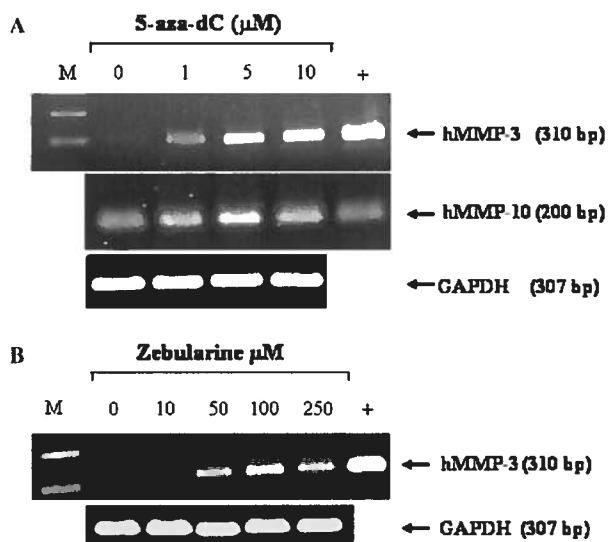


Fig. 3. MMP-3 gene expression in HCT116 following treatment with DNA methylase inhibitors. MMP-3 and/or MMP-10 mRNA expression before and after treatment with (A) 5-aza-dC or (B) Zebularine. Levels of MMP-3 and MMP-10 transcripts in HCT116 cells were measured 72 h after adding the inhibitor. For positive controls (+), RNA was either isolated from H1T080 cells in the case of MMP-3 or from A172 cells in the case of MMP-10. GAPDH was used as loading and specificity control. Data are representative of at least two independent experiments. M, molecular weight standards (100-bp ladder).

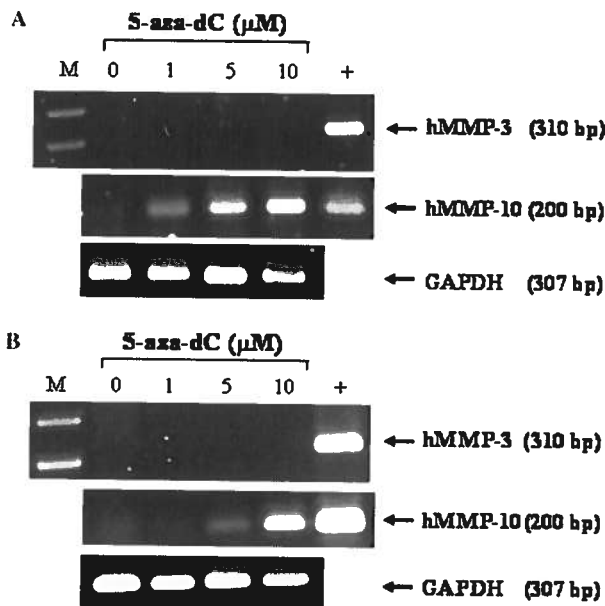


Fig. 5. MMP-3 and MMP-10 expression following treatment with 5-aza-dC in human B lymphomas. MMP-3 and MMP-10 mRNA expression before and after treatment with 5-aza-dC in Raji (A) and Ramos (B) B lymphoma cells. Levels of MMP-3 transcripts in cells were measured 72 h after adding the inhibitor. For positive controls (+), RNA was either isolated from HT1080 cells in the case of MMP-3 or from A172 cells in the case of MMP-10. GAPDH was used as loading and specificity control. Data are representative of at least two independent experiments. M, molecular weight standards (100-bp ladder).

in vitro methylation of the *mmp-3* promoter suppresses its transcriptional activity. On the basis of these findings, we conclude that hypomethylation induces de novo expression of *mmp-3* and *mmp-10* genes, suggesting that epigenetic changes may predispose tumor cells to express stromelysin genes.

Homologous recombination can be used to disrupt the expression of specific genes in somatic cell lines, generating experimental systems that lend themselves to evaluations of the biochemical events underlying processes such as DNA methylation. This approach has been used by Bert Vogelstein and co-workers [14] in the colorectal cancer cell line HCT116 to disrupt *DNMT1* and *DNMT3b* (thereby generating the dual knock-out, DKO cells). These cells represent therefore a unique tool for analyzing the precise biochemical properties of methyltransferase enzymes and the relationship between DNA methylation and specific signaling pathways. With the use of demethylating drugs, this model system also allowed us to show that epigenetic changes may at least in part explain the distinct pattern of expression of both stromelysin-1 (*mmp-3*) and stromelysin-2 (*mmp-10*) genes. Although MMP-3 shares fairly broad structural features with MMP-10, both enzymes differ considerably in terms of expression pattern. For instance, both promoters contain at almost identical positions consensus sequence sites for activating protein AP-1 and ETS.

The data presented here have a significant impact on the temporospatial and tissue-specific expression patterns of MMPs in vivo. It is now well recognized that transcription of *mmp* genes is independently regulated, each cell displaying a proteolytic phenotype in response to a particular stimulus [2]. Our findings indicate that epigenetic changes can significantly alter this phenotype. Indeed, while both *mmp-3* and *mmp-10* genes were susceptible to hypomethylation, their patterns of expression following epigenetic changes were quite distinct, resulting in a very different cell-specific expression pattern. For instance, while the expression of MMP-10 was constitutive in HCT116, that of MMP-3 was repressed by DNA methylation. In contrast, in B cell lymphoma, the expression of MMP-10, but not that of MMP-3, was induced by hypomethylation. This is consistent with our previous results showing that in B cell lymphoma, we could induce MMP-10, but not MMP-3, upon exposure to inflammatory cytokines [6]. We have also found that in other tumor cell types, such as the MDA-MB-231, both MMP-3 and MMP-10 are induced upon treatment with demethylating agents (unpublished observations). Thus, although these enzymes differ in their differential patterns of expression, they share a common trait; their expression is susceptible to DNA hypomethylation.

Alterations in DNA methylation at CpG sites have been reported during progression of colon carcinoma and other types of cancer [13,19–21]. Our findings support the hypothesis that genome-wide DNA hypomethylation, a molecular event observed in a variety of cancers, plays a significant role during neoplastic progression by up-regulating the expression of genes involved in tumor progression. In fact, the recently expressed view that DNA hypomethylation has opposing roles in carcinogenesis, promoting the early stage of tumor formation while suppressing the overall tumorigenesis in the intestine [12], is consistent with the role of MMPs in the early stages of carcinogenesis. In the case of MMP-3, for instance, transgenic mouse models have shown that elevated expression levels of MMP-3 in the peritumoral environment of squamous cell carcinoma may protect against tumor progression [22]. Of course, genome-wide DNA methylation could also induce the expression of other genes that may influence positively or negatively cancer development. Others have shown that demethylation of CpG induced over-expression of cyclin D2 and maspin in gastric carcinoma [23], HPV16 in cervical cancer [24,25], and S100A4 in metastasis-associated gene in colon cancer [11]. Hypomethylation of the multidrug-resistance gene *MDR1* also correlates with increased expression and drug resistance in acute myelogenous leukemia [26]. Of course, given the classical role usually attributed to MMPs in neoplastic progression, the possibility of using DNA methyltransferase inhibitors in patients with the objective of reactivating tumor suppressor genes, the epigenetic changes induced by agents that modulate DNA methylation may represent a major source of concern if decitabine treatment were to be prolonged. However, we should point out the fact that our findings

may also offer an alternative window of opportunity to increase the efficiency of cancer-targeting drug-delivery system in which the enzymatic activity of MMPs is used to cleave the inactive drug conjugate [27,28]. The fact that genomic DNA hypomethylation induced in patients administered with continuous infusion of decitabine for 7 days is transient, returning to baseline 28–35 days after the start of treatment [29], does indeed offer ideal conditions to exploit this approach.

Acknowledgments

We thank Dr. Bert Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute, John Hopkins Medical Institutions, Baltimore) for kindly providing cell lines and Dr. François Denis (INRS-Institut Armand-Frappier) for providing vectors. We also thank Doris Legault for her excellent technical support, Marie Désy for statistical support, Dr. Pierre-Olivier Estève for helpful advice, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. Y.S.P. is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.C. is supported by a studentship from La Fondation Armand-Frappier. M.D. and G.L. are supported by scholarships from the FRSQ.

References

- [1] C.E. Brinckerhoff, L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 207–214.
- [2] X.S. Puente, L.M. Sanchez, C.M. Overall, C. Lopez-Otin, Human and mouse proteases: a comparative genomic approach, *Nat. Rev. Genet.* 4 (2003) 544–558.
- [3] K.L. Sirum, C.E. Brinckerhoff, Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts, *Biochemistry* 28 (1989) 8691–8698.
- [4] C.E. Brinckerhoff, K.L. Sirum-Connolly, M.J. Karmilowicz, D.T. Auble, Expression of stromelysin and stromelysin-2 in rabbit and human fibroblasts, *Matrix Suppl.* 1 (1992) 165–175.
- [5] I.J. Windsor, H. Grenett, B. Birkedal-Hansen, M.K. Bodden, J.A. Engler, H. Birkedal-Hansen, Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 17341–17347.
- [6] C. Van Themsche, T. Alain, A.E. Kossakowska, S. Urbanski, E.F. Potworowski, Y. St-Pierre, Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo, *J. Immunol.* 173 (2004) 3605–3611.
- [7] A.P. Feinberg, B. Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts, *Nature* 301 (1983) 89–92.
- [8] S.E. Goetz, B. Vogelstein, S.R. Hamilton, A.P. Feinberg, Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms, *Science* 228 (1985) 187–190.
- [9] A.P. Feinberg, B. Tycko, The history of cancer epigenetics, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 143–153.
- [10] J. Wahlfors, H. Hiltunen, K. Heinonen, E. Hamalainen, L. Alhonen, J. Janne, Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 80 (1992) 2074–2080.
- [11] N. Nakamura, K. Takenaga, Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines, *Clin. Exp. Metastasis* 16 (1998) 471–479.
- [12] Y. Yamada, L. Jackson-Grusby, H. Linhart, A. Meissner, A. Eden, H. Lin, R. Jaenisch, Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 13580–13585.
- [13] A.M. De Marzo, V.L. Marchi, E.S. Yang, R. Veeraswamy, X. Lin, W.G. Nelson, Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis, *Cancer Res.* 59 (1999) 3855–3860.
- [14] I. Rhee, K.E. Bachman, B.H. Park, K.W. Jair, R.W. Yen, K.E. Schuebel, H. Cui, A.P. Feinberg, C. Lengauer, K.W. Kinzler, S.B. Baylin, B. Vogelstein, DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells, *Nature* 416 (2002) 552–556.
- [15] A.R. Karpf, S. Matsui, Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 8635–8639.
- [16] M.F. Paz, S. Wei, J.C. Cigudosa, S. Rodriguez-Perales, M.A. Peinado, T.H. Huang, M. Esteller, Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 2209–2219.
- [17] N. Sato, A. Maitra, N. Fukushima, N.T. van Heek, H. Matsubayashi, C.A. Iacobuzio-Donahue, C. Rosty, M. Goggins, Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 4158–4166.
- [18] E. Chicoine, P.O. Esteve, O. Robledo, C. Van Themsche, E.F. Potworowski, Y. St-Pierre, Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002) 765–772.
- [19] P.A. Jones, J.D. Buckley, The role of DNA methylation in cancer, *Adv. Cancer Res.* 54 (1990) 1–23.
- [20] J.P. Issa, P.M. Vertino, J. Wu, S. Sazawal, P. Celano, B.D. Nelkin, S.R. Hamilton, S.B. Baylin, Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression, *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1993) 1235–1240.
- [21] J. Frigola, X. Sole, M.F. Paz, V. Moreno, M. Esteller, G. Capella, M.A. Peinado, Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 319–326.
- [22] M.D. Sternlicht, M.J. Bissell, Z. Werb, The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter, *Oncogene* 19 (2000) 1102–1113.
- [23] Y. Oshimo, H. Nakayama, R. Ito, Y. Kitadai, K. Yoshida, K. Chayama, W. Yasui, Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 1663–1670.
- [24] V. Badal, L.S. Chuang, E.H. Tan, S. Badal, L.L. Villa, C.M. Wheeler, B.F. Li, H.U. Bernard, CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression, *J. Virol.* 77 (2003) 6227–6234.
- [25] A. de Capoa, A. Musolino, S. Della Rosa, P. Calafà, L. Mariani, F. Del Nonno, A. Vocaturo, R.P. Donnorso, A. Niveleau, C. Grappelli, DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples, *Oncol. Rep.* 10 (2003) 545–549.
- [26] M. Nakayama, M. Wada, T. Harada, J. Nagayama, H. Kusaba, K. Ohshima, M. Kozuru, H. Komatsu, R. Ueda, M. Kuwano, Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias, *Blood* 92 (1998) 4296–4307.
- [27] A.M. Mansour, J. Dreves, N. Esser, F.M. Hamada, O.A. Badary, C. Unger, I. Fichtner, F. Kratz, A new approach for the treatment of malignant melanoma: enhanced antitumor efficacy of an albumin-binding doxorubicin prodrug that is cleaved by matrix metalloproteinase 2, *Cancer Res.* 63 (2003) 4062–4066.

- [28] E. Van Valckenborgh, D. Mincher, A. Di Salvo, I. Van Riet, L. Young, B. Van Camp, K. Vanderkerken, Targeting an MMP-9-activated prodrug to multiple myeloma-diseased bone marrow: a proof of principle in the 5T33MM mouse model, *Leukemia* 19 (2005) 1628–1633.
- [29] W.E. Samlowski, S.A. Leachman, M. Wade, P. Cassidy, P. Porter-Gill, L. Busby, R. Wheeler, K. Boucher, F. Fitzpatrick, D.A. Jones, A.R. Karpf, Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 3897–3905.

CONCLUSION DU CHAPITRE II

Les résultats obtenus dans ce chapitre présentent l'impact de l'hypométhylation sur les patrons d'expression des MMP spécifiques aux tissus. Il est maintenant accepté que la transcription des gènes *MMP* est régulée de façon indépendante, chacun des gènes présentant un phénotype protéolytique cellulaire en réponse à un stimulus particulier. Les résultats indiquent que des changements épigénétiques peuvent altérer significativement ce phénotype. En effet, même si *mmp-3* et *mmp-10* sont susceptibles à l'hypométhylation, leurs patrons d'expression, suite aux changements épigénétiques sont distincts. Ceci démontrant un profil d'expression différent et spécifique aux cellules. Même si ces enzymes diffèrent dans leurs patrons d'expression, elles partagent un trait commun, la susceptibilité à l'hypométhylation de l'ADN. Les résultats supportent également l'hypothèse que l'hypométhylation globale du génome, un événement moléculaire observé dans une grande variété de cancers, joue un rôle significatif durant la progression néoplasique en augmentant l'expression des gènes impliqués dans la progression tumorale. Évidemment, si on attribue le rôle habituel des MMP dans cette tumorigenèse, la possibilité d'utiliser les inhibiteurs de méthyltransférases de l'ADN chez les patients dans le but de réactiver les gènes suppresseurs de tumeurs pourrait avoir un effet à double tranchant. Il se pourrait que les changements épigénétiques induits par les agents qui modulent la méthylation de l'ADN représentent une source de préoccupation, à plus forte raison si le traitement avec la décitabine est prolongé.

CHAPITRE III

RÉSUMÉ DU CHAPITRE III

Les membres de la famille des métalloprotéases de la matrice (MMP) jouent un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire lors de processus normaux et pathologiques. L'expression des gènes *MMP* est finement régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription spécifiques, notamment après une stimulation par les cytokines inflammatoires. Des études récentes avec l'agent pharmacologique 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), un inhibiteur de méthylation de l'ADN, suggèrent qu'un contrôle épigénétique contribue également à la régulation de l'expression de *MMP*. Même si certains patrons de méthylation aberrants reliés à l'inflammation ont déjà été démontrés, les mécanismes expliquant le lien entre l'inflammation et les altérations épigénétiques dans le contrôle de l'expression des MMP demeurent encore vagues. Les résultats du présent travail permettent de montrer des évidences que l'augmentation de l'expression du gène *MMP-3* par 5-aza-dC est modulée par l'IL-1. Plus spécifiquement, les résultats démontrent que la stimulation par l'IL-1 augmente significativement le statut d'hypométhylation du promoteur *MMP-3* à des niveaux similaires retrouvés dans la lignée cellulaire HCT116 dnmt1/dnmt3b-déficientes (DKO). De plus, les résultats démontrent que l'augmentation de l'expression de *MMP-3* par 5-aza-dC est associée à l'augmentation de l'expression et de l'activité de facteurs de transcription spécifiques régulant l'expression de *MMP-3*. Ces résultats permettent donc de jeter un nouveau regard quant au rôle coopératif de 5-aza-dC et les cytokines inflammatoires avec des facteurs de transcription spécifiques à la régulation de l'expression de *MMP-3*.

Dans le chapitre portant sur la collaboration entre l'IL-1 et la 5-aza-dC dans la déméthylation du promoteur *MMP-3*, j'ai effectué toutes les expériences et la majorité des expériences ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. St-Pierre. J'ai effectué certaines expériences, notamment les immunobuvardages de type western, certains séquençages et les PCR en temps réel dans le laboratoire du Dr. Sriharsa Pradhan (RNA Divisions, New England Biolabs, MA, USA). J'ai rédigé le manuscrit sous la supervision du Dr. Yves St-Pierre et la lecture critique a été réalisée par tous les auteurs.

Afin de faciliter la lecture de cet article une **figure 9** du promoteur MMP-3 avec les CG numérotés a été ajoutée avant l'article.

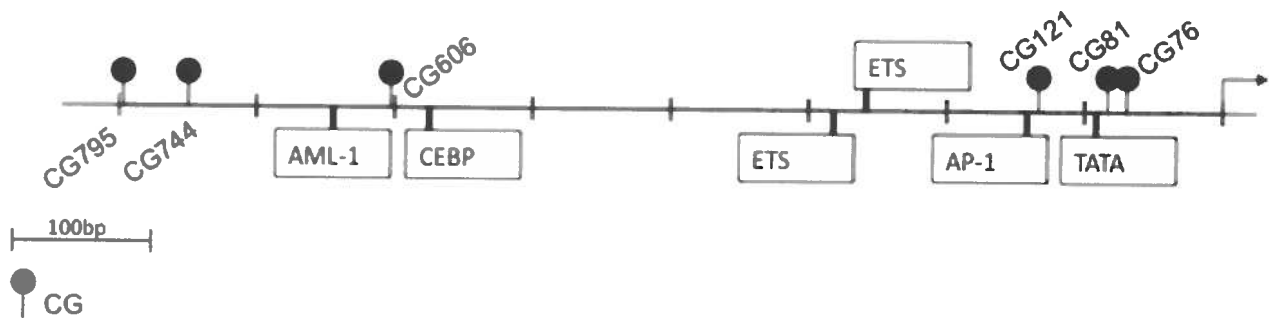


Figure 9 : Promoteur MMP-3 humain et les sites CpG analysés. Les sites principaux sites de liaisons pour les facteurs de transcription sont indiqués ainsi que les sites CpG analysés par séquençage au bisulfite (suçons). Les six CpG sont numérotés par rapport à leur position en amont du site d'initiation de transcription. Le site d'initiation de transcription du promoteur MMP-3 est représenté par une flèche brisée et chaque division représente 100 paires de bases en amont du site d'initiation de transcription.

5-Aza-2'-deoxycytidine and interleukin-1 cooperate to regulate matrix metalloproteinase-3 gene expression

Julie Couillard¹, Pierre-Olivier Estève², Sriharsa Pradhan² and Yves St-Pierre¹

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada

²New England Biolabs Incorporated, 240 County Road, Ipswich, MA

Members of the matrix metalloproteinase (MMP) family of enzymes play a critical role in extracellular matrix remodeling in a number of normal and pathologic processes. Accordingly, activation of *MMP* gene expression is tightly regulated at the level of transcription by specific transcription factors, most notably following exposure to inflammatory cytokines. Recent studies with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), a specific DNA methylase inhibitor, also suggest that epigenetic processes contribute to the regulation of *MMP* expression. Although inflammation-related aberrant patterns of DNA methylation have been described, a mechanistic link between inflammation and epigenetic alterations in the control of *MMP* expression remains unclear. Here, we provide evidence that increased *MMP-3* expression by 5-aza-dC is modulated by interleukin-1 (IL-1). More specifically, we found that stimulation with IL-1, but not with IL-6 or TNF α , significantly increased the hypomethylation status of the *MMP-3* promoter to a level similar to that found in *dnmt1/dnmt3b*-deficient HCT116 (DKO) cells. Furthermore, we showed that increased *MMP-3* expression by 5-aza-dC was associated with increased expression and activity of specific transcription factors known to regulate *MMP-3* expression. In fact, treatment with 5-aza-dC was obligatory for some transcription factors to trigger an increase in *MMP-3* expression, such as Ap-1. In contrast, CCAAT enhancer-binding proteins and E-twenty six were capable of inducing *MMP-3* alone. Overall, these findings provide a novel perspective of the collaborative role of 5-aza-dC and inflammatory cytokines with specific transcription factors that are normally involved in *MMP-3* expression.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent proteolytic enzymes that are capable of degrading practically all components of the extracellular matrix or other extracellular targets, including other MMPs. They contribute to many physiological processes, including embryogenesis, wound healing and tumor progression. Transcriptional dysregulation of *MMP* expression plays a prominent role in several diseases that involve tissue destruction. For example, elevated levels of stromelysin-1 (MMP-3) have been implicated in the progression of Crohn's disease,¹ cancer,² rheumatoid arthritis³ and coronary diseases.⁴

MMP expression is normally low in cells under regular physiological conditions and is controlled by strict regulatory mechanisms. The expression of *MMPs* dramatically increases following exposure to a variety of inflammatory mediators.

Key words: matrix metalloproteinase, MMP-3, IL-1, DNA methylation, gene expression

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Conflict of interest: The authors declare no competing interests
Grant sponsors: National Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), Canadian Institutes for Health Research
DOI: 10.1002/ijc.25865

History: Received 16 Sep 2010; Accepted 30 Nov 2010; Online 00 Month 2010

Correspondence to: Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V1B7, Tel: +450-686-5354, Fax: +450-686-5501, E-mail: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca

For example, interleukin-1 (IL-1) plays a central role in controlling *MMP-3* expression, most notably *via* activation of activator protein-1 (AP-1) and members of the E-twenty six (ETS) family of transcription factors.^{5,6} The transcription factor CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) has also been implicated in IL-1-mediated *MMP-3* expression.⁷

Recent studies have shown that the methylation status of cytosines in CpG dinucleotides located in the *MMP* promoter also plays a role in controlling *MMP* gene expression, most notably in cancer cells.⁸⁻¹³ An abnormal DNA methylation pattern is one of the hallmarks of cancer cells, which normally harbor widespread DNA hypomethylation of tumor-promoting genes along with site-specific DNA hypermethylation of tumor suppressor genes.¹⁴ Although studies have shown that demethylating agents, through the induction of tumor suppressor gene expression, can decrease tumorigenesis, a possible concern regarding hypermethylation therapy is that it would result in the activation of tumor-promoting genes, such as *MMP* genes. Whether such epigenetic mechanisms alter IL-1-induced *MMP* expression, however, remains unclear.

In our work, we report that IL-1 and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), a specific DNA methylase inhibitor, cooperate to induce hypomethylation of the *MMP-3* gene at the promoter level in human colorectal cancer cells. Furthermore, 5-aza-dC significantly upregulated the activity of transcription factors involved in *MMP-3* expression, thereby contributing to its increased expression level. Taken together, these results provide a mechanistic link between IL-1-mediated inflammatory processes and epigenetic alterations in the control of *MMP* gene expression.

Material and Methods

Cell lines and reagents

The HeLa cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium [supplemented with 10% (v/v) FCS, 2 mmol/L L-glutamine and 10 mmol/L HEPES buffer]. HCT-116 colon cancer cells and double Dnmt1^{-/-} Dnmt3b^{-/-} (DKO) HCT116 cells were generous gifts from Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins Kimmel Comprehensive Cancer Center, Baltimore, MD). Cells were grown in McCoy's 5A complete medium. All cell culture products were from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). 5-Aza-dC was purchased from Sigma chemicals (St. Louis, MO). Recombinant human IL-1, TNF α and IL-6 were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

RNA isolation and semiquantitative RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from HCT116, DKO or HeLa cells using TRIzol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was prepared from 2 μ g of cellular RNA in 20 μ L of reaction volume using the preamplification system reverse transcriptase RTomniscrypt (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). After reverse transcription, hMMP-3 (gene ID 4314) (sense primer: 5'-AGA GGT GAC TCC ACT CAC AT-3' and antisense: 5'-GGT CTG TGA GTG AGT GAT AG-3'), product size: 310 bp; hMMP-9 (gene ID 4318) (sense: 5'-CAA CAT CAC CTA TTG GAT CC-3' and antisense: 5'-CGG GTG TAG AGT CTC TCG CT-3'), product size: 479 bp and GAPDH (gene ID 2597) (sense: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' and antisense: 5'-CAG AAG TGG TGG TAC CTC TTC CGA-3'), product size: 307 bp. cDNAs were amplified using the following conditions: 94°C for 0.5 min, 58°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 10 min. Thirty-five cycles of amplification were performed in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA). The amplified products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels using SYBR Safe DNA gel (Life Technologies) staining and UV illumination.

Plasmid construction and site-directed mutagenesis

An 877-bp PCR-amplified genomic DNA fragment encoding the 5' flanking promoter of the human MMP-3 gene was obtained from genomic DNA isolated from HCT116 cells using the following primers: sense: 5'-TAG GGA GGA GGG GAA A-3' and antisense: 5'-TTC TCT CAA CCT TCC CAAT-3'. The promoter was further subcloned into the luciferase gene (reporter vector pGL3-Basic) (Promega, Madison, WI). Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis of AP-1 and C/EBP consensus sites was carried out with the QuikChange Mutagenesis Kit from Stratagene (La Jolla, CA). The AP-1 site was mutated using the following primers: sense: 5'-GCA AGG ATG TTT CAA GCTG-3' and antisense: 5'-CAG CTT GAA ACA TCC TTGC-3'. The C/EBP site was

mutated using the following primers: sense: 5'-ACT TTG AAT TTC CTG TGT TTC CTG CAG GTCC-3' and antisense: 5'-GGA CCT GCA GGA AAC ACA GGA AAT TCA AAGT-3'. The ETS-mutated MMP-3 promoter was a generous gift from Dr. M. Aumercier (Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, Lille Cedex, France).¹⁵ The expression vector encoding full-length c-Jun was a generous gift from Dr. Michael J. Birrer (National Institutes of Health, MD). All other cDNA expression vectors were purchased from OriGene Technologies (Rockville, MD).

Transient transfection and luciferase assay

HCT116 cells were seeded the day before treatment with 5-aza-dC (5 μ M) for 48 hr. Cells were then washed twice with PBS and transfected with 0.1–1.0 μ g of plasmid DNA using DNAfectin (Applied Biological Materials, Richmond, BC, Canada) according to the manufacturer's protocol. The culture medium was changed to complete McCoy's medium 5 hr after transfection. Forty-eight hours after transfection, recombinant IL-1 (10 ng/mL) was added, and cells were incubated for an additional 20 hr. The transfection efficiency was monitored using the pCMV/b-gal reporter vector (Promega). Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System protocol (Promega) and a luminometer (Lumat LB 9507, Berthold). The b-galactosidase activity was detected using a colorimetric enzyme assay using the Luminescent b-Galactosidase Detection Kit II (Clontech Laboratories, Mountain View, CA).

Preparation of genomic DNA and bisulfite treatment

HCT116 or HeLa cells were treated with 5-aza-dC (5 μ M) for 72 hr with or without 10 ng/mL of human recombinant IL-1 for the last 20 hr before harvesting the cells. Genomic DNA was then isolated and treated with sodium bisulfite using the EpiTect kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The methylation status of the MMP-3 promoter region was analyzed by PCR amplification by mixing bisulfite-treated DNA with specific oligoprimers using the Taq DNA Polymerase Kit (QIAGEN). The samples were incubated for 2 min at 95°C, followed by 40 cycles as follows: 1 min at 95°C; 2 min at 56°C; 1 min at 72°C and a final extension at 72°C for 10 min. The product of the first round of PCR was then subjected to a second round of amplification with a set of nested primers under the same PCR conditions. PCR products were separated by gel electrophoresis and cloned into the pCR4-TOPO vector (Life Technologies) using the TOPO-TA Cloning Kit (Life Technologies). Ten to twenty clones were subjected to sequencing. The sequences of the primers used to amplify the human MMP-3 promoter from bisulfite-treated DNA are available upon request.

Western blot analysis

HCT116 cells were washed with PBS and lysed at 4°C for 20 min with a lysis buffer containing 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 100 μ g/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Nonidet P-40 and a protease inhibitor mixture (Sigma). The protein concentrations in the supernatants

were determined using the Bio-Rad protein assay reagent based on the Bradford colorimetric method. After electrophoresis in an 11% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (Life Technologies), the proteins were transferred onto Protran[®] pure nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). After overnight electroblotting at 4°C, the membranes were incubated with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20, 5% nonfat dry milk (Bio-Rad) and a rabbit polyclonal antibody against DNMT1 (New England Biolabs), c-Jun (Cell Signaling Technologies; CST) and rabbit polyclonal antibody against actin (Sigma). Anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were used, and the bands were visualized with the chemiluminescence detection system (CST).

Results

IL-1 and 5-aza-dC synergize to induce MMP-3

expression in HCT116 colon carcinoma cells

Our previous studies have shown that methylation inhibitors, such as 5-aza-dC or zebularine, induce MMP-3 expression in HCT116 cells.⁹ As this induction was the highest observed among the MMP tested, and because MMP-3 is involved in the progression of colorectal cancer and colorectal chronic inflammation diseases,^{16,17} we have further investigated the mechanisms regulating its expression. Because IL-1 is known to induce MMP expression and because epigenetic changes have been linked to inflammatory processes, we investigated whether DNA hypomethylation could influence IL-1-induced MMP-3 expression. Our results showed that 5-aza-dC significantly increased IL-1-induced MMP-3 expression in HCT116 when compared to cells treated with IL-1 or 5-aza-dC alone (Fig. 1a). The combined effect of IL-1 and hypomethylation was also observed using Dnmt1/Dnmt3b double-knockout (DKO) HCT116 cells, which demonstrated higher MMP-3 expression levels following IL-1 stimulation than did control wild-type HCT116. Independent dose-response experiments (1–50 ng/mL) showed that maximal MMP-3 expression was reached at a dose of 5 ng/mL of IL-1 (Data known). Kinetic analysis showed that the ability of 5-aza-dC to increase IL-1-induced MMP-3 expression was higher at 4–12 hr poststimulation (Fig. 1b). Nevertheless, a similar synergistic effect between 5-aza-dC and IL-1 was also discovered when we examined the expression levels of MMP-9, another member of the MMP family that is regulated by DNA hypomethylation⁸ (Supporting Information).

IL-1 increases demethylation of the MMP-3 promoter

Sequencing of bisulfite-converted genomic DNA was used to determine the methylation status of the MMP-3 promoter in 5-aza-dC-treated HCT116 cells that were stimulated or not with IL-1. As expected, 5-aza-dC induced MMP-3 promoter hypomethylation when compared to nontreated cells (Fig. 2). Interestingly, however, we found that stimulation with IL-1 significantly increased the hypomethylation status of the promoter induced by 5-aza-dC to a level similar to that found in control DKO cells. A small but significant effect of IL-1 alone

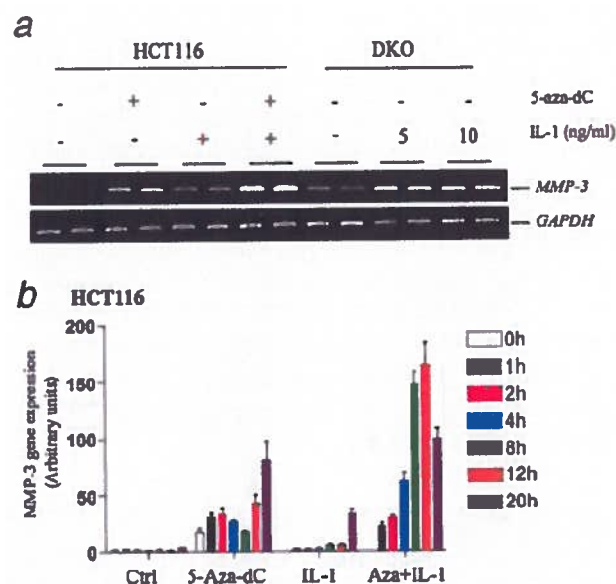


Figure 1. IL-1 and 5-aza-dC synergize to induce MMP-3 expression in HCT116 colon carcinoma cells. (a) MMP-3 expression levels in HCT116 and DKO cells following treatment with 5-aza-dC (5 μM, 72 hr) and/or IL-1 (20 ng/ml, 20 hr). The DKO cells were only treated with IL-1 because of the already unmethylated status of the cells, and they were used as control of hypomethylated cells. (b) Kinetic analysis showing changes in MMP-3 gene expression following treatment with 5-aza-dC and/or IL-1, as measured by real-time quantitative PCR. The results represent at least three independent experiments. GAPDH was used as loading control. Two-way ANOVA was done for statistical analysis p values; untreated vs. 5-aza-dC: $p < 0.001$ (between 12 and 20 hr); untreated vs. IL-1: $p < 0.05$ (at 20 hr); untreated vs. 5-aza-dC + IL-1: $p < 0.001$ (between 4 and 20 hr); 5-aza-dC vs. IL-1: $p < 0.01$ (between 12 and 20 hr); 5-aza-dC vs. 5-aza-dC + IL-1: $p < 0.001$ (between 4 and 12 hr) and IL-1 vs. 5-aza-dC + IL-1: $p < 0.001$ (between 4 and 12 hr).

on the methylation status of HCT116 cells was also observed. This cooperative effect of IL-1 and 5-aza-dC on hypomethylation and MMP-3 expression was also observed using HeLa cells (Fig. 3) and was specific because no significant increase was observed with IL-6 or TNFα. Similar results were obtained for MMP-9 (Supporting Information).

5-aza-dC cooperates with c-Jun to upregulate

MMP-3 expression in HCT116 cells

Consensus sequences located within the 800-bp region of the transcription initiation site have been shown to be essential for full promoter MMP-3 activity¹⁸ (Supporting Information). This promoter region contains consensus-binding sites for the AP-1, ETS and C/EBP transcription factors. Therefore, we examined whether 5-aza-dC and IL-1 cooperated with these factors to induce MMP-3 expression. We initially focused on AP-1, which plays a central role in the activation of most of the MMP genes.¹⁹ Our results showed that although all AP-1

a HCT116

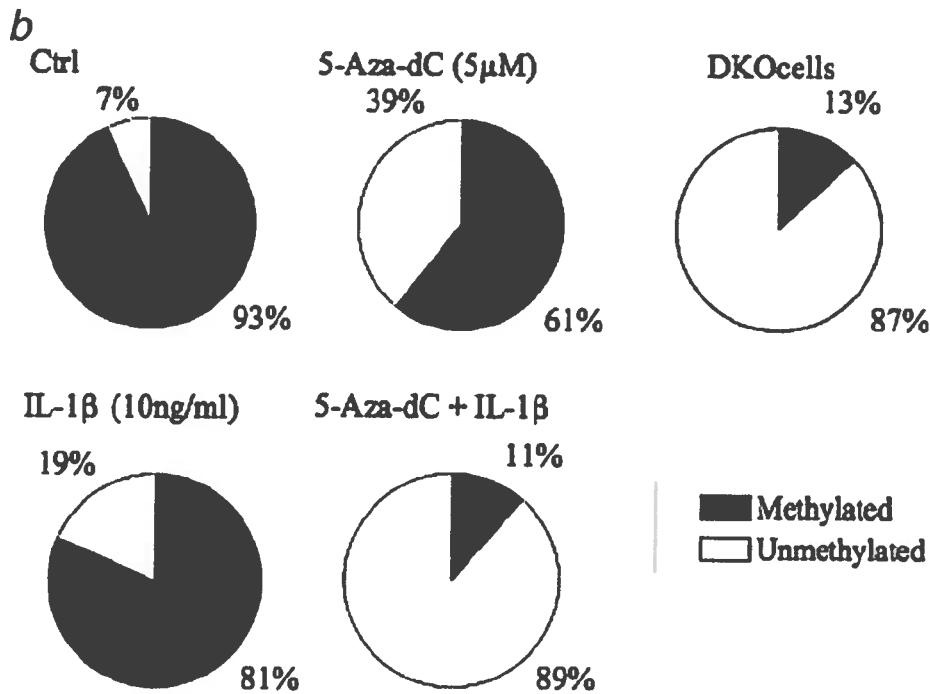
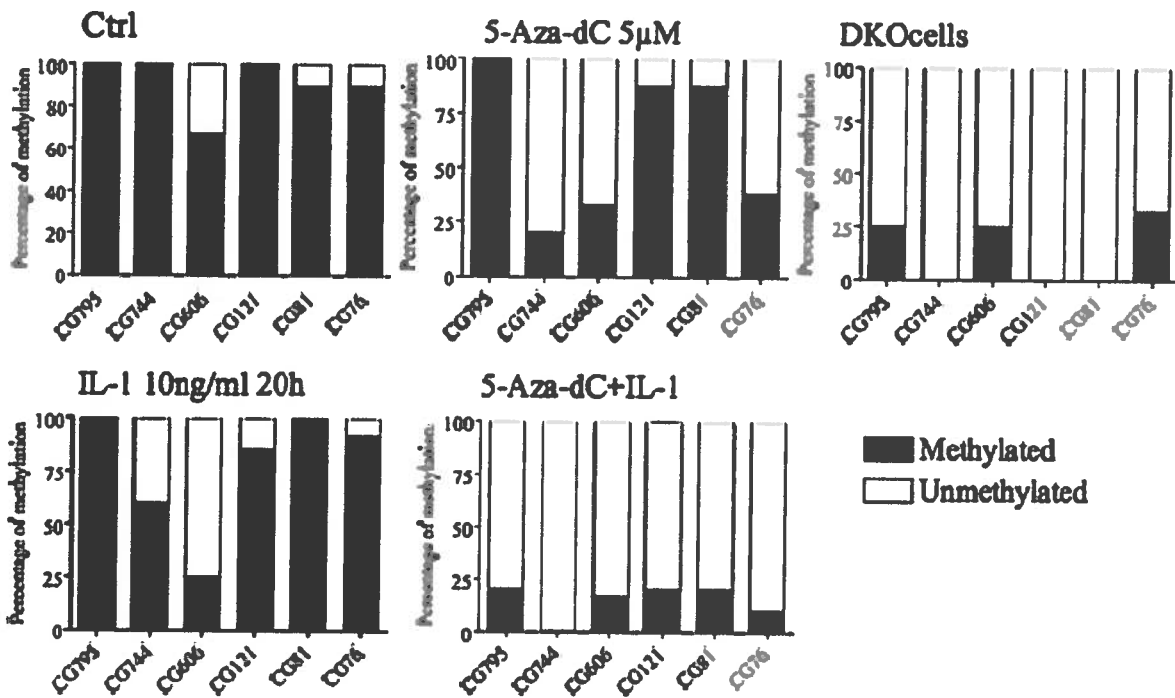


Figure 2. IL-1 and 5-aza-dC synergize to demethylate the MMP-3 promoter in HCT116 cells. (a) Bisulfite DNA sequence analysis showing the methylation status of CpG dinucleotides located in the proximal region of the human MMP-3 promoter in HCT116 cells following treatment with IL-1 and/or 5-aza-dC. Bisulfite sequencing has also been done in DKO cells as demethylated model. (b) Schematic representation showing the overall effect of IL-1 on 5-aza-dC-induced hypomethylation within the MMP-3 promoter, as determined by bisulfite sequencing in (a).

isoforms alone were mostly ineffective in inducing MMP-3 gene expression in HCT116 cells, each was capable of inducing such expression in the presence of 5-aza-dC, although c-

Jun was the most effective among the isoforms to induce strong and constitutive MMP-3 expression (Fig. 4a and data not shown). A similar cooperative effect between c-Jun and

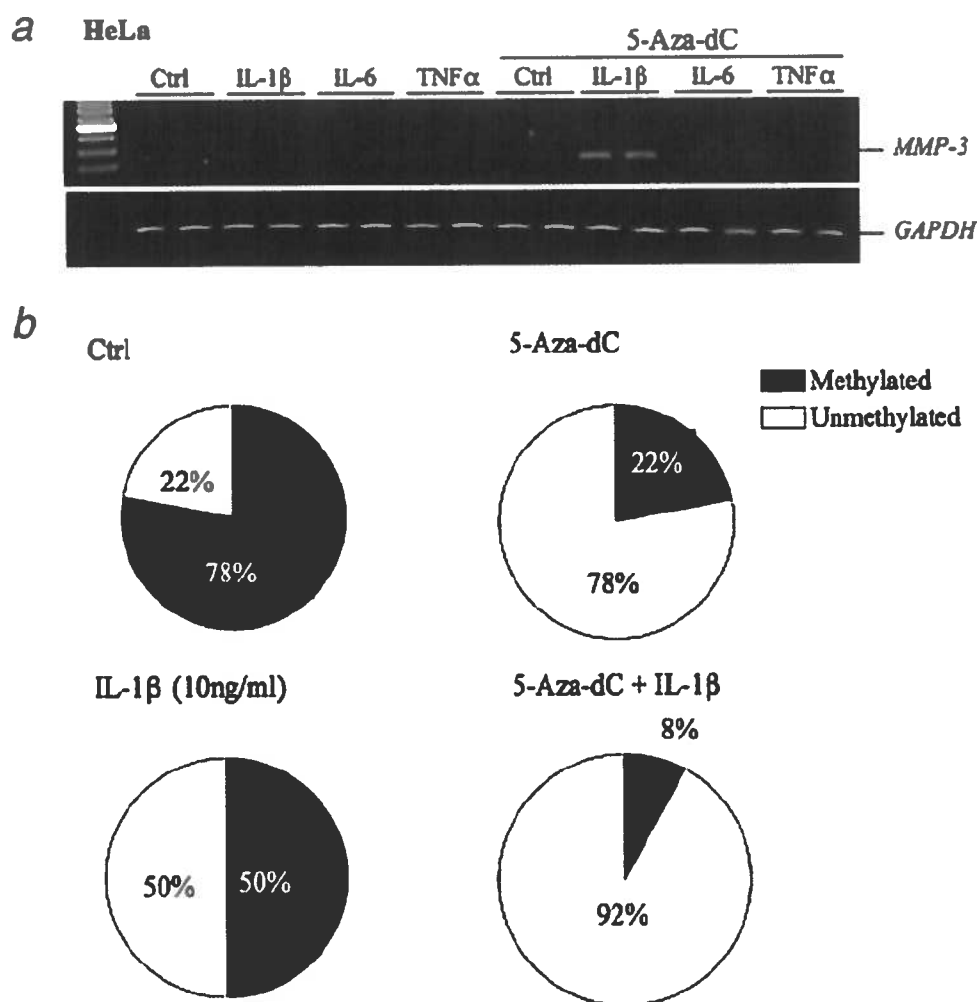


Figure 3. Cooperative effect of IL-1 and 5-aza-dC on endogenous MMP-3 gene expression in HeLa cells. (a) MMP-3 expression levels in HeLa cells induced by 5-aza-dC alone or in the presence of IL-1, IL-6 or TNF α (10 ng/ml). GAPDH was used as a loading control. The results represent at least three independent experiments. (b) Schematic representation showing the overall effect of IL-1 on 5-aza-dC-induced hypomethylation within the MMP-3 promoter in HeLa cells, as determined by bisulfite sequencing.

5-aza-dC was also observed under transient transfection conditions using a reporter construct containing the MMP-3 promoter (Fig. 4b). This ability of 5-aza-dC was most likely linked to its ability to significantly increase c-Jun expression and nuclear activity ($p < 0.05$) (Figs. 4c and 4d). In contrast, IL-1 could not induce a similar increase in AP-1-dependent nuclear activity, consistent with its inability to augment exogenous MMP-3 promoter activation.

Functional interaction between 5-aza-dC and other transcription factors in the regulation of MMP-3 promoter activity

Our results showing that de novo expression of AP-1 isoforms alone was insufficient to induce MMP-3 and required treatment with 5-aza-dC are consistent with previous studies showing that AP-1-induced MMP expression is dependent on the presence of other transcription factors.^{5,20,21} For example, using reporter vectors, Westermarck et al. have

shown that MMP-1 promoter activity is dependent on functional interactions between AP-1 and ETS factors.²⁰ Therefore, we investigated whether other transcription factors could cooperate with 5-aza-dC, most notably C/EBP, which acts as a positive transcriptional activator of MMP.^{22,23} Our results showed that in contrast to AP-1 isoforms, each C/EBP α and β isoform alone could induce endogenous MMP-3 gene expression in HCT116 cells (Fig. 5a). This induction by C/EBP increased significantly following treatment with 5-aza-dC ($p < 0.001$). Such a functional interaction between 5-aza-dC and C/EBP was also observed using the MMP-3 reporter construct (Fig. 5b). This finding was consistent with the ability of 5-aza-dC, but not IL-1, to significantly increase nuclear C/EBP-dependent activity ($p < 0.001$) (Fig. 5c). However, a similar cooperative response between 5-aza-dC and transcription factors was not observed with ETS, although ETS alone could upregulate MMP-3 expression (Fig. 6a). This finding is consistent with our results showing that, in contrast to c-Jun-

Cancer Cell Biology

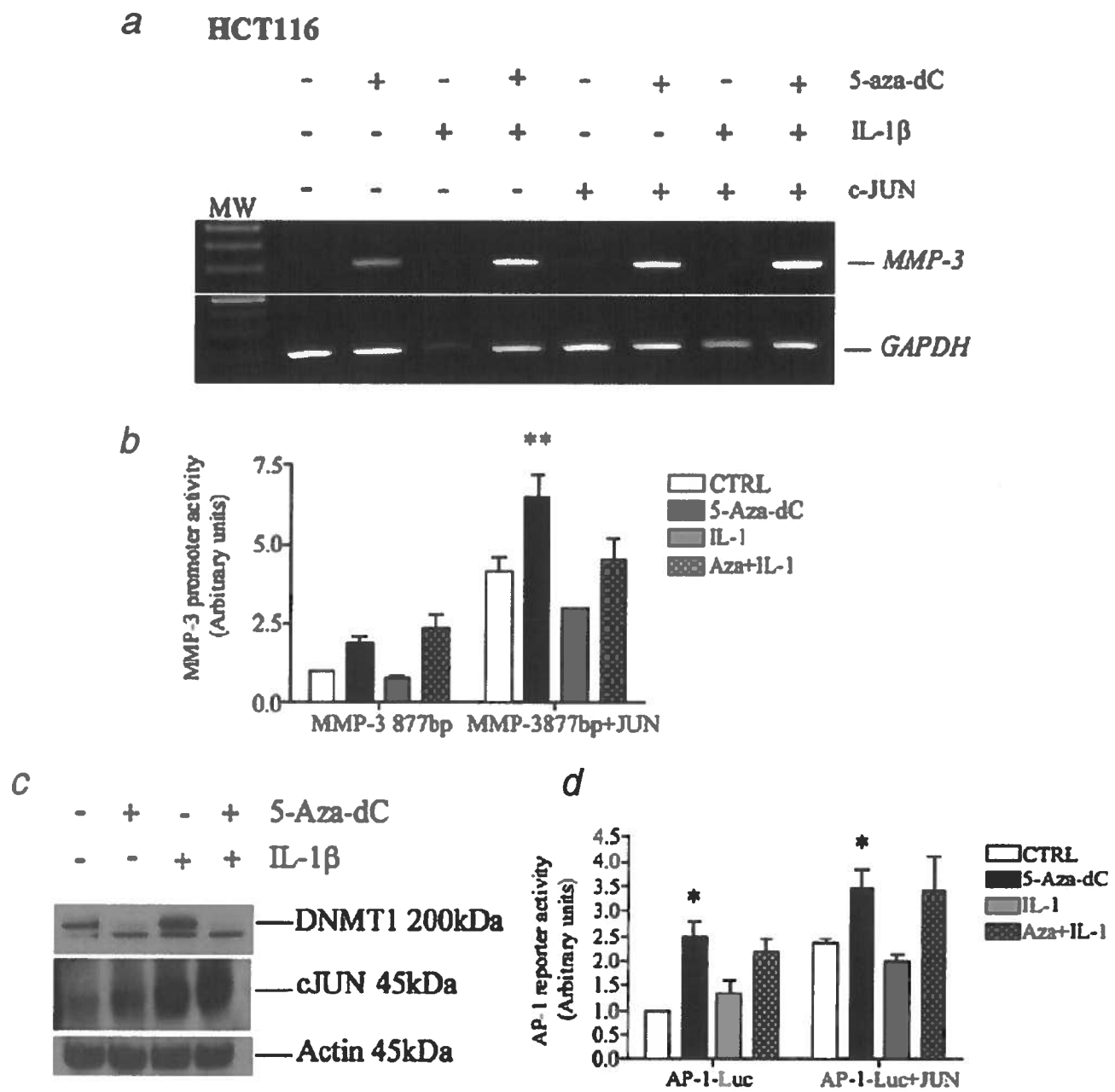


Figure 4. The role of c-JUN in MMP-3 gene expression in HCT116 cells following treatment with 5-aza-dC. (a) MMP-3 expression levels in HCT116 determined by RT-PCR analysis following transfection with an expression vector encoding human c-Jun, in the absence or the presence of 5-aza-dC and/or IL-1. GAPDH was used as a loading control. The results represent at least three independent experiments. (b)HCT116 cells were transiently transfected with a luciferase reporter plasmid containing 877 bp of the human MMP-3 promoter and a c-JUN expression vector in the presence of 5-aza-dC and/or IL-1. Translational activity of luciferase mRNA in response to each stimulus was quantified as the ratio of luciferase activity to b-galactosidase activity. (c) Expression of Dnmt1 and c-Jun in HCT116 cells following treatment with 5-aza-dC (5 μ M) and IL-1 (10 ng/mL), as determined by Western blot analysis. Actin was used as a loading control. The results represent at least three independent experiments. (d)AP-1-dependent transcriptional activity following treatment with 5-aza-dC and/or IL-1. AP-1-specific translational activity of luciferase mRNA in response to IL-1 and/or 5-aza-dC was quantified as the ratio of luciferase activity to b-galactosidase activity. The results represent at least three independent experiments.

and CEBP-mediated activity, no significant increase in nuclear ETS-dependent activity was observed following treatment of HCT116 cells with 5-aza-dC (Fig. 6b). Although mutations in the consensus sequences of these transcription factors showed that AP-1, ETS and CEBP were all required to obtain maximal MMP-3 promoter activity (Supporting Information), functional deletion of the AP-1-binding sites in the MMP-3 reporter vector completely abolished the ability

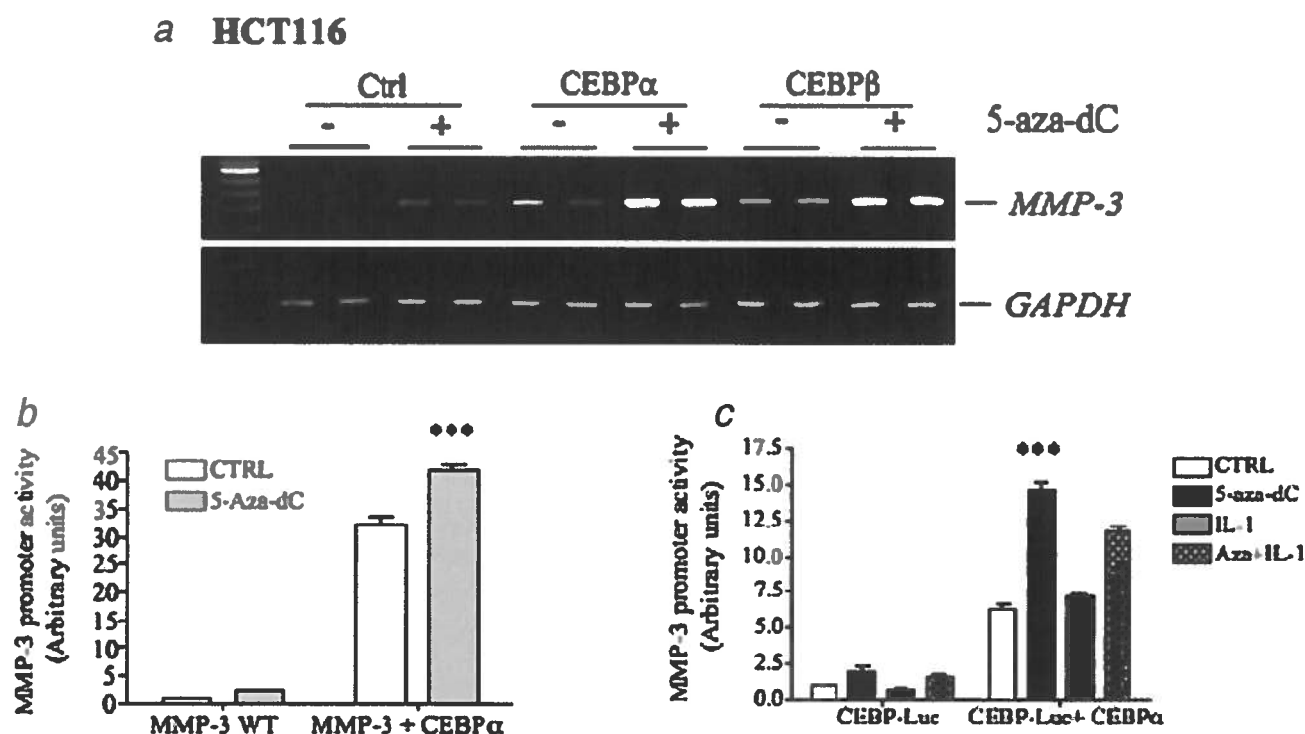


Figure 5. Effect of 5-aza-dC on C/EBP- and ETS-dependent transcriptional activity and MMP-3 gene expression. (a) MMP-3 expression levels in HCT116 determined by RT-PCR analysis following transfection with an expression vector encoding human C/EBP α and C/EBP β isoforms, in the absence or the presence of 5-aza-dC and/or IL-1. GAPDH was used as a loading control. (b) Luciferase activity of a luciferase reporter plasmid containing 877 bp of the human MMP-3 promoter following cotransfection with an expression vector encoding human C/EBP α , in the absence or the presence of 5-aza-dC and/or IL-1. Translational activity of luciferase mRNA in response to each stimulus was quantified as the ratio of luciferase activity to b-galactosidase activity. (c) CEBP α -dependent transcriptional activity following treatment with 5-aza-dC and/or IL-1. Translational activity of luciferase mRNA was quantified as the ratio of luciferase activity to b-galactosidase activity. The results are the average of triplicates and represent at least three independent experiments.

of 5-aza-dC to increase MMP-3 expression (Supporting Information), suggesting that AP-1 plays an essential role in MMP-3 promoter activity in hypomethylated HCT116 cells.

Discussion

In our work, we report that DNA methylation and IL-1 cooperate to induce MMP-3 gene expression. More specifically, we showed that (i) stimulation with IL-1 significantly increased the hypomethylation status of the MMP-3 promoter to a level similar to that found in dnmt1/dnmt3b-deficient DKO cells. This effect was observed in both colon HCT116 carcinoma cells and HeLa cells; (ii) this demethylation correlated with higher constitutive expression of the MMP-3; (iii) increased MMP-3 expression by 5-aza-dC was associated with increased expression and activity of specific transcription factors, including AP-1 and C/EBP and (iv) although ETS, AP-1 and C/EBP all play an important role in MMP-3 expression, they showed distinct abilities to induce MMP-3 and were differentially sensitive to 5-aza-dC. For example, although C/EBP and ETS were capable of inducing MMP-3 alone, de novo expression of AP-1 isoforms required treatment with 5-aza-dC. Taken together, these results pro-

vide evidence that the regulation of MMP-3 gene expression by DNA demethylation induced by 5-aza-dC involves cooperative interactions with IL-1 and specific transcription factors.

Recently, several studies have shown that the demethylation of MMP promoters induced by treatment with 5-aza-dC or by progression of diseases (e.g., osteoarthritis and cancer) plays an important role in MMP gene expression.^{8,9,11–13} Our study provides a novel perspective of the collaborative effect of 5-aza-dC and inflammatory cytokines on MMP-3 gene expression via specific transcriptional pathways. Although our results could not establish whether 5-aza-dC directly affected the ability of these transcription factors to bind the MMP-3 promoter, they suggested that 5-aza-dC acted, at least in part, by increasing the expression and function of these factors. Upregulation of MMP-3 expression by the combining effect of 5-aza-dC was also accelerated. For example, a significant increase in MMP-3 expression was observed within 4–8 hr using both IL-1 and 5-aza-dC when compared to 12–20 hr in cells treated with 5-aza-dC or IL-1 alone. This hypothesis is consistent with previous results showing that increased c-JUN activity is associated with hypomethylation

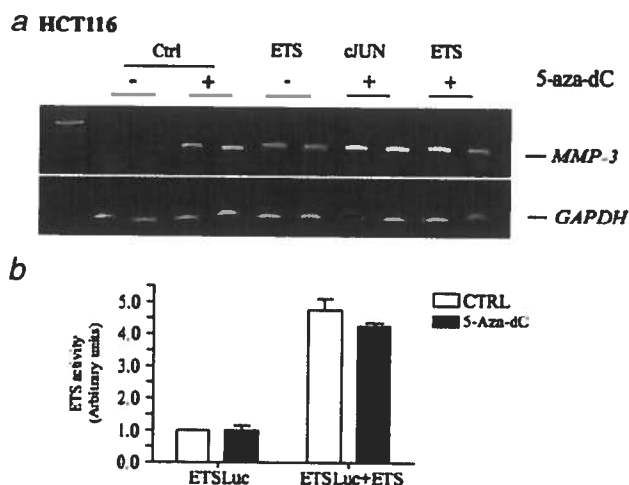


Figure 6. Effect of 5-aza-dC on ETS-dependent transcriptional activity and MMP-3 gene expression. (a) MMP-3 expression in HCT116 after treatment with 5-aza-dC and/or transient transfection of expression vectors encoding c-JUN or ETS2. GAPDH was used as a loading control. (b) ETS-dependent transcriptional activity in HCT116 following treatment with 5-aza-dC. Translational activity of luciferase mRNA was quantified as the ratio of luciferase activity to b-galactosidase activity. The results are the average of triplicates and represent at least three independent experiments.

of the c-JUN promoter in tumor cells. This hypomethylation state has been further associated with increased carcinogenesis. For instance, carcinogenic environmental contaminants induce c-JUN mRNA expression following promoter hypomethylation.²⁴ In fact, the hypomethylation of protooncogenes is one of the first lines of evidence of tumorigenic development associated with epigenetic mechanisms.²⁵

Although the contributions of ETS and AP-1 to MMP-3 gene expression have been previously documented, our data further suggest that C/EBP α plays an important role in the regulation of MMP-3. Although C/EBP-binding sites have been reported in the promoters of several MMP genes, our data provide evidence that C/EBP α and C/EBP β are both strong inducers of MMP-3 transcription activity. This role of C/EBP in MMP-3 gene activation is further supported by our results showing that deletion of a C/EBP consensus site in the MMP-3 promoter significantly reduces its transcriptional activity. It should be noted, however, that we mutated only one of three potential C/EBP-binding sites within the MMP-3 promoter, which may explain the higher residual MMP-3 activity in the C/EBP mutant when compared to cells harboring constructs with mutations in the AP-1- or ETS-binding sites. The determination of whether the other C/EBP consensus sites are functional requires further investigation.

Our results showing that MMP-3 expression correlated with the ability of IL-1 to induce DNA demethylation were initially unexpected. In contrast to 5-aza-dC, we found that IL-1 did not induce DNMT1 degradation. Whether IL-1 induces active demethylation via Gadd45, as suggested by

recent studies, remains a possibility.^{26,27} Nevertheless, our observations are consistent with those of Hashimoto et al., who recently reported changes in DNA methylation in human articular chondrocytes following stimulation with inflammatory cytokines, including IL-1.²⁸ How IL-1 induces demethylation of the MMP-3 promoter is currently being investigated.

Although the clinical use of azacytidine and decitabine has received significant attention, little is known about their molecular mechanisms of action. Nucleoside analogs clearly demonstrate cytotoxicity effects and induce DNA hypomethylation.²⁹ Recent studies have shown that DNA damage response (DDR) is induced by decitabine.³⁰ Interestingly, inflammatory cytokines can also induce DDR, most notably during the cellular senescence process.³¹ Chronic inflammation is associated with aging and plays an important role in many diseases such as cancer, atherosclerosis and osteoarthritis.³² Several factors and signaling pathways can induce establishment of senescence.³³ Among these factors, we found MMP-3, -10 and -1, IL-1, IL-6, IL-8, ICAM-1 and TIMP-2.³⁴ These factors are also called senescence-associated secretory phenotype (SASP). SASP genes, most notably MMP-3 and IL-1, are constitutively expressed in cancer cells because of the senescence induction process. Interestingly, we found that MMP-3 expression is induced and persists in epithelial cells after a 5-aza-dC/IL-1 treatment. Whether other SASP genes are concomitantly induced in HCT116 and HeLa cells remains an interesting possibility.^{35–37} Many genes coding for SASP proteins are physically regrouped in loci of human and mouse genomes, most notably many MMPs (MMP-1, -3, -10 and -12 and other) or members of CXCL and CCL cytokines family. These loci constitute important organization units of chromatin and transcriptional control.³⁸ From a therapeutical point of view, if decitabin (or 5-aza-dC) induces DNA damages/DNA repair along with chronic inflammation, one could envisage that pharmacological agents such as decitabine could be added to stimuli-inducing senescence. This would give a mechanistic explanation by which IL-1 can contribute to demethylate MMP-3 promoter with 5-aza-dC.

Finally, given their ability to induce the expression of tumor suppressor genes, epigenetic drugs such as 5-aza-dC are currently used for the treatment of various forms of cancers.^{39,40} Although MMPs have traditionally been associated with increased aggressiveness, recent studies using genetically engineered MMP-deficient mice have also shown that MMPs may also prevent or inhibit tumor progression.^{41,42} Whether 5-aza-dC may increase this beneficial MMP-dependent antitumoral response or whether its therapeutic efficiency is impaired by protumorigenic activity remains a challenging question.

Acknowledgements

The authors thank Diane Tremblay for her excellent technical support and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript. J.C. is supported by the Canadian Institutes for Health Research.

References

- Pender SL, Croucher PJ, Mascheretti S, Prothero JD, Fisher SA, MacDonald TT, Schreiber S, Ye S. Transmission disequilibrium test of stromelysin-1 gene variation in relation to Crohn's disease. *J Med Genet* 2004;41:e112.
- Zhang Y, Gong LH, Zhang HQ, Du Q, You JF, Tian XX, Fang WG. Extracellular ATP enhances in vitro invasion of prostate cancer cells by activating Rho GTPase and upregulating MMPs expression. *Cancer Lett* 2010;293:189–97.
- Nieminen R, Korhonen R, Moilanen T, Clark AR, Moilanen E. Aurothiomalate inhibits cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 3, and interleukin-6 expression in chondrocytes by increasing MAPK phosphatase 1 expression and decreasing p38 phosphorylation: MAPK phosphatase 1 as a novel target for antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum* 2010; 62:1650–9.
- White AJ, Duffy SJ, Walton AS, Ng JF, Rice GE, Mukherjee S, Shaw JA, Jennings GL, Dart AM, Kingwell BA. Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodelling: implications for unstable coronary disease. *Cardiovasc Res* 2007;75:813–20.
- Auble DT, Brinckerhoff CE. The AP-1 sequence is necessary but not sufficient for phorbol induction of collagenase in fibroblasts. *Biochemistry* 1991;30:4629–35.
- Hui A, Min WX, Tang J, Cruz TF. Inhibition of activator protein 1 activity by paclitaxel suppresses interleukin-1-induced collagenase and stromelysin expression by bovine chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1998;41:869–76.
- Armstrong DA, Phelps LN, Vincenti MP. CCAAT enhancer binding protein-beta regulates matrix metalloproteinase-1 expression in interleukin-1beta-stimulated A549 lung carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:1517–24.
- Chicoine E, Esteve PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:765–72.
- Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342: 1233–9.
- Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, Rabbani SA. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2006;66:9202–10.
- Roach HI, Yamada N, Cheung KS, Tilley S, Clarke NM, Oreffo RO, Kokubun S, Bronner F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 2005;52:3110–24.
- Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:327–30.
- Clark IM, Swingle TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1362–78.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415–28.
- Baillat D, Begue A, Stehelin D, Aumercier M. ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition. *J Biol Chem* 2002;277: 29386–98.
- Pedersen G, Saermark T, Kirkegaard T, Brynkvog J. Spontaneous and cytokine induced expression and activity of matrix metalloproteinases in human colonic epithelium. *Clin Exp Immunol* 2009;155: 257–65.
- Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, Picariello L, Cazzola P, Monteleone G, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT, et al. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut* 2009;58:777–89.
- Quinones S, Saus J, Otani Y, Harris ED, Jr, Kurkinen M. Transcriptional regulation of human stromelysin. *J Biol Chem* 1989;264: 8339–44.
- Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007;211:19–26.
- Westermarck J, Seth A, Kahari VM. Differential regulation of interstitial collagenase (MMP-1) gene expression by ETS transcription factors. *Oncogene* 1997; 14:2651–60.
- Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781–92.
- Hayashida M, Okazaki K, Fukushi J, Sakamoto A, Iwamoto Y. CCAAT/enhancer binding protein beta mediates expression of matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:708–16.
- Luo D, Guerin E, Ludwig MG, Stoll I, Basset P, Anglard P. Transcriptional induction of stromelysin-3 in mesodermal cells is mediated by an upstream CCAAT/enhancer-binding protein element associated with a DNase I-hypersensitive site. *J Biol Chem* 1999;274:37177–85.
- Tao L, Yang S, Xie M, Kramer PM, Pereira MA. Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoted mouse liver tumors. *Cancer Lett* 2000;158:185–93.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33:245–54.
- Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 2009;323: 1074–7.
- Engel N, Tront JS, Erinle T, Nguyen N, Latham KE, Sapienza C, Hoffman B, Liebermann DA. Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice. *Epigenetics* 2009;4:98–9.
- Hashimoto K, Oreffo RO, Gibson MB, Goldring MB, Roach HI. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2009;60: 3303–13.
- Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 2008;123:8–13.
- Luszczek W, Cheriya V, Mekhail TM, Borden EC. Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression. *Mol Cancer Ther* 2010;9: 2309–21.
- Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 2010;16: 238–46.
- Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 2007;128:83–91.
- Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29:273–83.

1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117

34. Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. SASPense and DDRama in cancer and ageing. *Nat Cell Biol* 2009;11:921–3.
35. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996;16:859–67.
36. Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8348–52.
37. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13742–7.
38. Narita M. Cellular senescence and chromatin organisation. *Br J Cancer* 2007; 96:686–91.
39. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002;20: 2429–40.
40. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek

- Regulation of MMP-3 gene expression
- V, Slack J, de Castro C, Ravandi F, Helmer R, III, Shen L, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006;106: 1794–803.
41. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 161–74.
42. Balbin M, Fueyo A, Tester AM, Pendas AM, Pitiot AS, Astudillo A, Overall CM, Shapiro SD, Lopez-Otin C. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* 2003;35:252–7.

Author Proof

CONCLUSION DU CHAPITRE III

Les résultats du présent chapitre suggèrent qu'il existe une collaboration entre la 5-aza-dC et les cytokines inflammatoires sur l'expression de *MMP-3* via des voies transcriptionnelle spécifiques. Même si les résultats n'ont pu établir si la 5-aza-dC affectait directement l'habilité de liaison des facteurs de transcription AP-1, ETS et C/EBP sur le promoteur *MMP-3*, ils suggèrent que 5-aza-dC agit, en partie, en augmentant l'expression et l'activité de ces facteurs. Nos résultats démontrant que l'expression de *MMP-3* corrèle avec l'habilité de l'IL-1 à induire une déméthylation étaient inattendus. À défaut d'inhiber la méthylation via la dégradation de DNMT1, l'IL-1 emprunterait une voie distincte et encore inconnue pour engager la déméthylation. Quoiqu'il en soit, la 5-aza-dC et l'IL-1 activent probablement une voie commune : la machinerie de dommage à l'ADN. Ce mécanisme de défense cellulaire activerait des protéines de réparation de l'ADN qui pourraient faire partie de mécanismes de déméthylation active. La collaboration entre 5-aza-dC et l'IL-1 pour déméthyliser la région proximale du promoteur *MMP-3* pourrait donc être le résultat d'un remplacement de cytosines méthylées en cytosines par les protéines de la réparation de l'ADN. Si la sur-expression de gènes pro-tumoraux comme les *MMP* peut être induite par la 5-aza-dC et par les molécules inflammatoires, il importe donc de tenir compte de plusieurs critères de santé au moment de choisir un traitement avec des inhibiteurs de méthyltransférases lors d'essais cliniques. Un traitement chez des patients atteints de maladies inflammatoires ou plus âgés nécessitera probablement une surveillance accrue ou une autre alternative.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

1- La régulation de l'expression de MMP-3 encore peu explorée

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle des MMP restent encore largement inconnus. L'identification d'un mécanisme épigénétique comme la méthylation de l'ADN ouvre une voie supplémentaire de régulation qui peut s'avérer importante pour d'autres MMP. De plus en plus de résultats démontrent que la méthylation est impliquée dans la régulation de l'expression des MMP dans différents types cellulaires [325-327, 337, 338]. D'ailleurs, la plupart des gènes *MMP* sont regroupés physiquement au niveau du génome, à l'exception de *MMP-9*. Chez l'humain, un groupe de huit gènes *MMP*, incluant dans l'ordre; *MMP-20*, *MMP-27*, *MMP-28*, *MMP-10*, *MMP-1*, *MMP-3*, *MMP-12* et *MMP-13*, a été localisé sur le chromosome 11q 22.3 [412, 413]. Néanmoins, malgré la redondance de leurs fonctions, les patrons d'expression de ces MMP diffèrent dépendamment du type cellulaire. Par exemple, *MMP-20*, aussi appelée énamélysine, est exprimée de façon exclusive et constitutive par les cellules épithéliales dérivées des améloblastes qui sont responsables de la formation de l'émail [414]. Dans le cas de *MMP-8* (collagénase des neutrophiles) son expression est plutôt inductible dans les neutrophiles en maturation [415], alors que dans le cas de *MMP-12* (métalloélastase des macrophages), on la retrouve surtout exprimée dans les macrophages infiltrants [416]. Malgré le fait que certains facteurs de transcription comme c-Jun régulent l'expression de ces MMP, d'autres mécanismes de régulation pourraient expliquer leurs différents patrons d'expression dans chaque type cellulaire. En d'autres mots, bien que les promoteurs de ces MMP partagent plusieurs caractéristiques communes, il est logique de croire que dépendamment de l'environnement et du type cellulaire, chacune de ces MMP possède une régulation qui lui est propre. C'est ce niveau de régulation qui reste encore à clarifier.

Pour ce qui est de *MMP-3*, bien que l'on retrouve plusieurs sites de liaisons pour C/EBP dans la région proximale de son promoteur, nos résultats indiquent que les isoformes C/EBP α et β seraient des régulateurs positifs de son expression. Par une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), il serait éventuellement intéressant de déterminer si la déméthylation du promoteur module la liaison avec C/EBP, de même qu'avec les autres facteurs de transcription comme c-Jun et ETS. Ceci permettrait de confirmer *in vivo* la corrélation entre l'hypométhylation du promoteur *MMP-3* et son

expression plus élevée suite à la liaison des facteurs de transcription. De même, il serait important d'étudier la régulation de l'expression et de l'activité de chacun de ces facteurs de transcription. Par exemple, ETS semble être un facteur de transcription « sous-estimé ». En plus des collaborations fréquentes avec AP-1, ETS est généralement en compétition avec d'autres membres de sa propre famille. C'est le cas du facteur TEL (Translocation-ETS-Leukemia) puisque TEL peut se lier aux mêmes sites consensus que ETS pour diminuer l'expression de MMP-3. De plus, TEL s'associe avec les protéines de remodelage de la chromatine HDAC-3, mSin3A et N-coR. Il a d'ailleurs été déjà démontré, par ChIP, que l'expression de TEL altère les patrons d'acétylation d'histone H3 près des sites de liaison pour TEL/ETS sur le promoteur MMP-3 dans les cellules NIH-3T3 [155].

Dans une expérience indépendante, des chercheurs ont démontré que ETS et Pax5 s'associent pour réguler le promoteur *mb-1* dans les cellules B. Dans ces études, les chercheurs démontrent qu'un seul CpG, localisé dans le promoteur, empêche l'assemblage et la liaison du complexe ETS/Pax5. Ce CpG méthylé semble contribuer à la diminution de l'expression du gène *mb-1* [417]. Ces résultats appuient donc la possibilité que les CpG localisés dans le promoteur de MMP-3, malgré leur faible quantité, puissent changer la structure de la chromatine et affecter l'expression de *MMP-3*, démontrant davantage la complexité de la régulation du promoteur dans le temps et dans l'espace. En fait, plusieurs facteurs de transcription sont connus pour lier des séquences consensus contenant un ou des dinucléotides CpG, notamment AP-2, HIF-1 α et c-Myc. Dans plusieurs cas, il a été démontré que ces facteurs ne peuvent se lier à leur séquence consensus si les CpG sont méthylés [418-420]. Un autre exemple provient des expériences de Qiang et ses collègues dans des neurones de souris [421]. Dans leurs expériences sur l'effet de l'hypométhylation de certaines régions dans le promoteur d'un gène important pour les communications neuronales (NR2B) suite à une exposition à l'alcool, ils démontrent d'abord par EMSA et ChIP, qu'un dinucléotide CpG méthylé à l'intérieur du site consensus de CREB affecte la liaison de ce facteur et l'activité du gène NR2B. Inversement, la déméthylation de ce CG augmente la liaison du facteur et l'activité transcriptionnelle de NR2B. Ces résultats illustrent, du moins dans certains cas, le rôle direct de la méthylation de l'ADN dans l'accessibilité des sites de liaison

pour les facteurs de transcription. Un autre exemple connu et souvent cité est le facteur de transcription Sp-1 [422]. Des expériences ont démontré que les protéines de liaison à l'ADN méthylé MBD1, MBD2 et MeCP2 contribuent à empêcher l'accès de Sp-1 à son site consensus. Dans une autre expérience, des chercheurs démontrent par ChIP que la liaison de MeCP2 sur un dinucléotides CpG méthylé dans le promoteur de l'insuline, empêche la liaison d'un facteur de transcription, ATF2, situé près de ce CG mais ne faisant pas partie du site de liaison de ce facteur [423]. Ces résultats suggèrent donc que des CpG situés non pas à l'intérieur du site consensus mais près de ceux-ci peuvent affecter la liaison de facteurs de transcription ne possédant pas de CG dans leur séquence consensus et que la liaison de protéines spécifiques à la méthylation peut compétitionner pour empêcher la liaison des facteurs de transcription. De plus, il est déjà connu que des protéines comme MeCP2 recrutent des HDAC pour maintenir la chromatine dans une forme compacte et inaccessible.

Au moins un autre régulateur transcriptionnel mérite une attention particulière quant à l'induction de l'expression de MMP-3, à plus forte raison dans le contexte de l'inflammation, soit NF- κ B, un facteur de transcription clé dans la réponse inflammatoire. Les cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et TNF α induisent la cascade d'activation de NF- κ B [424]. Aucun site consensus pour NF- κ B n'a été identifié dans la région proximale du promoteur MMP-3. Toutefois, dans les tissus gingivaux humains, le site polymorphique 5T/6T, à environ 1600 paires de bases en amont du site d'initiation de transcription, répond à la stimulation par l'IL-1 en impliquant la liaison de NF- κ B à cet endroit [146]. Dépendamment du nombre de T et de la combinaison des sous-unités formant NF- κ B, ce dernier est en mesure de réguler l'expression de MMP-3. De plus, des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de certaines histones et les microARN, sont impliqués dans la régulation de NF- κ B [425, 426]. Par exemple, une étude a démontré que la sous-unité RelA du complexe NF- κ B est méthylée sur les lysines 314 et 315 dans l'histone H3 par la méthylase Set9 suite à l'induction par TNF α . Cette méthylation conduit à la dégradation de RelA au protéasome et à la diminution de l'expression de NF- κ B [425]. D'autres expériences démontrent que l'expression de NF- κ B1 peut être négativement régulée par miR-9 dans des adénocarcinomes gastriques [424]. Une construction d'un plus long promoteur

MMP-3, couvrant cette région, permettrait d'étudier cet aspect dans la régulation du promoteur. La régulation d'autres CpG, dont deux sont localisés dans cette région éloignée, pourrait être impliquée dans la réponse inflammatoire et/ou épigénétique de MMP-3. Dans le contexte de nos expériences réalisées dans ce projet, il serait ainsi possible de connaître les réponses des facteurs situés plus loin dans le promoteur MMP-3 suite à une hypométhylation, une sur-expression de certains facteurs (i.e : CEBP et NF- κ B) et à une induction par l'IL-1. L'état de méthylation de cette région pourrait être également évalué par conversion au bisulfite de manière à vérifier s'il existe une corrélation entre la liaison de ces facteurs de transcription une hypométhylation du promoteur.

2- La régulation de MMP-3 et la spécificité cellulaire

Nos travaux ont clairement démontré que l'expression de MMP-3 diffère selon le type cellulaire ou plus spécifiquement, selon le type ou le stade de progression du cancer. Dans certaines cellules de cancer du sein analysées, l'inhibiteur de méthylation 5-aza-dC n'induit pas nécessairement l'expression de MMP-3. En fait, dans la lignée de cancer du sein non métastatique MCF-7, 5-aza-dC induit MMP-9 mais pas MMP-3. Au contraire, dans une lignée agressive comme MDA-MB-231, une induction dose-dépendante de MMP-3, mais pas de MMP-9, est observée suite au traitement avec 5-aza-dC (**Annexe E**). Pour ce qui est de la dose utilisée tout au long des expériences (5 μ M pour la plupart), cette dose a été choisie parce que le Dr. Vogelstein, généreux donateur de la lignée HCT116, a réalisé lui-même ses expériences avec cette dose [427]. Il est à noter que les cellules épithéliales utilisées dans nos expériences ont toutes bien répondu à cette dose. Elles ne démontraient que très peu de mort cellulaire et une faible diminution de la croissance cellulaire, particulièrement pour les cellules HeLa. De plus, les lymphomes B Raji et RAMOS ont également bien répondu. Les cellules plus sensibles au traitement à la 5-aza-dC furent les lymphomes T (164T2) dont les résultats ne sont pas présentés dans cette thèse. La dose de 5-aza-dC pour ces cellules ne dépassait pas 1 μ M.

Une expérience intéressante a récemment été effectuée dans les deux lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7. Les chercheurs ont exploré les

différences de régulation dans le promoteur de l'IL-6 entre les cellules non métastatiques MCF-7 et la lignée hautement agressive MDA-MB-231 [428]. D'abord, par des expériences de ChIP, l'équipe démontre que le promoteur de l'IL-6 est plus accessible dans les cellules MDA-MB-231. Ils notent l'acétylation de certaines histones et la diméthylation de la lysine 9 sur l'histone H3 (H3K9) du promoteur de l'IL-6 dans ces cellules. À l'inverse, la chromatine dans la même région du promoteur de l'IL-6 est plus compacte et il n'y a pas de diméthylation de H3K9 dans les MCF-7. Leurs expériences de ChIP démontrent également qu'un enrichissement de la sous-unité p65 de NF- κ B et de la protéine c-Jun sur le promoteur de l'IL-6 coïncide avec l'augmentation de l'expression de l'IL-6 dans les MDA-MB-231, comparativement aux cellules MCF-7. À noter que la collaboration entre NF- κ B et AP-1 dans l'expression constitutive de l'IL-6 a déjà été démontrée dans des cancers agressifs variés [77, 429-432]. D'autres expériences ont déjà démontré que c-Jun peut contrôler les modifications des histones, le recrutement de NF- κ B et la fonction de l'ARN polymérase II pour activer le gène *cc12* [433]. De façon plus précise, Ndlovu et ses collègues ont démontré que l'accessibilité était restreinte dans la région proximale du promoteur de l'IL-6 où l'on retrouve les sites de liaison pour AP-1, CREB-C/EBP et NF- κ B dans les MCF-7, comparativement aux cellules MDA-MB-231. Suite à des stimulations par le TNF α , la réponse du promoteur de l'IL-6 est plus élevée et constitutive dans les cellules métastatiques MDA-MB-231 due à l'accessibilité de cette région proximale du promoteur. Ils démontrent également que AP-1 et NF- κ B sont capables d'induire des changements localisés de la structure de la chromatine dans le promoteur de l'IL-6. De plus, la sur-expression de AP-1 dans les cellules MCF-7 démontre clairement l'augmentation de l'accessibilité de la chromatine dans le promoteur de l'IL-6. En corrélation avec ces résultats, d'autres expériences démontrent que la liaison de AP-1 à son site consensus dans un nucléosome, engage une perturbation de la structure nucléosomale et est suffisante pour faciliter la liaison d'un second facteur de transcription [434, 435]. Certaines possibilités ressortent de ces expériences :

- 1) Étant donné la collaboration entre AP-1, ETS, C/EBP et NF- κ B, il est possible qu'in de ces facteurs, notamment AP-1, puissent augmenter l'accessibilité de la région proximale du promoteur MMP-3 dans les cellules HCT116 et HeLa. Ceci expliquerait

l'augmentation de l'expression de MMP-3 lorsque ces facteurs de transcription sont sur-exprimés, ou lorsque leur expression est augmentée par l'IL-1 (**chapitre III**). De plus, il semble que la disponibilité de c-jun soit augmentée de façon synergique lorsque l'on traite les cellules HCT116 avec 5-aza-dC et IL-1. L'activité AP-1, quant à elle, ne semble être affectée que par le traitement avec 5-aza-dC (**chapitre III, figure 4c et d**). Dans la figure 4c (p.76), l'expression protéique de DNMT1 est utilisée comme témoin de l'inhibition de la méthylation par 5-aza-dC. Cette vérification fut effectuée pour la plupart des expérimentations entreprises au cours de mon doctorat mais n'est pas systématiquement montrée à chaque fois. La figure 4a démontre qu'il existe une induction synergique de l'expression de MMP-3 suite à un traitement avec 5-aza-dC et IL-1 ou 5-aza-dC et c-jun. Il ne semble pas y avoir cette synergie si les trois inducteurs sont testés simultanément. Cependant, une saturation de l'expression de MMP-3 peut-être responsable de cet effet. Il serait intéressant de confirmer cette induction en qPCR. Les résultats de la figure 4b démontrent que l'état hypométhylé des cellules HCT116 induit une plus grande activité du promoteur MMP-3 et cette induction se ferait avec un facteur se situant entre +11 et -866 en amont du site d'initiation de la transcription. La réponse « négative » via l'induction par IL-1 pourrait s'expliquer par le fait que le site de réponse à l'IL-1 sur le promoteur MMP-3 se situe beaucoup plus loin (soit -1600pb en amont du site d'initiation). De plus, l'effet de méthylation sur la construction plasmidique ne peut être évaluée, contrairement aux résultats obtenus par PCR ou western blot qui démontrent l'expression endogène de MMP-3

2) Ces résultats pourraient également expliquer les différences d'expression de MMP-3 dans les MCF-7 et les MDA-MB-231 suite à l'incorporation de 5-aza-dC. D'autant plus que la sur-expression de c-Jun dans les MCF-7 est nécessaire pour induire l'expression de MMP-3 (**Annexe E**).

L'étude de la régulation transcriptionnelle dans les cellules de cancer du sein est donc une voie intéressante entre autre parce que l'expression élevée de MMP-3 est détectée dans plusieurs échantillons de tissus de carcinomes mammaires comparés aux tissus normaux (**Annexe D**).

Les différences dans les patrons d'expressions de MMP-3 sont également observées dans les cellules de lymphomes. L'enzyme hautement homologue, MMP-10,

est induite de façon dose-dépendante dans ces cellules. Les leucémies sont des cancers encore très difficiles à traiter. On estime qu'en 2010, il y aura 7500 nouveaux cas de lymphomes non Hodgkiniens au Canada (<http://www.nhlcyberfamily.org/statistics.htm>). Jusqu'à ce jour, aucun traitement efficace n'a été développé pour contrer le mauvais pronostic de cette maladie. Les recherches en sont encore à l'identification de signes précoces déclenchant le développement d'au moins trente différents types de lymphomes non Hodgkiniens. Depuis longtemps, les MMP ont été identifiées comme étant des enzymes augmentant le pouvoir métastatique de ce type de cancer [436]. Les résultats préliminaires obtenus suite à une stimulation des modèles cellulaires RAJI et RAMOS par la 5-aza-dC démontrent que MMP-10 est induite de façon dose-dépendante mais pas MMP-3. De plus, une co-stimulation 5-aza-dC avec sur-expression de c-Jun n'a pas réussi, contrairement aux HCT116, à induire l'expression de MMP-3 (**Annexe F**). En revanche, l'expression de MMP-10 est induite de façon synergique par ce même traitement. Or, une analyse du statut de méthylation du promoteur MMP-3 dans les cellules RAJI démontre que les premiers CpG sont hautement méthylés. Malgré tout, il semble que l'inhibition de la méthylation ne soit pas suffisante pour induire l'expression de MMP-3. Afin d'expliquer cette réponse, qui semble être spécifique au type cellulaire (lymphomes versus cellules épithéliales), il serait important d'étudier et de comparer d'abord les patrons de méthylation des deux stromélysines pourtant hautement homologues en séquence et localisées dans la même région du chromosome avec d'autres gènes codant pour les MMP (voir plus haut). Donc, comme 5-aza-dC n'induit pas MMP-3, il semble que l'induction de MMP-10 par cet inhibiteur soit le reflet d'une réponse localisée. L'accessibilité du promoteur MMP-3 semble très restreinte et suggère que des facteurs supplémentaires soient nécessaires pour générer une induction de l'expression de MMP-3 (les inhibiteurs d'histones déacétylases par exemple). Comme le facteur de transcription TEL est un régulateur négatif de MMP-3 et que ce même facteur recrute des protéines du remodelage de la chromatine [155], le facteur de transcription ETS pourrait être un compétiteur intéressant à évaluer pour induire l'expression de MMP-3 dans les lymphomes. De plus, les cytokines inflammatoires n'ont pas encore été analysées dans ces lignées cellulaires quant à l'induction de l'expression de MMP-3 et la déméthylation de son promoteur. Dans notre laboratoire, il

a déjà été démontré qu'un contact avec les cellules endothéliales était requis pour induire l'expression de MMP-3 dans le lymphome [66]. La déméthylation du promoteur de MMP-3 dans un type cellulaire tel que les lymphomes nécessiterait peut-être un contact avec l'environnement stromal adjacent afin d'induire son expression. Finalement, des inhibiteurs supplémentaires, tels que les inhibiteurs d'histones déacétylases sont peut-être nécessaires pour favoriser la liaison de facteurs de transcription et conséquemment l'induction de l'expression de MMP-3. Ces expériences permettraient donc d'approfondir les mécanismes fondamentaux de régulation de l'expression transcriptionnelle de MMP-3 dans les différents environnements cellulaires.

3- Les voies possibles de déméthylation de l'ADN

Même si une enzyme de déméthylation spécifique n'a pas été encore identifiée, la déméthylation de l'ADN pourrait être passive et/ou active. La déméthylation passive se produit parce que les méthyltransférases de maintenance sont inactives (ou inhibées) durant le cycle cellulaire suivant la réplication de l'ADN. Le brin nouvellement synthétisé demeure donc dans un état déméthylé. La déméthylation active de l'ADN, quant à elle, impliquerait une ou plusieurs enzymes et se produirait indépendamment de la réplication de l'ADN [437]. L'identité de ces enzymes engageant la déméthylation active de l'ADN est restée nébuleuse pendant de nombreuses années. Récemment, toutefois, certaines recherches chez les plantes ont démontré qu'une sous-famille de glycosylases de l'ADN pourrait effacer un profil de méthylation par l'entremise de la voie de réparation de l'ADN par excision de bases [438]. Cette sous-famille de glycosylases serait donc responsable, du moins dans certains cas, de la déméthylation de l'ADN. Des études suggèrent qu'une déméthylation active de l'ADN chez les mammifères pourrait également se produire via la voie de réparation de l'ADN [439]. Il semble cependant que la cytosine méthylée soit d'abord convertie en thymine par désamination avant que la glycosylase agisse. Une déméthylation active de l'ADN pourrait ainsi se produire par désamination enzymatique d'une cytosine méthylée en thymine, suivie d'une réparation du mismatch G/T par les glycosylases de l'ADN [440]. Récemment, des chercheurs ont proposé que dans les cellules de cancer du sein humain en culture, DNMT3a et DNMT3b peuvent convertir la 5^{me}C en T par désamination. La

thymine est ensuite enlevée via la voie de réparation de l'ADN par excision de base [441]. Malgré un besoin d'approfondir ces études, DNMT3a et DNMT3b sont capables d'interagir avec les glycosylases de l'ADN [442, 443]. Cette interaction pourrait expliquer l'activité de désamination provenant des DNMT3 ou alternativement, cette interaction pourrait simplement permettre à la glycosylase de réparation d'être recrutée sur les cytosines méthylées afin de prévenir des mutations C-T causées par une désamination spontanée des 5^{me}C.

Une autre possibilité de voie de déméthylation pourrait être par déméthylation oxydative. Une 5^{me}C peut être convertie en 5-hydroxyméthylcytosine (5^{hme}C) par oxydation. Des bases 5^{hme}C ont récemment été identifiées dans les cellules souches de mammifères, les neurones de Purkinje et le cerveau [445, 446]. TET1, une enzyme dépendante du fer, peut catalyser la conversion 5^{me}C en 5^{hme}C dans les cellules en culture et *in vitro* [446]. La 5^{hme}C pourrait ensuite être convertie en cytosine par réparation de bases via les glycosylases de l'ADN telles que MBD4 (Methyl-CpG binding domain protein 4) ou TDG (Thymine DNA glycosylase), ou encore par un mécanisme inconnu. La 5^{hme}C pourrait également faciliter la déméthylation passive parce qu'elle n'est plus reconnue par DNMT1.

Nous avons effectué récemment des expériences préliminaires afin d'étudier l'implication possible de TET1 dans les cellules HeLa (**Annexe G**). Nos résultats ont démontré que de 8h à 12h après stimulation avec l'IL-1, combiné à la 5-aza-dC, les niveaux protéiques de TET1 augmentent. L'oxydation des cytosines suivie d'une réparation par les glycosylases pourrait peut-être expliquer le statut presque totalement déméthylé du promoteur MMP-3 dans ces cellules. Il faudrait donc évaluer l'expression des glycosylases, par exemple, MBD4 ou TDG, suite à une stimulation dans différents types cellulaires. De plus, une sur-expression de TET1 dans les cellules HCT116 ou HeLa suivie d'une conversion au bisulfite de sodium permettrait de vérifier si l'augmentation de l'expression de TET1 corrèle avec la diminution de la méthylation du promoteur MMP-3. Dans leurs expériences, Tahiliani et ses collègues utilisent un anticorps dirigé contre 5^{me}C et la microscopie confocale pour quantifier les cytosines méthylées. Des digestions d'ADNg et la chromatographie par couche mince permettent ensuite de différencier les 5^{me}C des 5^{hme}C suite à la transfection de TET1 dans les

cellules 293 [446]. Il serait possible d'évaluer ces différences dans les cytosines suite à une induction par l'IL-1 et établir un lien entre l'IL-1 et l'augmentation des 5^{hm}C.

Selon des études récentes, une autre voie par laquelle IL-1 pourrait engager une déméthylation serait via Gadd45a (Growth arrest and DNA-damage inducible protein 45 alpha), une petite protéine nucléaire induite par stress cellulaire et des cytokines inflammatoires (notamment l'IL-1) [447, 448]. Gadd45a pourrait en effet promouvoir la déméthylation de l'ADN [449]. Dans des expériences, la transfection de Gadd45a dans des cellules en culture a conduit à la déméthylation de vecteurs rapporteurs méthylés et de gènes endogènes. Une réduction globale de la méthylation de l'ADN dans les cellules transfectées a été observée, suggérant un rôle pour Gadd45a dans la déméthylation globale du génome. La délétion de Gadd45a et Gadd45b par petits ARN interférants a également permis d'observer une hyperméthylation associée à une inactivation de gènes. Il a également été démontré que Gadd45 interagit avec l'exonucléase de réparation par excision nucléotidique XPG [449]. Toutefois, une expérience indépendante n'a pas réussi à déterminer le rôle fonctionnel de Gadd45a dans la déméthylation de l'ADN [450]. De plus, une hyperméthylation globale ou locus-spécifique n'a pu être observée dans les souris Gadd45a-déficientes [451]. Comme l'expression de Gadd45a peut être induite par les cytokines inflammatoires et la voie du stress cellulaire, il est possible que cette dernière emprunte la voie de Gadd45a pour déméthyliser le promoteur de MMP-3. Une évaluation de l'expression de Gadd45a dans les cellules HCT116 et HeLa pourrait ainsi confirmer le rôle de Gadd45a ou une autre enzyme de réparation de l'ADN dans la déméthylation active de l'ADN. Quoiqu'il en soit, Gadd45a reste un gène candidat à étudier dans son rôle possible de déméthylation du promoteur MMP-3 via l'induction par l'IL-1. Il serait possible, par exemple, de vérifier l'expression de Gadd45a dans les différents types cellulaires suite aux différents traitements (via la 5-aza-dC et l'IL-1). Il a déjà été démontré que l'IL-1 induit l'expression de Gadd45a dans les kératinocytes humains [448]. Il a également déjà été rapporté que l'inflammation était capable d'activer la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN via la voie du stress oxydatif [373, 452-453]. Par exemple, des chercheurs ont démontré que l'expression de certains gènes de la réparation de l'ADN était induite dans des cellules de foies fibrotiques et cirrhotiques [455]. Parmi ces gènes

ont retrouvait notamment certaines enzymes de réparation de l'ADN par excision de nucléotide (*XPA*, *RAD23A*, *ERCC1* et *ERCC3*). Des expériences de sur-expression/inhibitions pourraient confirmer l'implication de ces protéines dans le processus de déméthylation du promoteur MMP-3.

Nos observations d'une déméthylation par l'IL-1 ont récemment été rapportées dans une expérience indépendante. Hashimoto et ses collègues ont comparé le statut de méthylation du promoteur humain de l'IL-1 β entre les chondrocytes normaux et après un long traitement de ces chondrocytes articulaires avec des cytokines inflammatoires. Leurs résultats démontrent qu'une stimulation à long terme par les cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 diminue le statut de méthylation de certains CpG sur le promoteur de l'IL-1. Ils observent également cette baisse de méthylation dans des échantillons de tissus provenant de patients atteints d'ostéoarthrite. Or, l'exposition à long terme à l'IL-1 corrèle avec une expression persistante de MMP-3 et MMP-13 [456]. L'évaluation des statuts de méthylation de ces MMP serait donc intéressante à réalisée dans ces cellules et ces tissus.

4 Modèle hypothétique de la déméthylation du promoteur MMP-3 par l'IL-1

Malgré l'intérêt qu'apportent l'azacytidine et la decitabine, on en connaît très peu sur le mode d'action moléculaire de ces agents. Il est clair que les analogues de nucléosides ont des effets cytotoxiques et qu'ils peuvent causer une déméthylation de l'ADN, mais leurs réponses cliniques respectives n'ont pas encore été établies [361]. Comprendre les caractéristiques de ces drogues sera donc critique pour définir les modes d'action et pour le développement de challenges cliniques futurs. L'identification de gènes hyperméthylés qui deviennent déméthylés et réactivés par le traitement ainsi que l'établissement d'association statistiquement significatives entre les événements de réactivation épigénétique et les réponses des patients devraient être des critères importants d'évaluations futures. Il est également important d'être prudent dans le cas d'une déméthylation continue à cause de l'augmentation illégitime d'événements transcriptionnels. Des modèles de souris avec de fortes et permanentes réductions de la méthylation de l'ADN présentent une amplification génétique et une activation d'insertion de loci oncogéniques [361]. Des récentes études ont également permis

d'éclaircir certaines informations sur l'induction de la réponse au dommage à l'ADN par la décitabine [371]. Il a été démontré que la décitabine cause la formation de cassures double-brin dans les lignées de cancers humains et que DNMT1 pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse cellulaire au dommage à l'ADN. L'induction de dommage par la décitabine, combiné avec un rôle de DNMT1 dans la réparation de l'ADN indiquent que les patrons de déméthylation induits par la drogue pourraient être influencés par des mécanismes de réparation de l'ADN [372].

La découverte de nouveaux régulateurs transcriptionnels de MMP-3 tels que la méthylation de l'ADN et l'hypométhylation du promoteur via l'IL-1, ouvre la porte sur d'autres mécanismes possibles de régulation. Ces mécanismes potentiels encore inconnus peuvent réguler MMP-3 mais, compte tenu de la similitude et de la redondance des MMP, l'étude de la régulation de chacune de ces enzymes demeure importante. La découverte que l'IL-1 peut s'associer avec 5-aza-dC pour démétyler le promoteur MMP-3 ajoute un problème supplémentaire au traitement des cancers avec tumeurs solides. Les analogues de pyrimidine sont utilisés dans le but de réactiver les gènes *in vitro* et *in vivo*. Même si la capacité anti-leucémique de la décitabine est connue depuis près de 40 ans, son potentiel thérapeutique demeure sous investigation. De nombreux challenges cliniques ont démontré une activité positive à faibles doses de décitabine pour le traitement des MDS, les AML et les hémoglobinopathologies, tandis que son efficacité dans le traitement de tumeurs solides est limitée. Les réponses cliniques semblent être induite par des altérations épigénétiques et l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire. Les essais cliniques récents tentent de développer un nouveau dosage, des nouvelles routes d'administration et des combinaisons de décitabine avec d'autres agents, incluant les inhibiteurs d'histones déacétylases [361]. Comprendre le mode d'action des azanucléosides devrait constituer une priorité au niveau moléculaire et clinique. Il sera important d'identifier et valider les biomarqueurs qui prédiront la réponse du patient. Dépendamment de leur association avec la régulation épigénétique (i.e : déméthylation des marqueurs spécifiques) ou de l'induction de l'apoptose ou sénescence (i.e : activation de signalisation DDR), ces biomarqueurs peuvent fournir des détails concernant les voies cellulaires qui sont influencées par les azanucléosides. De façon similaire, déterminer les mécanismes de résistance et la sensibilité aux

azanucléosides permettra ultimement de mieux comprendre le(s) modes d'action(s) et faciliter le développement de marqueurs moléculaires permettant d'établir une prédiction de la réponse d'un patient en traitement.

Les cytokines inflammatoires sont également connues pour induire la réponse aux dommages à l'ADN, en particulier durant le processus de sénescence cellulaire [373]. L'inflammation chronique est d'ailleurs associée au vieillissement et joue un rôle important dans plusieurs maladies comme le cancer, l'athérosclérose et l'ostéoarthrite [374]. Les cellules sénescents peuvent altérer le micro-environnement aussi longtemps qu'elles persisteront. Les gènes SASP, notamment *MMP-3* et *IL-1*, pourraient être constitutivement exprimés dans des cellules cancéreuses ou adjacentes à la tumeur due à l'induction du processus de sénescence. Nos résultats indiquent d'ailleurs que l'expression de *MMP-3* peut être induite et persister dans les cellules épithéliales de cancers du colon et cervical suite au traitement avec l'IL-1 et 5-aza-dC. Il serait intéressant de vérifier l'expression de gènes induits par sénescence dans les cellules HCT116 et HeLa. Par exemple, il a été démontré que dans les cellules sénescents il y a induction et activation des gènes *p53*, *p21* et *p16* [457-461]. Paradoxalement, ces gènes sont des cibles de l'agent 5-aza-dC.

Les protéines SASP peuvent avoir des effets bénéfiques mais aussi dévastateurs si elles ne sont pas contrôlées. Les cellules sénescents peuvent perturber la structure des tissus normaux et la fonction des glandes mammaires dans les cellules en culture [378], accélérer l'invasion des cellules transformées (essai chambre Boyden) via la transition endothélial-mésenchymal [385], stimuler l'invasion des cellules endothéliales (essai chambre Boyden) et l'angiogenèse dans un modèle de xénogreffe [395] et promouvoir la prolifération des cellules épithéliales malignes dans les cellules en culture et *in vivo* [396, 397]. De plus, les cellules endothéliales sénescents et les fibroblastes sont souvent trouvées adjacentes aux tumeurs malignes chez l'humain [398, 399], et les cellules tumorales peuvent elles-mêmes entrer en sénescence *in vivo* chez les patients traités par des agents chimiothérapeutiques endommageant l'ADN ou chez les souris forcées d'exprimer le suppresseur de tumeur *p53* [385, 400].

Nos résultats ont également démontré que l'expression de *MMP-3* est induite et constitutive suite à la sur-expression de c-Jun et C/EBP. Cette induction d'expression

est encore plus élevée lorsque l'on combine la sur-expression des facteurs de transcription avec la 5-aza-dC. La plupart des protéines SASP sont induites au niveau de l'ARNm [385] et l'augmentation des niveaux d'ARNm dépend de NF- κ B et C/EBP β , qui augmentent l'activité des cellules sénescents [403]. Il semble que la réponse des SASP soient induite par un stress génotoxique plutôt qu'un arrêt de la prolifération (i.e : les inducteurs génotoxiques comme les radiations ionisantes, l'hyperprolifération causée par un oncogène ou des télomères dysfonctionnels) [385, 401]. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et d'autres protéines de DDR sont requis pour l'expression des facteurs SASP, incluant les cytokines inflammatoires [401]. La DDR est une cascade d'amplification de signaux qui détecte le dommage, induit l'arrêt du cycle cellulaire et initie la machinerie de réparation de l'ADN. Si ce dommage est trop grave, les cellules engageront l'apoptose ou la sénescence, dépendamment du type cellulaire et/ou de la gravité du dommage. Dans le cas d'une sénescence, il y a arrêt de la croissance cellulaire et maintien de signalisation DDR chronique [462]. La réponse DDR n'est pas le seul régulateur de la voie SASP puisque cette réponse est activée immédiatement après un dommage. Or, la voie SASP se développe lentement, généralement après plusieurs jours suivant le stress génotoxique [385, 401]. La voie p38MAPK a été suggérée comme étant un régulateur accessoire de SASP. Par exemple, il a été démontré que l'inhibition de p38MAPK réduit l'expression de l'IL-8 dans les cellules en sénescence [403] et qu'une activation constitutive de p38MAPK est suffisante pour induire l'arrêt de croissance par sénescence via l'activation de p53 et p16 [404-406]

Même si les SASP sont régulées partiellement par l'activation des facteurs de transcription, le profil d'expression global des gènes acquis à la sénescence entraîne probablement des changements dans la conformation de la chromatine, qui est caractéristique des cellules en sénescence [407-411]. Plusieurs gènes codant pour les protéines SASP, tout comme plusieurs gènes MMP et cytokines, sont physiquement regroupés dans les loci des génomes humain et de souris. Ces loci constituent des unités d'organisation importantes de la chromatine et de contrôle transcriptionnel [411]. Globalement, si la décitabine cause des dommages à l'ADN et induit la machinerie de réparation et que l'inflammation chronique est un autre stimulus causant la sénescence

des cellules et l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, il semble que des agents pharmacologiques comme la décitabine pourrait être ajoutés aux stimuli induisant la cascade menant à la sénescence. Si ce lien est établi, il pourrait ajouter une explication mécanistique par laquelle l'IL-1 peut contribuer à démétyler le promoteur de MMP-3 (**Figure 10**).

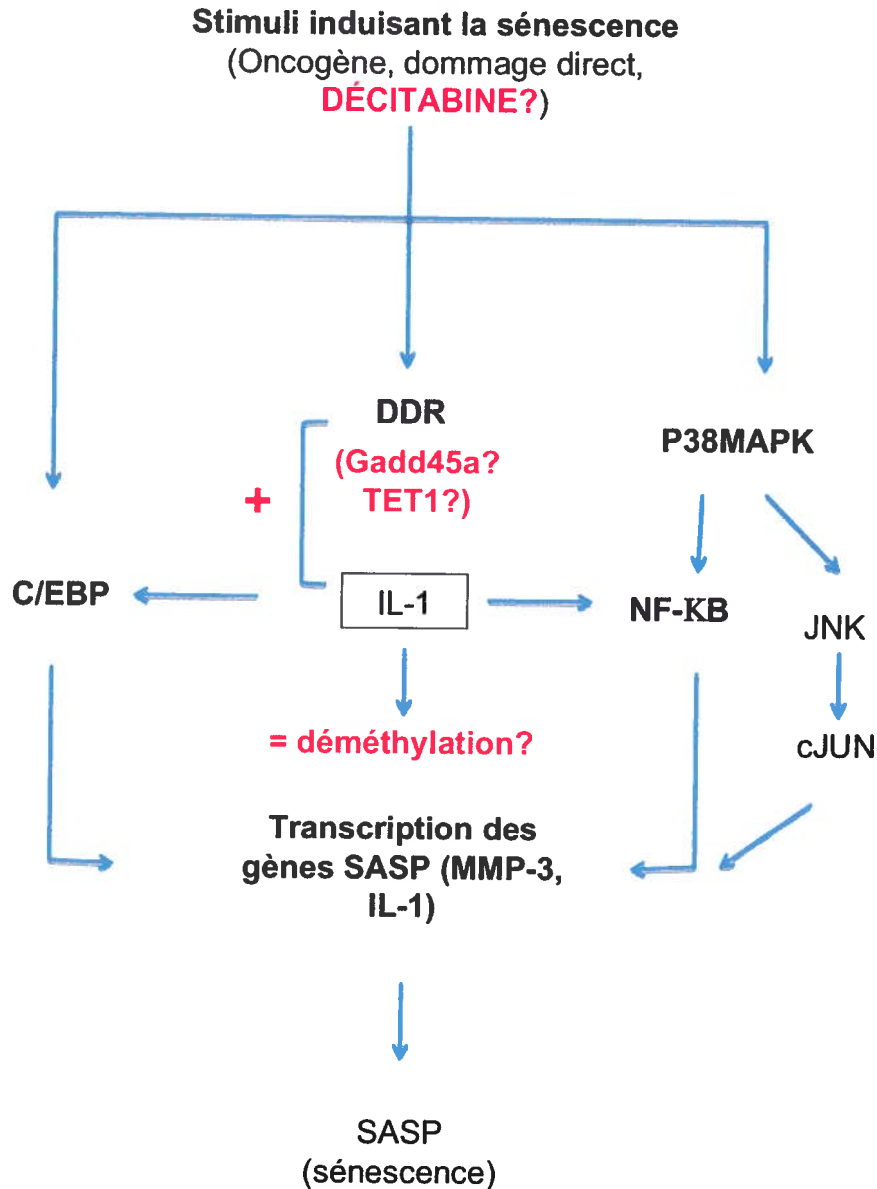


Figure 10 : Modèle de l'implication de l'IL-1 dans la déméthylation du promoteur MMP-3.

Un stimulus causant un stress génotoxique comme la décitabine (i.e : dommage à l'ADN, perturbation de la chromatine) active la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et la voie des p38MAPK. La réponse DDR engage également la machinerie de réparation de l'ADN qui inclut Gadd45a et possiblement TET1. Ces dernières pourraient peut-être contribuer à déméthyliser les promoteurs de gènes comme l'IL-1 et MMP-3. La sur-expression de ces gènes induite par les facteurs de transcription incluant C/EBP, NF-κB et cJUN, contribue à augmenter d'avantage la production de ces gènes. L'expression constitutive conduit au développement de l'inflammation chronique des cellules et de l'induction de la sénescence et du maintien des réponses aux dommages à l'ADN. Les informations en rouge indiquent l'ajout hypothétique de ces éléments dans la voie menant à la sénescence.

CHAPITRE V

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats du présent travail présentent l'impact de l'hypométhylation sur les patrons d'expression des MMP, principalement *MMP-3*, spécifiques aux tissus. Les résultats démontrent également que plusieurs facteurs de transcription travaillent de concert pour augmenter l'expression de *MMP-3*. L'état hypométhylé accentue encore plus la réponse de *MMP-3* à des stimuli comme les facteurs de transcription AP-1, ETS et C/EBP et une cytokine inflammatoire, l'IL-1. Les résultats obtenus via la stimulation par l'IL-1 et l'agent déméthylant demeurent des plus intéressants, ils permettent d'ouvrir la voie sur d'autres mécanismes de régulation possibles soit par collaboration, ou indépendamment les uns des autres. Finalement les résultats permettent d'approfondir les modes de régulation transcriptionnels de *MMP-3*, plus spécifiquement par rapport au type cellulaire évalué et, ultimement, au type de cancer. L'étude de la régulation du promoteur *MMP-3*, un promoteur MMP « classique », peut également contribuer à comprendre les modes de régulation de certains de ses homologues, notamment *MMP-9*. Même si l'on attribue généralement aux MMP un profil tumoral, de récentes études démontrent maintenant que certaines MMP peuvent être anti-tumorales. De plus, la plupart de ces études révèlent que le stade de progression tumorale et le type de tumeur contribuent à l'effet bénéfique de ces MMP. L'accumulation de ces données, combinées aux informations fondamentales quant à la régulation des MMP, permettent donc de progresser et d'améliorer les traitements de cancers en ciblant les effets voulus et en diminuant les effets nocifs.

ANNEXES

ANNEXE A

New role for matrix metalloproteinases in metastasis.

Demers M, Couillard J, Bélanger S, St-Pierre Y

Ma contribution dans cet article fut la rédaction de toute la partie II : Matrix metalloproteinases (MMP) ainsi que la rédaction et la recherche du tableau 1 sur les substrats des différentes MMP. J'ai également réalisé la figure 1 de l'article et participé à la correction et la critique de tout l'article.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Demers M, Couillard J, Bélanger S, St-Pierre Y. New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. Crit Rev Immunol. 2005;25(6):493-523. **DOI:** 10.1615/CritRevImmunol.v25.i6.30

ANNEXE B

Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel targets against cancer and inflammatory diseases.

St-Pierre Y, Couillard J and Van Tamsche C

Ma contribution sur cet article fut de réaliser la figure 1 décrivant les différents sites de liaison et de stimulation sur le promoteur MMP-9 murin. J'ai également participé à la correction et la critique de cet article.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

St-Pierre Y, Couillard J, Van Tamsche C. Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. Expert Opin Ther Targets. 2004 Oct;8(5):473-89. doi:10.1517/14728222.8.5.473

ANNEXE C

Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation.

Demers M, Couillard J, Giglia-Mari G, Magnaldo T and St-Pierre Y

Ma contribution à cet article fut de réaliser les RT-PCR de la figure 4 C et D démontrant l'expression constitutive de *hGal-7* dans les cellules DKO comparativement aux cellules parentales HCT116. La figure D démontre une augmentation dose-dépendante de *hGal-7* suite à une stimulation par la 5-aza-dC.



Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation

Mélanie Demers^{a,1}, Julie Couillard^a, Giuseppina Giglia-Mari^c, Thierry Magnaldo^b, Yves St-Pierre^{a,*}

^aINRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Que., Canada H7V 1B7

^bCNRS, UPR 2169, "Génétique et physiopathologie des cancers épidermiques", Faculté de Médecine, Nice, France

^cDepartment of Genetics and Cell Biology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2009

Available online 9 July 2009

Keywords:

Galectin-7

Lymphoma

p53

DNA methylation

ABSTRACT

Recent studies have reported that elevated levels of galectin-7 in different types of cancer. The mechanisms underlying its abnormal regulation in cancer cells remain, however, unknown. Here, we have examined the relationship between galectin-7 and p53, a gene previously associated with upregulation of galectin-7. While RNA and protein analyses revealed a consistent and irreversible upregulation of galectin-7 throughout progression of lymphoma, no correlation with p53 was found. In fact, most of the lymphoma cell lines expressing high levels of galectin-7 did not express any detectable level of p53, although expressed p21^{Waf1/Cip1} gene following doxorubicin treatment, indicating that p53 was functional in these cells. Methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) analyses rather suggested that galectin-7 expression was associated with changes in DNA methylation. This conclusion was supported by data using demethylating agent 5-aza-dC. Furthermore, disruption of the DNA methylases *dnm1* and *dnm3a* induced galectin-7. Collectively, our data suggest that abnormal expression of galectin-7 in lymphoma cells is not dependent on p53, but is rather associated with DNA hypomethylation.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Galectins are carbohydrate-binding proteins with an affinity for β-galactosides. To date, 14 mammalian galectins have been identified and several have been shown to play an important role in physiological processes, such as embryonic development, wound healing, apoptosis, immune response, and cancer [1].

Although galectin-7 was initially described as a marker of the differentiation of keratinocytes by Madsen and colleagues [2,3], galectin-7 expression can be found in the sheath of the hair follicle, in the esophagus and oral epithelia, in the cornea, and the Hassal's corpuscles of the thymus [4]. It has been shown to be essential in epithelial cell migration and in the re-epithelization of corneal and/or epidermal wounds [5,6]. Its expression is also strongly associated with UVB-induced apoptosis in epidermis since sunburn cell corresponding to apoptotic keratinocytes express abnormally high levels of galectin-7 [7]. In fact, galectin-7 was almost exclusively considered negative regulator of cell proliferation since its discov-

ery by the group of Bert Vogelstein as one of the 14 transcripts out of 7202 induced in colorectal cancer cells by the expression of p53, whose major function is to control apoptosis [8].

In sharp contrast to the intuitively negative roles played by galectin-7 in some types of cancer, Rorive et al. [9] showed that its expression was markedly higher in different forms of papillary carcinomas than in benign thyroid tumors. High levels of galectin-7 expressions have also been associated with recurrence rates and dismal prognosis in hypopharyngeal squamous cell carcinomas [10] and in aggressive lymphoma variants [11,12]. Moreover, suppressing galectin-7 expression increased the survival of mice by reducing the metastasis of lymphoma cells [13]. However, while the above analyses provided evidence that galectin-7 was expressed at higher levels in lymphoma cells, the regulatory mechanism associated with its abnormal expression remains unclear. Two hypotheses have been advanced. On one hand, it is possible that galectin-7 is induced by p53, since earlier studies on galectin-7 had shown that it was one of the most abundant transcripts induced in DLD-1 colon cancer cells infected with a replication-defective adenovirus encoding p53 [8]. On the other hand, since members of the galectin family have been shown to be under the control of epigenetic regulatory mechanisms [14,15], DNA methylation could well be responsible for the upregulation of galectin-7 in aggressive lymphoma cells. In the present work, we have examined whether these two mechanisms are associated with the abnormal galectin-7 expression patterns in lymphoma cells.

Abbreviations: 5-aza-dC, deoxycytidine; doxo, doxorubicin; MS-PCR, methyl-sensitive PCR.

* Corresponding author. Address: INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. Des Prairies, Laval, Que., Canada H7V 1B7. Fax: +1 450 686 5501.

E-mail address: yves.st-pierre@iaf.inrs.ca (Y. St-Pierre).

¹ Present address: CBR Institute for Biomedical Research, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Materials and methods

Cell lines and reagents. The lymphoma cell lines were established as described [16]. The human Jurkat T lymphoma cell line and Raji B lymphoma cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). The human H1CT116 parental and double knock-out (DKO) cell were a generous gift from Dr. Bert Vogelstein (John Hopkins University). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibodies were obtained from Amersham (Amersham Pharmacia, QC).

In vivo selection of highly aggressive mouse lymphoma cell lines. The aggressive 164T2S11 (S11) and 164T2S19 (S19) cell lines were established from serial *in vivo* passages (11 and 19, respectively) of the parental 164T2 line in young adult C57BL/6 males using the spleen as the organ from which lymphoma cells were harvested following intravenous injection, as previously described [16]. Briefly, for each passage, 6- to 8-week-old mice were injected via the tail vein with 10^6 lymphoma cells. When mice presented clinical signs of lymphoma, they were killed and lymphoma cells were isolated from the spleen (S) or the kidney (K). The 164T2K3.1 (K3.1), 164T2K6.1 (K6.1), 164T2K3.2 (K3.2), 164T2K6.2 (K6.2), and 164T2K9.2 (K9.2) cell lines were thus established after three, six, and nine passages, respectively, without loss of aggressiveness.

Western blot analysis. Immunoblotting was performed using a rabbit polyclonal anti-galectin-7 antibody (1:500) as previously described [13] and an anti-p53 antibody (FL-393) from Santa Cruz (Santa Cruz, CA). A horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG was used as a second antibody.

RT-PCR analysis. Total RNA was isolated from cells using the Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Canada, Inc., Burlington, ON). Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using the Omniscript™ reverse transcriptase (QIAGEN) and PCR performed as described using previously published primers [12,13]. Thirty cycles (for murine galectin-7 and *gapdh* gene amplification) and 35 cycles (human galectin-7 and *p21*) of amplification were performed in a thermal cycler (model PTC-100 TM, MJ Research, Watertown, MA). The amplification for each gene was in the linear curve. PCR products were size-separated on a 1.2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining and UV transillumination. Loading was equalized to the internal control mRNA (GAPDH).

DNA isolation and methylation-sensitive restriction mapping of the galectin-7 promoter. Genomic DNA from lymphoma cells was isolated using the Intergen DNA extraction kit according to the manufacturer's instructions (Serologicals Corporation, Toronto, ON). Briefly, $20\text{--}50 \times 10^6$ lymphoma cells were collected and gently lysed. The DNA was digested with or without restriction endonucleases (HpaII or MspI) for 3 h at 37 °C. Specific galectin-7 promoter regions were amplified using specific primers (sequences are available upon request). The optimal cycle number for PCR was determined to be that which produced a detectable band from undigested template but did not yield any product from DNA digested with the methylation-insensitive isoschizomer of HpaII (MspI). Cycles of amplification were performed in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA) using the following program: 94 °C for 0.5 min, 64 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min (2 min for the –2003 nt amplicon) with a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were size-separated on a 1.2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining and UV transillumination.

In vivo lymphoma. Lymphoma cells were inoculated intravenously via the tail vein of 6- to 8-week-old C57BL/6 mice (5–10 mice per group). Animals were monitored periodically for clinical signs of lymphoid tumor growth: dyspnea, runting, and splenomegaly. When moribund, mice were sacrificed, and spleen, liver and kidneys were examined and collected at necropsy.

Results

Stable and irreversible induction of galectin-7 in lymphoma cells

Normal lymphocytes or poorly aggressive T lymphoma cells, such as the murine 164T2 parental lymphoma cells, do not express galectin-7 [13]. We found, however, that upregulation of galectin-7 can be triggered in aggressive variants by successive *in vivo* passages in normal syngeneic mice using the spleen as the target organs from which the tumor cells are recovered. Here, we show that T lymphoma cell lines established after 3–15 such *in vivo* passages using either the kidneys or the spleen as the target organs constitutively express galectin-7 in contrast to their parental 164T2 cells (Fig. 1A). This upregulation of galectin-7 in variants of 164T2 cells upon *in vivo* passages was highly reproducible, as constitutive levels of galectin-7 were found after three passages (K3 cell lines) in two independent experiments (K3.1 and K3.2 lines) using the kidneys as the organs from which the lymphoma cells were recovered for successive *in vivo* passages. Western blot

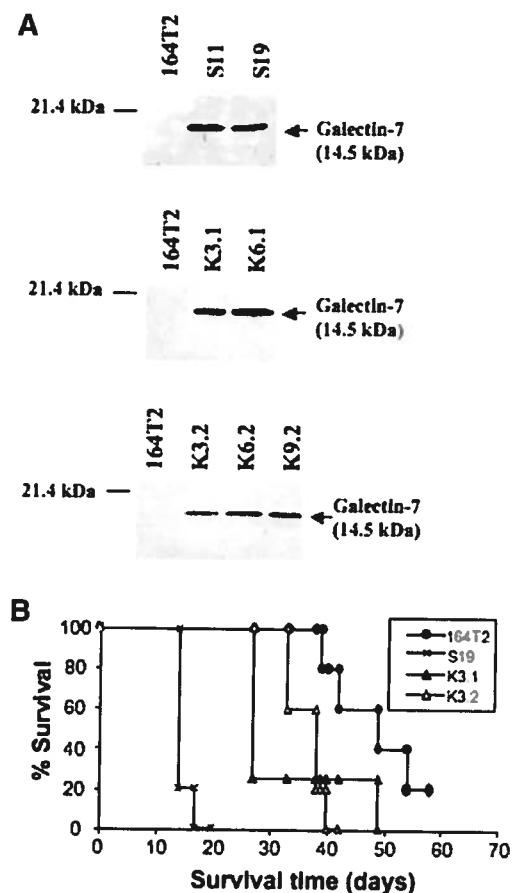


Fig. 1. Increased galectin-7 expression in lymphoma cells following *in vivo* passages. In (A) galectin-7 in lymphoma cell lines isolated from *in vivo* passages of the 164T2 lymphoma cell line in syngeneic C57BL/6 mice using the (S) spleen or the (K) kidney as the organ from which lymphoma cells were harvested following intravenous injection. For instance, after 11 and 19 passages, respectively, the S11 and S19 cell lines were established in culture and galectin-7 expression measured by Western blot using protein from cell lysates specific polyclonal antibodies as described. Independent cell lines were also established after three, six, and nine passages in two independent series of experiments using the kidneys as the target organ (series KX.1 and KX.3). In (B), increased metastatic behavior of lymphoma cell lines passages associated with high levels of galectin-7 [15]. Results are representative of three independent experiments.

analyses showed that high levels of galectin-7 were also very stable and did not return to baseline, even after 15–19 passages, whether they were isolated from the spleen or the kidneys, or whether they were maintained in culture *in vitro*. Consistent with previous results, higher levels of galectin-7 was associated with increased aggressiveness, as injection of variants derived from either the spleen (S11 and S19) or the kidneys (K3, K6, or K9) was associated with increased tumorigenicity ($p < 0.05$) (Fig. 1B). No such correlation between galectin gene expression and aggressiveness

was observed for other members of the galectin family, such as galectin-1 or galectin-3 (data not shown). The establishment of such highly metastatic cell lines allowed us to investigate the molecular mechanisms underlying the sustained expression of galectin-7 in lymphoma cells.

The role of p53 in the control of galectin-7 gene expression in lymphoma cells

We first examined the expression of p53 and galectin-7 in the panel of nine lymphoma variants derived from *in vivo* passages of 164T2. We could not, however, find any correlation between p53 expression and galectin-7. In fact, seven out of eight lymphoma cell

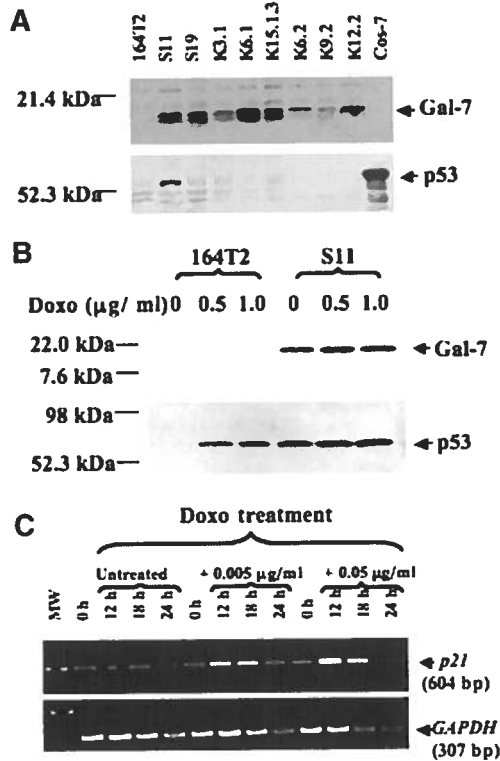


Fig. 2. p53 expression does not correlate with galectin-7 expression in lymphoma cells. (A) Western blot analysis showing p53 and galectin-7 expression in T lymphoma cell lines. Immunoblots were carried out using p53 and galectin-7-specific polyclonal antibodies. Cos-7 cells, which express p53 constitutively, were used as a positive control for p53 expression. (B) Western blot analysis showing induction of p53 but not of galectin-7 following doxorubicin treatment in T lymphoma cells. Lymphoma cell lines (164T2 and S11) were maintained in complete medium and treated with the indicated doxorubicin concentrations. Equal amounts of proteins (100 μg) from each sample were resolved in SDS/PAGE, transferred, and immunoblotted with antibodies against p53 and galectin-7. Untreated cells were included as controls. Data are representative of three independent experiments. (C) Induction of the p53-dependent *p21^{Waf1/Cip1}* gene in T lymphoma cells by doxorubicin treatment. Lymphoma cells were treated with the indicated concentrations of doxorubicin. At the indicated time points, cells were lysed and total RNA was isolated. Expression of *p21^{Waf1/Cip1}* was assessed by semi-quantitative RT-PCR. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a control for variation in total RNA content.

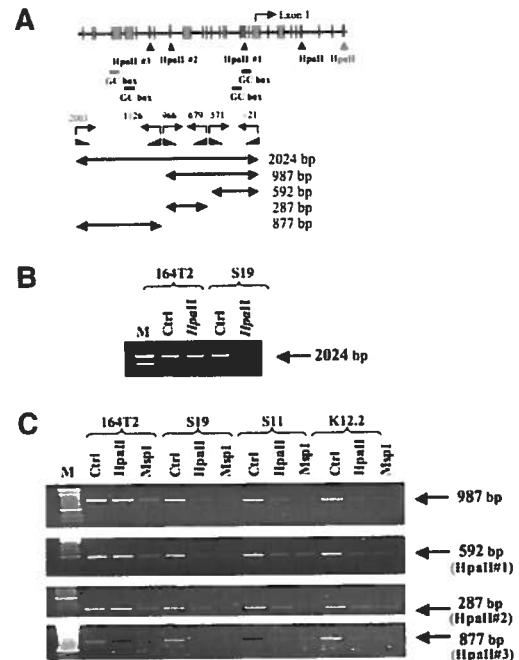


Fig. 3. Methylation status of galectin-7 promoter in lymphoma cells. (A) Schematic diagram of galectin-7 promoter depicting the methyl CpG dinucleotides and the relevant cis-acting elements. The vertical lines represent the location of CpG dinucleotides, and the arrow indicates the approximate position of the transcription start site. The horizontal bars below indicate the location of the DNA fragments amplified by methylation-sensitive restriction fingerprinting on the DNA recovered from lymphoma cells. (B) Genomic DNA was digested with HpaII and MspI, or incubated without enzymes (control) for 3 h at 37 °C. The presence of a 2024 bp product after PCR amplification indicates that galectin-7 promoter was methylated in 164T2 cells, but not in S19 cells. (C) Methylation status of individual CpG located within specific HpaII sites in the galectin-7 promoter of different lymphoma cell lines was further confirmed using primers encompassing specific HpaII sites. Undigested or DNA digested with MspI were both used as controls to assess the quality of genomic DNA source and accessibility of individual sequences to restriction enzymes. The presence of very small amount of PCR products most likely reflects the fact that the CpG methylation level is often markedly less than 100%. Lane M, 100 bp DNA ladder.

Table 1
Sequences of the oligonucleotides used for DNA sequencing of p53.

Primer F	Sequence 5' → 3'	Primer R	Sequence 5' → 3'	Exon	Size (bp)
ME5F	TCTCTTCCAGTACTCTCTC	ME5R	GAGGCTTACCATCACCATC	5	204
ME5F	TCTCTTCCAGTACTCTCTC	ME5-6R	AATTACAGACCTCGGTGGCT	5-6	425
ME7F	GCCGGCTCTGAGTATACCACCAT	ME7R1	GGAACACAGAGGAGAGACTTCAT	7	257
ME7F	GCCGGCTCTGAGTATACCACCAT	ME7R2	GGTAGATAGGCTAGGAAC	7	231
ME8F1	TCTTACTGCCTTGTGGCTGCTCT	ME8R1	CAGGTGGGACGCGCTGTGGAAGG	8	269
ME8F2	TCCCGGATAGTGGGAACCTT	ME8R2	GCCTGCGTACTCTCTTTTC	8	157

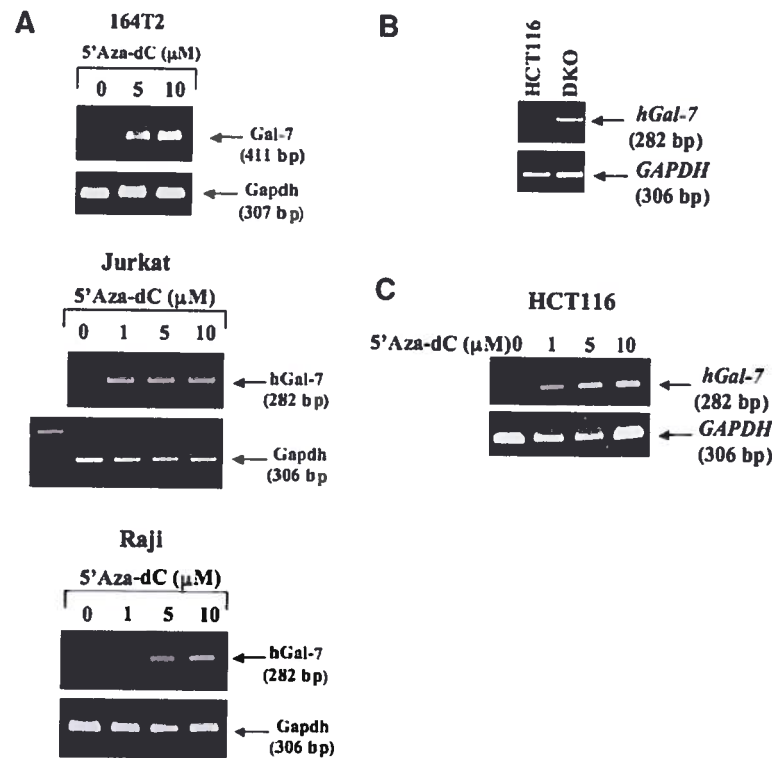


Fig. 4. Galectin 7 is expressed in human cancer cells with impaired methylation. (A) Increased expression of galectin-7 is observed following treatment of mouse 164T2 and human Jurkat and Raji lymphoma cells with 5-aza-dC. (B) Genetically engineered DKO cells deficient for both *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* genes encoding the major DNA methylases constitutively expressed higher levels of galectin-7 as compared to their wild-type counterpart, HCT116 cells [8]. (C) Expression of galectin-7 in HCT116 cells can, however, be induced upon treatment with 5-aza-dC. The expression of GAPDH was included as an RNA loading control.

lines expressing galectin-7 did not express a detectable level of p53 (Fig. 2A), even though our variants either were selected from different organs or originated from different *in vivo* serial passages. Moreover, the only variant that expressed both galectin-7 and p53 eventually lost p53 expression while remaining galectin-7 positive.

Since p53 protein has a short half-life [17], we examined whether the induction of p53 could nevertheless upregulate galectin-7 expression in lymphoma cells. Lymphoma cells were thus treated with increasing concentrations of doxorubicin (doxo), a therapeutic drug known to induce p53 [18]. Our results showed that although such treatment induced a strong increase in the steady-state level of p53 at the protein level, we could not detect *de novo* expression of galectin-7 in these cells (Fig. 2B). Doxorubicin treatment was, however, able to induce the expression of the *p21^{Waf1/Cip1}* gene, a p53-dependent gene encoding a cyclin-dependent kinase inhibitor known to mediate most of the biological effects following p53 activation (Fig. 2C) [19,20], suggesting that p53 in these cells was functional. The functional integrity of p53 was further confirmed by DNA sequencing [21] on the genomic DNA of lymphoma cell lines (164T2, S11, and S19) expressing or not galectin-7, using the mouse *p53* genomic sequence (Accession No. mCG15749.1 and the primers listed in Table 1). We found a complete absence of mutations in all lymphoma lines tested in the regions of the p53 gene previously associated with genetic alterations of p53 expression [22]. Taken together, our results suggest that upregulation of galectin-7 in lymphoma cells is independent of p53.

The promoter of galectin-7 gene is hypomethylated in galectin-7-positive cells

Since members of the galectin family have been shown to be regulated by DNA methylation, we next investigated the methyla-

tion status of CpGs located in the 2 kb 5' flanking region of the mouse *galectin-7* gene (from –2003 bp upstream to +21 bp of the ATG start codon) in our lymphoma cell lines by HpaII-methyl-sensitive PCR (MS-PCR) (Fig. 3A). We found the 2024 bp PCR product, indicative of methylated CpG sites, only in 164T2 cells but not in its S19 variants expressing galectin-7 (Fig. 3B). Use of primer sets specific for genomic regions encompassing individual MspI/HpaII sites located across promoter region with genomic DNA confirmed that 164T2 lymphoma cells were methylated at all three HpaII/MspI sites, as evidenced by the presence of PCR of the 987 bp, 592 bp, 287 bp, and 877 bp PCR products (Fig. 3C). Similar results were found using 267 cells, a low metastatic lymphoma line which does not express galectin-7 (Ref. [16], and data not shown). In contrast, methylation of these HpaII sites was not detected in any of the variants expressing galectin-7 constitutively.

Hypomethylation induces galectin-7 gene expression in lymphoma cells

To further investigate the importance of DNA methylation in increasing *galectin-7* gene expression in tumor cells, we investigated the effect of DNA demethylating drug 5-aza-dC on galectin-7 expression in human lymphoma cells. Our results showed that *galectin-7* expression levels in mouse and human lymphoma tumor cell lines markedly increased following treatment with 5-aza-dC (Fig. 4A). Further indications that galectin-7 was under the control of DNA methylation was obtained using the genetically engineered double knock-out (DKO) HCT116 model, bearing disruptions in both *Dnmt-1* and *Dnmt-3b* genes [23]. Our result showed that genetic ablation of *dnmt1* and *dnmt3b* induces a stable and constitutive expression of galectin-7 as compared to the normal HCT116 wild-type cells (Fig. 4B). In HCT116 cells, galectin-7 expression could be induced following treatment with 5-aza-dC

(Fig. 4C), further supporting the role of DNA hypomethylation in the control of *galectin-7* gene expression.

Discussion

In the present work, we have shown that high expression levels of *galectin-7* in lymphoma cells were associated with aberrant CpG methylation of its promoter. Several lines of evidence converge towards that conclusion: (1) methylation of the promoter inversely correlates with expression of *galectin-7*; (2) treatment with demethylating agent 5-aza-dC increases *galectin-7* expression; and (3) cells bearing genetic ablations of DNA methylases expressed *galectin-7* constitutively.

Previous studies have shown that induction of p53 expression in DLD-1 human colon carcinoma or bladder cancer cells by gene transfer or following drug treatment with cis-diamminedichloroplatinum induced *galectin-7* expression [8]. In lymphoma cells, however, our data show that *galectin-7* expression was not associated with p53. This view is based on the following: 1) most lymphoma cells expressing *galectin-7* did not express p53 at a steady state; (2) induction of a functional p53 following drug treatment was insufficient to induce *galectin-7*, although it was capable of inducing p53-related genes, such as *p21*. This would indicate that the functional relationship between p53 and *galectin-7* may vary from one cell type to another. It is worth noting that we could not find any p53 consensus binding site in the *galectin-7* 5' flanking region of the *galectin-7* promoter, suggesting that if p53 plays a role in controlling *galectin-7* gene activation, it probably does so via an indirect pathway or by interacting with another transcription factor. To date, p53 has been shown to modulate the promoter activity of *galectin-3*, but instead of inducing it, it has been shown to drastically down-regulate the promoter activity of this gene [24].

The implication of DNA methylation in the control of *galectin-7* gene is consistent with reports on other members of the *galectin* family. In the case of *galectin-1*, DNA methylation controls its expression in transformed cells as well as in tumors and the demethylating agent 5-aza-dC is able to reactivate its transcription in several cell systems, including lymphoma cell [25]. Our previous observations that hypomethylation favors the emergence of aggressive lymphoma cells by inducing MMP-9 [26], a gene previously associated with high-grade lymphoma [27], also support this idea. What is more, we have shown that *galectin-7* induces the expression of MMP-9 in lymphoma cells [12]. Future studies will be needed to determine whether aberrant methylation of the *galectin-7* promoter may serve as a useful biomarker to predict the progression of lymphoid malignancies.

Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR). M.D. was supported by studentships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.C. was supported by a studentship from the CIHR. We thank Doris Legault and Diane Tremblay for their excellent technical support, and Dr. Edouard F. Potworowski for critical reading of the manuscript.

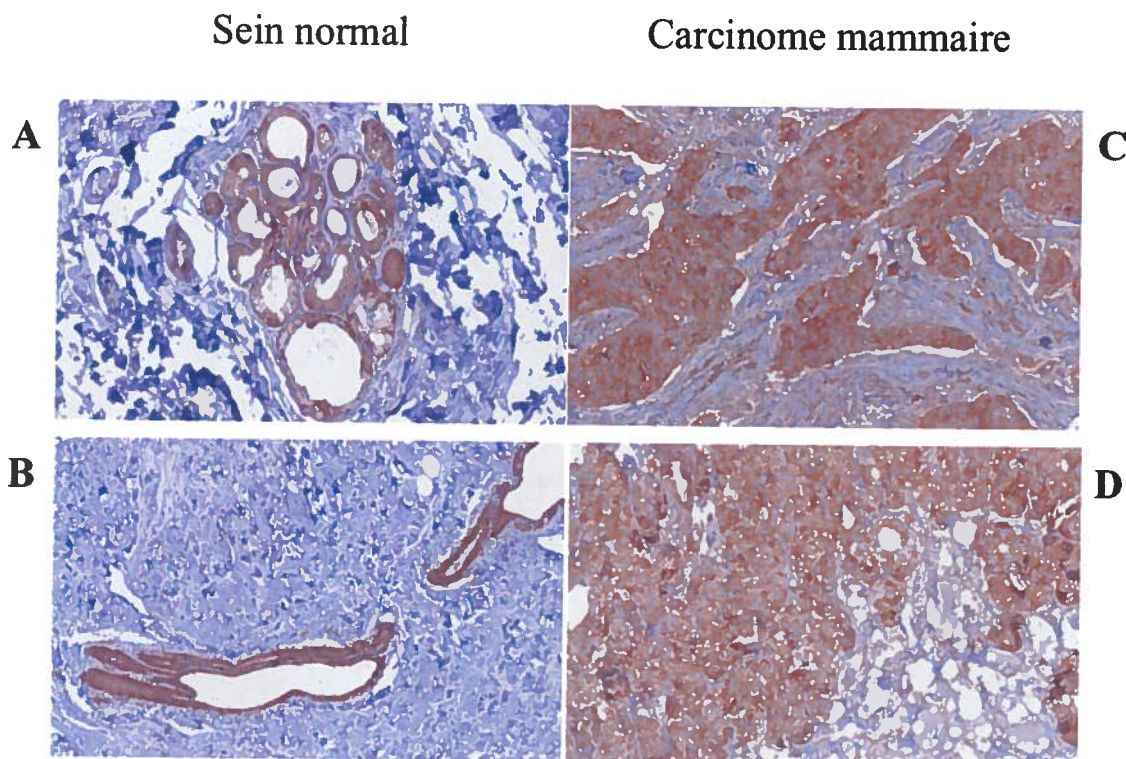
References

- [1] F.T. Liu, G.A. Rabinovich, Galectins as modulators of tumour progression, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 29–41.
- [2] P. Madsen, H.H. Rasmussen, T. Flint, P. Gromov, T.A. Kruse, B. Honore, H. Vorum, J.E. Celis, Cloning, expression, and chromosome mapping of human *galectin-7*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5823–5829.

- [3] T. Magnaldo, F. Bernerd, M. Darmon, *Galectin-7*, a human 14-kDa S-lectin, specifically expressed in keratinocytes and sensitive to retinoic acid, *Dev. Biol.* 168 (1998) 259–271.
- [4] T. Magnaldo, D. Fowlis, M. Darmon, *Galectin-7*, a marker of all types of stratified epithelia, *Differentiation* 63 (1998) 159–168.
- [5] C. Cao, N. Said, S. Amin, H.K. Wu, A. Bruce, M. Garate, D.K. Hsu, I. Kuwabara, F.T. Liu, *Galectins 3 and -7*, but not *galectin 1*, play a role in re-epithelialization of wounds, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42299–42305.
- [6] Z. Cao, N. Said, H.K. Wu, I. Kuwabara, F.T. Liu, N. Panjwani, *Galectin-7* as a potential mediator of corneal epithelial cell migration, *Arch. Ophthalmol.* 121 (2003) 82–86.
- [7] F. Bernerd, A. Sarasin, T. Magnaldo, *Galectin-7* overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11329–11334.
- [8] K. Polyak, Y. Xia, J.L. Zweier, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, A model for p53-induced apoptosis, *Nature* 389 (1997) 300–305.
- [9] S. Rorive, B. Eddafali, S. Fernandez, C. Decaestecker, S. André, H. Kaltner, I. Kuwabara, F.T. Liu, H.J. Gabius, R. Kiss, I. Salmon, Changes in *galectin 7* and *cytokeratin-19* expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications, *Mod. Pathol.* 15 (2002) 1294–1301.
- [10] S. Saussez, R. Kiss, *Galectin 7*, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 686–697.
- [11] S. Moisan, M. Demers, J. Mercier, Upregulation of *galectin-7* in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype, *Leukemia* 17 (2003) 751–759.
- [12] M. Demers, T. Magnaldo, Y. St-Pierre, A novel function for *galectin-7*: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression, *Cancer Res.* 65 (2005) 5205–5210.
- [13] M. Demers, K. Biron-Pain, J. Hébert, A. Lamarre, T. Magnaldo, Y. St-Pierre, Decreased dissemination of T cell lymphoma by inhibition of *galectin 7*, *Cancer Res.* 67 (2007) 2824–2829.
- [14] G. Benvenuto, M.L. Carpentieri, P. Salvatore, L. Cindolo, C.B. Bruni, L. Chiariotti, Cell-specific transcriptional regulation and reactivation of *galectin-1* gene expression are controlled by DNA methylation of the promoter region, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 2736–2743.
- [15] K.H. Ruebel, L. Jin, X. Qian, B.W. Scheithauer, K. Kovacs, N. Nakamura, H. Zhang, A. Raz, R.V. Lloyd, Effects of DNA methylation on *galectin 3* expression in pituitary tumors, *Cancer Res.* 65 (2005) 1136–1140.
- [16] F. Aoudjit, E.F. Potworowski, Y. St-Pierre, The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines in vivo are manifested after target organ invasion, *Blood* 91 (1998) 623–629.
- [17] J.P. Brown, M. Pagano, Mechanisms and degradation, *Biochem. Biophys. Acta* 1332 (1997) 1–6.
- [18] M.A. Troester, K.A. Hoadley, T. Sorlie, B.S. Herbert, A.L. Borresen-Dale, P.E. Lonning, J.W. Shay, W.K. Kaufmann, C.M. Perou, Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer, *Cancer Res.* 64 (2004) 4218–4226.
- [19] W.S. El Deiry, T. Tokino, V.V. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* 75 (1993) 817–825.
- [20] J.W. Harper, G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S.J. Elledge, The p21 Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin dependent kinases, *Cell* 75 (1993) 805–816.
- [21] N. Dumaz, A. Duthu, J. Ehrhart, C. Drougard, E. Appella, C. Anderson, P. May, A. Sarasin, L. Daya-Grosjean, Prolonged p53 protein accumulation in trichothiodystrophy fibroblasts dependent on unrepaired pyrimidine dimers on the transcribed strands of cellular genes, *Mol. Carcinog.* 20 (1997) 340–347.
- [22] A. Petitjean, E. Mache, S. Kato, C. Ishioka, S.V. Tavtigian, P. Hainaut, M. Olivier, Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 622–629.
- [23] I. Rhee, K.W. Jang, R.W. Yen, C. Lengauer, J.G. Herman, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, S.B. Baylin, K.E. Schuebel, CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking *dnmt1*, *Nature* 404 (2000) 1003–1007.
- [24] J. Raimond, F. Rouleux, M. Monsigny, A. Legrand, The second intron of the human *galectin-3* gene has a strong promoter activity down-regulated by p53, *FEBS Lett.* 363 (1995) 165–169.
- [25] F. Poirier, P. Bourin, D. Bladier, R. Joubert-Caron, M. Caron, Effect of 5-azacytidine and *galectin-1* on growth and differentiation of the human B lymphoma cell line *bl36*, *Cancer Cell Int.* 1 (2001) 2.
- [26] E. Chicoine, P.O. Estève, O. Robledo, C. Vanthemsche, E.F. Potworowski, Y. St-Pierre, Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002) 765–772.
- [27] M. Arlt, C. Kopitz, C. Pennington, K.L. Watson, H.W. Krell, W. Bode, B. Gansbacher, R. Khokha, D.R. Edwards, A. Kruger, Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model, *Cancer Res.* 62 (2002) 5543–5550.

ANNEXE D

Expression de MMP-3 dans le cancer du sein



Légende : Expression de MMP-3 par immunohistochie dans des tissus mammaires normaux (A et B) et tissus provenant de carcinomes mammaires (C et D). Expression de MMP-3 détectée avec un anticorps dirigé contre MMP-3 (marron) et contre-coloration avec hématoxyline (bleue). Dans le sein normal, MMP-3 se retrouve dans les cellules épithéliales luminales et myoépithéliales des lobules (A) et des canaux (B) ; MMP-3 est également exprimée dans les carcinomes canaux infiltrants du sein (C et D). (grossissement original x 200). La coloration a été effectuée par Andrée-Anne Grosset étudiante aux études supérieures sous la direction du Dr. Louis Gaboury et en co-direction avec le Dr. Yves St-Pierre.

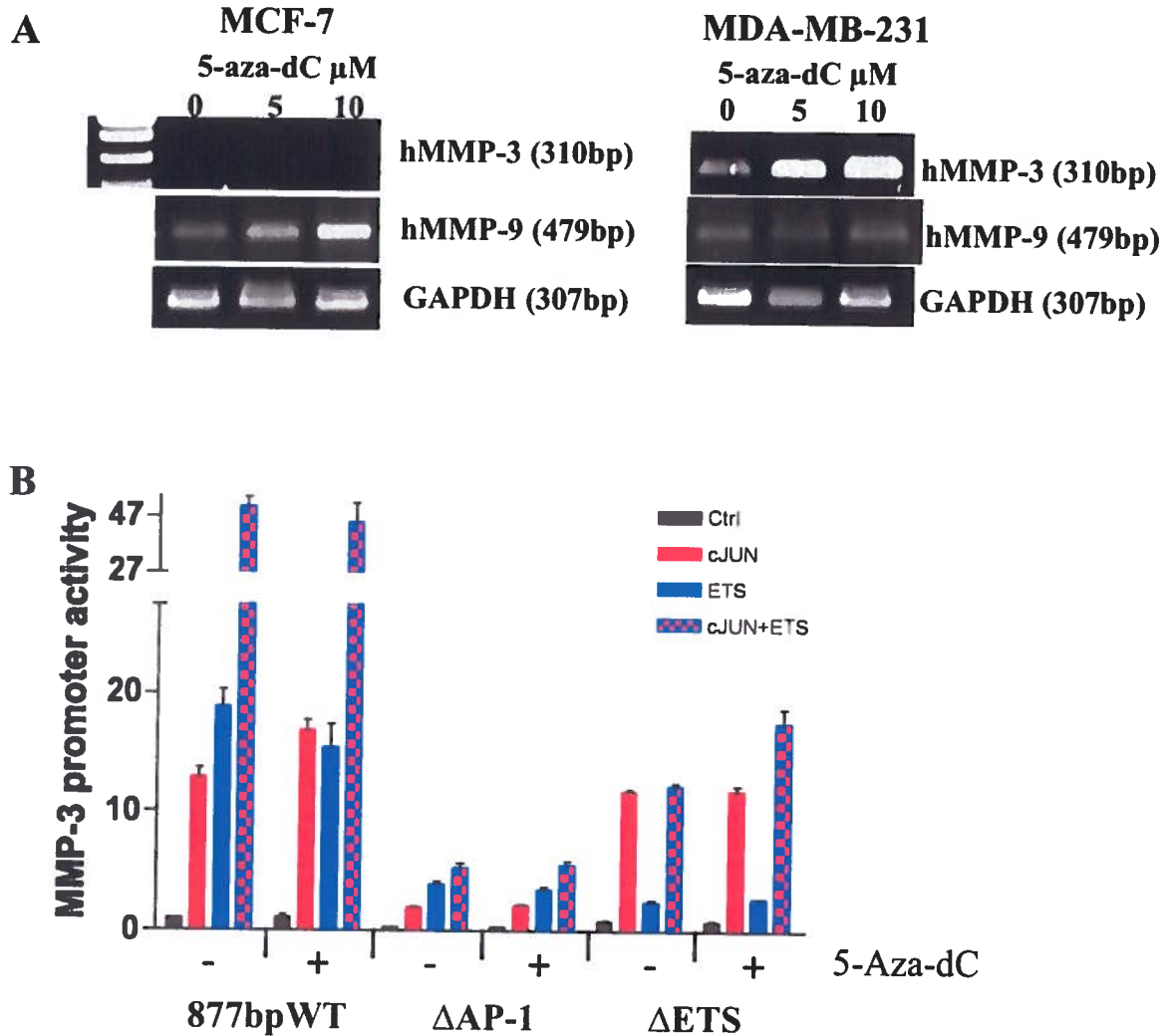
L'étude de la régulation transcriptionnelle de MMP-3 dans les cellules de cancer du sein est une voie intéressante entre autre parce que l'expression élevée de la protéine MMP-3 est détectée dans plusieurs échantillons de tissus de carcinomes mammaires comparés aux tissus normaux (Annexe D).

Il semble que l'expression de MMP-3 diffère selon le type cellulaire ou selon le type ou stade de progression du cancer. Dans certaines cellules de cancer du sein analysées,

l'inhibiteur de méthylation 5-aza-dC n'induit pas nécessairement l'expression de MMP-3. Dans la lignée de cancer du sein non métastatique MCF-7, 5-aza-dC induit *MMP-9* mais pas *MMP-3*. Au contraire, dans une lignée agressive comme MDA-MB-231, une induction dose-dépendante de *MMP-3*, mais pas de *MMP-9*, est observée suite au traitement avec 5-aza-dC (Annexe E). Des études ont démontré que l'accessibilité du promoteur de l'IL-6 est restreinte dans les cellules MCF-7 comparativement aux MDA-MB-231. En effet, AP-1 et NF- κ B sont capables d'induire des changements localisés de la structure de la chromatine dans le promoteur de l'IL-6. De plus, la sur-expression de AP-1 dans les cellules MCF-7 démontre clairement l'augmentation de l'accessibilité de la chromatine dans le promoteur. Le même phénomène pourrait donc se produire dans le promoteur MMP-3 et pourrait expliquer la variation d'induction d'expression dans les deux types cellulaires suite au traitement avec l'inhibiteur de méthylation. Ces résultats corréleraient également avec l'augmentation de l'expression de MMP-3 dans les MCF-7 suite à une transfection de c-jun (Annexe E figure C).

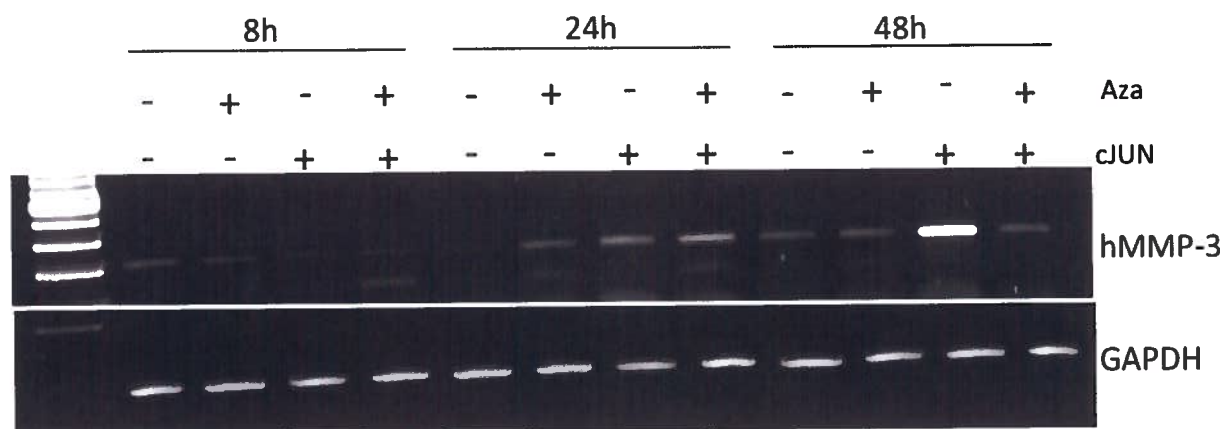
ANNEXE E

La régulation de l'expression de MMP-3 par 5-aza-dC (0, 5, 10 μ M) et c-Jun dans le cancer du sein : spécificité cellulaire

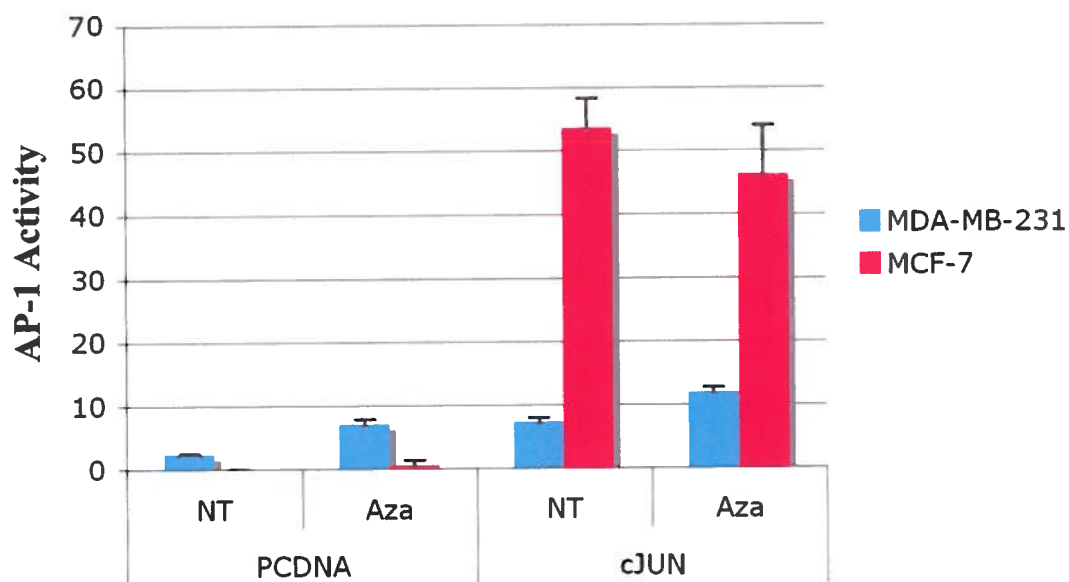


Légende : A) Expression de hMMP-3 et hMMP-9 dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 traitées avec 0, 5 et 10 μ M de 5-aza-dC pendant 72h analysée par RT-PCR. GAPDH est utilisé comme contrôle de chargement. Représentatif d'au moins trois expériences indépendantes. B) Activité luciférase des promoteurs MMP-3 WT 877bp, mutant AP-1 et mutant ETS transfectés dans les cellules MDA-MB-231 traitées ou non avec 5 μ M de 5-aza-dC 48h et co-transfectés ou non avec les vecteurs d'expression c-JUN et/ou ETS. L'essai luciférase est normalisé par co-transfection du vecteur rapporteur CMV-b-galactosidase. Représentatif d'au moins trois expériences indépendantes.

C



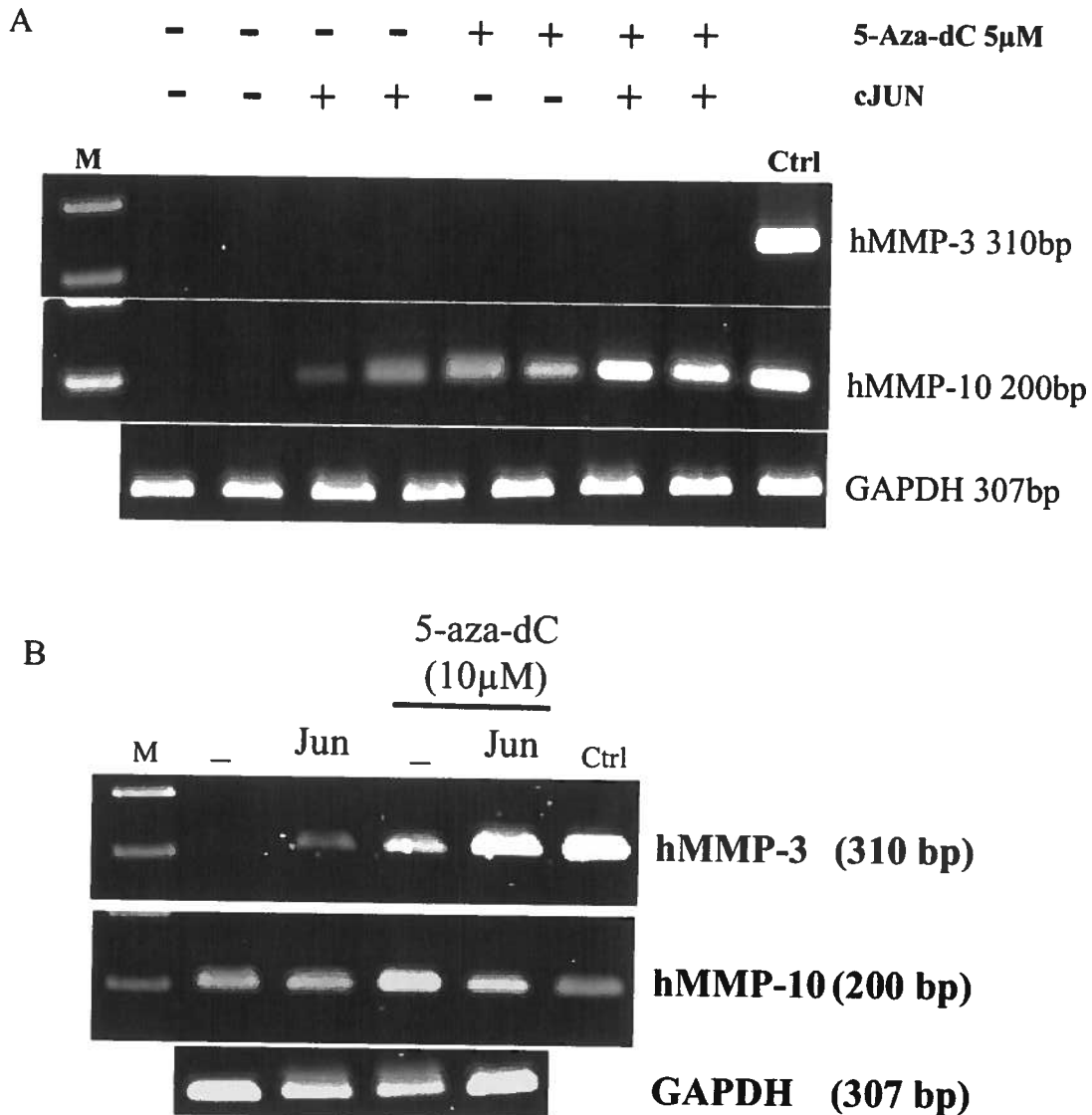
D



C) Expression de hMMP-3 dans les cellules MCF-7 traitées avec 5 μ M de 5-aza-dC (aza) et suite à une transfection de vecteur d'expression cJun. Les analyses d'expression ont été réalisées par RT-PCR après 8h, 24h et 48h de 5-aza-dC et de sur-expression de cJun. D) Activité luciférase générée par la transfection transitoire du vecteur rapporteur luciférase flanqué de répétitions de sites consensus pour le facteur de transcription AP-1 dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 transfectées avec le vecteur d'expression cJun ou le vecteur témoin (PCDNA). Les cellules ont été traitées ou non (aza ou NT respectivement) avec 5 μ M de 5-aza-dC 48h. L'activité AP-1 est calculée par essai luciférase et normalisée par co-transfection avec le vecteur CMV- β -galactosidase. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

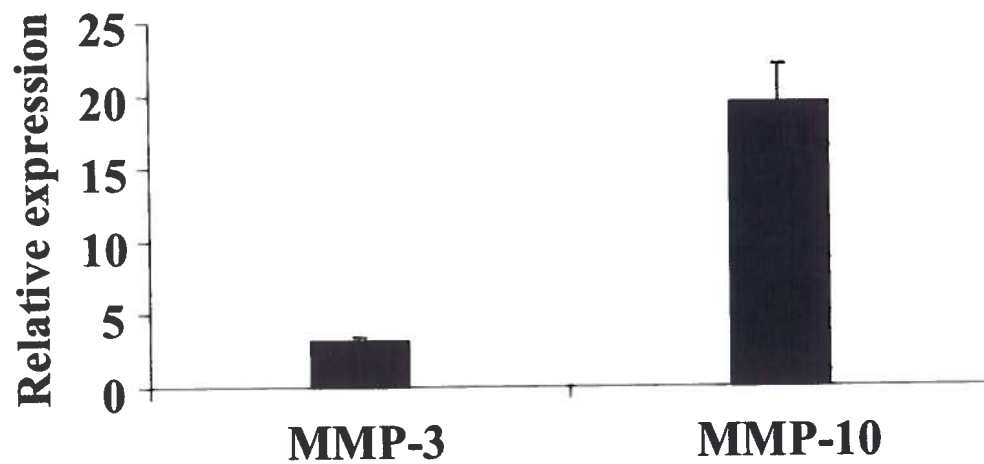
ANNEXE F

Stromélysines : l'homologie s'arrête à la séquence

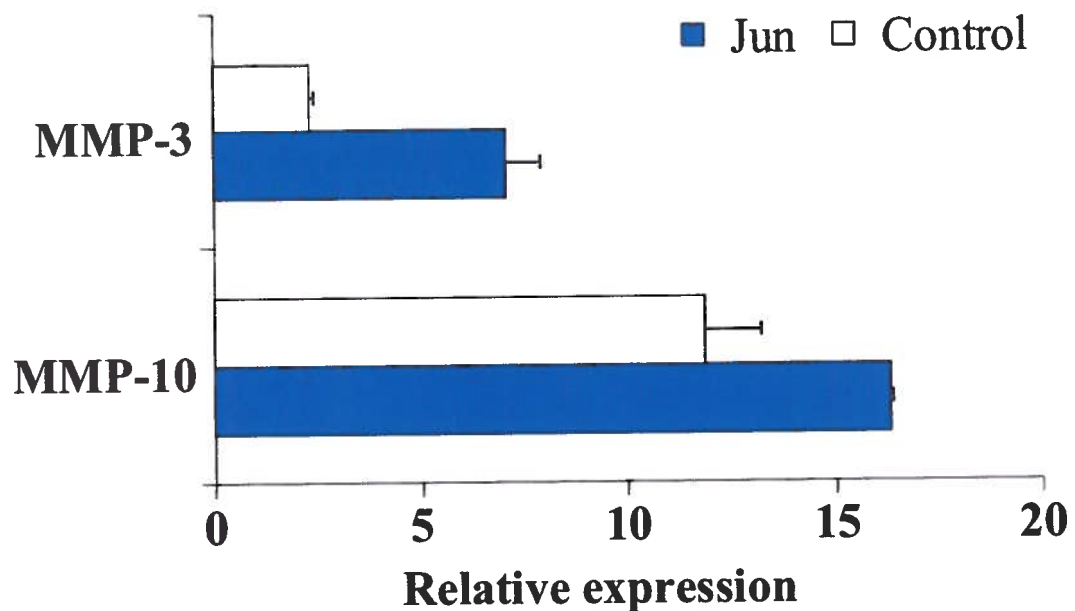


Légende : A) Expression de hMMP-3 et hMMP-10 analysée par RT-PCR dans les lymphomes B Raji traitées ou non avec 5-aza-dC pendant 48h et transfectées ou non avec le vecteur d'expression cJUN ou le vecteur témoin PCDNA. B) Expression de hMMP-3 et hMMP-10 analysée par RT-PCR dans les cellules HCT116 traitées ou non avec 5-aza-dC pendant 48h et transfectées ou non avec le vecteur d'expression cJUN ou le vecteur témoin PCDNA. Le témoin cellulaire positif pour l'expression de MMP-3 et MMP-10 utilisé est la lignée d'astrocytes A172 (ctrl). L'expression de GAPDH est utilisée comme contrôle de chargement et le marqueur 100bp (M) est utilisé comme échelle de chargement. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

C



D

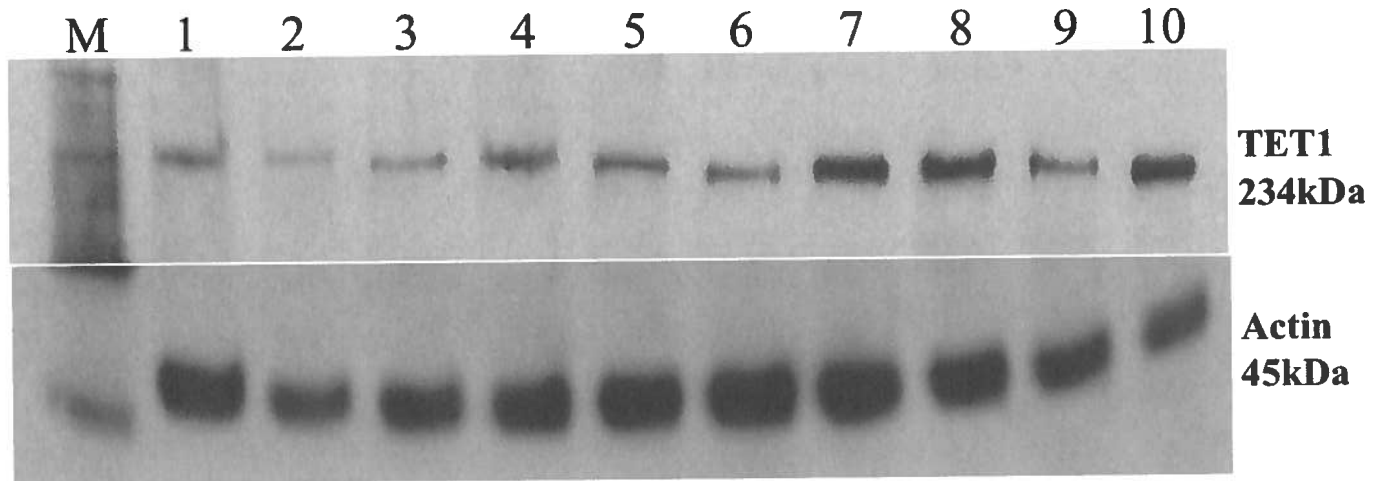


C) Activité des promoteurs hMMP-3 et hMMP-10 suite à une transfection transitoire des promoteurs luciférase dans les cellules HCT116. Les deux promoteurs ont la même longueur : MMP-3 (+11 à -866bp) ; MMP-10 (+4 à -873bp). D) Activité des promoteurs MMP-3 et MMP-10 dans les cellules HCT116 suite à une transfection transitoire des promoteurs luciférase MMP-3 et MMP-10 et transfection transitoire du vecteur d'expression cJUN (Jun) ou du vecteur témoin PCDNA (Control). L'activité des promoteurs est calculée par essai luciférase et normalisée par co-transfection du vecteur CMV- β -galactosidase. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

Les différences dans les patrons d'expression de MMP-3 sont observées dans les cellules de lymphomes. L'enzyme hautement homologue, MMP-10, est induite de façon dose-dépendante dans ces cellules. Depuis longtemps, les MMP ont été identifiées comme étant des enzymes augmentant le pouvoir métastatique de ce type de cancer. Les résultats préliminaires obtenus suite à une stimulation des modèles cellulaires RAJI et RAMOS (Annexe F) par 5-aza-dC démontrent que l'expression de *MMP-10* est induite de façon dose-dépendante mais pas *MMP-3*. De plus, une co-stimulation par l'inhibiteur de méthylation et la sur-expression de c-jun n'a pas réussi, contrairement aux cellules HCT116, à induire l'expression de *MMP-3*. En revanche, l'expression de *MMP-10* est induite de façon synergique par ce même traitement. Or, une analyse préliminaire du statut de méthylation du promoteur MMP-3 dans les cellules RAJI démontre que les premiers CpG sont hautement méthylés (CG76, 81 et 121). Cependant, la déméthylation du promoteur MMP-3 ne semble pas suffisante pour induire son expression. Afin d'expliquer cette réponse, qui semble spécifique au type cellulaire (lymphomes versus fibroblastes), il serait intéressant d'étudier et de comparer d'abord les patrons de méthylation des deux stromélysines pourtant hautement homologues en séquence protéiques et dont les gènes sont localisés dans la même région du chromosome. L'accessibilité du promoteur MMP-3 semble restreinte dans les lymphomes et suggère que des facteurs supplémentaires soient nécessaires pour générer l'induction de son expression (par exemple, le facteur de transcription ETS ou des inhibiteurs d'histones déacétylases). De plus, les cytokines inflammatoires n'ont pas encore été évaluées dans ces cellules. L'inflammation ou un contact cellulaire avec des cellules épithéliales (ce dernier a été démontré dans notre laboratoire) permettrait peut-être l'induction de l'expression de *MMP-3*.

ANNEXE G

TET 1: mécanisme possible de déméthylation par l'IL-1



Légende : Expression de TET1 analysé par immunobuvardage de type Western dans les cellules HeLa traitées ou non avec 5 μ M de 5-aza-dC 48h et différents temps de stimulation d'IL-1 β (10ng/ml). L'actine est utilisée comme contrôle de chargement M : marqueur.

Ligne 1 : Non traitées

Ligne 2 : 5-aza-dC 5 μ M 48h

Ligne 3 : IL-1 20h

Ligne 4 : 5-aza-dC 48h + IL-1 1h

Ligne 5 : 5-aza-dC 48h + IL-1 2h

Ligne 6 : 5-aza-dC 48h + IL-1 4h

Ligne 7 : 5-aza-dC 48h + IL-1 8h

Ligne 8 : 5-aza-dC 48h + IL-1 12h

Ligne 9 : 5-aza-dC 48h + IL-1 20h

Ligne 10 : cellules témoins pour TET1 : cellules ES

Nous avons effectué récemment des expériences préliminaires afin d'étudier l'implication possible de TET1 dans les cellules HeLa (Annexe G). Nos résultats ont démontré que de 8h à 12h après stimulation avec l'IL-1, combinée à la 5-aza-dC, les niveaux protéiques de TET1 augmentent. L'oxydation des cytosines suivie d'une réparation par les glycosylases pourraient peut-être expliquer le statu presque totalement déméthylé du promoteur MMP-3 dans ces cellules. Il faudrait donc évaluer l'expression des glycosylases, par exemple, MBD4 ou TDG, suite à une stimulation dans différents types cellulaires. De plus, une sur-expression de TET1 dans les cellules HCT116 ou HeLa suivie d'une conversion au bisulfite de sodium permettrait de vérifier si l'augmentation de l'expression de TET1 corrèle avec la diminution de la méthylation du promoteur MMP-3. Il serait également intéressant d'évaluer les différences dans les cytosines (hydroxyméthylées versus déméthylées ou méthylées) dans les différents types cellulaires suite à une stimulation par l'IL-1, ce qui permettrait d'établir un lien entre l'IL-1 et l'augmentation du nombre de 5^{hm}C.

RÉFÉRENCES

1. Gross, J. and C.M. Lapiere, *Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1962. **48**: p. 1014-22.
2. Bauer, E.A., A.Z. Eisen, and J.J. Jeffrey, *Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases*. Biochim Biophys Acta, 1970. **206**(1): p. 152-60.
3. Van Wart, H.E. and H. Birkedal-Hansen, *The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5578-82.
4. Demers, M., et al., *New roles for matrix metalloproteinases in metastasis*. Crit Rev Immunol, 2005. **25**(6): p. 493-523.
5. Ra, H.J. and W.C. Parks, *Control of matrix metalloproteinase catalytic activity*. Matrix Biol, 2007. **26**(8): p. 587-96.
6. Welgus, H.G., et al., *A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts*. J Biol Chem, 1979. **254**(6): p. 1938-43.
7. Blavier, L., et al., *Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **878**: p. 108-19.
8. Lambert, E., et al., *TIMPs as multifacial proteins*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **49**(3): p. 187-98.
9. Nagase, H. and K. Fushimi, *Elucidating the function of non catalytic domains of collagenases and aggrecanases*. Connect Tissue Res, 2008. **49**(3): p. 169-74.
10. Hamze, A.B., et al., *Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors*. Protein Sci, 2007. **16**(9): p. 1905-13.
11. Amour, A., et al., *TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3*. FEBS Lett, 1998. **435**(1): p. 39-44.
12. Kashiwagi, M., et al., *TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5)*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12501-4.
13. Amour, A., et al., *The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3*. FEBS Lett, 2000. **473**(3): p. 275-9.
14. Hashimoto, G., et al., *Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4)*. FEBS Lett, 2001. **494**(3): p. 192-5.
15. Wang, W.M., et al., *TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2*. Biochem J, 2006. **398**(3): p. 515-9.
16. Jacobsen, J., et al., *Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants*. Biochemistry, 2008. **47**(2): p. 537-47.
17. Stetler-Stevenson, W.G., *The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(1): p. 57-66.
18. Brew, K. and H. Nagase, *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p. 55-71.
19. Lovejoy, B., et al., *Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor*. Science, 1994. **263**(5145): p. 375-7.

20. Murphy, G., et al., *The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity*. J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9612-8.
21. Jeffrey, J.J. and J. Gross, *Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization*. Biochemistry, 1970. **9**(2): p. 268-73.
22. Roswit, W.T., J. Halme, and J.J. Jeffrey, *Purification and properties of rat uterine procollagenase*. Arch Biochem Biophys, 1983. **225**(1): p. 285-95.
23. Weeks, J.G., J. Halme, and J.F. Woessner, Jr., *Extraction of collagenase from the involuting rat uterus*. Biochim Biophys Acta, 1976. **445**(1): p. 205-14.
24. Brinckerhoff, C.E. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 207-14.
25. Mudgett, J.S., et al., *Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(1): p. 110-21.
26. Itoh, T., et al., *Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22389-92.
27. Wilson, C.L., et al., *Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1402-7.
28. Masson, R., et al., *In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy*. J Cell Biol, 1998. **140**(6): p. 1535-41.
29. Shipley, J.M., et al., *Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 3942-6.
30. Vu, T.H., et al., *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. Cell, 1998. **93**(3): p. 411-22.
31. Holmbeck, K., et al., *MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover*. Cell, 1999. **99**(1): p. 81-92.
32. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
33. Gonzalez-Avila, G., et al., *72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells*. Pathobiology, 1998. **66**(1): p. 5-16.
34. Sutinen, M., et al., *Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis*. Br J Cancer, 1998. **77**(12): p. 2239-45.
35. Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2387-92.
36. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1156-68.
37. Overall, C.M. and O. Kleinfeld, *Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(3): p. 227-39.

38. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
39. Bramhall, S.R., et al., *A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2002. **87**(2): p. 161-7.
40. Bramhall, S.R., et al., *Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial*. Br J Cancer, 2002. **86**(12): p. 1864-70.
41. Balbin, M., et al., *Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice*. Nat Genet, 2003. **35**(3): p. 252-7.
42. Witty, J.P., et al., *Decreased tumor formation in 7,12-dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell apoptosis*. Cancer Res, 1995. **55**(7): p. 1401-6.
43. Gorrin Rivas, M.J., et al., *Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance*. Hepatology, 1998. **28**(4): p. 986-93.
44. Overall, C.M. and C. Lopez-Otin, *Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 657-72.
45. Klotz, S., et al., *Mechanical unloading during left ventricular assist device support increases left ventricular collagen cross-linking and myocardial stiffness*. Circulation, 2005. **112**(3): p. 364-74.
46. Li, Y.Y., et al., *Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices*. Circulation, 2001. **104**(10): p. 1147-52.
47. Orbe, J., et al., *Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization*. Atherosclerosis, 2003. **167**(1): p. 45-53.
48. Ye, S., et al., *Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13055-60.
49. Beyzade, S., et al., *Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(12): p. 2130-7.
50. Medley, T.L., et al., *Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression*. Circ Res, 2003. **92**(11): p. 1254-61.
51. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, *Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors*. Arthritis Res, 2002. **4**(3): p. 157-64.
52. Young, J., et al., *Lymphotoxin-alpha-beta heterotrimers are cleaved by metalloproteinases and contribute to synovitis in rheumatoid arthritis*. Cytokine, 2010. **51**(1): p. 78-86.
53. Nieminen, R., et al., *Aurothiomalate inhibits cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 3, and interleukin-6 expression in chondrocytes by increasing MAPK phosphatase 1 expression and decreasing p38 phosphorylation: MAPK*

- phosphatase 1 as a novel target for antirheumatic drugs. Arthritis Rheum*, 2010. **62**(6): p. 1650-9.
54. Triantafyllou, A., et al., *Proliferative lesions and metalloproteinase activity in murine lupus nephritis mediated by type I interferons and macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(7): p. 3012-7.
 55. Upadhyay, A., et al., *Role of a LIF antagonist in LIF and OSM induced MMP-1, MMP-3, and TIMP-1 expression by primary articular chondrocytes. Cytokine*, 2009. **46**(3): p. 332-8.
 56. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, *Matrix metalloproteinases: role in arthritis. Front Biosci*, 2006. **11**: p. 529-43.
 57. Clark, I.M. and A.E. Parker, *Metalloproteinases: their role in arthritis and potential as therapeutic targets. Expert Opin Ther Targets*, 2003. **7**(1): p. 19-34.
 58. Rowan, A.D., et al., *Metalloproteases as potential therapeutic targets in arthritis treatment. Expert Opin Ther Targets*, 2008. **12**(1): p. 1-18.
 59. Alexander, C.M., et al., *Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. Development*, 1996. **122**(6): p. 1723-36.
 60. Sirum, K.L. and C.E. Brinckerhoff, *Cloning of the genes for human stromelysin and stromelysin 2: differential expression in rheumatoid synovial fibroblasts. Biochemistry*, 1989. **28**(22): p. 8691-8.
 61. Brinckerhoff, C.E., et al., *Expression of stromelysin and stromelysin-2 in rabbit and human fibroblasts. Matrix Suppl*, 1992. **1**: p. 165-75.
 62. Windsor, L.J., et al., *Cell type-specific regulation of SL-1 and SL-2 genes. Induction of the SL-2 gene but not the SL-1 gene by human keratinocytes in response to cytokines and phorbol esters. J Biol Chem*, 1993. **268**(23): p. 17341-7.
 63. Matrisian, L.M., et al., *The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(24): p. 9413-7.
 64. Liokumovich, P., et al., *Expression of metalloproteinases endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis. J Clin Pathol*, 1999. **52**(3): p. 198-202.
 65. Van Themsche, C., et al., *Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. J Immunol*, 2004. **173**(6): p. 3605-11.
 66. Van Themsche, C., E.F. Potworowski, and Y. St-Pierre, *Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors in vivo. Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **315**(4): p. 884-91.
 67. Thomasset, N., et al., *Expression of autoactivated stromelysin-1 in mammary glands of transgenic mice leads to a reactive stroma during early development. Am J Pathol*, 1998. **153**(2): p. 457-67.
 68. Sternlicht, M.D., M.J. Bissell, and Z. Werb, *The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. Oncogene*, 2000. **19**(8): p. 1102-13.
 69. McCawley, L.J., et al., *A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6965-72.
 70. Sternlicht, M.D., et al., *The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. Cell*, 1999. **98**(2): p. 137-46.

71. Matsuno, H., et al., *Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand*. J Rheumatol, 2001. **28**(1): p. 22-8.
72. Noe, V., et al., *Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 1): p. 111-118.
73. Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby, *Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3340-6.
74. Nemec, P., et al., *Association of the 5A/6A promoter polymorphism of the MMP-3 gene with the radiographic progression of rheumatoid arthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1110**: p. 166-76.
75. Yoshiyama, Y., M. Asahina, and T. Hattori, *Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in Alzheimer's disease brain*. Acta Neuropathol, 2000. **99**(2): p. 91-5.
76. Curran, T. and B.R. Franza, Jr., *Fos and Jun: the AP-1 connection*. Cell, 1988. **55**(3): p. 395-7.
77. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 859-68.
78. Vogt, P.K., *Fortuitous convergences: the beginnings of JUN*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 465-9.
79. Angel, P. and M. Karin, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
80. Behrens, A., M. Sibilio, and E.F. Wagner, *Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation*. Nat Genet, 1999. **21**(3): p. 326-9.
81. Schreiber, M., et al., *Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent*. Genes Dev, 1999. **13**(5): p. 607-19.
82. Bakiri, L., et al., *Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression*. Embo J, 2000. **19**(9): p. 2056-68.
83. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
84. Bassuk, A.G. and J.M. Leiden, *A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells*. Immunity, 1995. **3**(2): p. 223-37.
85. Diamond, M.I., et al., *Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element*. Science, 1990. **249**(4974): p. 1266-72.
86. Gaub, M.P., et al., *Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1267-76.
87. Stein, B., et al., *Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function*. Embo J, 1993. **12**(10): p. 3879-91.
88. Stein, B., P.C. Cogswell, and A.S. Baldwin, Jr., *Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 3964-74.

89. Zhang, Y., X.H. Feng, and R. Derynck, *Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 909-13.
90. Watson, D.K., et al., *Isolation of target gene promoter/enhancer sequences by whole genome PCR method*. Methods Mol Biol, 2000. **130**: p. 1-11.
91. Sementchenko, V.I. and D.K. Watson, *Ets target genes: past, present and future*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6533-48.
92. Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.
93. Bassuk, A.G. and J.M. Leiden, *The role of Ets transcription factors in the development and function of the mammalian immune system*. Adv Immunol, 1997. **64**: p. 65-104.
94. Dittmer, J. and A. Nordheim, *Ets transcription factors and human disease*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1377**(2): p. F1-11.
95. Graves, B.J. and J.M. Petersen, *Specificity within the ets family of transcription factors*. Adv Cancer Res, 1998. **75**: p. 1-55.
96. Sharrocks, A.D., et al., *The ETS-domain transcription factor family*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(12): p. 1371-87.
97. Wasylyk, B., J. Hagman, and A. Gutierrez-Hartmann, *Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(6): p. 213-6.
98. Li, R., H. Pei, and D.K. Watson, *Regulation of Ets function by protein - protein interactions*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6514-23.
99. Kihara-Negishi, F., et al., *In vivo complex formation of PU.1 with HDAC1 associated with PU.1-mediated transcriptional repression*. Oncogene, 2001. **20**(42): p. 6039-47.
100. Yan, C. and D.D. Boyd, *Regulation of matrix metalloproteinase gene expression*. J Cell Physiol, 2007. **211**(1): p. 19-26.
101. Benbow, U. and C.E. Brinckerhoff, *The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?* Matrix Biol, 1997. **15**(8-9): p. 519-26.
102. Chakraborti, S., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview*. Mol Cell Biochem, 2003. **253**(1-2): p. 269-85.
103. Westermarck, J. and V.M. Kahari, *Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion*. Faseb J, 1999. **13**(8): p. 781-92.
104. Van den Steen, P.E., et al., *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**(6): p. 375-536.
105. Ilyas, M., *Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development*. J Pathol, 2005. **205**(2): p. 130-44.
106. Le Floch, N., et al., *The proinvasive activity of Wnt-2 is mediated through a noncanonical Wnt pathway coupled to GSK-3beta and c-Jun/AP-1 signaling*. Faseb J, 2005. **19**(1): p. 144-6.
107. Paoni, N.F., et al., *Transcriptional profiling of the transition from normal intestinal epithelia to adenomas and carcinomas in the APCMin/+ mouse*. Physiol Genomics, 2003. **15**(3): p. 228-35.
108. Zi, X., et al., *Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells*

- suppresses tumor growth and cellular invasiveness. Cancer Res, 2005. 65(21): p. 9762-70.*
109. Mercurio, F. and A.M. Manning, *Multiple signals converging on NF-kappaB. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(2): p. 226-32.*
 110. Yan, C., et al., *A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. Faseb J, 2004. 18(3): p. 540-1.*
 111. Selvamurugan, N., S. Kwok, and N.C. Partridge, *Smad3 interacts with JunB and Cbfa1/Runx2 for transforming growth factor-beta1-stimulated collagenase-3 expression in human breast cancer cells. J Biol Chem, 2004. 279(26): p. 27764-73.*
 112. Dechow, T.N., et al., *Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(29): p. 10602-7.*
 113. Illman, S.A., et al., *Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 18): p. 3856-65.*
 114. Hess, J., et al., *AP-1 and Cbfa/runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. J Biol Chem, 2001. 276(23): p. 20029-38.*
 115. Ye, S., *Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. Matrix Biol, 2000. 19(7): p. 623-9.*
 116. Rutter, J.L., et al., *A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. Cancer Res, 1998. 58(23): p. 5321-5.*
 117. Kanamori, Y., et al., *Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. Cancer Res, 1999. 59(17): p. 4225-7.*
 118. Wyatt, C.A., et al., *Potential for the 2G single nucleotide polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase to enhance gene expression in normal stromal cells. Cancer Res, 2002. 62(24): p. 7200-2.*
 119. Price, S.J., D.R. Greaves, and H. Watkins, *Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. J Biol Chem, 2001. 276(10): p. 7549-58.*
 120. Harendza, S., et al., *Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. J Biol Chem, 2003. 278(23): p. 20490-9.*
 121. Jormsjo, S., et al., *Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. Circ Res, 2000. 86(9): p. 998-1003.*
 122. Zhang, B., et al., *Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. Circulation, 1999. 99(14): p. 1788-94.*

123. Overall, C.M., J.L. Wrana, and J. Sodek, *Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression.* J Biol Chem, 1991. **266**(21): p. 14064-71.
124. Hsu, J.C., R. Bravo, and R. Taub, *Interactions among LRF-1, JunB, c-Jun, and c-Fos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(10): p. 4654-65.
125. Delany, A.M., D. Durant, and E. Canalis, *Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts.* Mol Endocrinol, 2001. **15**(10): p. 1781-9.
126. Quinones, S., et al., *Transcriptional regulation of human stromelysin.* J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 8339-44.
127. Rothhut, B., et al., *Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through Focal adhesion kinase.* Biochimie, 2007. **89**(5): p. 613-24.
128. Kim, E.S., Y.W. Sohn, and A. Moon, *TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells.* Cancer Lett, 2007. **252**(1): p. 147-56.
129. Oh, J.H., et al., *Ultraviolet B-induced matrix metalloproteinase-1 and -3 secretions are mediated via PTEN/Akt pathway in human dermal fibroblasts.* J Cell Physiol, 2006. **209**(3): p. 775-85.
130. Borghaei, R.C., C. Sullivan, and E. Mochan, *Identification of a cytokine-induced repressor of interleukin-1 stimulated expression of stromelysin 1 (MMP-3).* J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2126-31.
131. Ye, S., et al., *Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis.* Br Heart J, 1995. **73**(3): p. 209-15.
132. Ghilardi, G., et al., *A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-3 promoter enhances breast cancer susceptibility.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(12): p. 3820-3.
133. Marasini, B., et al., *Stromelysin promoter polymorphism is associated with systemic sclerosis.* Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(4): p. 475-6.
134. Satsangi, J., et al., *A functional polymorphism of the stromelysin gene (MMP-3) influences susceptibility to primary sclerosing cholangitis.* Gastroenterology, 2001. **121**(1): p. 124-30.
135. Selmi, C., et al., *Common variants of the matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) gene promoter in primary biliary cirrhosis.* Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 247-8.
136. Takahashi, M., et al., *The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene.* J Bone Joint Surg Br, 2001. **83**(4): p. 491-5.
137. Zhang, B., et al., *Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -3, -9, and -12 genes in relation to subarachnoid hemorrhage.* Stroke, 2001. **32**(9): p. 2198-202.
138. Yoon, S., et al., *Genetic analysis of MMP3, MMP9, and PAI-1 in Finnish patients with abdominal aortic or intracranial aneurysms.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(2): p. 563-8.

139. Terashima, M., et al., *Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction*. *Circulation*, 1999. **99**(21): p. 2717-9.
140. Lamblin, N., et al., *Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(1): p. 43-8.
141. Ghilardi, G., et al., *Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(8): p. 2344-6.
142. Humphries, S., et al., *The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis*. *Eur Heart J*, 2002. **23**(9): p. 721-5.
143. Humphries, S.E., et al., *The 5A/6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP-3) gene predicts progression of angiographically determined coronary artery disease in men in the LOCAT gemfibrozil study. Lipid Coronary Angiography Trial*. *Atherosclerosis*, 1998. **139**(1): p. 49-56.
144. Rauramaa, R., et al., *The Rsal polymorphism in the alpha-fibrinogen gene and response of plasma fibrinogen to physical training--a controlled randomised clinical trial in men*. *Thromb Haemost*, 2000. **83**(6): p. 803-6.
145. Ye, S., et al., *Human stromelysin gene promoter activity is modulated by transcription factor ZBP-89*. *FEBS Lett*, 1999. **450**(3): p. 268-72.
146. Borghaei, R.C., et al., *NF-kappaB binds to a polymorphic repressor element in the MMP-3 promoter*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **316**(1): p. 182-8.
147. Sanz, L., et al., *Zeta PKC plays a critical role during stromelysin promoter activation by platelet-derived growth factor through a novel palindromic element*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(13): p. 10044-9.
148. Sanz, L., J. Moscat, and M.T. Diaz-Meco, *Molecular characterization of a novel transcription factor that controls stromelysin expression*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(6): p. 3164-70.
149. Matrisian, L.M., et al., *Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts*. *Embo J*, 1985. **4**(6): p. 1435-40.
150. Matrisian, L.M., et al., *Isolation of the oncogene and epidermal growth factor-induced transin gene: complex control in rat fibroblasts*. *Mol Cell Biol*, 1986. **6**(5): p. 1679-86.
151. Kerr, L.D., J.T. Holt, and L.M. Matrisian, *Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways*. *Science*, 1988. **242**(4884): p. 1424-7.
152. deSouza, S., et al., *A novel nerve growth factor-responsive element in the stromelysin-1 (transin) gene that is necessary and sufficient for gene expression in PC12 cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(16): p. 9106-14.
153. Baillat, D., et al., *ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(33): p. 29386-98.
154. Fenrick, R., et al., *TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(16): p. 5828-39.
155. Wang, L. and S.W. Hiebert, *TEL contacts multiple co-repressors and specifically associates with histone deacetylase-3*. *Oncogene*, 2001. **20**(28): p. 3716-25.

156. Buttice, G., S. Quinones, and M. Kurkinen, *The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(13): p. 3723-31.
157. Frisch, S.M. and H.E. Ruley, *Transcription from the stromelysin promoter is induced by interleukin-1 and repressed by dexamethasone*. J Biol Chem, 1987. **262**(34): p. 16300-4.
158. Sirum-Connolly, K. and C.E. Brinckerhoff, *Interleukin-1 or phorbol induction of the stromelysin promoter requires an element that cooperates with AP-1*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(2): p. 335-41.
159. Matrisian, L.M., et al., *Negative regulation of gene expression by TGF-beta*. Mol Reprod Dev, 1992. **32**(2): p. 111-20.
160. Calkhoven, C.F., C. Muller, and A. Leutz, *Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1920-32.
161. Ramji, D.P. and P. Foka, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 3): p. 561-75.
162. Tenen, D.G., et al., *Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia*. Blood, 1997. **90**(2): p. 489-519.
163. Tenen, D.G., *Abnormalities of the CEBP alpha transcription factor: a major target in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2001. **15**(4): p. 688-9.
164. Schuster, M.B. and B.T. Porse, *C/EBPalpha: a tumour suppressor in multiple tissues?* Biochim Biophys Acta, 2006. **1766**(1): p. 88-103.
165. Fuchs, O., *Growth-inhibiting activity of transcription factor C/EBPalpha, its role in haematopoiesis and its tumour suppressor or oncogenic properties in leukaemias*. Folia Biol (Praha), 2007. **53**(3): p. 97-108.
166. Diehl, A.M., *Roles of CCAAT/enhancer-binding proteins in regulation of liver regenerative growth*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 30843-6.
167. Porse, B.T., et al., *E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo*. Cell, 2001. **107**(2): p. 247-58.
168. Timchenko, N.A., et al., *CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(12): p. 7353-61.
169. Timchenko, N.A., M. Wilde, and G.J. Darlington, *C/EBPalpha regulates formation of S-phase-specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2936-45.
170. Timchenko, N.A., et al., *CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein*. Genes Dev, 1996. **10**(7): p. 804-15.
171. Wang, H., et al., *C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4*. Mol Cell, 2001. **8**(4): p. 817-28.
172. Zhu, S., et al., *C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7181-90.
173. Iakova, P., S.S. Awad, and N.A. Timchenko, *Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest*. Cell, 2003. **113**(4): p. 495-506.
174. Sebastian, T., et al., *C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras(V12)-induced cellular senescence*. Embo J, 2005. **24**(18): p. 3301-12.

175. Chen, Y., H. Hu, and B.G. Atkinson, *Characterization and expression of C/EBP-like genes in the liver of Rana catesbeiana tadpoles during spontaneous and thyroid hormone-induced metamorphosis*. Dev Genet, 1994. **15**(4): p. 366-77.
176. Poli, V., *The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29279-82.
177. Bretz, J.D., et al., *C/EBP-related protein 2 confers lipopolysaccharide-inducible expression of interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 to a lymphoblastic cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7306-10.
178. Luethy, J.D., et al., *Isolation and characterization of the hamster gadd153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA*. J Biol Chem, 1990. **265**(27): p. 16521-6.
179. Christy, R.J., et al., *CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2593-7.
180. Legraverend, C., et al., *High level activity of the mouse CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene promoter involves autoregulation and several ubiquitous transcription factors*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(8): p. 1735-42.
181. Wouters, B.J., et al., *Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3706-14.
182. Tada, Y., et al., *Epigenetic modulation of tumor suppressor CCAAT/enhancer binding protein alpha activity in lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(6): p. 396-406.
183. Bennett, K.L., et al., *Tumor suppressor activity of CCAAT/enhancer binding protein alpha is epigenetically down-regulated in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4657-64.
184. Niehof, M., et al., *Autoregulation enables different pathways to control CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) transcription*. J Mol Biol, 2001. **309**(4): p. 855-68.
185. Armstrong, D.A., L.N. Phelps, and M.P. Vincenti, *CCAAT enhancer binding protein-beta regulates matrix metalloproteinase-1 expression in interleukin-1beta-stimulated A549 lung carcinoma cells*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(9): p. 1517-24.
186. Georgopoulos, K., D.D. Moore, and B. Derfler, *Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment*. Science, 1992. **258**(5083): p. 808-12.
187. Nietfeld, W. and A. Meyerhans, *Cloning and sequencing of hIk-1, a cDNA encoding a human homologue of mouse Ikaros/LyF-1*. Immunol Lett, 1996. **49**(1-2): p. 139-41.
188. Georgopoulos, K., *Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 162-74.
189. Molnar, A. and K. Georgopoulos, *The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8292-303.
190. Georgopoulos, K., S. Winandy, and N. Avitahl, *The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 155-76.

191. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
192. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
193. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
194. Gama-Sosa, M.A., et al., *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(19): p. 6883-94.
195. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **111**(1): p. 47-54.
196. Qu, G.Z., et al., *Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16*. Cancer Genet Cytogenet, 1999. **109**(1): p. 34-9.
197. Baylin, S.B., et al., *DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas*. Cancer Res, 1986. **46**(6): p. 2917-22.
198. Greger, V., et al., *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. Hum Genet, 1989. **83**(2): p. 155-8.
199. Sakai, T., et al., *Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Am J Hum Genet, 1991. **48**(5): p. 880-8.
200. Mohandas, T., R.S. Sparkes, and L.J. Shapiro, *Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation*. Science, 1981. **211**(4480): p. 393-6.
201. Hsiao, W.L., S. Gattoni-Celli, and I.B. Weinstein, *Effects of 5-azacytidine on the progressive nature of cell transformation*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(7): p. 1800-3.
202. Taylor, S.M. and P.A. Jones, *Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine*. Cell, 1979. **17**(4): p. 771-9.
203. Daskalakis, M., et al., *Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2957-64.
204. Juttermann, R., E. Li, and R. Jaenisch, *Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 11797-801.
205. Eden, A., et al., *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation*. Science, 2003. **300**(5618): p. 455.
206. Yang, A.S., et al., *Comment on "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation" and "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation"*. Science, 2003. **302**(5648): p. 1153; author reply 1153.
207. Stedman, E., *Cell specificity of histones*. Nature, 1950. **166**(4227): p. 780-1.
208. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 786-94.
209. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
210. Allis, C.D., et al., *New nomenclature for chromatin-modifying enzymes*. Cell, 2007. **131**(4): p. 633-6.

211. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
212. Ruthenburg, A.J., et al., *Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 983-94.
213. Wang, G.G., C.D. Allis, and P. Chi, *Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications*. Trends Mol Med, 2007. **13**(9): p. 363-72.
214. Mikkelsen, T.S., et al., *Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 553-60.
215. Cedar, H. and Y. Bergman, *Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(5): p. 295-304.
216. Eden, S., et al., *DNA methylation models histone acetylation*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 842.
217. Hashimshony, T., et al., *The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development*. Nat Genet, 2003. **34**(2): p. 187-92.
218. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
219. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 187-91.
220. Esteve, P.O., et al., *Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication*. Genes Dev, 2006. **20**(22): p. 3089-103.
221. Zhao, Q., et al., *PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(3): p. 304-11.
222. Tost, J., *DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker*. Methods Mol Biol, 2009. **507**: p. 3-20.
223. Clark, I.M., et al., *The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1362-78.
224. Ulrey, C.L., et al., *The impact of metabolism on DNA methylation*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No 1**: p. R139-47.
225. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
226. Cheng, X. and R.M. Blumenthal, *Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective*. Structure, 2008. **16**(3): p. 341-50.
227. Hermann, A., S. Schmitt, and A. Jeltsch, *The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 31717-21.
228. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
229. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
230. Bonfils, C., et al., *Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10754-60.

231. Mertineit, C., et al., *Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells*. Development, 1998. **125**(5): p. 889-97.
232. Ratnam, S., et al., *Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development*. Dev Biol, 2002. **245**(2): p. 304-14.
233. Howell, C.Y., et al., *Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene*. Cell, 2001. **104**(6): p. 829-38.
234. Lei, H., et al., *De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells*. Development, 1996. **122**(10): p. 3195-205.
235. Shirohzu, H., et al., *Three novel DNMT3B mutations in Japanese patients with ICF syndrome*. Am J Med Genet, 2002. **112**(1): p. 31-7.
236. Brenner, C., et al., *Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor*. Embo J, 2005. **24**(2): p. 336-46.
237. Klenova, E.M., et al., *The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(5): p. 399-414.
238. Kanellopoulou, C., et al., *Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing*. Genes Dev, 2005. **19**(4): p. 489-501.
239. Boyes, J. and A. Bird, *DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1123-34.
240. Compere, S.J. and R.D. Palmiter, *DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene lymphoid cells*. Cell, 1981. **25**(1): p. 233-40.
241. Kass, S.U., N. Landsberger, and A.P. Wolffe, *DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation*. Curr Biol, 1997. **7**(3): p. 157-65.
242. Siegfried, Z., et al., *DNA methylation represses transcription in vivo*. Nat Genet, 1999. **22**(2): p. 203-6.
243. Watt, F. and P.L. Molloy, *Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter*. Genes Dev, 1988. **2**(9): p. 1136-43.
244. Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. Cell, 1997. **88**(4): p. 471-81.
245. Buschhausen, G., et al., *Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1177-81.
246. Bird, A.P. and A.P. Wolffe, *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. Cell, 1999. **99**(5): p. 451-4.
247. Sarraf, S.A. and I. Stancheva, *Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 595-605.
248. Yoon, H.G., et al., *N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 723-34.
249. Wade, P.A., *Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression*. Bioessays, 2001. **23**(12): p. 1131-7.
250. Gabory, A., et al., *H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice*. Development, 2009. **136**(20): p. 3413-21.

251. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
252. Lees-Murdock, D.J. and C.P. Walsh, *DNA methylation reprogramming in the germ line*. Epigenetics, 2008. **3**(1): p. 5-13.
253. Kurukuti, S., et al., *CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10684-9.
254. Chow, J. and E. Heard, *X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(3): p. 359-66.
255. Cedar, H. and Y. Bergman, *Developmental regulation of immune system gene rearrangement*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(1): p. 64-9.
256. Bergman, Y., A. Fisher, and H. Cedar, *Epigenetic mechanisms that regulate antigen receptor gene expression*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(2): p. 176-81.
257. Skok, J.A., et al., *Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 848-54.
258. Liang, H.E., et al., *Variegated transcriptional activation of the immunoglobulin kappa locus in pre-b cells contributes to the allelic exclusion of light-chain expression*. Cell, 2004. **118**(1): p. 19-29.
259. Hsieh, C.L. and M.R. Lieber, *CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication*. Embo J, 1992. **11**(1): p. 315-25.
260. Engler, P., et al., *Factors affecting the rearrangement efficiency of an Ig test gene*. J Immunol, 1991. **146**(8): p. 2826-35.
261. Cherry, S.R. and D. Baltimore, *Chromatin remodeling directly activates V(D)J recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10788-93.
262. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
263. Kanduri, C., et al., *Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive*. Curr Biol, 2000. **10**(14): p. 853-6.
264. Thakur, N., et al., *An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the Kcnq1 imprinting control region*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(18): p. 7855-62.
265. Feinberg, A.P., H. Cui, and R. Ohlsson, *DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(5): p. 389-98.
266. Everett, C.M. and N.W. Wood, *Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease*. Brain, 2004. **127**(Pt 11): p. 2385-405.
267. Cleary, J.D. and C.E. Pearson, *The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence*. Cytogenet Genome Res, 2003. **100**(1-4): p. 25-55.
268. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
269. Mertens, F., et al., *Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms*. Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2765-80.
270. Robertson, K.D. and A.P. Wolffe, *DNA methylation in health and disease*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 11-9.

271. Widschwendter, M., et al., *DNA hypomethylation and ovarian cancer biology*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4472-80.
272. De Smet, C., et al., *DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7327-35.
273. Nakamura, N. and K. Takenaga, *Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(5): p. 471-9.
274. Akiyama, Y., et al., *Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells*. Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 1911-9.
275. Gupta, A., et al., *Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(3): p. 664-73.
276. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 597-610.
277. Song, F., et al., *Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3336-41.
278. Strichman-Almashanu, L.Z., et al., *A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes*. Genome Res, 2002. **12**(4): p. 543-54.
279. Issa, J.P., *CpG island methylator phenotype in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 988-93.
280. Costello, J.F., et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 132-8.
281. Laird, P.W., *The power and the promise of DNA methylation markers*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 253-66.
282. Laird, P.W., *Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(3): p. 191-203.
283. Hatada, I., et al., *A microarray-based method for detecting methylated loci*. J Hum Genet, 2002. **47**(8): p. 448-51.
284. Balog, R.P., et al., *Parallel assessment of CpG methylation by two-color hybridization with oligonucleotide arrays*. Anal Biochem, 2002. **309**(2): p. 301-10.
285. van Steensel, B., J. Delrow, and S. Henikoff, *Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 304-8.
286. Yan, P.S., et al., *CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(4): p. 1432-8.
287. Huang, T.H., M.R. Perry, and D.E. Laux, *Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(3): p. 459-70.
288. El-Osta, A. and A.P. Wolffe, *Analysis of chromatin-immunopurified MeCP2-associated fragments*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(3): p. 733-7.
289. Beck, S., A. Olek, and J. Walter, *From genomics to epigenomics: a loftier view of life*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(12): p. 1144.
290. Yan, P.S., et al., *Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays*. Cancer Res, 2001. **61**(23): p. 8375-80.

291. Cokus, S.J., et al., *Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 215-9.
292. Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-22.
293. Lister, R., et al., *Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis*. Cell, 2008. **133**(3): p. 523-36.
294. Pomraning, K.R., K.M. Smith, and M. Freitag, *Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes*. Methods, 2009. **47**(3): p. 142-50.
295. Callinan, P.A. and A.P. Feinberg, *The emerging science of epigenomics*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R95-101.
296. Beck, S. and V.K. Rakyan, *The methylome: approaches for global DNA methylation profiling*. Trends Genet, 2008. **24**(5): p. 231-7.
297. Ushijima, T., *Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 223-31.
298. Hatada, I., *Emerging technologies for genome-wide DNA methylation profiling in cancer*. Crit Rev Oncog, 2006. **12**(3-4): p. 205-23.
299. Wilson, I.M., et al., *Epigenomics: mapping the methylome*. Cell Cycle, 2006. **5**(2): p. 155-8.
300. Lieb, J.D., et al., *Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease*. Cytogenet Genome Res, 2006. **114**(1): p. 1-15.
301. Jacinto, F.V., E. Ballestar, and M. Esteller, *Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): hunting down the DNA methylome*. Biotechniques, 2008. **44**(1): p. 35, 37, 39 passim.
302. Berman, B.P., D.J. Weisenberger, and P.W. Laird, *Locking in on the human methylome*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(4): p. 341-2.
303. Jeddloh, J.A., J.M. Greally, and O.J. Rando, *Reduced-representation methylation mapping*. Genome Biol, 2008. **9**(8): p. 231.
304. Birney, E., *Evolutionary genomics: come fly with us*. Nature, 2007. **450**(7167): p. 184-5.
305. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
306. Guccione, E., et al., *Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 933-7.
307. Guenther, M.G., et al., *A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells*. Cell, 2007. **130**(1): p. 77-88.
308. Robertson, G., et al., *Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing*. Nat Methods, 2007. **4**(8): p. 651-7.
309. Mukhopadhyay, R., et al., *The binding sites for the chromatin insulator protein CTCF map to DNA methylation-free domains genome-wide*. Genome Res, 2004. **14**(8): p. 1594-602.
310. Zhang, X., et al., *Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1189-201.
311. Zilberman, D., et al., *Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription*. Nat Genet, 2007. **39**(1): p. 61-9.

312. Farthing, C.R., et al., *Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes*. PLoS Genet, 2008. **4**(6): p. e1000116.
313. Fouse, S.D., et al., *Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 160-9.
314. Dindot, S.V., et al., *Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions*. Genome Res, 2009. **19**(8): p. 1374-83.
315. Irizarry, R.A., et al., *Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM)*. Genome Res, 2008. **18**(5): p. 780-90.
316. Weber, M., et al., *Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells*. Nat Genet, 2005. **37**(8): p. 853-62.
317. Keshet, I., et al., *Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 149-53.
318. Hayatsu, H., *The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research*. Mutat Res, 2008. **659**(1-2): p. 77-82.
319. Wang, R.Y., C.W. Gehrke, and M. Ehrlich, *Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues*. Nucleic Acids Res, 1980. **8**(20): p. 4777-90.
320. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
321. Clark, S.J., et al., *High sensitivity mapping of methylated cytosines*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(15): p. 2990-7.
322. Lister, R. and J.R. Ecker, *Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation*. Genome Res, 2009. **19**(6): p. 959-66.
323. Paul, C.L. and S.J. Clark, *Cytosine methylation: quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN analysis*. Biotechniques, 1996. **21**(1): p. 126-33.
324. Eckhardt, F., et al., *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. Nat Genet, 2006. **38**(12): p. 1378-85.
325. Chicoine, E., et al., *Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(4): p. 765-72.
326. Couillard, J., et al., *The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(4): p. 1233-9.
327. Shukeir, N., et al., *Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9202-10.
328. Pesta, M., et al., *Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC*. Anticancer Res, 2009. **29**(11): p. 4535-9.

329. Liu, B.L., et al., *Quantitative detection of multiple gene promoter hypermethylation in tumor tissue, serum, and cerebrospinal fluid predicts prognosis of malignant gliomas*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(6): p. 540-8.
330. Barski, D., et al., *Hypermethylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas*. *Brain Pathol*, 2010. **20**(3): p. 623-31.
331. Rohrs, S., et al., *Hypomethylation and expression of BEX2, IGSF4 and TIMP3 indicative of MLL translocations in acute myeloid leukemia*. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 86.
332. Muhlisich, J., et al., *Frequent but borderline methylation of p16 (INK4a) and TIMP3 in medulloblastoma and sPNET revealed by quantitative analyses*. *J Neurooncol*, 2007. **83**(1): p. 17-29.
333. Hou, P., et al., *Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma*. *Cancer*, 2006. **106**(7): p. 1602-9.
334. Clement, G., et al., *Methylation of APC, TIMP3, and TERT: a new predictive marker to distinguish Barrett's oesophagus patients at risk for malignant transformation*. *J Pathol*, 2006. **208**(1): p. 100-7.
335. Battagli, C., et al., *Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients*. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8695-9.
336. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. *Nat Genet*, 1999. **21**(1): p. 103-7.
337. Roach, H.I., et al., *Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(10): p. 3110-24.
338. Sato, N., et al., *Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness*. *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(4): p. 327-30.
339. Pender, S.L., et al., *Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(5): p. G918-24.
340. Ailenberg, M. and M. Silverman, *Trichostatin A-histone deacetylase inhibitor with clinical therapeutic potential-is also a selective and potent inhibitor of gelatinase A expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **298**(1): p. 110-5.
341. Ailenberg, M. and M. Silverman, *Differential effects of trichostatin A on gelatinase A expression in 3T3 fibroblasts and HT-1080 fibrosarcoma cells: implications for use of TSA in cancer therapy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **302**(2): p. 181-5.
342. Yan, C., et al., *Repression of 92-kDa type IV collagenase expression by MTA1 is mediated through direct interactions with the promoter via a mechanism, which is both dependent on and independent of histone deacetylation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2309-16.
343. Ma, Z., et al., *Brg-1 is required for maximal transcription of the human matrix metalloproteinase-2 gene*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(44): p. 46326-34.
344. Ma, Z., et al., *Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(12): p. 5496-509.

345. Chang, S., et al., *Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10*. Cell, 2006. **126**(2): p. 321-34.
346. Young, D.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(3): p. R503-12.
347. Weiss, C., et al., *JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun*. Embo J, 2003. **22**(14): p. 3686-95.
348. Ammanamanchi, S., J.W. Freeman, and M.G. Brattain, *Acetylated sp3 is a transcriptional activator*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35775-80.
349. Braun, H., et al., *Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(24): p. 4994-5000.
350. Czuwara-Ladykowska, J., et al., *Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20399-408.
351. Yang, S.H. and A.D. Sharrocks, *SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression*. Mol Cell, 2004. **13**(4): p. 611-7.
352. List, A., et al., *Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion*. N Engl J Med, 2006. **355**(14): p. 1456-65.
353. Sorm, F., et al., *5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic*. Experientia, 1964. **20**(4): p. 202-3.
354. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
355. Silverman, L.R., et al., *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B*. J Clin Oncol, 2002. **20**(10): p. 2429-40.
356. Kantarjian, H., et al., *Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study*. Cancer, 2006. **106**(8): p. 1794-803.
357. Lyko, F. and R. Brown, *DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(20): p. 1498-506.
358. Yoo, C.B. and P.A. Jones, *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(1): p. 37-50.
359. Chuang, J.C., et al., *Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(10): p. 1515-20.
360. Stresemann, C., et al., *Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2794-800.
361. Stresemann, C. and F. Lyko, *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 8-13.
362. Mund, C., B. Brueckner, and F. Lyko, *Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications*. Epigenetics, 2006. **1**(1): p. 7-13.
363. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
364. Notari, R.E. and J.L. DeYoung, *Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions*. J Pharm Sci, 1975. **64**(7): p. 1148-57.

365. Lin, K.T., R.L. Momparler, and G.E. Rivard, *High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine*. J Pharm Sci, 1981. **70**(11): p. 1228-32.
366. Chabot, G.G., G.E. Rivard, and R.L. Momparler, *Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 5-Aza-2'-deoxycytidine in rabbits and dogs*. Cancer Res, 1983. **43**(2): p. 592-7.
367. Chabot, G.G., J. Bouchard, and R.L. Momparler, *Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside*. Biochem Pharmacol, 1983. **32**(7): p. 1327-8.
368. Santi, D.V., A. Norment, and C.E. Garrett, *Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(22): p. 6993-7.
369. Chen, L., et al., *Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase*. Biochemistry, 1991. **30**(46): p. 11018-25.
370. Ghoshal, K., et al., *5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4727-41.
371. Palii, S.S., et al., *DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(2): p. 752-71.
372. Mortusewicz, O., et al., *Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(25): p. 8905-9.
373. Freund, A., et al., *Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences*. Trends Mol Med, 2010. **16**(5): p. 238-46.
374. Vasto, S., et al., *Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(1): p. 83-91.
375. Sarkar, D. and P.B. Fisher, *Molecular mechanisms of aging-associated inflammation*. Cancer Lett, 2006. **236**(1): p. 13-23.
376. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
377. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. **120**(4): p. 513-22.
378. Parrinello, S., et al., *Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 3): p. 485-96.
379. Gopinath, S.D. and T.A. Rando, *Stem cell review series: aging of the skeletal muscle stem cell niche*. Aging Cell, 2008. **7**(4): p. 590-8.
380. Carlson, M.E. and I.M. Conboy, *Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches*. Aging Cell, 2007. **6**(3): p. 371-82.
381. Mourkioti, F. and N. Rosenthal, *IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration*. Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 535-42.
382. Huang, H., et al., *IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling*. Cell Death Differ, 2009. **16**(10): p. 1332-43.

383. Seita, J., et al., *Interleukin-27 directly induces differentiation in hematopoietic stem cells*. Blood, 2008. **111**(4): p. 1903-12.
384. Iliopoulos, D., H.A. Hirsch, and K. Struhl, *An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation*. Cell, 2009. **139**(4): p. 693-706.
385. Coppe, J.P., et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. 2853-68.
386. Young, A.R. and M. Narita, *SASP reflects senescence*. EMBO Rep, 2009. **10**(3): p. 228-30.
387. Coppe, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 99-118.
388. Kumar, S., A.J. Millis, and C. Baglioni, *Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4683-7.
389. Wang, S., et al., *Characterization of IGFBP-3, PAI-1 and SPARC mRNA expression in senescent fibroblasts*. Mech Ageing Dev, 1996. **92**(2-3): p. 121-32.
390. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *The signals and pathways activating cellular senescence*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(5): p. 961-76.
391. Lombard, D.B., et al., *DNA repair, genome stability, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 497-512.
392. Braig, M. and C.A. Schmitt, *Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2881-4.
393. Collado, M. and M. Serrano, *The power and the promise of oncogene-induced senescence markers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 472-6.
394. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
395. Coppe, J.P., et al., *Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence*. J Biol Chem, 2006. **281**(40): p. 29568-74.
396. Krtolica, A., et al., *Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12072-7.
397. Liu, D. and P.J. Hornsby, *Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3117-26.
398. Charalambous, C., et al., *Glioma-associated endothelial cells show evidence of replicative senescence*. Exp Cell Res, 2007. **313**(6): p. 1192-202.
399. Studebaker, A.W., et al., *Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 9087-95.
400. Xue, W., et al., *Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 656-60.
401. Rodier, F., et al., *Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(8): p. 973-9.
402. d'Adda di Fagagna, F., *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(7): p. 512-22.

403. Acosta, J.C., et al., *Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1006-18.
404. Kwong, J., et al., *p38alpha and p38gamma mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11237-46.
405. Iwasa, H., J. Han, and F. Ishikawa, *Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway*. Genes Cells, 2003. **8**(2): p. 131-44.
406. Wang, W., et al., *Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3389-403.
407. Funayama, R. and F. Ishikawa, *Cellular senescence and chromatin structure*. Chromosoma, 2007. **116**(5): p. 431-40.
408. Mehta, I.S., et al., *Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 250-63.
409. Adams, P.D., *Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging*. Gene, 2007. **397**(1-2): p. 84-93.
410. Narita, M., *Cellular senescence and chromatin organisation*. Br J Cancer, 2007. **96**(5): p. 686-91.
411. Horike, S., et al., *Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome*. Nat Genet, 2005. **37**(1): p. 31-40.
412. Pendas, A.M., et al., *Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase genes clustered on chromosome 11q22.3*. Genomics, 1996. **37**(2): p. 266-8.
413. Sun, T., et al., *Haplotypes in matrix metalloproteinase gene cluster on chromosome 11q22 contribute to the risk of lung cancer development and progression*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(23): p. 7009-17.
414. Caterina, J.J., et al., *Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49598-604.
415. Van Lint, P. and C. Libert, *Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(4): p. 217-23.
416. Kerkela, E., et al., *Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumor cells in skin cancer*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(6): p. 1113-9.
417. Maier, H., et al., *Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1946-60.
418. Comb, M. and H.M. Goodman, *CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(13): p. 3975-82.
419. Wenger, R.H., et al., *Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site*. Eur J Biochem, 1998. **253**(3): p. 771-7.
420. Prendergast, G.C. and E.B. Ziff, *Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region*. Science, 1991. **251**(4990): p. 186-9.

421. Qiang, M., et al., *The site specific demethylation in the 5'-regulatory area of NMDA receptor 2B subunit gene associated with CIE-induced up-regulation of transcription*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8798.
422. Katryniok, C., et al., *Role of DNA methylation and methyl-DNA binding proteins in the repression of 5-lipoxygenase promoter activity*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(1): p. 49-57.
423. Kuroda, A., et al., *Insulin gene expression is regulated by DNA methylation*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6953.
424. Pahl, H.L., et al., *Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention*. J Cell Biol, 1996. **132**(4): p. 511-22.
425. Yang, X.D., et al., *Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit*. EMBO J, 2009. **28**(8): p. 1055-66.
426. Wan, H.Y., et al., *Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 16.
427. Rhee, I., et al., *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 552-6.
428. Ndlovu, N., et al., *Hyperactivated NF- κ B and AP-1 transcription factors promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(20): p. 5488-504.
429. Belguise, K., et al., *FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1434-44.
430. Fujioka, S., et al., *NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7806-19.
431. Zerbini, L.F., et al., *Constitutive activation of nuclear factor kappaB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2206-15.
432. Zhou, Y., et al., *Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 59.
433. Wolter, S., et al., *c-Jun controls histone modifications, NF-kappaB recruitment, and RNA polymerase II function to activate the ccl2 gene*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(13): p. 4407-23.
434. Ito, T., et al., *Identification of SWI.SNF complex subunit BAF60a as a determinant of the transactivation potential of Fos/Jun dimers*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2852-7.
435. Ng, K.W., et al., *The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome*. EMBO J, 1997. **16**(8): p. 2072-85.
436. Kossakowska, A.E., et al., *Elevated plasma gelatinase A (MMP-2) activity is associated with quiescent Crohn's Disease*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **878**: p. 578-80.
437. Zhu, J.K., *Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 143-66.
438. Gehring, M., W. Reik, and S. Henikoff, *DNA demethylation by DNA repair*. Trends Genet, 2009. **25**(2): p. 82-90.
439. Ooi, S.K. and T.H. Bestor, *The colorful history of active DNA demethylation*. Cell, 2008. **133**(7): p. 1145-8.

440. Morgan, H.D., et al., *Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52353-60.
441. Metivier, R., et al., *Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 45-50.
442. Boland, M.J. and J.K. Christman, *Characterization of Dnmt3b:thymine-DNA glycosylase interaction and stimulation of thymine glycosylase-mediated repair by DNA methyltransferase(s) and RNA*. J Mol Biol, 2008. **379**(3): p. 492-504.
443. Li, L.C., et al., *Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17337-42.
445. Kriaucionis, S. and N. Heintz, *The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain*. Science, 2009. **324**(5929): p. 929-30.
446. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
447. Banno, T., A. Gazel, and M. Blumenberg, *Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32633-42.
448. Wan, Y., et al., *UV-induced expression of GADD45 is mediated by an oxidant sensitive pathway in cultured human keratinocytes and in human skin in vivo*. Int J Mol Med, 2000. **6**(6): p. 683-8.
449. Barreto, G., et al., *Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 671-5.
450. Jin, S.G., C. Guo, and G.P. Pfeifer, *GADD45A does not promote DNA demethylation*. PLoS Genet, 2008. **4**(3): p. e1000013.
451. Engel, N., et al., *Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice*. Epigenetics, 2009. **4**(2): p. 98-9.
452. Rao, V.A., et al., *Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(7): p. 713-24.
453. Nuciforo, P.G., et al., *Complex engagement of DNA damage response pathways in human cancer and in lung tumor progression*. Carcinogenesis, 2007. **28**(10): p. 2082-8.
455. Zindy, P., et al., *Upregulation of DNA repair genes in active cirrhosis associated with hepatocellular carcinoma*. FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 95-9.
456. Hashimoto, K., et al., *DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(11): p. 3303-13.
457. Noda, A., et al., *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*. Exp Cell Res, 1994. **211**(1): p. 90-8.
458. Atadja, P., et al., *Increased activity of p53 in senescing fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8348-52.
459. Alcorta, D.A., et al., *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13742-7.
460. Hara, E., et al., *Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 859-67.

461. Reznikoff, C.A., et al., *Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells*. Cancer Res, 1996. **56**(13): p. 2886-90.
462. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Couillard J, Esteve, P.O, Pradhan, S and St-Pierre, Y. 5-Aza-2'deoxyctidine and interleukin-1 cooperate to regulate matrix metalloproteinase-3 gene expression. *Int. J. Cancer*. Dec 17 Ahead of print

Demers M, **Couillard J**, Giglia-Marie G, Magnaldon T and St-Pierre Y. Increased Galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under control of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 25;387(3):425-9.

Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y. The role of hypomethylation in the control of stromelysin expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Apr 21;342(4):1233-9.

St-Pierre Y, **Couillard J**, and Van Themsche C. Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2004 Oct ; 8(5) : 473-489

Demers M, **Couillard J**, Belanger S and St-Pierre Y,. New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. *Crit. Review Immunol*. 2005;25(6):493-523

COMMUNICATIONS:

Couillard J and St-Pierre Y. Interplay between inflammatory mediators and epigenetic factors in the control of MMP-3 gene expression by tumor cells. Proceedings of the Special Conference by American Association for Cancer Research on Chemical and Biological Aspects of Inflammation and Cancer. Ko Olina, Oahu, Hawaii October 14 – 17, 2008

Couillard J, Lavoie G and St-Pierre Y. The role of DNA methylation in the regulation of MMP gene expression. Proceedings of the Special Conference by Gordon Research Conference on Cancer Genetics and Epigenetics. Il Ciocco Lucca (Barga), Italy. May 20-25, 2007

Couillard, J, Demers, M, St-Pierre, Y. DNA methylation controls stromelysin-1 expression in colon carcinoma cells. Proceeding of the AACR Special Conference on Cancer, Proteases, and the Tumor Microenvironment. Bonita Springs, FL. Nov 30th to Dec 4th 2005. (p. B53).

St-Pierre Y, Chicoine E, and **Couillard J**. Hypomethylation favors the emergence of aggressive tumor cells by inducing the expression of matrix metalloproteinases. Proceedings of the Special Conference by the American Association for Cancer Research

(AACR) on Chromatin, Chromosome, and Cancer Epigenetics, Waikola, Hawaii, November 1-14th, 2004, (p. A37).