

ERIC CHICOINE

Rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de MMP-9

Mémoire (par article)

Présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Immunologie et Virologie

Directeur : Yves St-Pierre, PhD

Jury interne : François Denis, PhD

Jury externe : Michel Houde, PhD

©Droits réservés

Novembre 2001

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Université du Québec

TABLES DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	I
TABLES DES MATIÈRES.....	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IV
LISTE DES FIGURES	VI
SOMMAIRE	VIII

Chapitre 1

1-Introduction :	1
1.1 Cancer	1
1.2 Cancer et métastase	1
1.3 Les différentes étapes du processus métastatique	2
2- Lymphome et métastase	2
2.1 Définition du lymphome	2
2.2 Classification.....	3
2.2.1 Classification générale du lymphome.....	3
2.2.2 Le lymphome non-Hodgkinien.....	4
2.2.3 Les traitements du lymphome non-Hodgkinien	5
2.3 Un modèle expérimental du lymphome : le modèle de Kaplan.....	6
2.4 Activité protéolytique et dissémination du lymphome	7
3-MMP-9 : aspects biologiques	8
3.1 Introduction : rôles de MMP-9	8
3.2 Embryologie et MMP-9	9
3.3 Lymphome et MMP-9.....	10
3.4 MMP-9 : caractéristiques biochimiques	11
3.4.1 Activation	11
3.4.2 Substrats peptidiques	11
3.4.3 Substrats biologiques	11
3.4.4 Structure chimique.....	12
3.5 Inhibition par les TIMPs	12
3.6 Régulation transcriptionnelle de MMP-9.....	13
3.7 Facteurs de croissance, cytokines, signaux de transduction et facteurs de transcription	13

4-Régulation transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN :.....	16
4.1 Introduction.....	16
4.2 Distribution des cytosines méthylées et îlots CpG	16
4.3 Enzymes catalysant la réaction de méthylation : les méthyltransférases à ADN (ou « DNMTs »).....	17
4.3.1 DNMT1	18
4.3.2 DNMT3	18
4.4 Rôles de la méthylation de l'ADN.....	19
4.4.1 Condensation et stabilité chromosomique.....	20
4.4.2 Répression de la transcription de gènes.....	21
4.4.3 Mécanisme de répression indirecte : protéines de la famille ' <i>methyl-CpG binding-proteins</i> '	22
4.4.4 Méthylation de l'ADN et Histone déacétylase : partenaires dans la répression de la transcription.....	23
4.5 Méthylation et cancer.....	24
4.5.1 Méthylation comme phénomène épigénétique.....	24
4.5.2 Hyperméthylation et ' <i>tumor-suppressor genes</i> ' (Tableau 1)	25
4.5.3 Hyper- et hypométhylation : Complémentarité de fonction.....	27

Chapitre 2

ACCUSÉ DE RÉCEPTION	34
PARTICIPATION DES AUTEURS	35
ARTICLE "Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression" de Chicoine <i>et al.</i> (2001), tel que soumis à <i>Cancer Research</i>	36

Chapitre 3

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	67
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-azaC ou 5-aza-CdR	5-aza-2'-deoxycytidine
a.a	acide aminé
ADN (DNA)	acide désoxyribonucléique (deoxyribonucleic acid)
ADNc	ADN complémentaire
AP-1	'activating protein-1'
AP-2	'activating protein-2'
ARN (RNA)	acide ribonucléique (ribonucleic acid)
ARNm	ARN de type messenger (messenger RNA)
ATCC	American Type Culture Collection
bp	paire de bases
DNMT ou DNA Mtase	'DNA methyltransferase'
ECM	matrice extracellulaire (extracellular matrix)
EGF	facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
ES	cellules souches embryonnaires (embryonic stem cells)
FCS	serum fœtal de veau (fetal calf serum)
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
IL-1	interleukine-1
kb	kilobases
kDa	kiloDalton
LNH	lymphome non-Hodgkinien
M	molaire

mCyt-sensitive	'methyl-cytosine sensitive'
MeCP	'methyl-CpG-binding proteins'
ml	millilitre
mM	millimolaire
MMP	métalloprotéase de la matrice
MMP-9	métalloprotéase de la matrice-9
NK	cellules NK
NF- κ B	'nuclear factor- κ B'
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
PMA	12-phorbol 13-myristate acétate
PEA3	'polyoma virus enhancer A-binding protein-3'
PKC	protéine kinase C
Rb	protéine du rétinoblastome
RT-PCR	réaction de transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du sodium docecyl sulfate
TIMP	inhibiteurs tissulaires des MMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases)
TGF- β	'transforming growth factor-beta'
TNF- α	facteur de nécrose tumorale-alpha (tumor necrosis factor-alpha)
°C	degré Celcius
μ L	microlitre
uPA	'urokinase-plasminogen activator'
nM	nanomolaire
wt	'wild-type'

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Expression de MMP-9 chez les cellules de lymphomes murins non-agressifs (164T2 et 718) et agressifs (S19 et 374T1). (A) Les cellules ont été mises en culture sans sérum. Après 24h, les surnageants ont été lyophilisés et testés pour la présence d'activité gélatinase par zymographie. (B) L'expression de MMP-9 au niveau de l'ARNm a été analysée en RT-PCR et visualisée sur gel d'agarose. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.
- Figure 2 :** Représentation schématique du promoteur MMP-9 des lymphomes murins. La ligne horizontale représente la séquence du promoteur (de 5' à 3') avec les sites de liaisons potentiels pour certains facteurs de transcriptions et séquences de régulations encadrés tels AP-1, AP-2, Sp1, NF- κ B, de même que les séquences microsatellites d(CA)_n, et TATA. La flèche courbée représente le site d'initiation à la transcription. Les lignes verticales représentent chacun des sites CpG. Le numéro du Genbank pour cette séquence complète est AF403768.
- Figure 3 :** Schéma du taux de méthylation du promoteur MMP-9 chez des lignées de lymphomes. Séquence du promoteur MMP-9 dans la région -1058 à -383 après conversion par le traitement au bisulfite pour les cellules lymphomateuses (A) 164T2, (B) S19, (C) 374T1, et (D) 164T2 traitées avec le 5-aza-CdR. Les lignes noires sur l'axe des *x* représentent chacun des sites CpG. Les sites Sp1 situés aux positions -165 et -468 sont indiqués. L'axe des *y* représente le pourcentage de CpG méthylé.
- Figure 4 :** Induction de l'expression de MMP-9 chez les lignées de lymphomes 164T2, 718 et YAC-1 suite au traitement avec le 5-aza-CdR. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu sans sérum et traitées avec 0, 1, 5 et 10 μ M de 5-aza-CdR pendant 24h. (A) Les surnageants ont été lyophilisés et testés l'expression de MMP-9 par zymographie. (B) L'expression de MMP-9 a également été analysé par RT-PCR et visualisé sur gel d'agarose. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Figure 5 : Effet du 5-aza-CdR sur l'induction de l'expression de MMP-9 sur les cellules 164T2. Les cellules ont été pré-traitées avec le 5-aza-CdR (5 μ M) pendant 3h, puis stimulées avec le PMA (50nM) pendant 24 h. Les surnageants ont été lyophilisés et analysés pour l'expression de MMP-9 par zymographie. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Figure 6 : Effet de la méthylation *in vitro* sur l'activité du promoteur MMP-9 chez les cellules HT1080. Les vecteurs plasmidiques contenant le promoteur de MMP-9 adjacent au cDNA de la LuciferaseTM ont été transfectés dans les cellules HT1080. Quarante-huit heures après la transfection, l'activité du promoteur a été évaluée en mesurant l'activité Luciferase. Les valeurs obtenues ont été normalisées en mesurant l'activité β -galactosidase du même échantillon à partir d'une co-transfection. L'activité du promoteur MMP-9 a été mesurée avec ou sans la présence du PMA (50nM) ajouté 6 h après la transfection. Le vecteur contrôle (MMP-9wt) est constitué de la région de -681 à +63 du promoteur MMP-9. Le promoteur de MMP-9 méthylé *in vitro* est illustré en gris pâle. Les sites intacts des motifs Sp1 sont illustrés par des rectangles noirs, tandis que les mutations de chacun des deux sites Sp1 aux position -668 et -468 sont représentées par des rectangles blancs. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

SOMMAIRE

Le caractère métastatique du lymphome non-Hodgkinien est associé avec la sécrétion de protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Avec l'aide d'un modèle expérimental de lymphomes thymiques, notre groupe de recherche a démontré que l'augmentation du caractère agressif des lymphomes était associée avec l'augmentation de l'expression de MMP-9. Récemment, plusieurs études ont démontré l'importance de la méthylation de l'ADN dans la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le processus tumorigénique. Bien que la modulation de la transcription causée par la méthylation de l'ADN dans la région du promoteur est souvent associée avec la suppression transcriptionnelle du gène correspondant, certaines indications laissent supposer que l'expression des certains oncogènes pourraient être favorisées par l'hypométhylation à certains stades du cancer. Dans la présente étude, nous avons examiné l'importance de la méthylation de l'ADN sur la régulation transcriptionnelle de MMP-9 chez des lignées de lymphomes murins. Nos études ont démontré que : 1) il y a une corrélation inverse entre le taux de méthylation du promoteur de MMP-9 et le niveau d'expression de MMP-9, notamment aux sites Sp1 impliquées dans l'activité du promoteur; 2) le traitement de cellules lymphomateuses non-agressives avec un agent pharmacologique hypométhylant est suffisant pour induire la sécrétion de MMP-9; 3) cette induction de MMP-9 est potentialisée par le PMA et, 4) l'utilisation du vecteur contenant le promoteur MMP-9 méthylé *in vitro* a permis de confirmer que la méthylation de l'ADN exerce une répression sur l'activité transcriptionnelle sur le promoteur de MMP-9. L'ensemble de ces résultats indiquent que méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la régulation du gène *mmp-9* et de mieux mettre en perspective le rôle de l'hypométhylation dans le processus de métastase.

Chapitre 1

1-Introduction :

1.1 Cancer

Plusieurs travaux ont été effectués sur les causes profondes du cancer. Certaines études ont démontré que des changements dynamiques au niveau du génome (délétions, insertions, recombinaisons, etc) surviennent chez les cellules cancéreuses. En effet, une cellule cancéreuse semble avoir la capacité de modifier son génome afin d'acquérir soit 1) une surexpression d'oncogènes et/ou 2) une perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces deux classes de gènes confèrent à la cellule cancéreuse des avantages de croissance. Ces deux grandes classes de gènes impliqués dans le cancer ont été catégorisés dû à leurs altérations communes retrouvées chez les cellules cancéreuses d'humains, d'animaux et par leur présence dans les phénotypes cancéreux expérimentaux (Bishop et Weinberg, 1996). L'avancement de la recherche au cours de la dernière décennie a révélé un nombre important d'altérations communes tant au niveau moléculaire, biochimique que cellulaire. Ces *altérations* sont partagées par la plupart des types de cancer connus (Hanahan et Weinberg, 2000).

Plusieurs preuves démontrent que la tumorigénèse est un processus qui se déroule en plusieurs étapes, reflétant des altérations génétiques qui conduiraient à une cellule transformée. Les cancers retrouvés chez les humains et les animaux semblent ainsi suivre un processus analogue à l'évolution selon la théorie de Darwin : une succession de changements génétiques, chacun donnant un ou plusieurs avantages sélectifs de croissance, menant éventuellement à une conversion progressive d'une cellule normale à une cellule cancéreuse (Hanahan et Weinberg, 2000).

1.2 Cancer et métastase

De façon générale, on peut regrouper six altérations qui semblent collectivement ou individuellement promouvoir la croissance tumorale : 1) l'auto-suffisance en signaux et facteurs de croissances, 2) l'insensibilité aux signaux d'anti-prolifération, 3) l'insensibilité aux mécanismes d'apoptose, 4) le potentiel de division cellulaire illimité, 5)

le potentiel d'angiogénèse continue, et finalement, 6) la capacité d'invasion et la capacité de former des métastases (Hanahan et Weinberg, 2000). Parmi les thérapies les plus complexes et à la fois les plus prometteuses contre le cancer, plusieurs s'appuient aujourd'hui sur ce sixième et dernier aspect.

1.3 Les différentes étapes du processus métastatique

Tôt ou tard, durant le développement de la plupart des cancers, des masses primaires de tumeurs donneront naissance à des cellules pionnières qui envahiront les tissus adjacents. Ces dernières pourront par la suite s'établir avec succès en d'autres lieux et fonder de nouvelles colonies qui seront à leur tour plus agressives. Ce processus 'métastatique' est la cause d'environ 90% des décès chez les patients cancéreux (Sporn, 1996). Les principales étapes de ce processus peuvent être définies arbitrairement comme: 1) le **détachement** de la cellule cancéreuse de la tumeur primaire; 2) la **migration** de la cellule à travers le stroma cellulaire; 3) l'**intravasation**; 4) l'**adhésion** de la cellule métastatique à l'endothélium vasculaire (via les molécules d'adhésion); 5) l'interaction **bidirectionnelle** entre les cellules cancéreuses et endothéliales menant à la réactivation des gènes codant pour les enzymes de dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (ECM); 6) l'**extravasation**, ou sortie de la cellule hors de la circulation par diapédèse; 7) la **migration** jusqu'à un site secondaire potentiel; 8) la **nidification** et la croissance de la tumeur secondaire.

2- Lymphome et métastase

2.1 Définition du lymphome

Le lymphome est un terme qui comprend une grande variété de cancers issus du système lymphatique et/ou de la rate. Le lymphome est une tumeur néoplastique qui peut être formé à partir d'un seul lymphocyte malin dont les descendants se multiplient dans les tissus lymphoïdes ou autres, mais qui n'entrent pas nécessairement dans le sang en grand nombre (Conca *et al.*, 1994). Il y a divers types de lymphomes, catégorisés

selon les classes de cellules lymphocytaires affectées, selon le type de cellules en croissance et selon la présentation histopathologique du cancer.

2.2 Classification

Plus de 120 000 cas de cancers reliés de près ou de loin à des tumeurs lymphoïdes sont recensés, représentant près de 11% de tous les types de cancers que l'on retrouve chaque année, aux États-Unis uniquement (Kutas *et al.*, 2000; Tulpule et Levine, 1999). Les cancers lymphoïdes représentent une cause significative de la mort des jeunes femmes, des hommes de moins de 35 ans et plus récemment des sidéens (<http://www.leukemia-lymphoma.org>). Les causes d'émergence et de son évolution pathophysiologique se révèlent être extrêmement complexes tant au niveau cellulaire, biochimique, que génétique. Les conséquences pathologiques graves de la métastase subséquente au lymphome justifient donc l'importance d'en étudier les causes profondes, essentielles à sa prévention, à sa compréhension et à son traitement.

2.2.1 Classification générale du lymphome

Le lymphome est l'un des cancers les plus divisé et diversifié de tous les types de tumeurs existantes. Malgré la mise en pratique de plusieurs techniques de coloration cellulaire et de techniques sophistiquées de détection, plusieurs nouveaux sous-types sont continuellement découverts. Au cours des 30 dernières années, différents systèmes de classification basés sur l'apparence morphologique ont été utilisés pour catégoriser le lymphome, incluant la classification de Rappaport (utilisé jusque dans les années '70), du « National Cancer Institute Working Formulation » et plusieurs autres classifications européennes (<http://www.leukemia-lymphoma.org>). Longtemps source de frustration et de divergence à cause de la complexité et du manque d'information, la classification de ces différents types de lymphome fait maintenant consensus, celle-ci étant réajustée en fonction de nouvelles techniques immunologiques et moléculaires (permettant même de retracer la nature de la cellule maligne d'origine). La classification la plus couramment acceptée est celle de la « Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm » ou REAL (<http://www.leukemia-lymphoma.org>). Cette classification exhaustive est basée sur les distinctions faites entre l'origine cellulaire (cellules souches), le stade d'émergence cancéreux et le niveau d'agressivité clinique.

En effet, le niveau d'agressivité peut être divisé en trois sous-groupes, soit : « Low » (grade faible), « Intermediate » (grade moyen) ou « High » (grade élevé). Les lymphomes « Low grade » tendent à croître lentement et requièrent un traitement de 1 an à 5 ans, tandis que les lymphomes « Intermediate grade » ne prennent seulement que quelques semaines ou quelques mois pour croître et nécessitent donc un diagnostic et une thérapie à l'intérieur de quelques mois. Quant aux lymphomes « High grade » ils ont comme caractéristique de doubler leur taille à chaque jour. En conséquence, le traitement doit être initié très rapidement (à l'intérieur de quelques jours), car les patients deviennent malades sur de courts laps de temps (Prosper *et al.*, 1994).

Deux grands groupes de lymphomes sont catégorisés chez l'humain : soit les lymphomes Hodgkiniens (HD; ou « Hodgkin's disease ») et les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) (<http://www.leukemia-lymphoma.org>). Quatre grands groupes constituent les LNH selon la classification du REAL, soit :

Pour les néoplasmes de lymphocytes B :

- I) Précurseurs de néoplasme de lymphocytes B (comprenant précurseurs de lymphomes ou de leucémies lymphoblastiques B)
- II) Néoplasmes de lymphocytes périphériques B matures (comprenant le lymphome folliculaire, du manteau (ganglions) et de Burkitt)

Pour les néoplasmes de lymphocytes T (et cellules NK) :

- III) Précurseurs de néoplasme de lymphocytes T (comprenant précurseurs de lymphomes ou de leucémies lymphoblastiques T)
- IV) Néoplasmes de lymphocytes matures T et NK périphériques, regroupant des néoplasmes exprimant des caractéristiques similaires entre les cellules T et/ou NK.

2.2.2 Le lymphome non-Hodgkinien

L'indication la plus fréquente de l'apparition du LNH chez les patients est le gonflement ou la présence d'une masse sur au moins un des ganglions lymphatiques du cou, près de la clavicule, sous le bras ou dans la région du coude. Les facteurs associés comprennent des sueurs nocturnes, de la fièvre et la perte rapide de poids.

Alternativement, la rate peut élargir, provoquant une douleur et un inconfort interne près de la région concernée. Malgré le fait que la plupart des LNH originent des ganglions lymphatiques et de la rate, environ 25% de ceux-ci ont une origine extranodale (Kutas *et al.*, 2000). Les LNH constituent un groupe fort complexe tant au niveau de ses caractéristiques morphologiques que pathophysiologiques, ce pourquoi ils représentent la principale forme de lymphome en Amérique du Nord, avec une incidence qui augmenterait avec l'âge (Mounter et Lennard, 1999). Plus de 56,800 américains (32,600 hommes et 24,200 femmes) ont été diagnostiqués avec le LNH en 1999, comparativement à 7,100 cas pour la maladie de Hodgkin (<http://www.lymphomainfo.net/lymphoma/whatis.html>). Depuis le début de la décennie '70, le taux d'incidence pour le LNH a presque doublé, tandis que celui du lymphome Hodgkin a diminué (plus spécifiquement chez les personnes âgées) (<http://www.leukemia-lymphoma.org>).

2.2.3 Les traitements du lymphome non-Hodgkinien

Une distinction importante doit être faite entre les thérapies actuelles contre le *lymphome Hodgkin versus celles du lymphome non-Hodgkinien*. De par leur nature, le développement du lymphome de Hodgkin est moins agressif, plus localisé et facilement traitable, tandis que le développement du LNH peut être plus anarchique, plus agressif, plus systémique et s'avère difficile à traiter cliniquement (Armitage, 1993). En effet, la faible efficacité des traitements (contre le LNH) reflète bien les incidences statistiques mentionnées précédemment (Miller *et al.*, 1998). Il existe plusieurs traitements pour le LNH dépendamment de la sous-catégorie de la maladie. Le plus souvent, la chimiothérapie est utilisée si le LNH est identifié à une phase précoce de son développement. Si le lymphome se retrouve à une phase avancée de niveau d'agressivité intermédiaire (ou « intermediate grade », souvent de grande taille), la chimiothérapie, la radiothérapie (utilisant de fortes doses de rayons X ou d'autres rayons à haute énergie pour tuer les cellules cancéreuses ou les agrégats de tumeurs) et/ou l'immunothérapie pourront être conjuguées pour le traitement (Nademanee *et al.*, 1997). En effet, la mise à la disposition d'anticorps monoclonaux ont fait émerger l'idée que des néoplasies pourraient être visées et détruites sélectivement par une immunothérapie basée sur des anticorps élaborés contre des antigènes spécifiques de tumeurs (Miller *et al.*, 1982). Au

contraire des antigènes tumoraux reconnus par les cellules T, seules des molécules de la surface cellulaire représentent des cibles pour les anticorps monoclonaux. Mais, à ce jour, il n'y a eu que des succès limités dans l'utilisation de cette approche, bien qu'elle soit porteuse de promesses en complément à d'autres thérapies. Le premier rapport d'un succès dans le traitement d'une néoplasie au moyen d'anticorps monoclonaux a employé des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre des cellules B lymphomateuses, dont l'immunoglobuline membranaire exprimait l'idiotype spécifique (Miller *et al.*, 1982). La première phase du traitement conduit généralement à une rémission, mais la tumeur réapparaît toujours sous une forme qui a subi des mutations somatiques et qui, de ce fait, ne se lie plus à l'anticorps utilisé au début du traitement (Riethmuller *et al.*, 1993). Ce cas représente un exemple de ce qu'une néoplasie profite de son instabilité génétique inhérente pour échapper au traitement.

Par ailleurs, si le développement du lymphome ne répond plus à aucun traitement, la transplantation de la moelle osseuse et/ou de cellules souches du sang (qui rétablit partiellement le système immunitaire) pourra aussi être envisagée (Kutas *et al.*, 2000).

Les causes profondes provoquant l'apparition du LNH restent encore obscures, mais il semble que des altérations génétiques (la translocation génétique t(2;5), des anomalies chromosomiques (identifiées dans plus de 85% des spécimens LNH)) et certains facteurs exogènes (infection virale par le virus Epstein-Barr et/ou HTLV-1, thérapie immunosuppressive, transplantation d'organes, etc.) prédisposeraient à l'apparition de ce type de tumeur (Mounter et Lennard, 1999; Rabbitts, 1994).

2.3 Un modèle expérimental du lymphome : le modèle de Kaplan

Bien que la plupart des études utilisent des tumeurs hétérogènes isolées à partir de patients, peu de modèles expérimentaux existent pour étudier différents aspects du LNH. Néanmoins, un modèle d'étude classique bien caractérisé a été développé par l'équipe du Dr. Henry S. Kaplan. Suite aux événements d'Après-Guerre (1945), plusieurs rapports avaient documenté une apparition anormalement élevée de lymphomes chez la population ayant été exposée aux irradiations lors des bombardements nucléaires de Hiroshima et de

Nagasaki. Kaplan et ses collaborateurs ont donc reproduit ce développement de lymphomes (plus particulièrement du lymphome thymique, c'est-à-dire des cellules T immatures) grâce à l'exposition de souris (C57BL/6) à de faibles doses de rayons X (175 rads une fois/semaine x 4 semaines) (Kaplan, 1952). Ces études ont donc permis de mieux comprendre les différents stades (notamment durant le période pré-leucémique) et les agents étiologiques (virus RadLV; *virus des radio-leucoses*) impliqués dans le développement du lymphome (Liebermann, 1959). Techniquement, le prélèvement de la tumeur radio-induite chez la souris permet de maintenir en culture *in vitro*, de façon stable, les cellules tumorales récupérées au niveau du thymus, des ganglions, de la rate et/ou des reins (Lieberman *et al.*, 1979). Ceci permet donc une caractérisation rapide d'un modèle d'étude murin, ayant certaines caractéristiques communes avec les LNH.

Avec cette technique, notre laboratoire a pu ainsi au cours des dernières années générer une banque importante de ces lignées *in vitro* afin d'analyser leur transcriptome, permettant de cibler des groupes de gènes qui auraient potentiellement un impact sur de futures avenues thérapeutiques (St-Pierre *et al.*, 1999). Ces cellules lymphomateuses peuvent également dans certains cas induire une tumeur lorsqu'elles sont ré-injectées par voie intraveineuse, intrathymique ou sous-cutanée à des souris syngéniques. La disponibilité de lignées stables de différents niveaux d'agressivité permet donc de déterminer l'effet de la modulation d'un gène en particulier sur le processus métastatique (Aoudijt *et al.*, 1998a). Ce modèle a été utilisé dans notre laboratoire pour l'étude des molécules d'adhésion lors du processus métastatique (Lalancette *et al.*, 2000) et du rôle des métalloprotéases de la matrice (Aoudijt *et al.*, 1998b).

2.4 Activité protéolytique et dissémination du lymphome

La destruction de l'ECM accompagne plusieurs processus biologiques et physiologiques, incluant l'inflammation et l'invasion tumorale. Dans ce processus d'invasion, les cellules malignes doivent briser la barrière naturelle de la membrane basale pour migrer à travers l'ECM et trouver des vaisseaux lymphatiques ou sanguins. La sécrétion de protéases extracellulaires par les lymphomes semble notamment répondre à ce critère essentiel (Coussens et Werb, 1996; Chambers et Matrisian, 1997). En effet,

chez plusieurs types de cancers (dont le lymphome), on observe une surexpression de protéases, une sous-expression de leurs inhibiteurs ainsi qu'une activation de leurs zymogènes (Kossakowska *et al.*, 1992; Kossakowska *et al.*, 1998; Werb, 1997; Stetler-Stevenson, 1999; Lalancette *et al.*, 2000).

Les MMPs sont des enzymes de dégradation qui ont une gamme d'affinités variées pour certains substrats de l'ECM, dont la vitronectine (Imai *et al.*, 1995), les protéoglycans (Krane *et al.*, 1996), la fibronectine (Homandberg *et al.*, 1996), les collagènes (Krane *et al.*, 1996) et l'élastine (Senior *et al.*, 1991). La famille des MMPs comprend maintenant plus d'une vingtaine de membres, certains d'entre eux pouvant être catégorisés selon leurs similitudes structurales et leurs affinités pour les composants de l'ECM. Certaines études ont démontré que les MMPs jouent un rôle primordial dans le processus métastatique et dans l'invasion tumorale (Hanahan et Weinberg 2000). *Plus spécifiquement, plusieurs études semblent suggérer que MMP-9, une protéase régulée au niveau transcriptionnel dans les lymphocytes T normaux, jouerait un rôle important dans la croissance et la dissémination du lymphome.*

3-MMP-9 : aspects biologiques

3.1 Introduction : rôles de MMP-9

MMP-9 (E.C.3.4.24.35) a été identifiée et caractérisée initialement comme protéine de sécrétion (extracellulaire) chez les macrophages alvéolaires (Mainardi *et al.*, 1984) et chez les cellules monocytiques U937 (suite à la stimulation au PMA) (Hibbs *et al.*, 1985;1987). Par la suite, cette protéine a été classée dans la 'famille' des protéases, dû au fait qu'elle a la capacité de cliver des composants physiologiques (composants de l'ECM). Plusieurs hypothèses se sont alors posées quant au rôle de MMP-9 dans le remodelage tissulaire, tant au niveau de processus normaux (tel l'embryogénèse, section suivante) que pathologiques (tel le lymphome, section 3.3) (Vu *et al.*, 1998).

3.2 Embryologie et MMP-9

L'expression normale de MMP-9 dans les tissus est très bien coordonnée durant le développement embryonnaire. Cette enzyme est exprimée dans certains organes spécifiques (en un temps précis) durant l'implantation et le développement zygotique (Reponen *et al.*, 1995). En effet, une forte expression de MMP-9 a été démontrée au niveau des explants d'endomètres humains (Marbaix *et al.*, 1992). Plus spécifiquement, lors de l'implantation, MMP-9 est exprimée localement au niveau des cellules trophoblastiques et du sac vitellin (Reponen *et al.*, 1994). Toujours chez l'humain, on retrouve une expression de MMP-9 au 11^e jour de l'embryogénèse dans le cerveau et le système nerveux central (Pagenstecher *et al.*, 1998). Au 15^e jour, de fortes sécrétions sont détectées dans le foie, les alvéoles pulmonaires, l'épithélium de la glande thyroïde, le système squelettique, les ostéoclastes, le thymus et les cellules neuronales. Au stade adulte, MMP-9 est produite entre autres par les cellules T et est induite par leur activation clonale (division clonale des cellules T) (Leppert *et al.*, 1995). Par conséquent, MMP-9 est présente dans la plupart des réponses inflammatoires normales. Par exemple, MMP-9 n'est pas exprimée dans le derme ou l'épiderme chez la peau d'un adulte, mais son expression est induite dans les couches basales de l'épiderme et dans l'épithélium cornéal lors d'une blessure et/ou d'une cicatrisation (Mohan *et al.*, 1998). MMP-9 semble contribuer également à la dégradation de la membrane basale de la barrière encéphalique lors de blessures hémorragiques, souvent associée pour ces patients à de l'œdème cérébral (Rosenberg *et al.*, 1995).

Les études faites sur les souris délétées du gène *mmp-9* (ou « knock-out *mmp-9* ») ont démontré un rôle important de cette protéase dans le développement normal de certains tissus (Vu *et al.*, 1998). Ces souris démontrent un profil anormal dans le développement de plaques de croissance osseuse (cartilage), dans la vascularisation, dans l'angiogénèse et dans l'ossification. Bien que les chondrocytes de ces souris déficientes se développent, l'apoptose, la vascularisation et l'ossification y sont retardés, résultant en un sur-allongement progressif des plaques de croissance d'environ huit fois.

MMP-9 est aussi impliquée dans certaines pathologies reliées à la vieillesse. MMP-9 a été détectée dans les liquides cérébrospinaux et a été associée à des maladies inflammatoires au niveau du système nerveux central (Norga *et al.*, 1995). De plus, MMP-9 a été détectée dans les fluides synoviaux de patients atteints d'arthrite, bien que la corrélation directe entre MMP-9 et l'arthrite reste encore évasive (Okada *et al.*, 1995). De récents travaux ont aussi démontré un lien entre la maladie d'Alzheimer et MMP-9 (Backstrom *et al.*, 1996). Plusieurs modèles *in vitro* (et animaux) de tumorigénèse, d'arthrite et d'autres maladies ont été mis au point pour étudier la relation de MMP-9 dans ces pathologies, permettant de développer de nouvelles thérapies basées sur des inhibiteurs de protéases (Giavazzi *et al.*, 1998; Zucker *et al.*, 2000).

3.3 Lymphome et MMP-9 :

Le rôle de MMP-9 dans le processus de métastase fait l'objet d'une documentation importante, et ce, à presque tous les niveaux dans les différents types de cancers (Nelson *et al.*, 2000). Ces observations sont probablement dues à la propriété que MMP-9 a de cliver de nombreux composants de la matrice extracellulaire, permettant ainsi aux cellules néoplasiques de former des foyers de tumeurs secondaires. L'expression de MMP-9 se retrouve dans certains tissus, d'origine *lymphoïde* notamment, et au niveau des cellules endothéliales vasculaires, suggérant un rôle dans la capacité des cellules de lymphomes à migrer à travers le stroma tissulaire des organes cibles lors des dernières étapes de la métastase (St-Pierre et Potworowski, 1999). Au niveau du lymphome, plusieurs études ont porté sur la relation entre la progression tumorale et MMP-9. Ainsi, on retrouve une expression anormalement élevée des niveaux de MMP-9 chez les LNH ayant un phénotype clinique agressif et invasif (Kossakowska *et al.*, 1992, 1996, 1998, 1999; Kelly *et al.*, 2000; Vacca *et al.*, 2000). De plus, notre laboratoire a démontré que les lymphomes thymiques (issus entre autres du modèle de lymphomagenèse de Kaplan) les plus agressifs surexpriment MMP-9 de façon constitutive (Lalancette *et al.*, 2000). D'autres travaux ont démontré que la transfection du cDNA de MMP-9 chez des cellules de rat augmentait leur potentiel métastatique (Bernhard *et al.*, 1990, 1994). *Malgré tous les travaux effectués sur l'importance de*

MMP-9 dans le processus métastatique, sa régulation transcriptionnelle au niveau du lymphome reste peu documentée.

3.4 MMP-9 : caractéristiques biochimiques

3.4.1 Activation

MMP-9 est une endopeptidase zinc-dépendante sécrétée d'abord comme pro-enzyme (appelée pro-MMP-9) et par la suite activée. Tous les modes connus d'activation résultent en un clivage protéolytique d'un propeptide en N-terminal (Grant *et al.*, 1987; Sang *et al.*, 1995; Nagase et Woessner, 1999). L'activation de MMP-9 *in vitro* est également possible par le traitement avec certains produits chimiques tel les organomercures, laissant une partie de la séquence propeptidique intacte (Sang *et al.*, 1995). Certains activateurs physiologiques peuvent activer MMP-9 en la clivant, tel l'« urokinase Plasminogen Activator » (ou uPA), la stromélysine, la trypsine, l'élastase et la matrilysine (Goldberg *et al.*, 1992; Sang *et al.*, 1995).

3.4.2 Substrats peptidiques

Les substrats clivés par MMP-9 sont ceux qui ont de petites structures d'acides aminés, tel une glycine ou une alanine dans le site P1, alors que dans le site P1', les résidus aliphatiques hydrophobes sont préférés (Goldberg *et al.*, 1992). Le substrat idéal pour MMP-9 est la séquence suivante : Gly-Pro-Gln-Gly↓Ile-Phe-Gly-Gln.

3.4.3 Substrats biologiques

La gélatine (ou collagène dénaturé) est le substrat *in vitro* pour lequel MMP-9 a la plus grande affinité et c'est pourquoi elle est couramment utilisée en zymographie. Bien que l'abondance et le rôle physiologique de la gélatine dans les tissus soient peu documentés, la spécificité de substrat pour MMP-9 reste un sujet de controverse, ce qui explique entre autre le fait que plusieurs noms lui ont été attribués (Sang *et al.*, 1995). Mentionnons brièvement qu'*in vitro*, MMP-9 peut cliver les collagènes de type III, IV et V, la gélatine, la fibronectine, la laminine, l'IL-1-β, l'élastine, l'endothéline et la MBP (ou « myelin basic protein »), d'où l'association entre MMP-9 et certaines maladies

neurodégénératives) (Birkedal-Hansen, 1995; Fernandez-Patron *et al.*, 2001; Vu *et al.*, 1998).

3.4.4 Structure chimique

De façon générale, les MMPs contiennent trois domaines communs qui succèdent le peptide signal : un propeptide, un domaine catalytique et un domaine homologue à l'hémopexine (Cockett *et al.*, 1994). La portion N-terminale des MMPs (le pro-peptide) est formée de 77 à 87 résidus d'acides aminés. Cette séquence est essentielle à la conservation de la forme latente de l'enzyme, puisqu'elle bloque l'entrée du site catalytique. La portion C-terminale peut contenir une séquence hydrophobe transmembranaire utilisée comme ancre dans le cas des MMPs membranaires (MT-MMPs, ou «Membrane-Type-MMP») (Tokuraku *et al.*, 1995). MMP-9 chez l'humain est sécrétée sous forme de proenzyme de 92 kDa glycosylée et contient 17 résidus cystéine lui conférant une stabilité thermodynamique (Goldberg *et al.*, 1992). Le propeptide contient une cystéine conservée en position 99, qui joue un rôle essentiel dans le maintien stable du proenzyme et également dans l'interaction avec l'ion Zinc (dans le site actif). Une des caractéristiques particulières de MMP-9 est qu'elle peut dimériser avec elle-même et former un complexe équimolaire avec TIMP-1 (voir section suivante) (Goldberg *et al.*, 1992).

3.5 Inhibition par les TIMPs

Les MMPs possèdent leurs propres mécanismes de régulation post-traductionnelle. Les TIMPs (ou «tissue-inhibitor of matrix metalloproteinase») (21-30 kDa) sont des régulateurs physiologiques importants pour l'activité des MMPs. Pour l'instant, quatre homologues de TIMPs ont été clonés, soit TIMP-1 à - 4. Le premier membre de la famille des inhibiteurs de MMP, TIMP-1, a la capacité de réguler l'action protéolytique de MMP-9 (Nagase et Woessner, 1999). Cette glycoprotéine (ayant une masse moléculaire de 28.5 kDa) peut se lier à la forme active et latente de MMP-9 via de fortes interactions avec le domaine similaire à l'hémopexine (ou «hemopexin-like»), situé dans le site actif de l'enzyme (Nagase et Woessner, 1999). Ce complexe (rapport stoechiométrique de 1:1) ainsi formé est stable et catalytiquement inerte (c'est-à-dire qu'il y a inhibition de l'activation du proenzyme MMP-9). Donc, le déséquilibre

'protéique' entre MMP-9 et TIMP-1 *in vivo* déterminerait l'état de l'activité protéolytique du microenvironnement extracellulaire. Mentionnons finalement que d'autres inhibiteurs de MMPs existent, tel que la macroglobuline (Grinnell et Zhu, 1996)

3.6 Régulation transcriptionnelle de MMP-9

Bien que MMP-9 est l'une des protéases extracellulaires les plus étudiées au niveau de ses fonctions physiologiques, ses « circuits » de régulation et ses mécanismes moléculaires qui gouvernent sa sécrétion restent encore relativement peu documentés.

3.7 Facteurs de croissance, cytokines, signaux de transduction et facteurs de transcription

MMP-9 peut être induit au niveau transcriptionnel par des facteurs de croissance et des cytokines inflammatoires, comme le bFGF (ou « basic Fibroblast Growth Factor ») (Bond *et al.*, 1998), le EGF (« Epidermal Growth Factor ») (Lyons *et al.*, 1993), l'IL-1 (Lyons *et al.*, 1993), l'IL-6 (Kossakowska *et al.*, 1999), l'IL-13 (De Noncourt *et al.*, 2001), le PDGF (ou « Platelet-Derived Growth Factor ») (Bond *et al.*, 1998), le TGF- β (« Transforming Growth Factor-beta ») (Han *et al.*, 2001), le TNF- α (Han *et al.*, 2001) et par des agents chimiques tels les phorbol-esters comme le PMA ou le TPA (Sato et Seiki, 1993). Tous ces activateurs (sauf IL-13) peuvent aussi induire d'autres membres de la famille des MMPs comme la collagénase et la stromélysine. Par ailleurs, les signaux de transduction sous-adjacents semblent être quant à eux distincts.

MMP-9 est codé chez l'homme par un gène de 7.7 kb qui s'étend sur 13 exons. La partie 5' du gène *mmp-9* est hautement conservée entre l'humain, la souris et le lapin, du site d'initiation à la transcription (+1) jusqu'en amont du gène (-600 bp) (Mohan *et al.*, 1998). La transcription du gène *mmp-9* (qui s'effectue via un ARNm de 2.5 kb) semble être régulée chez l'humain par une séquence en amont du site de transcription d'environ 670 bp, laquelle contient des sites de liaisons pour AP-1, Sp1 et NF- κ B (Sato et Seiki, 1993). Comme chez plusieurs autres membres des MMPs, un site de liaison TRE (ou « TPA response element », ou site de liaison AP-1) se trouve près du site d'initiation à la transcription, alors qu'un second TRE se trouve également près de la partie conservée en

aval du promoteur (Mohan *et al.*, 1998). TNF- α a déjà été identifié comme inducteur de MMP-9 chez les ostéosarcomes (OST) au niveau de l'ARNm (Okada *et al.*, 1995). Des études faisant appel à des délétions et/ou mutations au niveau du promoteur de MMP-9 chez l'homme ont révélé que les motifs tels que AP-1 (situé à -79 bp), NF- κ B (situé à -600 bp) et Sp1 (situé à -558 bp) contribueraient positivement à l'induction de MMP-9 par le PMA et par le TNF- α (Sato et Seiki, 1993). Han *et al.* (2001) ont aussi démontré que le TGF- β et le TNF- α pouvaient indépendamment stimuler le promoteur de MMP-9 via deux sites de liaison, soit le TGF- β -*response element* et NF- κ B, respectivement. Watabe *et al.* (1998) ont établi que l'induction de MMP-9 par le EGF dans les lignées de cellules du cancer du sein serait médiée par les éléments tels Ets-1 et Ets-2.

Par ailleurs, d'autres travaux études ont établi l'implication d'oncogènes dans la transcription de MMP-9. Ainsi, l'activation de MMP-9 par l'oncogène *v-src*, présent chez les cellules HT1080, semble être attribuable à des sites de liaison AP-1 et Sp1 (Sato *et al.*, 1993). Le site AP-1 (le plus proximal du site d'initiation à la transcription) est indispensable mais pas suffisant pour l'induction du promoteur MMP-9 et requiert la participation additive de NF- κ B ou de Sp1 chez les cellules d'ostéosarcome OST et chez les cellules d'hépatomes HepG2 (Sato et Seiki, 1993). Dans les cellules OST, le facteur nucléaire protéique Sp1 est exprimé de façon constitutive, tandis que les facteurs AP-1 et NF- κ B sont rapidement induits par le TNF- α (Sato et Seiki, 1993). De plus chez les cellules d'adénocarcinome OVCAR-3, l'activation de MMP-9 par l'oncogène *Ha-ras* semble être médiée par les facteurs de transcription tel PEA3/*ets* et AP-1, et serait indépendante de l'enzyme *Mitogen-activated protein kinase kinase-1* (MEK-1) (Gum *et al.*, 1996). Chez la lignée hautement métastatique embryonnaire de rat 2.10.10, transformée avec les oncogènes *Ha-ras* et *v-myc*, la surexpression de MMP-9 semble impliquer NF- κ B, Sp1, PEA3 et AP-1 (Himelstein *et al.*, 1997). De plus, la délétion de répétitions microsatellites d(CA)_n, située près du site d'initiation de la transcription, semble diminuer l'activité transcriptionnelle de MMP-9, suggérant donc que la conformation du promoteur peut être importante pour la régulation de MMP-9 (Himelstein *et al.*, 1997; Shimajiri *et al.*, 1999).

De plus, l'activation transcriptionnelle chez les cellules de gliomes de rat de MMP-9 par IL-1 et le TNF- α semble être médiée par l'isoforme PKC- ζ , qui serait dépendante de NF- κ B (Estève *et al.*, soumis pour publication). D'autres résultats laissent suggérer que l'induction de MMP-9 par l'IL-1 serait médiée par la cascade des kinases *extracellular signal-regulated kinase* (ou « ERK ») et *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) via NF- κ B et AP-1 (Eberhardt *et al.*, 2000). De plus, le groupe de Reddy *et al.* (1999) ont déterminé que chez des cellules de cancer du sein, EGF stimulerait MMP-9 via les MAPK kinases.

Certains travaux ont été effectués sur la régulation transcriptionnelle de MMP-9 en utilisant des modèles d'études *in vivo*. En effet, Mohan *et al.* (1998) ont démontré chez la souris, que l'expression et l'activité de NF- κ B, Sp1 et AP-2, qui contrôlent la régulation du promoteur MMP-9, sont sélectivement induits dans l'épithélium lors d'une réaction d'inflammation et/ou lors d'une cicatrisation, modulant ainsi l'absence ou la présence de MMP-9 en temps et en lieu opportuns. Des analyses plus poussées ont révélé l'existence d'éléments régulateurs agissant en *cis* entre les régions -2722 et -7745. Ces éléments permettraient spécifiquement l'expression de MMP-9 dans les ostéoclastes et les kératinocytes, démontrant ainsi pour la première fois *in vivo*, que l'expression de MMP-9 restreinte à certaines cellules spécifiques peut être attribuable à une région spécifique du promoteur (Munaut *et al.*, 1999). Bref, au moins un site TRE doit être intact pour l'activation du promoteur MMP-9 chez les cellules en culture, tandis que les sites Sp1, NF- κ B et AP-2 jouent un rôle unique dans l'expression de MMP-9 dans certains tissus qui lui sont spécifiques (Mohan *et al.*, 1998).

Peu d'études ont été effectuées sur les mécanismes potentiels de suppression transcriptionnelle pour MMP-9, pouvant éventuellement mener à de nouvelles voies de thérapies anti-cancéreuses. Il semble, cependant, que dans certains cas, MMP-9 pourrait être inhibé par l'isoforme PKC- α chez le macrophage (St-Denis *et al.*, 1998), par le glucocorticoïde (dexaméthasone) chez les cellules de fibrosarcome humain HT1080 (Park *et al.*, 1999) et le par TGF- β chez les mastocytes (Nagase et Woessner, 1999; Fang *et al.*, 1999). Par ailleurs, une étude récente faite par l'équipe de MacDougall *et al.* (1999) à

soulevé l'hypothèse que la méthylation de l'ADN pourrait être un mode de régulation pour le gène *mmp-9*.

4-Régulation transcriptionnelle par la méthylation de l'ADN :

4.1 Introduction

Les bases de la double hélice d'ADN peuvent être modifiées de façon covalente et, généralement chez les vertébrés, la méthylation d'une cytosine semble être un mécanisme important qui permet de distinguer les gènes actifs de ceux qui ne le sont pas (Antequera et Bird, 1993). La méthylation consiste en une modification biochimique par l'addition covalente d'un groupe methyl (-CH₃) à la position du carbone 5 du noyau pyrimidine d'une cytosine, et ce, sur la séquence dinucléotidique CpG (ou CG) et/ou CpNpG (ou CNG, N représentant n'importe quelle base nucléotidique), qui est exactement appariée à la même séquence (orientée dans l'autre sens) sur l'autre chaîne de l'hélice d'ADN (Clark *et al.*, 1997). La base ainsi modifiée est apparentée à la cytosine comme la thymine l'est à l'uracile et n'a, en outre, aucun effet sur l'appariement des bases (Klimasauskas *et al.*, 1994). Selon des analyses cristallographiques avec l'enzyme méthylase bactérienne *M.HhaI*, la cytosine ciblée par l'enzyme (voir aussi section 4.3) est tout d'abord 'sortie' et tournée hors de la double hélice d'ADN pour ensuite aller dans la cavité enzymatique de la méthylase, comprenant un site actif où la réaction de méthylation peut avoir lieu grâce notamment à un site conservé comprenant une cystéine (Klimasauskas *et al.*, 1994).

4.2 Distribution des cytosines méthylées et îlots CpG

Durant l'embryogénèse chez les vertébrés, entre 70-80% des dinucléotides CpG sont symétriquement (c'est-à-dire sur le double-brin d'ADN) méthylés d'une façon distincte à chaque tissu ou cellule (Glickman *et al.*, 1997). Bien que les séquences CpG qui sont dans le génome sont rares et inégalement réparties dans le génome (appelé CpG isolé ou « bulk CpG »), on en retrouve parfois dans des régions restreintes du génome avec une fréquence de 10 à 20 fois supérieure à la moyenne, longues de 1000 à 2000

paires de bases, appelées îlots CpG (ou « CpG islands ») (Antequera et Bird, 1993). Contrairement aux CpG isolés dans le génome, ces îlots semblent rester non-méthylés dans plusieurs types cellulaires (Antequera et Bird, 1993). Ces îlots sont souvent associés à la partie 5' (en amont) de promoteurs de gènes domestiques (ou « housekeeping genes »), c'est-à-dire des gènes qui codent pour des protéines indispensables à la survie cellulaire, et qui sont de ce fait, exprimés dans une majorité de cellules (Glickman *et al.*, 1997).

4.3 Enzymes catalysant la réaction de méthylation: les méthyltransférases à ADN (ou « DNMTs »)

Les changements génomiques dans le patron de méthylation sont hautement orchestrés durant le développement embryonnaire des mammifères. En effet, ces modifications impliquent une déméthylation génomique globale ainsi qu'une re-méthylation (*de novo*), de la gamétogénèse jusqu'au développement de l'embryon (Sanford *et al.*, 1987). Plus précisément, la gamète mâle est au départ hautement méthylée, comparativement à la gamète femelle (Feinberg, 2001). Une fois fertilisé, l'œuf (ou zygote) subit une « vague » de déméthylation (déméthylation systématique du génome) jusqu'à sa pré-implantation utérine, permettant donc d'effacer tout patron de méthylation pré-existant provenant des parents (appelé « imprinting »). L'ADN du blastocyte est donc généralement non-méthylé. Après l'implantation, l'embryon subit une deuxième « vague », mais cette fois-ci de méthylation *de novo* (c'est-à-dire de nouveau) (voir section 4.3.2), qui établit ainsi un nouveau patron de méthylation embryonnaire unique (Sanford *et al.*, 1987; Kafri *et al.*, 1992). La fonction biologique de cette « re-programmation » dynamique chez l'embryon est encore inconnue. Ce profil global de méthylation des cytosines semble être établi chez les mammifères par une interaction complexe d'au moins trois enzymes nucléaires fonctionnelles appelées *Méthyltransférases à ADN* (ou « DNMTs »), lesquelles sont codées de façon indépendante par différents locus. On retrouve donc DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. Une quatrième *Méthyltransférase à ADN*, appelée DNMT2, a été clonée et caractérisée, mais jusqu'à présent, aucune fonction catalytique de cette enzyme n'a été démontrée ni *in vitro* ni *in vivo* (Okano *et al.*, 1998b; Yoder et Bestor, 1998).

4.3.1 DNMT1

DNMT1 a été la première méthyltransférase à être découverte (Bestor *et al.*, 1988), alors que les isoformes DNMT3 ont été récemment découverts (voir section suivante). DNMT1 a été démontrée comme ayant de 10 à 40 fois plus d'affinité pour de l'ADN hémi-méthylé (i.e. méthylé sur un seul brin, représentant donc un modèle artificiel calqué sur la réplication d'ADN) que de l'ADN non-méthylé (Pradhan *et al.*, 1997; 1999). Elle est de plus la méthyltransférase la plus abondante dans les cellules somatiques (Robertson *et al.*, 1999). DNMT1 a été notamment localisée par immunohistochimie à la fourche de réplication de l'ADN en méthylant de façon préférentielle les séquences CpG qui sont appariées à des séquences CpG déjà méthylées (Leonhardt *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998). Ces caractéristiques lui confèrent pour l'instant le rôle de méthyltransférase de *maintenance* (d'entretien). En effet, elle serait l'enzyme primordiale responsable pour copier le profil pré-existant de méthylation exacte, sur le brin fils, suite à la réplication d'ADN. Il en résulte que le profil de méthylation du brin d'ADN parental servira de matrice de méthylation au brin fils, permettant au profil d'être directement transmis à la prochaine réplication d'ADN.

Les souris délétées du gène DNMT1 (ou « knock-out DNMT1 ») ont démontré que cette enzyme est essentielle au développement embryonnaire ainsi qu'à l'inactivation du chromosome X (Beard *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1992; 1993). Il est possible que la létalité observée chez ces embryons (déficients en 5-méthyl-C ou 5^mC) soit due au fait que les mécanismes de répression transcriptionnelle soient non-opérationnels, ayant comme conséquence d'induire l'expression de gènes létaux (normalement inactifs). Cette méthyltransférase 'd'entretien' expliquerait la transmission automatique des résidus 5-méthyl-C, mais comme elle ne peut normalement méthyler un ADN non méthylé, ce n'est pas elle qui permet de comprendre comment un groupement méthylé peut être ajouté au départ chez les vertébrés, sans qu'il n'y ait de matrice au préalable.

4.3.2 DNMT3

Bien que DNMT1 peut méthyler de l'ADN hémi-méthylé *in vitro*, les preuves quant à son implication dans l'activité *de novo* durant le développement *in vivo* restent

contradictoires. Plusieurs exemples ont mené à l'identification d'une nouvelle classe d'enzyme méthyltransférase chez les mammifères. En effet, l'activité méthyltransférase *de novo* sur de l'ADN non-méthylé est détectée de façon prédominante chez les embryons précoces et chez les carcinomes embryonnaires (Stewart *et al.*, 1982). De plus, si une molécule d'ADN non méthylée est injectée dans un œuf de souris fécondé, des groupements méthyl y seront ajoutés à pratiquement toutes les séquences CpG (Holliday, 1993). Certaines études ont indiqué que des enzymes nucléaires autres que DNMT1 seraient responsables de l'activité *de novo in vivo*, puisque les cellules souches embryonnaires (ou « embryonic stem-cells ») qui portent la délétion du gène DNMT1 restent encore capables de méthyliser de l'ADN rétroviral *de novo* (Lei *et al.*, 1996). En 1998, le groupe d'Okano *et al.* (1998a), a finalement effectué le clonage et la caractérisation d'une nouvelle famille de méthyltransférase appelée DNMT3, comprenant deux isoformes, soit DNMT3A et -3B. Des études plus approfondies ont démontré que ces enzymes sont principalement exprimées lors de l'embryogénèse chez la souris et chez l'humain. De plus, ces isoformes semblent être hautement conservés entre les espèces (95% d'homologie en acides aminés entre la souris et l'homme) (Xie *et al.*, 1999). Des études chez les souris déficientes en isoformes DNMT3 (ou « knock-out DNMT3 ») ont révélé que ces enzymes sont essentielles à la méthylation *de novo* de leur ADN génomique (méthylation des brins de nouveau; sans qu'il y ait un profil de méthylation pré-établi) qui survient après l'implantation de l'embryon (Okano *et al.*, 1999). Les souris déficientes en DNMT3A peuvent parvenir à terme mais meurent après quatre semaines, tandis que les souris déficientes en DNMT3B ne sont pas viables et démontrent de graves signes de déficience dans le développement de certains organes (Okano *et al.*, 1999). Une relation entre une maladie humaine récessive appelée ICF (ou « immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies ») et des mutations dans le gène DNMT3B a également été démontrée (voir section 4.4.1) (Xu *et al.*, 1999).

4.4 Rôles de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN a de profonds effets sur le développement des mammifères. Certains de ces effets interdépendants incluent notamment : 1) la modification de la structure de la chromatine et de la stabilité des chromosomes, 2) la

répression de la transcription, 3) le retard ou la létalité dans le développement embryonnaire murin (voir section 4.3.1 et 4.3.2), 4) la modification de l’empreinte génomique (ou « genomic imprinting » ou ‘héritage génétique’ des parents), 5) la répression de rétrovirus et de microsatellites endogènes, 6) l’inactivation du chromosome X, et 7) le développement de la tumorigénèse (Baylin et Herman, 2000; Jones et Laird, 1999; Robertson et Wolffe, 2000). Plusieurs observations soutiennent l’idée que la méthylation de l’ADN chez les vertébrés est associée au phénomène d’inactivation des gènes et que généralement, elle ne fait que renforcer des décisions transcriptionnelles alternativement apportées par d’autres mécanismes (Baylin et Herman, 2000).

4.4.1 Condensation et stabilité chromosomique

Les cellules eucaryotes ont la tâche de condenser une quantité énorme d’ADN dans leur noyau, tout en s’assurant qu’une série de gènes soit simultanément exprimée et réprimée correctement. La plus haute densité de CpG non-méthylés dans le génome des vertébrés se trouve dans les îlots CpG, séquences qui se retrouvent près ou constituent une partie des promoteurs qui sont requis pour la transcription active de gènes. Ces îlots CpG sont dans certains cas enrichis d’histones hyperacétylés, caractéristique typique d’une chromatine transcriptionnellement compétente. Par contre, une chromatine incompétente est souvent méthylée et associée à des histones hypoacétylés, réfractaires entre autre à la digestion par les nucléases ou par des enzymes de restriction (Eden *et al.*, 1998). La micro-injection de promoteurs méthylés et non-méthylés dans les cellules de mammifère ont montré que l’ADN méthylé pouvait coopérer avec les nucléosomes pour permettre une répression optimale (voir section 4.4.4) (Kass *et al.*, 1997). En effet, l’ADN méthylé injecté est tout d’abord transcrit mais devient progressivement inactif au fur et à mesure que son assemblage dans les nucléosomes nucléaires prend lieu. Éventuellement, la machinerie transcriptionnelle, incluant l’ARN polymérase II, devient éradiqué du promoteur, expliquant la diminution ou la suppression de la transcription (voir section suivante). Cependant, cette ‘expulsion’ ne survient pas avec l’ADN non-méthylé, même lorsqu’il est assemblé dans les nucléosomes, supportant l’idée que la méthylation a un rôle à jouer dans l’assemblage de la chromatine (Eden *et al.*, 1998).

Le syndrome ICF est une maladie autosomale récessive rare qui a été récemment reliée à l'altération de la machinerie cellulaire de la méthylation de l'ADN (Xu *et al.*, 1999). Les patients affectés démontrent des signes d'affaiblissement mental. Au niveau cellulaire, ces patients développent une élévation dramatique de l'hétérochromatine du centromère, notamment au niveau des lymphomes. De profondes anomalies, incluant des conformations chromosomiques multiradiales, des délétions et des duplications aberrantes de bras entier des chromosomes 1, 9 et 16 ont été observées (Robertson, 2001). De façon surprenante, le chromosome X inactif et les séquences satellites situées près des centromères sur ces chromosomes (1, 9 et 16) se trouvent à être anormalement hypométhylés chez les patients atteints d'ICF, indiquant ainsi que la méthylation de l'ADN aurait un rôle à jouer dans la stabilité et la structure des centromères (Xu *et al.*, 1999). Des études plus avancées ont déterminé que le syndrome ICF est associé à des mutations dans le gène DNMT3B, plus spécifiquement au locus 20q11.2. La plupart des mutations sont hétérozygotes et affectent le domaine catalytique de DNMT3B (Robertson, 2001).

4.4.2 Répression de la transcription

La relation entre la méthylation de l'ADN et la répression de la transcription de gènes, impliqués dans le développement chez les vertébrés, est connue depuis au moins une vingtaine d'années, mais les mécanismes sous-jacents à cette suppression n'ont été découverts que récemment (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). La modulation de la transcription causée par la méthylation au niveau du promoteur a longtemps été associée avec la suppression de l'expression de certains gènes spécifiques de tissus et également de gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Doerfler, 1983; Stoger *et al.*, 1993). Par exemple, le gène codant pour l'actine au niveau des muscles peut être préparé sous deux formes, totalement méthylé et totalement non-méthylé. Lorsque les deux versions du gène sont introduites dans des cellules musculaires en culture, elles sont toutes les deux transcrites avec la même rapidité. Lorsqu'elles sont introduites dans les fibroblastes, (qui normalement ne transcrivent pas ce gène) le niveau de transcription du gène non-méthylé est faible, mais il est encore plus élevé que celui de la version méthylée du gène exogène introduit (ou du gène endogène du fibroblaste, qui est aussi méthylé) (Yisraeli *et al.*, 1986).

Le mécanisme le plus direct par lequel la méthylation d'ADN peut interférer avec la transcription est de prévenir la liaison de la machinerie transcriptionnelle basale à l'ADN, laquelle requiert un contact direct protéine/cytosine dans la cavité majeure de la double hélice d'ADN (Bird et Wolffe, 1999). La plupart des facteurs de transcription (des mammifères) ont des sites de liaisons riches en GC et plusieurs ont un doublet CpG dans leur site de reconnaissance à l'ADN. La liaison de plusieurs de ces facteurs peut être en effet affaiblie ou abolie par la méthylation au doublet CpG, tel le facteur CREB (ou « CRE-binding protein ») (Bird et Wolffe, 1999). Bien que l'interférence directe semble jouer un rôle important dans la suppression de gènes méthylés, il n'en demeure pas moins que certains gènes densément méthylés peuvent être tout aussi bien transcrits même lorsque la chromatine et/ou des protéines de liaison à l'ADN méthylé (ou « methyl-CpG binding-proteins », voir section suivante) sont absentes (Bird et Wolffe, 1999).

4.4.3 Mécanisme de répression indirecte : protéines de la famille « *methyl-CpG binding-proteins* »

Une des voies alternatives par laquelle la méthylation au niveau d'un promoteur méthylé peut inactiver la transcription est par l'exclusion indirecte de sa machinerie transcriptionnelle. Certaines protéines nucléaires ont été identifiées récemment comme pouvant se lier à de l'ADN génomique méthylé et entraîner des conséquences importantes sur sa transcription. L'un de ces 'prototypes modèles' protéiques pouvant se lier à de l'ADN méthylé est appelé « *methyl CpG binding protein* » ou MeCP2. Ce polypeptide est capable de se lier à un seul dinucléotide CpG méthylé (Lewis *et al.*, 1992). Cette protéine est associée avec les chromosomes lors du cycle cellulaire et est co-localisée immunohistochimiquement avec de l'ADN riche en CpG méthylé (Lewis *et al.*, 1992). Plus spécifiquement, cette protéine a deux domaines fonctionnels. Le premier, le « *methyl-binding domain* » ou MBD, est suffisant pour distinguer un seul CpG méthylé (Nan *et al.*, 1993). Le deuxième domaine fonctionnel est appelé « *transcriptional repression domain* » ou TRD, interagit avec plusieurs autres protéines nucléaires impliquées dans la régulation transcriptionnelle. Ce domaine est également requis pour la répression de la transcription *in vitro* et *in vivo* (Nan *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1998; Kaludov et Wolffe, 2000). Des études ont démontré que cette protéine avait la possibilité

de réprimer la transcription *in vitro* d'un promoteur si seulement celui-ci était méthylé (Nan *et al.*, 1997). De par sa capacité à se lier au co-répresseur transcriptionnel Sin3 et aux histones déacétylase, MeCP2 pourrait servir d'intermédiaire dans le remodelage de la chromatine à un loci méthylé, solidifiant ainsi le lien entre la méthylation de l'ADN, la modification structurale de la chromatine et la répression transcriptionnelle d'un gène spécifique (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998).

L'identification du domaine MBD de MeCP2 a amené la découverte de protéines homologues nucléaires de mammifère, qui semblent partager des fonctions similaires de répression. Parmi celles-ci, on retrouve MBD1 et ses isoformes (membres de la famille MeCP1, tel MBD1v1), MBD2, MBD3 et MBD4 (Hendrich et Bird, 1998). Ces quatre protéines sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules somatiques, alors qu'il n'y a pas d'expression de MBD1 et MBD2 dans les cellules ES (Hendrich et Bird, 1998). Ces quatre protéines subissent chacune des épissages alternatifs de leur ARNm, ayant comme particularité de générer des transcrits qui sont spécifiques à certains tissus et qui sont spécifiques dans leur domaine MBD (Hendrich et Bird, 1998). En conclusion, ce second mécanisme alternatif permettrait à la méthylation de l'ADN de renforcer l'état d'inhibition initial en bloquant l'accès de façon stérique (ou autre) à certaines protéines essentielles dans l'activation de la transcription.

4.4.4 Méthylation de l'ADN et Histone déacétylase : partenaires dans la répression de la transcription

La méthylation de l'ADN semble être capable de prévenir directement la liaison de certains facteurs de transcription à leur site consensus (Tate et Bird, 1993). Par contre, la majorité de l'inhibition observée à l'extérieur de ces sites de liaisons (aux facteurs de transcription) semble indirectement être médiée par des complexes protéiques, qui sont reliés à des changements importants dans la structure même de la chromatine. Par exemple, des expériences de transfection ont pu démontrer que des gènes méthylés *in vitro* sont tout d'abord transcrits et qu'après quelques heures, l'ADN est condensé et réprimé suivant les changements dynamiques de la chromatine. (Buschhausen *et al.*, 1987; Kass *et al.*, 1997). Ces résultats indiqueraient que l'ADN méthylé 'marque' l'établissement d'une chromatine incompétente transcriptionnellement à un locus donné.

Récemment, une relation a pu être établie entre la déacétylation des histones (ce qui compacte les nucléosomes et réprime la transcription) et la méthylation de l'ADN (Cameron *et al.*, 1999). En effet, cette découverte a été déterminante dans la compréhension de la régulation des gènes. En effet, ce lien a été établi lorsqu'on a traité des cellules en combinaison avec deux inhibiteurs d'enzymes nucléaires. Le premier, appelé 5-Aza-CdR (5-aza-2'-deoxycytidine), est un inhibiteur qui bloque l'activité de DNMT (ce qui provoque indirectement une diminution du taux d'ADN pouvant être méthylé). Le deuxième, est un inhibiteur d'Histone déacétylase (HDAC), appelé Trichostatin A (TSA), qui crée une hyperacétylation chez les protéines d'histones, souvent associées avec une chromatine de conformation ouverte et transcriptionnellement active. Le traitement fait seulement avec 5-Aza-CdR ou le TSA sur les cellules a résulté en de faibles expressions de certains gènes, tandis que la combinaison des deux agents a résulté en une synergie de ré-activation de ces mêmes gènes (Cameron *et al.*, 1999). Ce mécanisme 'additif' de répression a été poussé encore plus loin. Il a été démontré que MeCP2 (voir section 4.4.3) a la capacité de recruter les enzymes HDAC1 et HDAC2 (deux enzymes Histones déacétylases) via une interaction indirecte avec le co-répresseur Sin3A par son domaine TRD, supprimant ainsi la transcription (Nan *et al.*, 1998). Cette découverte renforce ainsi le rôle de la méthylation de l'ADN et des histones dans la suppression de la transcription (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). Des mécanismes similaires ont été démontrés avec les protéines MBD1, 2 et 3, qui peuvent également réprimer partiellement la transcription en recrutant HDAC (Robertson, 2001). Donc, la liaison de MeCP2 à un CpG méthylé en particulier (via MBD) et le recrutement simultané de Sin3A/HDAC (via TRD) permettrait ainsi de produire une déacétylation locale. Ceci mènerait par la suite à une condensation de la chromatine, réduisant ainsi l'accès aux facteurs de transcription (Robertson et Wolffe, 2000).

4.5 Méthylation et cancer

4.5.1 Méthylation comme phénomène épigénétique

Le génome contient de l'information sous deux formes : génétique et épigénétique. L'information génétique donne un 'plan' pour la création et la modification de toutes les protéines en vue de créer un organisme vivant, tandis que l'épigénétique donne des 'instructions plus raffinées' sur comment, où et quand l'information génétique doit être utilisée. S'assurer que les gènes soient activés au temps opportun est aussi important que s'assurer qu'ils soient réprimés lorsqu'ils ne sont pas nécessaires. Une des formes majeures de cette régulation épigénétique chez les cellules de mammifères est la méthylation de l'ADN, c'est-à-dire le changement dans l'expression génétique sans en changer la séquence d'ADN. Le cancer est une maladie qui résulte de l'accumulation et de l'interaction entre des changements génétiques (mutations, délétions, insertions, recombinaisons, etc) et épigénétiques (méthylation de l'ADN).

4.5.2 Hyperméthylation et '*tumor-suppressor genes*'

Il est bien connu depuis une quinzaine d'années que le profil (ou patron) de méthylation de l'ADN est souvent altéré dans les cellules tumorales comparativement aux cellules normales (Feinberg *et al.*, 1988; Goetz *et al.*, 1985). Ainsi, les cellules tumorales *semblent démontrer une hypométhylation (c'est-à-dire une diminution anormale du niveau de méthylation) globale du génome accompagnée simultanément d'hyperméthylation (c'est-à-dire une augmentation anormale) locale (d'un locus en particulier)* (Baylin et Herman, 2000; Jones et Laird 1999). Les régions qui sont reconnues habituellement comme cibles pour l'hyperméthylation sont appelées îlots CpG (ou « CpG islands », voir définition section 4.2). Ces îlots CpG sont des régions d'environ un kilobase qui sont riches en GC et en dinucléotides CpG. Ces régions sont habituellement associées à la partie 5' des gènes. La méthylation de ces îlots CpG est habituellement inexistante chez la plupart des cellules normales, mais joue un rôle dans l'inactivation du chromosome X chez les femelles normales (Jones et Laird 1999).

Certaines études ont montré que la méthylation de ces régions augmente avec l'âge et aussi avec le nombre de passages cellulaires *in vitro* (Baylin et Herman, 2000). Une 'sur-méthylation' anormale (ou hyperméthylation) de ces îlots CpG chez les cellules tumorales serait associée à la répression de la transcription d'une manière similaire à une délétion ou une insertion (Baylin et Herman, 2000; Jones et Laird, 1999). Plusieurs exemples

classiques où l'hyperméthylation d'îlots CpG au niveau du promoteur est associée à la répression de gènes suppresseurs de tumeurs (ou « tumor-suppressor genes ») et de gènes impliqués dans le développement cellulaire ont été caractérisés (voir Tableau 1). La suppression transcriptionnelle de ces 'classes' de gènes pour une cellule cancéreuse lui permettrait d'acquérir des capacités avantageuses de prolifération, tout en évitant les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire, d'apoptose, de réparation de l'ADN, etc.

Tableau 1 : Exemples de gènes hyperméthylés impliqués à différents niveaux dans le développement du cancer

(Tiré de Rountree *et al.*, 2001)

<i>Voies cellulaires affectées</i>	<i>Gènes supprimés par la méthylation au niveau d'îlots CpG</i>
Contrôle du cycle cellulaire	Rb, p16(INK4 α), p15, p14(ARF), p73
Réparation de l'ADN génomique endommagé	MLH1, O ⁶ MGMT, BRCA1
Inhibition de l'apoptose	Caspase-8, DAP-kinase, TMS1
Invasion tumorale	E-Cadhérine, VHL, uPA TIMP-3
Facteurs de croissance	ER, RAR- β , récepteur de l'androgène

Selon une étude de Costello *et al.* (2000), l'hyperméthylation aberrante de ces îlots CpG serait spécifique à certains tissus. En effet, certains types de tumeurs, comme le cancer du sein, du cou et des testicules, démontrent une faible fréquence d'hyperméthylation tandis que des tumeurs comme le côlon, le gliome et la leucémie aiguë montrent une hyperméthylation plus prononcée. Les anomalies de la méthylation sont à la fois détectables dans les tumeurs malignes avancées ou non (« Low » ou « High-grade »), ce qui suggère que des changements dans la méthylation peuvent être des

événements relativement précoces dans la progression tumorale (Jones et Laird, 1999). À savoir si, à elle seule, la méthylation aberrante de certains de ces gènes surviendrait avant ou après l'apparition de la transformation cellulaire, reste un sujet controversé qui dépasse le cadre de ce travail. Notons cependant que l'hyperméthylation aberrante a même été détectée dans des lésions pré-néoplastiques et la fréquence de celles-ci augmenterait avec la progression de la maladie (Belinsky *et al.*, 1998; Nuovo *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999). Une des voies d'explication de cette hyperméthylation impliquerait une 'surexpression' de l'enzyme DNMT1 chez certains cancers (Baylin *et al.*, 1998; Belinsky *et al.*, 1996). En effet, l'expression soutenue de DNMT1 chez des fibroblastes murins résulterait en une transformation cellulaire (Wu *et al.*, 1993). De plus, une surexpression de DNMT1 chez des hépatomes de rat causerait une hyperméthylation progressive à travers le temps de certains îlots CpG, dont le gène de *métallothionéine-I* (Ghoshal *et al.*, 2000; Vertino *et al.*, 1996).

4.5.3 : Hyper- et hypométhylation : Complémentarité de fonction

La plupart des travaux actuels qui portent sur le rôle de la méthylation dans le cancer sont en majorité basés sur la relation existante entre la progression tumorale et l'hyperméthylation de certains promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs. Relativement peu d'études ont été consacrées au rôle de l'hypométhylation en regard de l'activation de gènes 'pro-cancéreux'. Les résultats de certaines études ont démontré que pour une même cellule, l'hyperméthylation locale survient souvent de façon concomitante avec la perte globale (hypométhylation) de la méthylation de l'ADN, laquelle peut être d'une importance tout aussi capitale pour le développement de cellules cancéreuses (Robertson, 2001). Certains travaux ont pu démontrer, par exemple, que la méthylation de l'ADN pourrait agir pour stabiliser le génome contenant de grandes quantités d'ADN répétitif (satellite) en 'masquant' ou inhibant la recombinaison homologue entre ces répétitions (donc entre des portions de chromosomes), évitant ainsi l'apparition de cellules transformées (Colot et Rossignol, 1999). Ainsi, la recombinaison entre les allèles V(D)J chez les lymphocytes est réduite plus de 100 fois lorsque le substrat de recombinaison est méthylé (Hsieh et Lieber 1992). De plus, les cellules souches-embryonnaires (ou ES) issues des souris déficientes en DNMT1 démontrent des taux dix fois plus élevés de mutations impliquant un réarrangement génétique (Chen *et al.*, 1998).

Plusieurs groupes ont également rapporté que certains gènes favorisant la croissance tumorale pouvaient être hypométhylés, et donc avantageusement surexprimés (Robertson, 2001). Cette constatation va donc dans le sens complémentaire de l'hyperméthylation (section précédente), c'est-à-dire favoriser par pression sélective la croissance tumorale. L'hyperméthylation et l'hypométhylation de l'ADN seraient donc deux phénomènes de modifications génomiques retrouvés chez les cellules cancéreuses. En effet, l'hypométhylation expliquerait la surexpression de plusieurs oncogènes et de gènes favorisant la croissance tumorale (ou « tumor-promoting gene »). Récemment, en utilisant des fibroblastes 'déméthylés' de façon indirecte, le groupe de Grusby-Jackson *et al.* (2001) ont détecté l'induction des oncogènes *jun-b* et de *ect2* par 13.4 et 4.1 fois respectivement. De plus, l'hypométhylation spécifique de certains gènes, tel que *c-myc* (Crossen et Morrison, 1999), *h-ras* (Vachtenheim *et al.*, 1994), *bcl-2* (Hanada *et al.*, 1993) et *mdr1* (Nakayama *et al.*, 1998), laisse croire que celle-ci pourrait favoriser la progression tumorale. L'exemple le plus intéressant vient de l'uPA, une protéinase surexprimée et impliquée dans les processus d'invasion et d'angiogénèse (de façon similaire à MMP-9). Récemment, Xing *et al.* (1999) ont démontré que le degré d'hypométhylation du promoteur de uPA chez des cellules du cancer du sein hautement agressives corroborait avec l'activation transcriptionnelle, *suggérant un rôle clé de l'hypométhylation dans la progression tumorale. Étant donné que: 1) MMP-9 est impliqué dans la progression tumorale; 2) les mécanismes de régulation transcriptionnelle entre les gènes uPA et mmp-9 sont très similaires; et 3) une étude de MacDougall et al. (1999) fait un lien préliminaire entre la méthylation et MMP-9, ces constatations suggèrent donc que la méthylation de l'ADN aurait un rôle à jouer dans la régulation de MMP-9.* Nous avons donc voulu vérifier si la méthylation de l'ADN a un impact sur la régulation transcriptionnelle de MMP-9 au niveau du lymphome murin. Les résultats de ces recherches sont rapportés dans le manuscrit ci-joint.



Chapitre 2

Objet: CAN-2759-1; date received 10/8/200

Date: Mon, 8 Oct 2001 12:06:29 -0400

De: MWilliams@aacr.org

A: Dr. Yves St-Pierre <yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca>

We are in receipt of your above-referenced submission to Cancer Research. The "CAN" number is the number that has been assigned to your manuscript; please refer to it should you need to contact the Editorial Office at any time during the review process.

The Editors thank you for your submission to our journal. We will contact you when the review process is complete. Should you have any questions regarding the manuscript during the review process, please address them to pubs@aacr.org

Sincerely,
Cancer Research Editorial Office

Mike Williams
Editorial Assistant, Cancer Research
American Association for Cancer Research
Public Ledger Building, Suite 826
150 S. Independence Mall West
Philadelphia, PA 19106
Tel: (215) 440-9300 ext. 188
Fax: (215) 440-9354
E-mail: mwilliams@aacr.org

PARTICIPATION DES AUTEURS

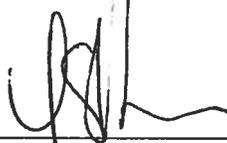
Éric Chicoine, premier auteur de l'article intitulé « **EVIDENCE FOR THE ROLE OF PROMOTER METHYLATION IN THE REGULATION OF MMP-9 GENE EXPRESSION** » a effectué les expériences ayant mené aux résultats rapportés aux figures 1 à 6.

Le clonage du promoteur MMP-9 murin dans le vecteur Luciférase a été effectué en partie par Dr Olivier Robledo. Le clonage et le séquençage du promoteur MMP-9 pour soumission au « Genbank » a été en partie effectuée par Céline Van Themsche.

Le Dr Yves St-Pierre et Pierre-Olivier Estève ont supervisé le projet et ont contribué à le mener à terme par leurs judicieux conseils et leurs expertises techniques. Finalement, le Dr Potworowski a contribué à la correction du manuscrit.



Eric Chicoine



Dr. Yves St-Pierre

EVIDENCE FOR THE ROLE OF PROMOTER METHYLATION IN THE REGULATION OF MMP-9 GENE EXPRESSION

Éric Chicoine, Pierre-Olivier Estève, Olivier Robledo, Céline Van Themsche,
Edouard F. Potworowski, and Yves St-Pierre*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec,
531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

*** To whom reprint requests for reprints should be addressed to:**

INRS-Institut Armand-Frappier

531 Boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Phone: 514-686-5354

FAX: 514-686-5501

E-mail: yves.st-pierre@inrs-iaf.quebec.ca

Running title: MMP-9 methylation in lymphoma

Abbreviations : MMP-9, matrix metalloproteinase-9; Aza-CdR, 5-aza-2'deoxyctidine;
GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PMA, phorbol 12-myristate 13-
acetate.

Number of Words: (including spaces): 34 021

Acknowledgments. We would like to thank Ms. D. Legault for her excellent assistance.

This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of Canada (Y.S.P. and E.F.P.). C.V.T is recipient of a studentship from le Fond pour la Formation de Chercheurs et Aide à la Recherche. O.R. is recipient of a post-doctoral fellowship from la Fondation Armand-Frappier. Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Abstract.

Matrix metalloproteinases have essential roles in tumor invasion and metastasis. Several studies have reported that elevated MMP-9 expression in lymphoma tissues correlated with tumor stage, grade or prognosis. Because the DNA methylation pattern is critical for gene expression, detailed methylation analysis using genomic bisulfite sequencing was performed on a series of lymphoma cell lines. We found an inverse correlation between level of methylation of the MMP-9 promoter, most notably at both Sp-1 sites, and the level of MMP-9 expression at both mRNA and protein levels. Moreover, we showed that treatment of non-aggressive lymphoma cells with a pharmacological hypomethylating agent was sufficient to induce the secretion of MMP-9, both at the mRNA and at the protein levels. This increased expression was potentiated by PMA, a known stimulus of MMP-9 in lymphoma cells. Finally, experiments using *in vitro* methylated MMP-9 promoter constructs confirmed that DNA methylation exerts suppression on transcriptional activity. We conclude that transcriptional activation of MMP-9 is related to the DNA methylation status of its promoter.

INTRODUCTION

The capacity of cancer cells to metastasize is attributed to their ability to secrete matrix metalloproteinases (MMPs) which degrade the extracellular matrix (ECM) of basement membranes (1). MMPs are zinc-binding endopeptidases capable of degrading ECM components such as collagen, fibrinogen and proteoglycans. One member of this family, MMP-9 (EC 3.4.24.35), has been assigned an important role in tissue-specific remodeling in normal and pathological processes, most notably during angiogenesis and tumor invasion (2-6). Indeed, elevated levels of MMP-9 have been found in patients suffering from various types of tumors *in vivo* and a correlation has been established between secretion of MMP-9 and experimental metastasis (7,8). Furthermore, overexpression of MMP-9 in transfected nonmetastatic tumor cells renders them invasive (9, 10). Given the importance of this molecule in cancer, diverse strategies are currently being designed to inhibit the expression or the activity of MMP-9 (11-15).

In non-Hodgkin's lymphomas, a high constitutive level of MMP-9 is associated with aggressive metastatic potential, leading to a poor prognosis (16, 17). Moreover, we and others have shown that increased MMP-9 expression in lymphoma cell lines is closely related to aggressiveness and tumor invasion (18-20). Thus, although there is very little doubt that MMP-9 plays a significant role in neoplasia, the mechanism that controls its expression in tumor cells is still poorly understood. Nonetheless, we know that the 5' flanking sequence of the MMP-9 gene contains several consensus motifs for AP-1, NF- κ B, Sp-1, and Ets transcription factors (21). We also know from *in vitro* transient transfection systems that transcription of the *mmp-9* gene requires the synergistic cooperation of AP-1 with either NF- κ B or Sp1 (22, 23). These transcription factors are responsible for the fact that MMP-9 is

considered as an inducible gene, whose expression is transient upon exposure to external stimuli, such as inflammatory cytokines (24, 25). However, indications that many tumor cell types constitutively express high levels of MMP-9 point to the presence of additional regulatory mechanism(s), most notably those responsible for inappropriate expression resulting from mutations in the regulatory region of the gene.

Major attention has focussed on DNA methylation as a possible regulatory mechanism for the expression of a number of genes during malignant processes (26). Methylation at CpG sites in the promoter, which inhibits transcription by interfering with transcription initiation, has been shown to repress a large repertoire of tumor suppressor genes expressed in several tumor types. However, while recent studies have often focussed on the role of hypermethylation on silencing the expression of tumor suppressor genes, the observation that regional hypermethylation is concomitant with widespread genomic hypomethylation suggests that the imbalance in the methylation status of the genome may also fundamentally contribute to tumor progression by favoring reactivation of the promoter of genes involved in different aspects of tumorigenesis (27). In the present study, we investigated whether DNA methylation can influence the regulation of MMP-9 expression.

MATERIALS AND METHODS

Cells lines and reagents

The mouse thymic lymphoma cell lines 164T2 and 374T1 were established from a radiation-induced thymic lymphoma in C57Bl/6 mice (19) while the 718 thymic lymphoma cell line was established from a radiation-induced thymic lymphoma in an ICAM-1-deficient C57BL/6 mouse (10). The S19 aggressive lymphoma variants were obtained from 19 serial *in vivo* passages of the parental 164T2 line in young adult C57BL/6 males using the spleen as the organ from which lymphoma cell were harvested after each passage (19). The YAC-1 lymphoma and the HT1080 fibrosarcoma cell lines were kindly provided by Dr S. Lemieux and Dr. D. Oth respectively (INRS-Institut Armand-Frappier). The lymphoma and fibrosarcoma cells were maintained in culture in RPMI-1640 and DMEM medium respectively containing 2 mM glutamine, 10 mM HEPES buffer, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. For treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (aza-CdR) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), cells were washed, and aliquots of 0.5 ml containing 2.5 x10⁶ cells were resuspended in serum-free RPMI medium containing the indicated concentrations of aza-CdR with and without phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) and incubated for 20 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from lymphoma cells using the Trizol reagent (Life Technologies, Inc., Mississauga, Canada) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was prepared from 3 µg cellular RNA in 20 µl of reaction volume using the

preamplification system reverse transcriptase Superscript II (Life Technologies). After reverse transcription, MMP-9 (Sense: 5'-CCATGAGTCCCTGGCAG-3'; Antisense: 5'-GTAGTATTGTAGGTATGA-3') GAPDH (Sense: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCTG-TAT-3'; Antisense: 5'-CAGAAGTGGTGGTACCTCTTCCGA-3') cDNA were amplified in an MJ Research thermal cycler (Watertown, MA) as following: 94°C for 4 min then 94°C for 1 min, 62°C for 2 min, and 72°C for 1 min for 30 cycles and 72°C for 5 min. Amplification of GAPDH was terminated after 25 cycles to ensure linear amplification.

Zymography

MMP-9 activity in cell culture supernatants was determined as previously described (10). Briefly, aliquots of 20µl of conditioned cell culture supernatants were electrophoresed on a 7.5% SDS-PAGE containing 1mg/ml of denatured collagen (gelatin G-2500, Sigma). After electrophoresis, the gel was washed to remove SDS and incubated in a renaturing buffer (50mM Tris, 5mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, 1% Triton X-100) for 16 hr at 37°C. Gels were stained with Coomassie brilliant blue and destained in 30% methanol/10% acetic acid (v/v). The proteolytic activity was identified as a clear band on a blue background.

Determination of the nucleotide sequence of the murine MMP-9 promoter

The 5' region of the *mmp-9* gene of the 164T2, 718, S19 and 374T1 cell lines was subjected to automated DNA sequencing from gel-purified PCR fragments using the following primers: region -1350 to -963: 5'-GAGAGTTTTGTAGAGAGCGTATC-3' (sense) and 5'-AGGAAAGCTTTGGCACAGTCTTG-3' (antisense); region -1082 to +24: 5'-GCTTAGTCGAACAGCTTGC-3' (sense) and 5'-CTCATGGTGAGGACCGCAGC-3' (antisense); region -533 to +194: 5'-TGCCTCAAAGAGCCTGCTCC-3' (sense) and 5'-

TGCCTCAAAGAGCCTGCTCC-3' (antisense); region +119 to +632: 5'-AGACCTG-AAAACCTCCAACCTC-3' (sense) and 5'-GGTGTAACCATAGCGGTACAAG-3' (antisense).

Preparation of genomic DNA and bisulfite treatment

Genomic DNA from lymphoma cells was isolated and treated with sodium bisulfite following the protocol of Frommer et al. (28) with the modifications of Rein et al. (29). Briefly, DNA (10 µg) of each cell line was digested with the restriction endonucleases (10 U/µg) EcoRI and BamHI. DNA was then denatured in 0.3 M NaOH for 15 min at 37°C in a final volume of 20µL, mixed with 120 µL of 3.6 M sodium bisulfite containing 0.6 mM hydroquinone (Sigma) and cycled in a thermal cycler at 50°C for 15 min and 95°C for 30 sec for 20 cycles respectively. The DNA samples were then desalted using the Ambicon-Microcon-PCR kit (Millipore, Bedford, MA) and desulfonated in the presence of 0.3 M NaOH. The solution was neutralized by addition of NaOAc. The DNA was precipitated with ethanol solubilized in TE buffer (Tris-EDTA, pH 8.0), and used for PCR amplification.

PCR amplification of bisulfite-treated DNA and sequencing analysis

A 675 bp fragment between -1058 and -383 in the *mmp-9* promoter region containing the CpG-rich dinucleotide region and most of the regulatory motifs (AP-1, NF-kB and Sp-1 sites) was amplified by mixing bisulfite-treated DNA with 5 µl of 20 pmol/µl of each primers, 2.5 mM dNTPs, 1.5 MgCl₂, 5 U/µl Taq DNA polymerase, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM (NH₄)₂SO₄ and 0.01 % Tween-20. The samples were incubated for 2 min at 94°C, followed by 40 cycles as follows : 1 min at 95°C; 2 min at 60°C; 1 min at 72°C, and a final extension at

72°C for 9 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. The PCR products generated were separated by gel-electrophoresis and cloned in the pCR4-TOPO vector (Invitrogen) using the TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen). Ten clones were subjected to double-stranded DNA sequencing. Sequences of the primers used to amplify the murine *mmp-9* promoter from the bisulfite-treated DNA are available upon request.

Plasmid construction and site-directed mutagenesis

A fragment encompassing the essential consensus sequences for the transcriptional activity of the *mmp-9* promoter (22) was amplified from genomic DNA isolated from murine lymphoma cells using the following primers containing the artificial *NheI* and *XhoI* restriction sites: (a) sense, 5'-AGGAAGGATAGTGCTAGCCTGAGA-AGGATG-3'; (b) antisense, 5'-CCGAAACTCGAGGAGAGCCAGGAGCAGGG-3'. The resulting 744 bp PCR product was subsequently cloned into the pGL3 Basic vector (Promega, Madison, WI). Site-directed mutagenesis of Sp1 sites were carried out with the QuikChange Mutagenesis kit from Stratagene (La Jolla, CA). The Sp1a (Δ Sp1a) site was mutated using the following primers: (a) sense, 5'-CATGTGTGTGTCCCCttCCCCCAGGCTCATC-3'; (b) antisense 5'-GATGAGCCTGGGGGgaaaGGGGACACACACATGTGG-3'. The Sp1b (Δ Sp1b) site was mutated using the following primers: (a) 5'-GACTCTATCAGGGGtttGGGATGAGAGGATAG-3'; (b) antisense, 5'-CTATCCTCTCATCCCaaaCCCCTGATAGAGTC-3'. Site-directed mutagenesis to generate a construct that contains a mutation in both Sp1 sites (Δ Sp1a+b) was carried out using the Δ Sp1b construct as a template for the second round of mutagenesis.

In vitro DNA methylation

The reporter vector pGL3-MMP-9wt encoding the wild-type *mmp-9* promoter was digested with *NheI* and *XhoI*, and the promoter region was gel-purified and divided into two aliquots. One aliquot was methylated at 37°C overnight with 3U/μg of the recombinant *SssI* CpG methylase (New England Biolabs, Mississauga, ON) in presence of 160 μM S-adenosylmethionine. The second aliquot (control) was incubated in the same conditions without the *SssI* CpG methylase, which methylates the CpG dinucleotides in both strands. This procedure prevents methylation of the coding region of the luciferase protein, which would be expected to decrease reporter gene expression. Complete methylation of the fragments was confirmed by the resulting resistance to cleavage by the methylation -sensitive restriction enzyme *AclI* (New England Biolabs). Methylated or unmethylated control promoter fragments were religated at an equimolar concentration in the original pGL3 basic vector digested with *NheI* and *XhoI*.

Transient transfection and Luciferase assay

A suspension of HT1080 single cells was seeded 2-3 h prior to transfection into a 6-well plate at a concentration of 10^6 cells per well. Cells were then washed once with PBS and co-transfected with 5 μg of test plasmid using LipofectAMINE 2000 according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). Normalization in transfection efficiency was measured by cotransfection with 0.5 μg of a β-galactosidase construct (kindly provided by Dr. Pierre Lemieux, Supratek Pharma, Laval, QC). The culture medium was changed to complete RPMI medium 6 h after transfection, for 24 h. The medium was then replaced by complete

RMPI with or without PMA (50 nM) and incubated for an additional 24 h. Cell lysis and luciferase assays were performed using the Luciferase Assay System (Promega) in a luminometer (Berthold Lumat LB 9507) and values were converted to relative light units (RLU). β -galactosidase activity was measured according to the kit β -galactosidase Assay System (Promega).

RESULTS

Methylation status of mmp-9 promoter in murine lymphoma cells. The 164T2 and 718 lymphoma cells do not express constitutive levels of MMP-9 while the S19 and 374T1 lines expressed MMP-9 constitutively (**Fig. 1**). S19 is a metastatic variant that has been derived upon 19 serial *in vivo* passages of the parental 164T2 cells (19). We have previously shown that, in contrast to the low metastatic 164T2 lymphoma cells, both S19 and 374T1 can metastasize in the otherwise lymphoma resistant ICAM-1-deficient mice (19). To determine whether aberrant promoter methylation could contribute to the variation of MMP-9 expression between our cell lines, high sensitivity mapping of the methylated cytosine for the 5' flanking region -1058 to -383 was carried out by bisulfite modification for MMP-9 expressing (S19 and 374T1) and non-expressing (164T2) cells (**Fig. 2 and 3**). This subregion was chosen since it contains the transcription factor binding motifs essential for MMP-9 promoter activity, two including Sp-1 sites, two AP-1 sites, and NF-kB (21-23). This region harbors 10 CpG sites, 35 CpNpGs, and 118 non-CpG or non-CpNpG cytosines. A total of 300 clones (10 clones per CpG sites) was analysed. Our results showed that in the 164T2 cell, the CpG sites were heavily methylated; indeed 9 out of 10 CpG had a 100% frequency of methylation, the remaining CpG being methylated at a frequency of 90% (**Fig. 3A**). In the case of S19, only 3 out of 10 CpG had a 100% frequency of methylation (**Fig. 3B**). In the 374T1 cells, a more general status of hypomethylation was noted throughout the promoter, with half of the CpG having a methylation frequency of less than 50% (**Fig. 3C**). Significant hypomethylation of two CpG sites, contained within the consensus sequence of Sp1 sites (position -615 and -468), was detected in MMP-9-expressing cells lines S19 (**Fig. 3B**) and 374T1 (**Fig. 3C**). For instance, comparison between 164T2 and 374T1 (**Fig. 3A vs 3C**)

shows a decrease of the percentage of methylation frequency at both Sp1 sites of -100% (position -615) and -70% (position -468) respectively. This finding clearly indicates an inverse correlation between the level of methylation of the promoter, particularly at Sp1 sites, and the level of MMP-9 expression at both mRNA and protein levels. In order to ascertain that the apparent correlation between methylation status and MMP-9 expression was not skewed by other events such as deletions, we examined the DNA sequence of region -1350 to +619 bp harboring regulatory motifs previously described to affect promoter regulation (21). Neither mutation, deletion, nor insertion were found in any of the four promoters (Chicoine *et al.*, GenBank Accession No. AF403768). Moreover, we found no difference in the number of d(CA)_n repeats in any of the cell lines tested, indicating that microsatellite d(CA)_n instability is not responsible for differences in MMP-9 secretion among our cell lines, as suggested previously (30).

Treatment of lymphoma cells with hypomethylating agent caused dose-dependant neo-expression of MMP-9 at mRNA and protein levels. To establish a causal relationship between hypomethylation and induction of MMP-9 expression, murine lymphoma cell lines 164T2, 718 and YAC-1 were treated with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR, a known hypomethylating agent. These cells were shown to have no detectable MMP-9 expression, making them suitable candidates for gene reactivation. Treatment of these lymphoma cells with 5-aza-CdR induced MMP-9 expression both at the mRNA and protein levels, detectable 24h after treatment both by zymography (Fig. 4A) and by RT-PCR (Fig. 4B). Bisulfite mapping analysis showed that induction of MMP-9 expression by 164T2 cells treated with 5-aza-CdR correlated with hypomethylation of the CpG sites of the 5' flanking

region of the MMP-9 promoter (**Fig. 3D**). Furthermore, we found that under hypomethylation conditions, lymphoma cells were much more responsive to PMA-mediated induction of MMP-9 (**Fig. 5**).

***In vitro* methylation of the MMP-9 promoter silences its transcription.** The above bisulfite genomic mapping analysis has shown significant hypomethylation at two Sp1 sites in high MMP-9-secreting cells. In order to establish the importance of those particular sites on MMP-9 transcription, we investigated whether *mmp-9* promoter activity was inhibited by mutation or methylation at Sp1 sites. Due to the low transfection efficiency of lymphoma cells, expression vectors containing essential consensus sequences for the transcriptional activity of the *mmp-9* promoter (22) were transiently transfected in the HT 1080 cells, previously used to characterize the functional properties of MMP-9 promoter regulation (23, 31). Our results showed that a C→T substitution within Sp1_a reduced the constitutive expression of MMP-9 by approximately 50% (**Fig. 6**), whereas no such effect was observed when such a substitution was made in Sp1_b. Experiments using constructs carrying mutations in both Sp1 sites (Sp1_{a+b}) generated levels of MMP-9 expression comparable to those obtained with empty control vectors, indicating that both Sp1 sites are essential for optimal transcriptional activity (**Fig. 6**). Furthermore, when the MMP-9 reporter gene was methylated, its transcriptional activity was abolished, even after addition of PMA, firmly establishing the critical role of methylation in the control of MMP-9 promoter activity.

DISCUSSION

The present study was undertaken to investigate whether DNA methylation regulates MMP-9 expression. We found that: 1) an inverse correlation between the level of methylation of the promoter, particularly at Sp1 sites, and MMP-9 expression at both mRNA and protein levels, 2) treatment of lymphoma cells with DNA demethylating agent, 5-aza-CdR, induced MMP-9 expression in otherwise non MMP-9-expressing cells, 3) demethylation potentiated the ability of PMA, a known modulator of MMP-9, to induce MMP-9 expression, and 4) methylation of the MMP-9 promoter *in vitro* abolished the luciferase reporter activity in transient expression analysis, providing evidence that methylation of the promoter region is functionally important for *mmp-9* gene expression.

Treatment of MMP-9 non-expressing murine lymphoma cells lines 164T2, 718 and YAC-1 with the DNA hypomethylating agent 5-aza-CdR, resulted in MMP-9 induction. This observation is consistent with the study of MacDougall et al. (32), which have shown that treatment of melanoma cells with 5-aza-CdR increased MMP-9 expression at the mRNA level. Their work and ours therefore indicate that MMP-9 regulation by DNA methylation in neoplastic tissues could be extended to other metastatic tumors involving MMP-9, such as breast cancer (33). To support the specificity of our drug treatment for MMP-9 induction, we also tested the potential induction of the proteinase MMP-2, a closely related member of the gelatinases family. Like MacDougall et al., (32), we did not detect any MMP-2 induction following treatment with 5-aza-CdR either by RT-PCR, or by zymography (data not shown). Although both enzymes share fairly broad overlapping substrate specificity, the inability of 5-aza-CdR to activate MMP-2 in lymphoma cells and melanoma cells add support to the view that both enzymes differ substantially in their transcriptional regulation.

How does methylation interfere with MMP-9 transcriptional activity? Our transient transfection experiments clearly established the critical role for both Sp1 binding sites in controlling MMP-9 expression. Interestingly, bisulfite mapping showed that these sites were hypomethylated in MMP-9 expressing cells, while they were heavily methylated in cells that were not expressing MMP-9. DNA methylation could decrease transcriptional activity by blocking Sp1 binding. Indeed, although Sp1 binding has been shown to be insensitive to DNA methylation at central CpG on either strand, methylation occurring on two consecutive cytosine at the antisense strand CpCpG can inhibit binding of Sp1 to its consensus motif (34, 35). Alternatively, MMP-9 promoter activity could be repressed through binding of repressor proteins on methylated CpG dinucleotides (36, 37). Nan et al. (38), have described the existence of methyl-CpG-binding protein-2 (MeCP2), a repressor protein that interferes negatively with transcription machinery by binding to any single methyl-CpG pair present in a promoter. Silencing of CD43 via DNA methylation depends on MeCP2 expression level and harbors, just like MMP-9, an Sp-1-dependent promoter activity with no CpG island (39). MeCP2 also contains a transcription repression domain that allows MeCP2 to physically associate with the co-repressor mSin3A of the histone deacetylase complex (40). Recruitment of the HDAC complex is thought to play a critical role in gene silencing mediated by CpG methylation in promoter sequences. Similarly, an isoform of MBD1, a member of the MeCP1 family of methyl-CpG-binding proteins, has also been shown to repress transcription of sparsely methylated Sp1-dependent promoter (41), indicating that both MeCP2 and MBD1 are prime candidates for controlling MMP-9 gene transcription in tumor cells.

Elevated MMP-9 levels is almost invariably accompanied by increased transcripts of urokinase plasminogen activator (uPA), a protease implicated in the proteolytic activation of

MMP-9 (42). Such co-expression between MMP-9 and uPA in aggressive tumor cells could be expected to share similar induction mechanisms at the transcriptional level. In this regard, Xing et al. (43) have recently demonstrated that hypomethylation of uPA promoter induced its transcription in breast cancer cells, strengthening the importance of DNA hypomethylation as a key regulatory transcriptional mechanism for genes involved in tumor invasion.

In addition to providing a better understanding of the regulation of MMP-9 in tumor cells, our study has important implications from a therapeutical perspective in the treatment of cancer. By establishing that MMP-9 expression is under the control of DNA methylation, and that treatment of tumor cells with demethylating agents increases its expression at both the mRNA and protein levels, the benefit of using demethylating agents in the treatment of certain types of cancer to upregulate the expression of tumor suppressor gene expression may be at least in part counterbalanced by the possible upregulation of MMP-9. This concern is supported by experimental evidence that increased expression of MMP-9 increases tumorigenicity of tumor cells and confers tumor cells with metastatic behaviour. The results by MacDougall et al. (32) showing that 5-aza-CdR increased MMP-9 and tumorigenicity of tumor cells were in fact consistent with those previously reported by Trainer et al. (44) who showed that treatment of the B16 melanoma with 5-aza-CdR increased the ability of these cells to form pulmonary metastases. Further studies are required to examine the effect of demethylating agents on secretion of MMP-9 *in vivo* and whether anti-MMP-9 strategies should be used concomitantly with such regimen.

References

1. Powell, W.C., Matrisian, L.M. Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, *213*:1-21, 1996.
2. Himmelstein, B.P., Canete-Soler, R., Bernhard, E.J., Dilks, D.W., Muschel, R.J. Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis.*, *14* : 246-258, 1994-95.
3. Patterson, B.C., Sang, Q.A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.*, *272* : 28823-28825, 1997.
4. Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M., Werb, Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.*, *93*: 411-422, 1998.
5. Dubois, B., Masure, S., Hurtenbach, U., Paemen, L., Heremans, H., van den Oord, J., Sciot, R., Meinhardt, T., Hammerling, G., Opdenakker, G., Arnold, B. Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. *J. Clin. Invest.*, *104* : 1507-1515, 1999.
6. Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., Hanahan, D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.*, *2*: 737-44, 2000.
7. Rao, J.S., Steck, P.A., Mohanam, S., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Sawaya, R. Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res.*, *53* : 2208-2211, 1993.

8. Zucker, S., Lysik, R.M., Zarrabi, M.H., Moll, U. M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res.*, *53* : 140-146, 1993.
9. Bernhard, E.J., Gruber, S.B., Muschel, R.J. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *91* : 4293-4297, 1994.
10. Aoudjit, F., Masure, S., Opdenakker, G., Potworowski, E.F., St-Pierre, Y. Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. *Int. J. Cancer.*, *82* : 743-747, 1999.
11. Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A., Medina, O.P., Heikkila, P., Kantor, C., Gahmberg, C.G., Salo, T., Kontinen, Y.T., Sorsa, T., Ruoslahti, E., Pasqualini, R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat. Biotechnol.*, *17* : 768-774, 1999.
12. Lozonschi, L., Sunamura, M., Kobari, M., Egawa, S., Ding, L., Matsuno, S. Controlling tumor angiogenesis and metastasis of C26 murine colon adenocarcinoma by a new matrix metalloproteinase inhibitor, KB-R7785, in two tumor models. *Cancer Res.* *59* : 1252-1258, 1999.
13. Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S.K., Kin, Y., Jasti, S.L., Nirmala, C., Lakka, S.S., Adachi, Y., Kyritsis, A.P., Ali-Osman, F., Sawaya, R., Fuller, G.N., Rao, J.S. Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res.*, *60* : 6851-6855, 2000.

14. Li, H., Lindenmeyer, F., Grenet, C., Opolon, P., Menashi, S., Soria, C., Yeh, P., Perricaudet, M., Lu, H. AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum. Gene Ther.*, *12* : 515-26, 2001.
15. Medina, O.P., Soderlund, T., Laakkonen, L.J., Tuominen, E.K., Koivunen, E., Kinnunen, P.K. Binding of novel peptide inhibitors of type IV collagenases to phospholipid membranes and use in liposome targeting to tumor cells in vitro. *Cancer Res.* *61* : 3978-85, 2001.
16. Kossakowska, A.E., Urbanski, S.J., Huchcroft, S.A., and Edwards, D.R. Relationship between the clinical aggressiveness of large cell immunoblastic lymphomas and expression of 92 kDa gelatinase (type IV collagenase) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNAs. *Oncol. Res.*, *4* : 233-240, 1992.
17. Kossakowska, A.E., Huchcroft, S.A., Urbanski, S.J., and Edwards, D.R. Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br. J. Cancer*, *73* : 1401-1408, 1996.
18. Kossakowska, A.E., Hinek, A., Edwards, D.R., Lim, M.S., Zhang, C.L., Breitman, D.R., Prusinkiewicz, C., Stabler, A.L., Urbanski, L.S., and Urbanski, S.J. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Pathol.*, *152* : 565-576, 1998.
19. Lalancette, M., Aoudjit, F., Potworowski, E.F., and St-Pierre, Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood*, *95* : 314-319, 2000.

20. Vacca, A., Ribatti, D., Ria, R., Pellegrino, A., Bruno, M., Merchionne, F., Dammacco, F. Proteolytic activity of human lymphoid tumor cells. Correlation with tumor progression. *Dev. Immunol.*, 7 : 77-88, 2000.
21. Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J.H., Sato, H., Seiki, M., and Boyd, D. Stimulation of 92-kDa Gelatinase B promoter activity by *ras* is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/*ets* and AP-1 sequence. *J. Biol. Chem.*, 271 : 10672-10680, 1996.
22. Sato, H., and Seiki, M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*, 8 : 395-405, 1993.
23. Sato, H., Kita, M., and Seiki, M. v-Src activates the expression of 92-kDa Type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to Retinoblastoma control elements. *J. Biol. Chem.*, 268 : 23460-23468, 1993.
24. Esteve, P.O., Tremblay, P., Houde, M., St-Pierre, Y., Mandeville, R. In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1403 : 85-96, 1998.
25. Aoudjit, F., Potworowski, E.F., St-Pierre, Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J. Immunol.*, 160 : 2967-2973, 1998.

26. Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M., Issa, J.P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, 72 : 141-196, 1998.
27. Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301 : 89-92, 1983.
28. Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89 : 1827-1831, 1992.
29. Rein, T., Zorbas, H., and DePamphilis, M.L. Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of ^mCpG dinucleotides. *Mol. Cell. Biol.*, 17 : 416-426, 1997.
30. Shimajiri, S., Arima, N., Tanimoto, A., Murata, Y., Hamada, T., Wang, K.Y., and Sasaguri, Y. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Letters*, 455 : 70-74, 1999.
31. Himmelstein, B.P., Lee, E.J., Sato, H., Seiki, M., and Muschel, R.J. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene*, 14 : 1995-1998, 1997.
32. MacDougall, J.R., Bani, M.R., Lin, Y., Muschel, R.J., and Kerbel, R.S. 'Proteolytic switching': opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. *Br. J. Cancer*, 80 : 504-512, 1999.

33. Ricca, A., Biroccio, A., Del Bufalo, D., Mackay, A.R., Santoni, A., and Cippitelli, M. bcl-2 over-expression enhances NF-kappaB activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7(ADR) breast-cancer cells. *Int. J. Cancer*, 86 : 188-196, 2000.
34. Clark, S.J., Harrison, J., and Molloy, P.L. Sp1 binding is inhibited by ^mCp^mCpG methylation. *Gene*, 195 : 67-71, 1997.
35. Mancini, D.N., Singh, S.M., Archer, T.K., and Rodenhiser, D.I. Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and Sp1 transcription factors. *Oncogene*, 18 : 4108-4119, 1999.
36. Bird, A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, 70 : 5-8, 1992.
37. Boyes, J., and Bird, A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.*, 11 : 327-333, 1992.
38. Nan, X., Campoy, F.J., and Bird, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, 88 : 471-481, 1997.
39. Kudo, S. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 repress Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol. Cell. Biol.*, 18 : 5492-5499, 1998.
40. Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393 : 386-389, 1998.
41. Fujita, N., Shimotake, N., Ohki, I., Chiba, T., Saya, H., Shirakawa, M., and Nakao, M. Mechanism of transcriptional regulation by Methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol. Cell. Biol.*, 20 : 5107-5118, 2000.

42. Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S., and Fujinaga, K. The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int. J. Cancer*, 77 : 128-137, 1998.
43. Xing, R.H., and Rabbani, S.A. Transcriptional regulation of urokinase (uPA) gene expression in breast cancer cells: role of DNA methylation. *Int. J. Cancer*, 81 : 443-450, 1999.
44. Trainer, D.L., Kline, T., Mallon, F., Greig, R., Poste, G. Effect of 5-azacytidine on DNA methylation and the malignant properties of B16 melanoma cells. *Cancer Res.*, 45: 6124-6130, 1985.

Figure Legends.

Figure 1. Expression of MMP-9 in lymphoma cells. (A) Cells were cultured in serum-free medium and supernatants were collected after 24h, lyophilized, and assayed for their gelatinase content by zymography. (B) Total RNA was extracted and subjected to RT-PCR analysis using MMP-9 and GAPDH specific primers. Molecular weight markers (M) are 100 bp ladder. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2. Organization of the murine MMP-9 promoter from the DNA sequence of lymphoma cell lines (GenBank accession number No. AF403768). The potential binding consensus sequences, d(CA)_n repeats, and TATA box are shown. The Sp-1a (-615) and Sp-1b (-468) sites are shown. The bent arrow represents transcription initiation and the numbering of nucleotide starts from this site (Exon I). CpG sites are depicted as vertical marks.

Figure 3. Schematic representation of bisulfite genomic mapping of the MMP-9 promoter. The upper strand of MMP-9 promoter obtained from the bisulfite-converted genomic DNA from lymphoma cell lines (A) 164T2 (B), S19 (C), 374T1 and (D) and 164T2 treated with 5-aza CdR. Black marks on the x axis (■) represent approximate location of CpG dinucleotides in region -1058 to -383. The two Sp1 sites are shown (located at positions -165 and -468 respectively). The y axis represents the percentage of methylated CpG.

Figure 4. MMP-9 induction following treatment with 5-azaCdR on lymphoma cell lines. Lymphoma cell lines were maintained in serum-free medium and treated with 0, 1, 5 or 10 μM 5-aza-CdR for 24 h. (A) Supernatants were collected, lyophilized, and assayed for their

gelatinase content by zymography for cell lines. (B) Expression of MMP-9 at the mRNA level was performed by RT-PCR analysis using MMP-9 and GAPDH-specific primers. Molecular weight markers (M) are 100 bp ladder. Results are representative of three independent experiments.

Figure 5. Effect of 5-azaCdR on PMA-induced MMP-9 expression in 164T2 lymphoma cells. Cells were pretreated with 5 μ M 5-aza-CdR for 3 h, and stimulated with 50 nM PMA for 24 h in serum-free medium. Supernatants were collected, lyophilized, and assayed for their MMP-9 content by zymography. Results are representative of three independent experiments.

Figure 6. Effect of in vitro methylation on mmp-9 gene promoter activity in HT1080 cells. Luciferase reporter plasmids were transiently transfected into HT1080 cells. Luciferase activity was measured 48h after the transfection with or addition of PMA (50 nM added 6 h after transfection). Control included the wild-type (wt) encompassing the entire 5' flanking region (-681 to +63) which harbors additional three CpG motifs located at the 3' flanking region near the TATA box. In vitro methylated mmp-9 reported promoter is shown in light gray. Intact Sp1 motifs are shown in black while mutated Sp1 motifs are represented as empty boxes. Results are representative of two independent experiments.

Figure 1

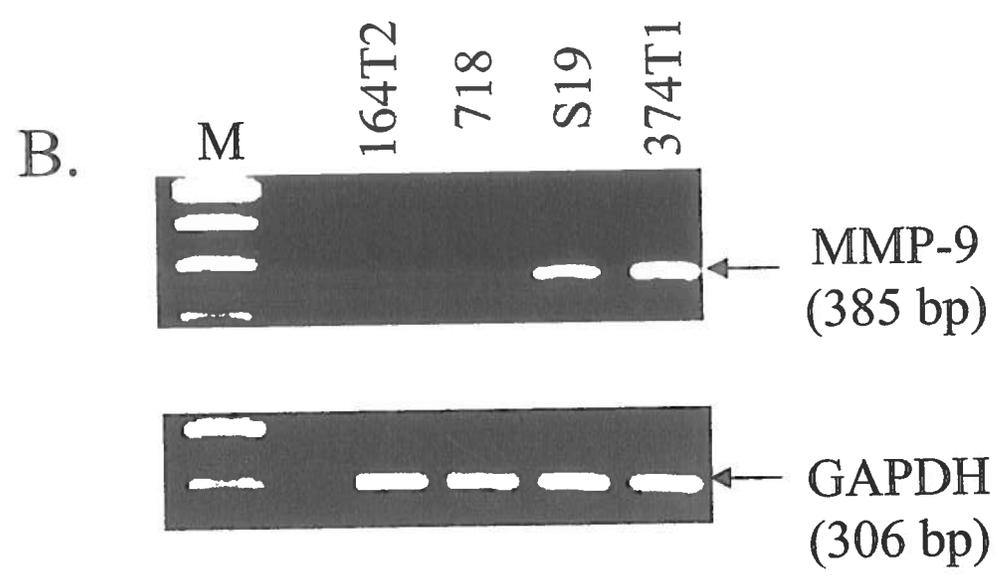
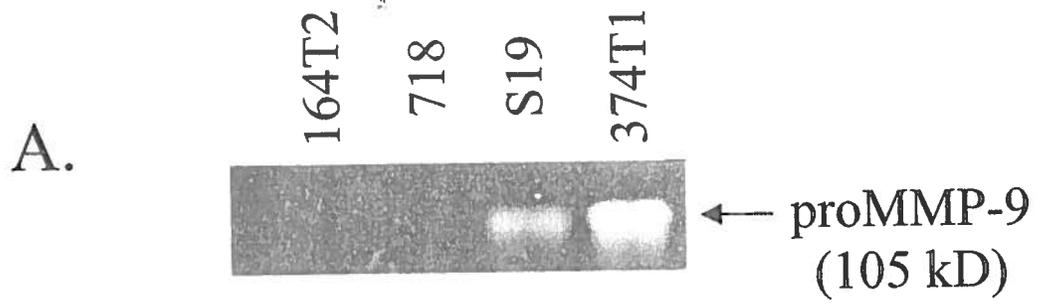


Figure 2

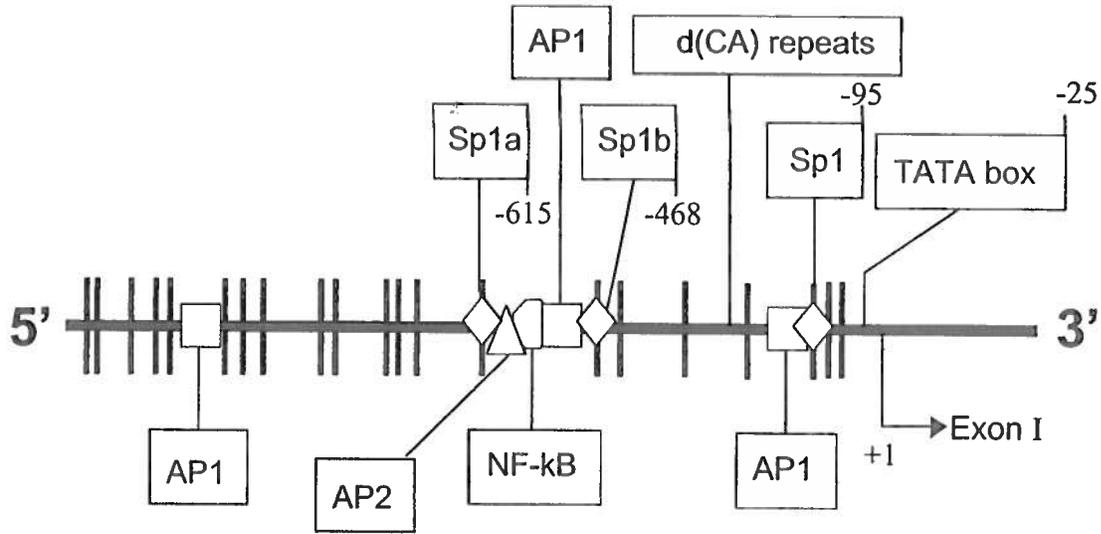
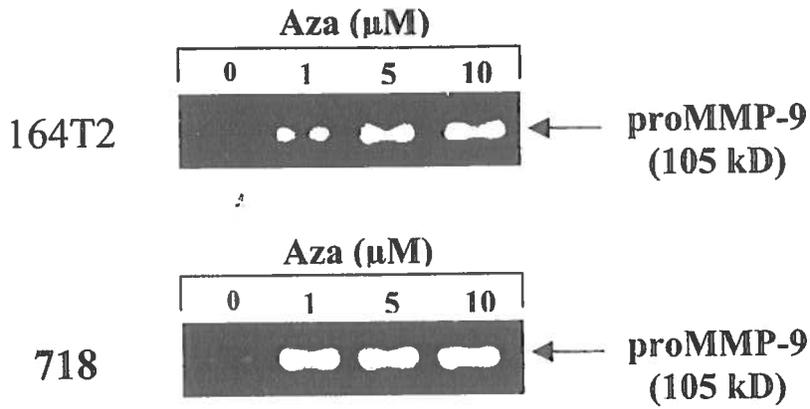


Figure 4

A.



B.

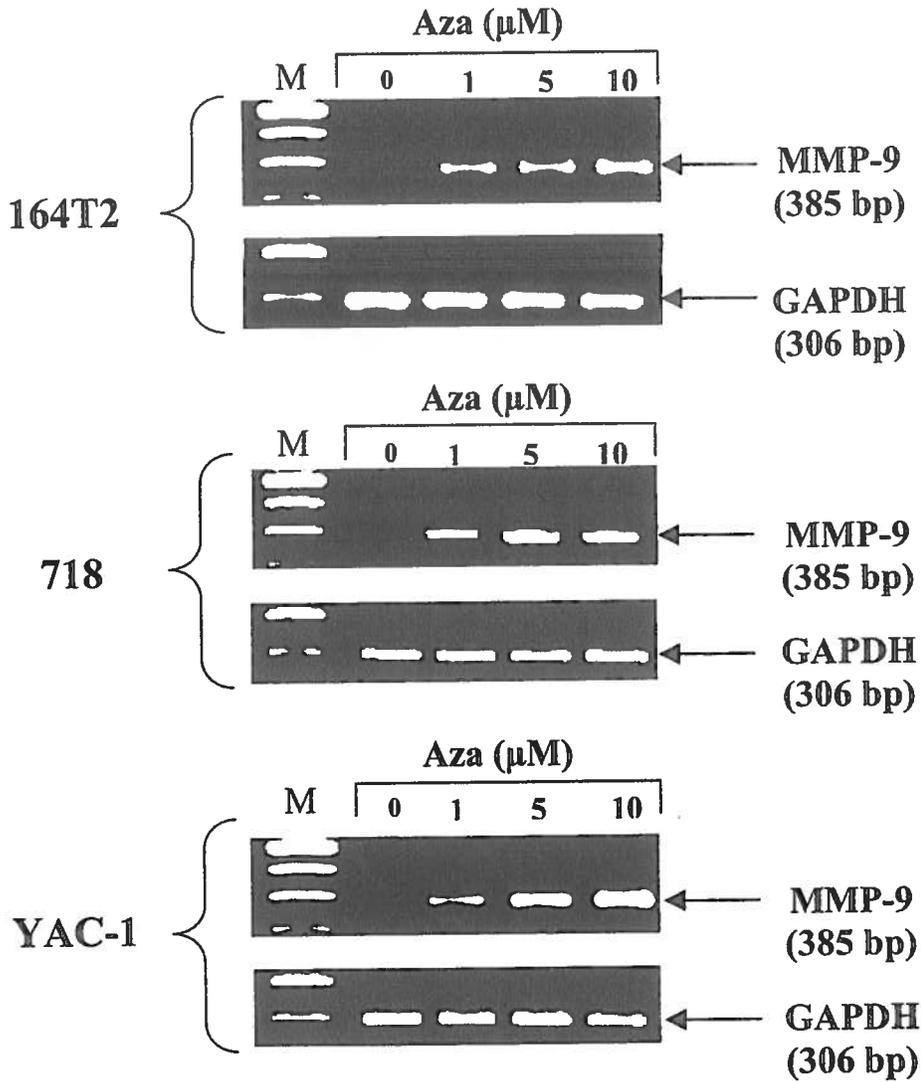
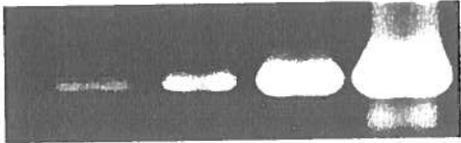


Figure 5

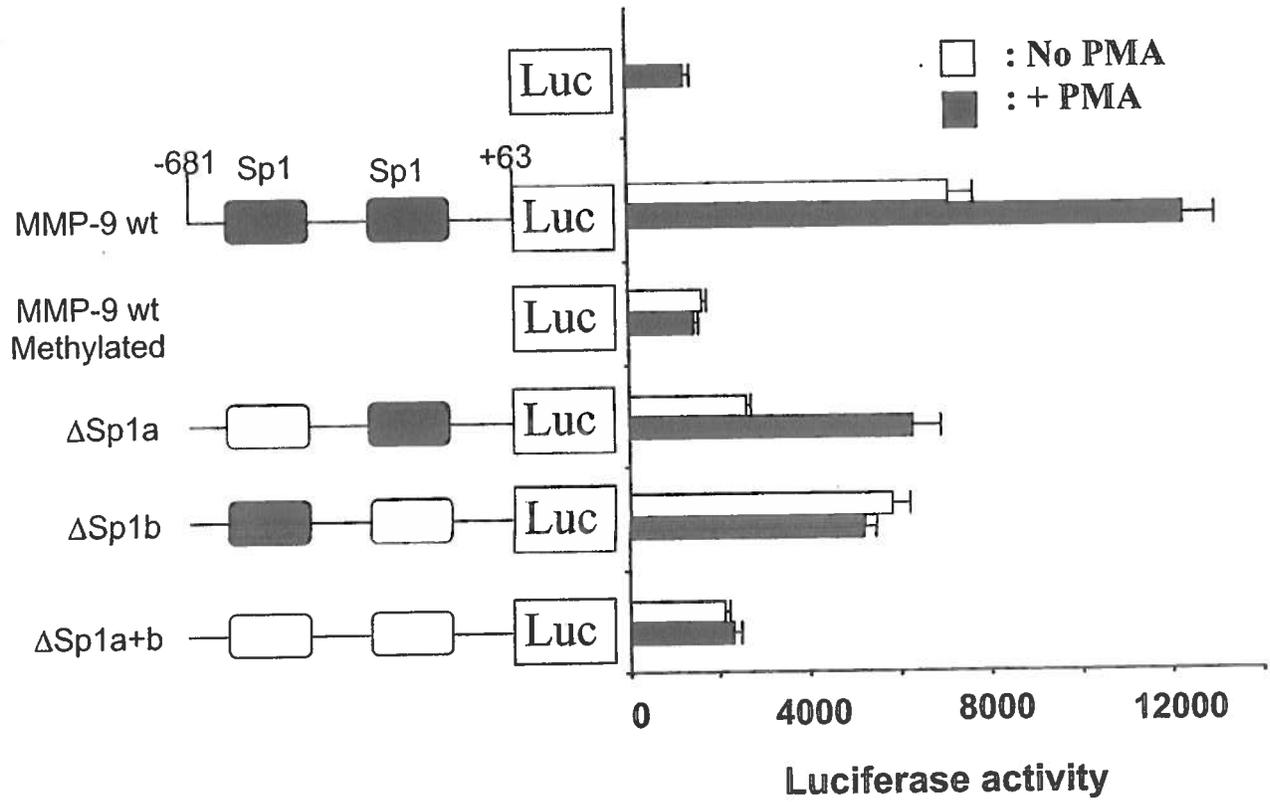
AZA (5μM)	-	+	-	+
PMA (50nM)	-	-	+	+

164T2



← **pro-MMP-9
(105 kD)**

Figure 6



Chapitre 3

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La présente étude avait pour but d'étudier le rôle de la méthylation d'ADN dans la régulation de l'expression de MMP-9, notamment dans les cellules de lymphomes. Nos résultats ont démontré : 1) une corrélation entre l'expression constitutive de MMP-9 chez les lymphomes agressifs (S19 et 374T1) et l'hypométhylation de sites CpG au niveau du promoteur de MMP-9, notamment aux sites Sp1; 2) que le traitement de cellules lymphomateuses avec un agent pharmacologique hypométhylant augmente l'expression de MMP-9 ; 3) que cette induction de MMP-9 est potentialisée en présence de PMA, et 4) que la méthylation *in vitro* du promoteur de MMP-9 abolit son activité transcriptionnelle.

Nos résultats sont consistants avec ceux de MacDougall *et al.* (1999), qui indiquent que le traitement des cellules de mélanomes humains avec le 5-aza-CdR induit MMP-9 au niveau protéique et au niveau de l'ARNm. Ceci suggère que la régulation de MMP-9 par la méthylation de l'ADN ne serait pas restreinte aux lymphomes, mais pourrait être aussi exercée chez d'autres types cellulaires. L'induction de MMP-9 par le 5-aza-CdR semble spécifique, puisque nous n'avons pas détecté ni en RT-PCR, ni en zymographie, d'induction de MMP-2 suite au traitement avec le 5-aza-CdR, tout comme l'étude de MacDougall *et al.* (1999). Cependant, bien que nos résultats aient démontré que le 5-aza-CdR pouvait créer une hypométhylation du promoteur de MMP-9, d'autres travaux devront déterminer si le 5-aza-CdR a une influence secondaire dans l'induction de cytokines importantes pour l'activation transcriptionnelle de MMP-9, comme le TNF- α et l'IL-1 β . La détection en RT-PCR et/ou en immunobuvardage (ou « Western blot ») d'une augmentation d'expression de ces cytokines (suite au traitement avec le 5-aza-CdR) nous permettrait de répondre à cette hypothèse. De plus, d'autres études seront nécessaires afin de déterminer si le 5-aza-CdR (en présence ou non au PMA) modifie l'expression de facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation de l'activité du

promoteur de MMP-9, tel NF- κ B, Sp1 et AP1. La détection de ces facteurs de transcription en EMSA (ou « Electrophoretic Mobility Shift Assay ») pourra donc être envisagée. La surexpression de ces cytokines et/ou de ces facteurs de transcriptions suite au traitement avec le 5-aza-CdR pourrait effectivement, du moins en partie, être impliquée dans l'induction d'expression de MMP-9. L'utilisation de matrices d'ADNc (ou « DNA microarrays ») afin d'étudier globalement la modulation des facteurs impliqués dans l'expression de MMP-9 serait une approche à considérer pour déterminer les mécanismes 'indirects' de l'hypométhylation sur l'activation du promoteur de MMP-9.

Pour déterminer si des changements aberrants dans la méthylation de l'ADN pouvaient contribuer à l'expression de MMP-9 dans nos lignées cellulaires, nous avons utilisé la technique du "Bisulfite mapping" qui permet de déterminer l'état de méthylation de chacune des cytosines d'une séquence d'ADN. Selon les résultats obtenus pour le *promoteur de MMP-9, les cellules exprimant des taux constitutif de MMP-9* démontrent une hypométhylation significative pour les deux motifs Sp1 (fig.3B et C), ce qui constitue un point fort de notre étude. Cependant, les cellules n'exprimant pas MMP-9 se sont avérées fortement méthylées à ces sites (fig.3A). Ces données permettent de croire que la méthylation joue un rôle important dans la régulation transcriptionnelle de MMP-9. Pour renforcer cette constatation, des études de 'Bisulfite mapping' sur la même région du promoteur (surtout pour les deux sites Sp1) seront nécessaires sur d'autres lignées cellulaires de lymphomes murins, puisque peu de lignées ont été utilisées. Il serait également nécessaire de confirmer ces résultats chez les lymphomes LNH humains.

Les résultats obtenus, avec le 'Bisulfite mapping' se sont concentrés dans la région -1058 à -383. Or, on retrouve en aval de cette région, d'autres dinucléotides CpG et d'autres séquences régulatrices (motifs de liaison AP-1, boîte TATA, répétitions de microsatellites d(CA)_n) impliquées dans la régulation transcriptionnelle de MMP-9 (Sato et Seiki, 1993). Par exemple, la boîte GC ("GC Box") est située près du site d'initiation à

la transcription et pourrait avoir un impact (si méthylée) sur la transcription de MMP-9. La méthylation de ces éléments de régulation (ou des sites adjacents) pourrait aussi avoir des impacts sur la suppression transcriptionnelle de MMP-9. D'autres études de 'Bisulfite mapping' seront donc nécessaires sur le reste du promoteur afin de déterminer si des changements importants dans le niveau de méthylation surviennent à ces sites.

Bien que la technique du 'Bisulfite mapping' soit privilégiée dans plusieurs études de haut calibre effectuées sur la méthylation de l'ADN, son utilisation à grande échelle (tel que suggérée précédemment) peut cependant s'avérer coûteuse. Pour remédier à ce problème, une technique alternative est fréquemment employée. Il s'agit du buvardage de type Southern. Cette technique est basée sur le fait que des enzymes de restrictions peuvent cliver ou non une séquence d'ADN particulière contenant une cytosine méthylée. En utilisant une sonde à ADN (marquée à la radioactivité ou autre), le profil de digestion enzymatique changera dépendamment de l'état de méthylation du site ciblé. Bien que cette technique donne peu d'information sur l'état de méthylation de chacun des nucléotides d'une séquence d'ADN (limitation aussi dûe aux petits nombres de séquences d'ADN reconnues par les enzymes de restrictions), elle s'avère néanmoins plus rapide et moins dispendieuse que le 'Bisulfite mapping'. Étant donné que notre étude nous a permis de cibler deux 'sites' spécifiques où la méthylation changeait significativement (sites Sp1), cette approche pourrait être une technique de choix pour: 1) corrélérer nos résultats de 'Bisulfite mapping' obtenus chez les lymphomes et 2) étudier rapidement l'état de méthylation de ces sites dans d'autres types cellulaires.

Pour déterminer quel était l'impact de la méthylation de l'ADN sur les deux sites Sp1, nous avons utilisé la méthylation *in vitro* (avec l'enzyme bactérienne *M.SssI*, qui méthyle toutes les séquences CG). Par la suite, nous avons vérifié sur gel d'agarose la méthylation de ces sites par la digestion avec l'enzyme *Aci I*, qui clive la séquence C↓CGC (similaire au motif Sp1) lorsque la cytosine, adjacente au G, est non-méthylée.

Nos résultats démontrent que la méthylation inhibe l'activité du promoteur de MMP-9 et ce, même en présence de PMA. Dû au fait que les lymphomes étudiés sont difficilement transfectables de façon transitoire (comme d'ailleurs plusieurs types cellulaires qui se divisent en suspension), les cellules de fibrosarcomes HT 1080 ont été utilisées. Bien que les motifs Sp1 aient déjà été décrits comme étant importants pour l'activité transcriptionnelle de MMP-9 chez les cellules HT 1080 (voir section 3.6.1), plusieurs questions peuvent se poser sur la validité de ce modèle cellulaire vis-à-vis les cellules de lymphomes, à savoir: 1) est-ce que la méthylation a aussi une influence sur la transcription endogène de MMP-9 chez les cellules HT1080, et 2) est-ce que les changements au niveau de la méthylation des sites Sp1 surviennent aussi chez le promoteur endogène des cellules HT1080? Pour répondre rapidement à ces questions, le 'Bisulfite mapping' ainsi que le traitement avec le 5-aza-CdR pourront être envisagés sur les cellules HT1080.

De plus, la méthylation *in vitro* de promoteurs, utilisée dans de nombreuses études, a aussi ses limites d'interprétation. Il s'avère difficile techniquement de méthyler un seul site (^mCpG) à la fois, car souvent, ce site est présent à de nombreux endroits dans le promoteur. La méthylase bactérienne 'méthylera' donc toutes les séquences reconnues sans distinction. L'enzyme *M.SssI* ne peut pas discriminer un seul site Sp1 d'un autre, puisque les sites Sp1 (dans notre cas) possèdent tous la même séquence d'ADN. De plus, d'autres dinucléotides ^mCpG (qui n'ont pas pu être reconnus par le profil de digestion de *Aci I*) se trouvent en aval des deux sites Sp1. Donc, il pourrait être aussi plausible que ces autres sites (méthylés) situés en aval aient eu une influence sur l'activité transcriptionnelle de MMP-9. L'une des possibilités pour remédier à ce problème de méthylation "site-spécifique", serait d'incuber l'enzyme méthylase *M.SssI* selon différentes concentrations d'enzymes à différents temps. Ceci permettrait donc de "limiter" l'activité enzymatique de *M.SssI* sur l'ADN et pourrait créer ainsi des sites méthylés à certains endroits (et non à tout l'ADN). Par la suite, le 'Bisulfite mapping'

(effectué sur le plasmide) pourrait être envisagé pour confirmer l'état de méthylation de chacun des sites ^mCpG du promoteur de MMP-9.

L'une des indications qui laisserait croire que la méthylation de l'ADN pourrait diminuer l'activité transcriptionnelle en bloquant, par un mécanisme direct, la liaison de Sp1 à son site consensus, vient d'une étude de Clark *et al.* (1997). Malgré le fait que Sp1 semble être insensible à la méthylation de l'ADN sur le ^mCpG central (qui constitue une partie du site de liaison) de l'un ou l'autre des brins complémentaires d'ADN, la méthylation de deux cytosines consécutives sur le brin antisens, tel ^mCp^mCpG, inhibe la liaison de Sp1 à son motif (Clark *et al.*, 1997). Il a déjà été établi que certaines cellules de mammifères ont la capacité de méthyler deux cytosines adjacentes aux sites CpCpG, avec notamment comme exemple le site Sp1 du promoteur Rb et du promoteur NF1 ('Neurofibromatosis-1') (Clark *et al.*, 1997; Mancini *et al.*, 1999). D'autres analyses avec le 'Bisulfite mapping' seront nécessaires sur les sites Sp1 du brin complémentaire de notre promoteur MMP-9 pour déterminer la possibilité d'une méthylation sur les deux cytosines consécutives (CpCpG) constituant le site consensus Sp1. Si la méthylation est détectée sur les deux cytosines constituant le site Sp1, la technique du "EMSA" pourra être utilisée pour confirmer l'inhibition de liaison du facteur de transcription Sp1 (issu de nos lignées de lymphomes) sur des oligonucléotides méthylés au sites ^mC^mCG. Si ces résultats s'avèrent positifs, cela signifierait donc que la méthylation de l'ADN exerce sa suppression transcriptionnelle en inhibant la liaison de Sp1, sur le brin complémentaire du promoteur de MMP-9. Par ailleurs, si ces résultats s'avèrent négatifs, des études plus approfondies seront nécessaires pour déterminer d'autres mécanismes d'inhibition indirects qui seraient responsables de l'inactivation transcriptionnelle médiée par la méthylation de l'ADN.

Notre étude a soulevé l'existence d'une interaction négative (au niveau transcriptionnel) entre Sp1 et une protéine nucléaire ayant des propriétés de répression

appelée “methyl-CpG-binding protein-2” ou MeCP2 (Kudo, 1998; voir discussion de l'article). Plusieurs étapes seraient nécessaires pour permettre de répondre de façon préliminaire à cette hypothèse, soit: 1) isoler l'ADNc de MeCP2 et de Sp1 à partir de nos lymphomes; 2) cloner ces ADNc dans des vecteurs d'expression inductibles distincts; 3) utiliser comme système de transfection les cellules de *Drosophila melanogaster*, qui n'ont pas de facteurs Sp1, ni de MeCP2 et ni de mécanisme de méthylation génomique majeur; 4) co-transfecter le vecteur d'expression Sp1 avec le plasmide contenant déjà le promoteur méthylé de MMP-9, pour s'assurer que Sp1 active la transcription de MMP-9 dans ces cellules; 5) co-transfecter le plasmide contenant le promoteur de MMP-9 non-méthylé avec le plasmide d'expression de Sp1 (une concentration fixe déterminée à l'étape #4) et avec des concentrations croissantes du vecteur d'expression MeCP2; 6) répéter l'étape #5 mais en transfectant cette fois-ci le plasmide contenant le promoteur MMP-9 méthylé; et 7) déterminer l'activité Luciférase relative pour les étapes #4, #5 et #6. Si le taux de répression transcriptionnelle (lorsque le plasmide contenant le promoteur de MMP-9 méthylé) est directement proportionnel à la quantité de vecteur d'expression MeCP2, alors ces résultats suggéreraient une interférence négative entre Sp1 et MeCP2 pour la transcription de MMP-9 chez le lymphome.

Il est possible de croire que MMP-9, lors de l'embryogénèse, pourrait être régulée par la méthylation de l'ADN. En effet, l'hyperméthylation au niveau de certains promoteurs est bien connue pour inactiver des gènes associés dans : 1) le développement embryonnaire et 2) l'expression de gènes spécifiques à certains tissus (ou « tissue-specific genes »). Un exemple bien connu est le gène de γ -globin, régulé par la méthylation de l'ADN dépendant du tissu (Busslinger *et al.*, 1983). La méthylation de l'ADN est modifiée de façon importante aussi durant l'embryogénèse (Mayer *et al.*, 2000; voir section 4.4). En effet, certains travaux ont démontré qu'une déméthylation globale du génome survenait durant la pré-implantation de l'embryon. MMP-9 est exprimée dans certaines cellules à un temps précis durant l'implantation du zygote et lors du

développement de l'embryon, plus particulièrement chez les cellules trophoblastiques et les cellules du sac vitellin (Reponen *et al.*, 1994). De plus, des études effectuées chez les souris déficientes en MMP-9 ont révélé des rôles critiques de cette protéase pour la croissance des plaques osseuses, pour l'angiogénèse et durant le développement des chondrocytes lors du processus d'ossification (Vu *et al.*, 1998; voir section 3.2). Ceci laisserait croire que l'expression de MMP-9, spécifique à certains tissus et essentielle pour le développement embryonnaire normal, serait concomitante au remaniement de la méthylation, d'où la possibilité d'une régulation par la méthylation de l'ADN de MMP-9 au cours de l'embryogénèse. Donc, l'altération de la méthylation de l'ADN d'un gène spécifique, tel MMP-9, pourrait promouvoir à des stades plus tardifs, le processus tumorigénique.

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (ou « tumor-suppressor genes ») p16 et O⁶-méthyl-guanine-DNA méthyltransférase (ou MGMT) a longuement été associée au développement du cancer pulmonaire. En effet, certaines études ont révélé que ces deux gènes sont inactivés (dérégulant ainsi le cycle cellulaire) par l'hyperméthylation de leur promoteur respectif. Récemment, Palmisano *et al.* (2000) ont démontré qu'ils pouvaient prédire (à partir de sputum prélevé à différents temps) le pronostic du cancer des poumons par la détection de changements aberrants (dans ce cas-ci, d'hyperméthylation) dans la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs p16 et/ou MGMT. De part les changements de la méthylation au niveau de leur promoteur, ces deux gènes constituent donc deux 'marqueurs à ADN', facilement et rapidement détectables chez une majorité de personnes susceptibles de développer ce type de cancer. Il n'est pas possible, pour l'instant, de déterminer à partir de notre étude, si l'hypométhylation du locus de MMP-9 pourrait servir de 'bio-marqueur précoce' pour la détection de néoplasmes de lymphomes. D'autres travaux seront nécessaires sur un plus grand nombre d'échantillons de tissus cancéreux humains afin de déterminer si

l'hypométhylation au niveau du promoteur de MMP-9 s'applique à d'autres types de tumeurs. Néanmoins, cette étude offre une nouvelle perspective dans ce contexte.

En conclusion, les résultats de cette étude démontrent pour la première fois que la méthylation de l'ADN joue un rôle dans le contrôle transcriptionnel du gène MMP-9 chez le lymphome. Les résultats obtenus par le 'Bisulfite mapping' et par le traitement avec le 5-aza-CdR ont confirmé que l'hypométhylation est en partie responsable de l'induction du gène MMP-9. D'autres études seront nécessaires afin d'établir si les changements du taux de méthylation du promoteur sont la conséquence de variations du taux d'expression et/ou de variations de l'activité des DNMTs entre nos lignées de lymphomes. Enfin, la compréhension plus approfondie de la régulation de MMP-9 chez le lymphome se révélera d'une importance cruciale pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Liste des références:

Antequera F, Bird A. 1993. CpG islands. *EXS* **64** : 169-185.

Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. 1998a. Protection from lymphoma metastasis in ICAM-1 mutant mice : a post-homing event. *J Immunol* **161** : 2333-2338.

Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. 1998b. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma / endothelial cell contact : implication of ICAM-1. *J Immunol* **160** : 2967-2973.

Armitage JO. 1993. Treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **328** :1023-1030.

Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA. 1996. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci* **16** :7910-7919.

Baylin SB, Herman JG. 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* **16** : 168-174.

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. 1998. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* **72** : 141-196.

Beard C, Li E, Jaenisch R. 1995. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* **9** : 2325-2334.

Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin SB, Issa JP. 1996. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 4045-4050.

Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. 1998. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 11891-11896.

Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. 1994. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 4293-4297.

Bernhard EJ, Muschel RJ, Hughes EN. 1990. Mr 92,000 Gelatinase release correlates with the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Cancer Res* **50** : 3872-3877.

Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V. 1988. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to the bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* **203** : 971-983.

Bird AP. 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* **70** : 5-8.

Bird AP, Wolffe AP. 1999. Methylation-induced repression- belts, braces, and chromatin. *Cell* **99** :451-454.

Birkedal-Hansen H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* **7** :728-735.

Bishop JM, Weinberg RA. 1996. The discovery of proto-oncogenes. *Molecular Oncology* (New York : scientific american Inc.)

Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. 1998. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines :an absolute requirement for transcription factor NF- κ B. *FEBS Letter* **435** :29-34.

Buschhausen G, Wittig B, Graessmann M, Graessmann A. 1987. Chromatin structure is required to block transcription of the methylated herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 1177-1181.

Busslinger M, Hurst J, Flavell RA. 1983. DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* **34** : 197-206.

Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet* **21** : 103-107.

Chambers AF, Matrisian LM. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* **89** : 1260-1270.

Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. 1998. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* **395** : 89-93.

Clark SJ, Harrison J, Molloy PL. 1997. Sp1 binding is inhibited by ^mCp^mCpG methylation. *Gene* **195** : 67-71.

Cockett MI, Birch ML, Murphy G, Hart IR, Docherty AJ. 1994. Metalloproteinase domain structure, cellular invasion and metastasis. *Biochem Soc Trans* **22** :55-57.

Colot V, Rossignol JL. 1999. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* **21** : 402-411.

Conca W, Willmroth F. 1994. Human T lymphocytes express a member of the Matrix Metalloproteinase gene family. *Arthritis Rheum* **37** : 951-956.

Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Fermisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Huang H-JS, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genet* **25** :132-138.

Coussens LM, Werb Z. 1996. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* **3** : 895-904.

Crossen PE, Morrison MJ. 1999. Methylation status of the 3rd exon of the c-MYC oncogene in B-cell malignancies. *Leuk Res* **23** :251-253.

De Noncourt P, Robledo O, Alain T, Kossakowska AE, Urbanski SJ, Potworowski EF, St-Pierre Y. 2001. Leukocyte elastase in murine and human non-Hodgkin lymphomas. *J Leukoc Biol* **70** : 585-591.

Doerfler W. 1983. DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* **52** : 93-124.

Eberhardt W, Huwiler A, Beck KF, Walpen S, Pfeilschifter J. 2000. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* **165** :5788-5797.

Eden S, Hashimshony T, Keshet I, Cedar H, Thorne AW. 1998. DNA methylation models histone acetylation. *Nature* **394** : 842-847.

Estève PO, Chicoine E, Robledo O, Aoudjit F, Descoteaux A, Potworowski EF, St-Pierre Y. 2001. Regulation of MMP-9 by PKC-zeta. Protein kinase C-zeta regulates the transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-κB. *J Biol Chem* (soumis pour publication)

Fang KC, Wolters PJ, Steinhoff M, Bidgol A, Blount JL, Caughey GH. 1999. Mast cell expression of gelatinase A and B is regulated by kit ligand and TGF-beta. *J Immunol* **162** :5528-5535.

Feinberg AP. 2001. Methylation meets genomics. *Nat Genet* **27** :9-10.

Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M. 1988. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* **48** : 1159-1161.

Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal R, Chan JS, Davidge ST, Filep JG. 2001. Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1 [1-32]. *FASEB J* **15** :2230-2240.

- Ghoshal K, Majumder S, Li Z, Dong X, Jacob ST. 2000. Suppression of Metallothionein gene expression in a rat hepatoma because of promoter-specific DNA Methylation. *J Biol Chem* **275** : 539-547.
- Giavazzi R, Garofalo A, Ferri C, Lucchini V, Bone EA, Chiari S, Brown PD, Nicoletti MI, Taraboletti G. 1998. Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts. *Clin Cancer Res* **4**: 985-992.
- Glickman JF, Pavlovich JG, Reich NO. 1997. Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation. *J Biol Chem* **272** : 17851-17857.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. 1985. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* **228** : 187-190.
- Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. 1992. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* **267** :4583-4591.
- Grant GA, Eisen AZ, Marmer BL, Roswit WT, Goldberg GI. 1987. The activation of human skin fibroblast procollagenase. Sequence identification of the major conversion products. *J Biol Chem* **262** :5886-5889.
- Grinnell F, Zhu M. 1996. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol* **106** : 335-341.
- Grusby-Jackson L, Beard C, Possemato R, Tudor M, Fambrough D, Csankovszki G, Dausman J, Lee P, Wilson C, Lander E, Jaenisch, R. Loss of genomic methylation causes p53-dependant apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genetics* **27** : 31-39.
- Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, Boyd D. 1996. Stimulation of 92-kDa Gelatinase B promoter activity by *ras* is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/*ets* and AP-1 sequence. *J Biol Chem* **271** : 10672-10680.
- Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. 2001. Transforming growth factor – beta – and tumor necrosis factor-alpha – mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* **276** :22341-22350.
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. 1993. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **82** :1820-1828.

- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100** : 57-70.
- Hendrich B, Bird A. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* **10** : 6538-6547.
- Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* **260** : 2493-2500.
- Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH. 1987. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J Clin Invest* **80** : 1644-1650.
- Himmelstein BP, Lee EJ, Sato H, Seiki M, Muschel RJ. 1997. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene* **14** :1995-1998.
- Holliday R. 1993. Epigenetic inheritance based on DNA methylation. *EXS* **64** : 452-468.
- Homandberg GA, Hui F. 1996. Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys* **334** :325-331.
- Hsieh CL, Lieber MR. 1992. CpG methylated minichromosomes become inaccessible for *(D)J* recombination after undergoing replication. *EMBO J* **11** : 3115-3125.
- Imai K, Shikata H, Okada Y. 1995. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett* **369** : 249-251.
- Jones PA, Laird PW. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet* **21** : 163-166.
- Jones PA, Veenstra GJG, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet* **19** : 187-191.
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. 1992. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* **6** : 705-714.
- Kaludov NK, Wolffe AP. 2000. MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucl Acids Res* **28** : 1921-1928.
- Kaplan HS, Brown MB. 1952. A quantitative dose-response study of lymphoid-tumor development in irradiated C57 black mice. *J Natl Cancer Inst* **13** :185-208.

- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. 1997. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* **7** : 157-165.
- Kelly T, Borset M, Abe E, Gaddy-Kurten D, Sanderson RD. 2000. Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* **37** :273-281.
- Klimasauskas S, Kumar S, Roberts RJ, Cheng X. 1994. *HhaI* methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76** : 357-369.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, Janowska-Wiecczorek A. 1999. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **94** : 2080-2089.
- Kossakowska AE, Hinek A, Edwards DR, Lim MS, Zhang CL, Breitman DR, Prusinkiewicz C, Stabbler AL, Urbanski LS, Urbanski SJ. 1998. Proteolytic activity of human non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* **152** : 565-576.
- Kossakowska AE, Huchcroft SA, Urbanski SJ, Edwards DR. 1996. Comparative analysis of the expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in breast neoplasia, sporadic colorectal neoplasia, pulmonary carcinomas and malignant non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Br J Cancer* **73** : 1401-1408.
- Kossakowska AE, Urbanski SJ, Huchcroft SA, Edwards DR. 1992. Relationship between the clinical aggressiveness of large cell immunoblastic lymphomas and expression of 92 kDa gelatinase (type IV collagenase) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNAs. *Oncol Res* **4** : 233-240.
- Krane SM, Byrne MH, Lemaitre V, Henriot P, Jeffrey JJ, Witter JP, Liu X, Wu H, Jaenisch R, Eeckhout Y. 1996. Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J Biol Chem* **271** :28509-28515.
- Kudo S. 1998. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 repress Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* **18** : 5492-5499.
- Kutas GJ, Armitage JO, Howard O. 2000. Current approaches to the lymphomas. *Patient Care Canada* **6** : 67-76.
- Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. 2000. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* **95** : 314-319.
- Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. 1996. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* **122** : 3195-3205.

- Leonhardt H, Page AW, Weier H, Bestor TH. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71** : 865-873.
- Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. 1995. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* **154** : 4379-4389.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. 1992. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69** : 905-914.
- Li E, Beard C, Jaenisch R. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366** : 362-365.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69** : 915-926.
- Lieberman M, Kaplan HS. 1959. Leukemogenic activity of filtrates from radiation-induced lymphoid tumors of mice. *Science* **130** : 387-388.
- Lieberman M, Decleve A, Ricciardi-Castagnoli P, Boniver J, Finn OJ, Kaplan HS. 1979. Establishment, characterization and virus expression of cell lines derived from radiation- and virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice. *Int J Cancer* **24** : 168-177.
- Liu Y, Oakeley EJ, Sun L, Jost JP. 1998. Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res* **26** : 1038-1045.
- Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson MC, Whitelock JM, Birkedal-Hansen H. 1993. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor induce expression of M(r) 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* **268** : 19143-19151.
- MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Muschel RJ, Kerbel RS. 1999. 'Proteolytic switching': opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. *Br J Cancer* **80** : 504-512.
- Mainardi CL, Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM. 1984. Purification of a type V collagen degrading metalloproteinase from rabbit alveolar macrophages. *Collagen Rel Res* **4** : 479-492.
- Mancini DN, Singh SM, Archer TK, Rodenhiser DI. 1999. Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with the binding of CREB and Sp1 transcription factor. *Oncogene* **18** : 4108-4119.

Marbaix E, Donnez J, Courtoy PJ, Eeckout Y. 1992. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** : 11789-11793.

Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403** : 501-502.

Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, Adelstein DJ, Spier CM, Grogan TM, LeBlanc M, Carlin S, Chase E, Fisher RI. 1998. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **339** :21-26.

Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R. 1982. Treatment of B cell lymphoma with monoclonal anti-idiotype antibody. *N Engl J Med* **306** :517-522.

Mohan R, Rinehart WB, Bargagna-Mohan P, Fini E. 1998. Gelatinase B/*lacZ* transgenic mice, a model for mapping Gelatinase B expression during developmental and injury-related tissue remodeling. *J Biol Chem* **273** :25903-25914.

Mounter PJ, Lennard AL. 1999. Management of non-Hodgkin's lymphomas. *Postgrad Med J* **75**: 2-6.

Munaut C, Salonurmi T, Kontusaari S, Reponen P, Morita T, Foidart JM, Tryggvason K. 1999. Murine matrix metalloproteinase-9. 5'upstream region contains cis-acting elements for expression in osteoclasts and migrating keratinocytes in transgenic mice. *J Biol Chem* **274** :5588-5596.

Nademanee A, Molina A, O'Donnell MR, Daxis A, Snyder DS, Parker P, Stein A, Smith E, Planas I, Kashyap A, Spielberger R, Fung H, Wong KK, Somlo G, Margolin K, Chow W, Sniecinski I, Vora N, Blume KG, Niland J, Forman SJ. 1997. Results of high-dose therapy and autologous bone marrow/stem cell transplantation during remission in poor-risk intermediate- and high-grade lymphoma: international index high and high-intermediate risk group. *Blood* **90** : 3844-3852.

Nagase H, Woessner JF. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274** :21491-21494.

Nakayama M, Wada M, Harada T, Nagayama J, Kusaba H, Ohshima K, Kozuru M, Komatsu H, Ueda R, Kuwano M. 1998. Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human *MDR1* gene in acute myeloid leukemias. *Blood* **92** :4296-4307.

Nan X, Campoy FJ, Bird AP. 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88** : 471-481.

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

Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird AP. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393** : 386-389.

Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* **18**:1135-1149.

Norga K, Paemen L, Masure S, Dillen C, Heremans H, Billiau A, Carton H, Cuzner L, Olsson T, Van Damme J, Opdenakker G. 1995. Prevention of acute autoimmune encephalomyelitis and abrogation of relapses in murine models of multiple sclerosis by the protease inhibitor D-penicillamine. *Inflammation Res* **44** : 529-534.

Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. 1999. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 12754-12759.

Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. 1995. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest* **72** : 311-322.

Okano M, Bell DW, Harber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99** : 247-257.

Okano M, Xie S, Li E. 1998a. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genet* **19** : 219-220.

Okano M, Xie S, Li E. 1998b. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **26** : 2536-2540.

Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Shapiro SD, Campbell IL. 1998. Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* **152** : 729-741.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. 2000. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* **60** :5954-5958.

Park MT, Cha HJ, Jeong JW, Kim SI, Chung HY, Kim ND, Kim OH, Kim KW. 1999. Glucocorticoid receptor-induced down-regulation of MMP-9 by ginseng components, PD and PT contributes to inhibition of the invasive capacity of HT1080 human fibrosarcoma cells. *Mol Cells* **9** : 476-483.

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. 1999. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* **274** : 33002-33010.

Pradhan S, Talbot D, Sha M, Benner J, Hornstra L, Li E, Yaenisch R, Roberts RJ. Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. 1997. *Nucleic Acids Res* **25** : 4666-4673.

Prosper F, Robledo C, Cuesta B, Rifon J, Borbolla JR, Pardo J, Rocha E. 1994. Incidence of non-Hodgkin's lymphoma in patients treated for Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* **12** :457-462.

Rabbitts, TH. 1994. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372** :143-149.

Reddy KB, Krueger JS, Kondapaka SB, Diglio CA. 1999. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int J Cancer* **82** :268-273.

Reponen P, Leivo I, Sahlberg C, Apte SS, Olsen BR, Thesleff I, Tryggvason K. 1995. 92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation. *Dev Dyn* **202** : 388-396.

Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. 1994. High expression of 92-kDa type IV collagenase (gelatinase) in the osteoclast lineage during mouse development. *Ann NY Acad Sci* **732** :472-475.

Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Johnson JP. 1993. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* **5** :732-739.

Robertson KD. 2001. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* **20** : 3139-3155.

Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. 1999. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* **27** : 2291-2298.

Robertson KD, Wolffe AP. 2000. DNA methylation in health and disease. *Nature Rev Genet* **1** : 11-19.

Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. 1995. Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res* **703** : 151-155.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* **20** :3156-3165.

- Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM, Rossant J. 1987. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Gene Dev* **1** : 1039-1046.
- Sang QX, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. 1995. Proteolytic and non-proteolytic activation of human neutrophil progelatinase B. *Biochim Biophys Acta* **1251** :99-108.
- Sato H, Kita M, Seiki M. 1993. v-Src activates the expression of 92-kDa Type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to Retinoblastoma control elements. *J Biol Chem* **268** : 23460-23468.
- Sato H, Seiki M. 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* **8** :395-405.
- Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. 1991. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem* **266** : 7870-7875.
- Shimajiri, S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, Sasaguri Y. 1999. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Letters* **455** : 70-74.
- Sporn MB. 1996. The war on cancer. *Lancet* **347** : 1377-1381.
- St-Denis A, Chano F, Tremblay P, St-Pierre Y, Descoteaux A. 1998. Protein kinase C-alpha modulate lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* **273** :32787-32792.
- St-Pierre Y, Aoudjit F, Lalancette M, Potworowski EF. 1999. Dissemination of T cell lymphoma to target organs: a post-homing event implicating ICAM-1 and matrix metalloproteinases. *Leuk Lymphoma* **34** : 53-61.
- St-Pierre Y, Potworowski EF. 2000. T cell control of extracellular matrix degradation. *Dev Immunol* **7** : 171-177.
- Stetler-Stevenson WG. 1999. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* **103** : 1237-1241.
- Stewart C, Stuhlmann H, Jahner D, Jaenisch R. 1982. De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79** : 4098-4102.
- Stoger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow DP. 1993. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* **73** : 61-71.

Xing RH, Rabbani SA. 1999. Transcriptional regulation of Urokinase (uPA) gene expression in breast cancer cells : role of DNA methylation. *Int J Cancer* **81** : 443-450.

Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Péquignot E. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* **402** :187-191.

Yisraeli J, Adelstein RS, Melloul D, Nudel U, Yaffe D, Cedar H. 1986. Muscle-specific activation of a methylated chimeric actin gene. *Cell* **46** : 409-416.

Yoder JA, Bestor TH. 1998. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* **7** : 279-284.

Zucker S, Cao J, Chen WT. 2000. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* **19** : 6642-6650.

Sites internet :

(<http://www.leukemia-lymphoma.org>)

(<http://www.lymphomainfo.net/lymphoma/whatis.html>)

- WANG, X., X. Yu et R. Bartha. 1990. «Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil». Environ. Sci. Technol., vol. 24, p. 1086-1089.
- WEISSENFELS, W. D., M. Beyer, J. Klein et H. J. Rehm. 1991. «Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 34, p. 528-535.
- WEISSENFELS, W. D., M. Beyer et J. r. Klein. 1990. «Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 32, p. 479-484.
- WORLD HEALT ORGANIZATION (WHO). 1998. «Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons». Rapport 202. World Healt Organization. 863 p.
- WILLUMSEN, P. A., U. Karlson et P. H. Pritchard. 1998. «Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 50, p. 475-483.
- WILSON, S. C., et K. C. Jones. 1993. «Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review». Environ. Pollut., vol. 81, p. 229-249.
- WUNDER, T., J. Marr, S. Kremer, O. Steiner et H. Anke. 1997. «1-Methoxyppyrene and 1,6-dimethoxyppyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons». Arch. Microbiol., vol. 167, p. 310-316.
- YE, D., A. Siddiqi, A. E. Maccubin, S. Kumar et H. C. Sikka. 1996. «Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*». Environ. Sci. Technol., vol. 30, p. 136-142.

- Tate PH, Bird AP. 1993. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **3** : 226-231.
- Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M. 1995. Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer* **64** : 355-359.
- Tupule A, Levine A. 1999. AIDS-related lymphoma. *Blood Rev* **13** :147-150.
- Vacca A, Ribatti D, Ria R, Pellegrino A, Bruno M, Merchionne F, Dammacco F. 2000. Proteolytic activity of human lymphoid tumor cells. Correlation with tumor progression. *Dev Immunol* **7** :77-88.
- Vachtenheim J, Horakova I, Novotna H. 1994. Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **54** :1145-1148.
- Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB. 1996. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol Cell Biol* **16** : 4555-4565.
- Vu TH, Shipley M, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. 1998. MMP-9/Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93** : 411-422.
- Watabe T, Yoshida K, Shindoh M, Kaya M, Fujikawa K, Sato H, Seiki M, Ishii S, Fujinaga K. 1998. The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer* **77** : 128-137.
- Werb Z. 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91** : 439-442.
- Wong DJ, Foster SA, Galloway DA, Reid BJ. 1999. Progressive region-specific de novo methylation of the p16 CpG island in primary human mammary epithelial cell strains during escape from M(0) growth arrest. *Mol Cell Biol* **19** : 5642-5651.
- Wu J, Issa JP, Herman JG, Bassett DEJ, Nelkin BD, Baylin SB. 1993. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90** : 8891-8895.
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* **236** : 87-95.