

2m11, 287 5.7

Université de Montréal

**RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE
DU GÈNE *GLYPICAN 3 (GPC3)***

par

Gino Boily

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise (M.Sc.)
en biologie moléculaire

novembre 2000

© Gino Boily, 2000



QH
506
U54
2001
V.012

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

**RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE
DU GÈNE *GLYPICAN 3 (GPC3)***

présenté par:

Gino Boily

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Edward Bradley, président-rapporteur

Dr Daniel Sinnett, directeur de maîtrise

Dr Nicole Lemieux, membre du jury

Mémoire accepté le: _____

SOMMAIRE

Une étude réalisée dans notre laboratoire a montré que le gène *Glypican 3* (*GPC3*) est exprimé dans certaines tumeurs embryonnaires, incluant le neuroblastome (NB) et la tumeur de Wilms (WT), mais excluant le médulloblastome. *GPC3* est un gène lié au chromosome X dont l'expression est principalement observée dans les tissus embryonnaires. Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de ce gène, nous avons mené une étude de méthylation et de cartographie *in vivo* des sites d'interactions ADN-protéines au niveau de la région promotrice du gène. Le profil de méthylation a été investigué à l'aide des essais de méthylation par PCR et par hybridation Southern sur de l'ADN génomique provenant de cellules normales et tumorales. Dans les cellules normales, le profil de méthylation ne corrélait pas avec le statut d'expression mais plutôt avec le sexe (méthylation partielle chez les filles et absence de méthylation chez les garçons). Ces résultats suggèrent que, dans les cellules normales, la méthylation de l'ADN n'est pas nécessaire à la répression transcriptionnelle de *GPC3* et que la méthylation observée chez les filles est probablement liée au chromosome X inactif. Des anomalies de méthylation ont été détectées dans certains échantillons tumoraux de NB et de WT, sans toutefois présenter de lien évident avec le statut d'expression. Afin d'identifier les facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *GPC3*, nous avons cartographié les sites d'interactions ADN-protéines *in vivo* à l'aide de l'approche « ligation-mediated polymerase chain reaction » (LMPCR) au niveau du promoteur de *GPC3* dans deux lignées cellulaires de NB dérivées de garçons, soit SJNB-7 (exprimant *GPC3*) et SK-N-FI (n'exprimant pas *GPC3*). Plusieurs empreintes ont été mises en évidence : certaines étaient communes aux deux lignées cellulaires alors que d'autres étaient spécifiques à SJNB-7 (*GPC3*+) ou à SK-N-FI (*GPC3*-). Nos résultats présentent certaines évidences suggérant que les facteurs de transcription Sp1, NF-Y et Oct-x pourraient être impliqués dans l'activation transcriptionnelle de *GPC3* et que la région promotrice semble adopter une conformation particulière *in vivo*, qui pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'expression du gène.

ABSTRACT

We have previously shown that the *Glypican 3* (*GPC3*) gene was expressed in embryonal tumors, including neuroblastoma (NB) and Wilms' tumor (WT), but excluding medulloblastoma. *GPC3* is an X-linked gene that is almost exclusively expressed in embryonal tissues. To understand the mechanisms regulating the expression of this gene, we performed a DNA methylation study and an *in vivo* footprinting analysis in the promoter region. Southern blot- and PCR-based methylation assays were used to assess the methylation status of the *GPC3* promoter in genomic DNA from both normal and tumor cells. In normal cells, we found that the methylation patterns did not correlate with the expression but rather with the gender (partial methylation in females and absence of methylation in males). These results suggest that, in normal cells, DNA methylation of the promoter region is not necessary for the transcriptional repression of the *GPC3* gene and that the methylation observed in females is probably linked to the inactive X chromosome. Methylation abnormalities have been found in both NB and WT tumor samples with no obvious link with the expression status. In order to identify transcription factors that could be involved in the transcriptional regulation of *GPC3*, we performed an *in vivo* footprinting analysis using the ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) in two male-derived NB cell lines, SJNB-7 (expressing *GPC3*) and SK-N-FI (not expressing *GPC3*). Several footprints were found: some were detected in both cell lines whereas others were specific to one or the other cell line. Our results present evidence suggesting that Sp1, NF-Y and Oct-x could be implicated in the transcriptional activation of *GPC3* and that the promoter region may adopt a particular conformation in an *in vivo* context that may also play a role in the regulation of the expression of the gene.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
ABSTRACT	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	x
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 Expression du gène <i>Glypican 3</i> dans les tumeurs embryonnaires	1
1.2 Implication de <i>GPC3</i> dans la régulation de la croissance cellulaire et dans l'apoptose	3
1.3 La transcription chez les eucaryotes par l'ARN polymérase II	11
1.3.1 La machinerie transcriptionnelle	12
1.3.2 L'influence du contexte génomique dans la réponse aux facteurs de transcription	15
1.3.3 Le contrôle de l'empaquetage de l'ADN	17
1.4 La méthylation de l'ADN	24
1.4.1 La méthylation du génome des mammifères	24
1.4.2 La méthylation au cours du développement embryonnaire	31
1.4.3 Les rôles attribués à la méthylation	33
1.4.3.1 Méthylation et transcription	33
1.4.3.2 L'expression mono-allélique par empreinte parentale (« imprinting »)	37
1.4.3.3 La méthylation et l'inactivation du chromosome X	39
1.4.3.4 La méthylation et le cancer	41
1.5 Ce que nous savons à propos de la régulation transcriptionnelle de <i>GPC3</i>	44
1.6 Objectifs	47
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	48
2.1 Échantillons d'ADN et lignées cellulaires	48
2.2 Essai de méthylation par PCR	48
2.3 Essai de méthylation par hybridation Southern	57
2.4 Cartographie <i>in vivo</i> des sites d'interactions ADN-protéines	62
2.4.1 Bases de la technique	62
2.4.2 Méthodologie	66

2.4.2.1	Culture de cellules, traitements au DMS et irradiations aux UVC	66
2.4.2.2	Isolement de l'ADN traité <i>in vivo</i>	68
2.4.2.3	Réactions de séquençage de Maxam et Gilbert.	68
2.4.2.4	Conversion des bases endommagées en cassures simple-brin	70
2.4.2.5	Évaluation de la fréquence de cassure	72
2.4.2.6	"Ligation-mediated polymerase chain reaction" (LMPCR)	73
2.5	Synthèse des gabarits MET2-6 et MET1-5 pour la génération de sondes	78
2.6	Essai de détermination du sexe par PCR	82
2.7	Amplification PCR des marqueurs microsatellites	83
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS		84
3.1	Étude de la méthylation	84
3.1.1	La méthylation du promoteur de <i>GPC3</i> dans les cellules normales	86
3.1.2	La méthylation du promoteur de <i>GPC3</i> dans les tumeurs embryonnaires	93
3.2	Cartographie des sites d'interactions ADN-protéines	103
CHAPITRE 4 : DISCUSSION		114
4.1	La méthylation du promoteur de <i>GPC3</i>	114
4.1.1	Méthylation du promoteur de <i>GPC3</i> dans les tissus normaux	114
4.1.2	Méthylation du promoteur de <i>GPC3</i> dans les tumeurs embryonnaires.	115
4.2	Facteurs de transcription et régulation de l'expression de <i>GPC3</i>	116
4.2.1	Identification de sites de liaison de facteurs de transcription au niveau du promoteur de <i>GPC3</i>	116
4.2.2	Pertinence des trois facteurs de transcription potentiels dans l'expression de <i>GPC3</i>	123
4.2.3	Mécanismes hypothétiques de la régulation transcriptionnelle de <i>GPC3</i>	127
4.3	Conclusion	130
RÉFÉRENCES		132
REMERCIEMENTS		163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques génétiques et cliniques du Neuroblastome en fonction du pronostic _____	2
Tableau 2. Les histones désacétylases (HAT) et leur substrat _____	21
Tableau 3. Gènes suppresseurs de tumeurs réprimés par méthylation dans les cancers sporadiques _____	43
Tableau 4. Amorces utilisées pour les réactions de PCR et de LMPCR _____	54
Tableau 5. Combinaisons d'enzymes utilisées pour les réactions LMPCR dans chaque sous-région _____	75
Tableau 6. Étapes d'amplification de la méthode LMPCR _____	77
Tableau 7. Sommaire des résultats de l'étude de méthylation dans les cellules normales _____	92
Tableau 8. Sommaire des résultats de l'étude de méthylation dans les cellules tumorales _____	102
Tableau 9. Caractéristiques des facteurs de transcription prédits pour lier le promoteur de <i>GPC3</i> _____	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique du gène <i>GPC3</i>	5
Figure 2. Modèle tridimensionnel d'un complexe de pré-initiation de la transcription	14
Figure 3. Empaquetage de l'ADN sous forme de chromatine	19
Figure 4. Désamination du 5-méthylcytosine en thymine	26
Figure 5. Mécanismes proposés de la méthylation et de la déméthylation de l'ADN	27
Figure 6. Méthylations <i>de novo</i> et de maintien	29
Figure 7. Changements du profil de méthylation au début du développement	32
Figure 8. Modèle de la répression transcriptionnelle par la méthylation	36
Figure 9. Empreintes à la DNase I obtenues par l'approche <i>in vitro</i> au niveau du promoteur de <i>GPC3</i>	46
Figure 10. Essais de méthylation par PCR et par hybridation Southern	50
Figure 11. Construction du plasmide pBSKS+3H	51
Figure 12. Dinucléotides CpGs investigués pour la méthylation	52
Figure 13. Essai de méthylation par PCR : position des sites de restriction HpaII et des amorces utilisées dans le promoteur de <i>GPC3</i>	53
Figure 14. Essai de méthylation par hybridation Southern : position des sites de restriction investigués dans le promoteur de <i>GPC3</i>	59
Figure 15. Carte de restriction partielle de la région étudiée par l'essai de méthylation par hybridation Southern	60
Figure 16. Méthode de cartographie <i>in vivo</i> des interactions ADN-protéines : exemple présentant l'approche utilisant le DMS	63
Figure 17. Illustration des étapes de la méthode LM-PCR	65
Figure 18. Cartographie des sites interactions ADN-protéines au niveau du promoteur de <i>GPC3</i>	67
Figure 19. Conversion des dommages 7-méthylguanines et dimères cyclobutyliques de pyrimidines en cassure simple-brin	71
Figure 20. Procédure utilisée pour la synthèse des fragments MET2-6 et MET1-5	

	80
Figure 21. Contenu en nucléotides G+C et en dinucléotides CpG du promoteur du gène <i>GPC3</i>	85
Figure 22. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de sang périphérique, qui n'expriment pas <i>GPC3</i>	88
Figure 23. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de placentas, qui expriment <i>GPC3</i>	89
Figure 24. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des cellules normales	90
Figure 25. Détermination du sexe et du nombre de chromosomes X présents dans l'échantillon de placenta #32	91
Figure 26. Essai de méthylation par PCR sur de l'ADN génomique d'échantillons de caryotype 45,X (syndrome de Turner)	94
Figure 27. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de lignées cellulaires de NB	96
Figure 28. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des échantillons d'ADN de lignées cellulaires de NB	97
Figure 29. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de NB primaires	98
Figure 30. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des échantillons d'ADN de NB primaires	99
Figure 31. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de WT primaires	100
Figure 32. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des échantillons de WT primaires	101
Figure 33. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN provenant de WT primaires et de cellules rénales normales adjacentes	104
Figure 34. Empreintes <i>in vivo</i> au niveau du promoteur du gène <i>GPC3</i>	106
Figure 35. Carte détaillée des empreintes <i>in vivo</i> identifiées au niveau du promoteur de <i>GPC3</i> et des sites de liaison putatifs de facteurs de transcription	108
Figure 36. Comparaison des empreintes générées <i>in vivo</i> à celle générées <i>in vitro</i> au niveau de la région proximale du promoteur de <i>GPC3</i>	124

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

A : ampère	GPC3 : Glypican 3
ADN : acide désoxyribonucléique	GPI : résidu glycosyl-phosphatidyl- inositol
ADNc : ADN complémentaire	GST : glutathione S-transférase
ARN : acide ribonucléique	GTF : facteur général de transcription
ARNm : ARN messager	h : heure
b : base (base azotée de l'ADN)	HAT : histone acétyltransférase
BWS : syndrome de Beckwith- Wiedemann	HDAC : histone désacétyltransférase
C : cytosine	HIR1 : domaine de dimérisation de RAP74
° C : degré celcius	HSPG : protéoglycane à héparane sulfate
Ci : Curie (radioactivité)	IGF2 : « insulin-like growth factor 2 »
cm : centimètre	Inr : initiateur de la transcription riche en pyrimidine
CPD : dimère cyclobutylique de pyrimidine	kb : kilobase (base azotée de l'ADN)
CpG : dinucléotide 5'-CG-3'	LMPCR : « ligation-mediated PCR »
cpm : coups par minute (radioactivité)	LOH : perte d'hétérozygoté (« loss of heterozygosity »)
CTD : domaine C-terminal de l'ARN polymérase II	M : concentration molaire
DMS : diméthylsulfate	MB : médulloblastome
dMTase : ADN-déméthylase	MAR : « matrix attachment region »
Dnmt : ADN-méthyltransférase	MBD : « methyl-binding domain »
dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate : dATP, dCTP, dGTP ou TTP	MeCP2 : « methyl-CpG binding protein 2 »
EST : « expressed sequence tag »	µg : microgramme
fg : femtogramme	min : minute
fmol : femtomole	ml : millilitre
x g : unité de force centrifuge	µl : microlitre
GAG : résidu glycosaminoglycane	MM : mésothéliome malin
GpC : dinucléotide 5'-GC-3'	

mM : milimolaire	TF : facteur de transcription
μM : micromolaire	TFIIB : facteur de transcription IIB
NB : neuroblastome	TFIIE : facteur de transcription IIE
ng : nanogramme	TFIIF : facteur de transcription IIF
nm : nanomètre	Tm : température de dénaturation (« melting temperature »)
nM : concentration nanomolaire	TRD : « transcriptional repression domain »
pb : paire de bases (bases azotées de l'ADN)	TRK : famille de récepteurs neurotrophiques de type tyrosine kinase
PCR : « polymerase chain reaction »	U : unité (d'activité enzymatique)
pol II : ARN polymérase II	UV : rayons ultra-violets
RAP 30 : sous-unité de TFIIF de 30 kDa	UVC : rayons ultra-violets de type C
RAP74 : sous-unité de TFIIF de 74 kDa	V : volt
rpm : tour par minute	WT : tumeur de Wilms
RT-PCR : « reverse transcription – polymerase chain reaction »	Xic : centre d'inactivation du chromosome X (« X inactivation center »)
SAR : « scaffold attachment region »	XIST : transcrit spécifique au chromosome X (« X inactive specific transcript »)
sec : seconde	
SGBS : syndrome de Simpson-Golabi-Behmel	
snRNA : petit ARN nucléaire (« small nuclear RNA »)	
T4 endo V : T4 endonucléase V	
TBP : « TATA-box binding protein »	

À Pascale et Simon

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Expression du gène *Glypican 3* dans les tumeurs embryonnaires

L'étude du gène *Glypican 3* (*GPC3*), décrite dans ces pages, prend sa source dans un projet plus global visant à caractériser génétiquement le neuroblastome (NB). Le NB est une néoplasie solide prenant origine dans les cellules de la crête neurale, une structure embryonnaire dont est issu le système nerveux sympathique. Généralement, cette tumeur prend naissance dans la glande surrénale (50 %), dans d'autres régions de l'abdomen (20 %) ou au niveau des ganglions sympathiques du cou, du thorax ou du pelvis (Huddart et Mann, 1991). Cette maladie affecte surtout les enfants de moins de cinq ans. Son incidence annuelle au Québec, qui est de 27,42 enfants/année/million chez les enfants de moins de cinq ans, en fait la néoplasie solide la plus fréquente pour ce groupe d'âge (Leclerc et Dupuis-Lalonde, 2000).

Le NB est une tumeur cliniquement hétérogène. Son évolution se fait selon des scénarios extrêmement divers allant de la régression spontanée à la progression agressive entraînant la mort. Plusieurs groupes de recherche ont tenté de comprendre cette hétérogénéité. Il a été proposé que le terme diagnostic "neuroblastome" pourrait décrire un certain nombre de tumeurs reliées entre elles d'un point de vue histologique mais qui sont distinctes génétiquement (Brodeur, 1995). Au cours des 10-15 dernières années, diverses caractéristiques génétiques ont été découvertes et associées à des comportements cliniques distincts (en revue: Maris et Matthay, 1999). Ces caractéristiques sont importantes non seulement pour mieux comprendre l'étiologie du NB, mais aussi pour guider les cliniciens vers des traitements mieux appropriés pour les sujets atteints. De tels « marqueurs » permettent de classer les différentes formes de NB en fonction de leur taux de survie (tableau 1). Malgré l'utilité de ces marqueurs, nous sommes forcés d'admettre qu'aucun ne peut à lui seul prédire de façon absolue l'évolution de la maladie et que, malgré toutes les données génétiques dont nous disposons

Tableau 1. Caractéristiques génétiques et cliniques du Neuroblastome en fonction du pronostic

(Tiré de Brodeur *et al.*, 1997)

CARACTÉRISTIQUE	TYPE 1	TYPE 2	TYPE 3
<i>MYCN</i>	normal	normal	amplifié
Ploïdie	hyperploïde ou paratriploïde	paradiploïde ou paratétraploïde	paradiploïde ou paratétraploïde
1p LOH	< 5 %	25 – 50 %	80 – 90 %
14p LOH	< 5 %	25 – 50 %	< 5 %
Expression <i>TRK-A</i>	élevé	faible	faible ou absente
Expression <i>TRK-B</i>	faible ou tronquée	faible ou absente	élevée (pleine longueur)
Expression <i>TRK-C</i>	élevée	faible ou absente	faible ou absente
Âge	< 1 an	> 1 an	1 – 5 ans
Stade	1, 2, 4S	3, 4	3, 4
Survie 3 ans	95 %	25 – 50 %	< 5 %

aujourd'hui, les cliniciens ne sont pas toujours en mesure de bien saisir la nature des NB qu'ils ont à traiter. De ce fait, la découverte d'autres marqueurs est grandement souhaitable, d'autant plus que chaque nouvelle caractéristique a, par le passé, apporté son lot de compréhension sur la maladie.

C'est avec ces considérations en tête que des études d'expression d'ARNm différentielle (differential display) ont été entreprises dans notre laboratoire (Saikali et Sinnett, 2000). Ces études avaient pour but d'identifier des transcrits présents dans certains NB et absents dans d'autres. Cet objectif s'appuyait sur la prémisse qu'il est possible de distinguer génétiquement les différentes formes de NB. Plusieurs transcrits ont été isolés par cette étude et l'un d'eux correspondait à *GPC3* (Saikali et Sinnett, 2000). Jugeant ce candidat intéressant, nous avons déterminé son profil d'expression dans d'autres tumeurs embryonnaires. L'expression transcriptionnelle de *GPC3* a été évaluée dans des tumeurs primaires de Wilms (WT) (tumeur d'origine rénale) et dans des échantillons de reins normaux. *GPC3* était exprimé seulement dans les WT alors que seulement des traces ont été révélées par « reverse transcription – polymerase chain reaction » (RT-PCR) dans quelques-uns des échantillons de reins normaux (Saikali et Sinnett, 2000). Donc, comparativement au rein normal, *GPC3* est différentiellement exprimé dans la tumeur de Wilms. Son expression a aussi été évaluée dans des cultures primaires de médulloblastome (MB) mais aucune trace de transcrit n'a été décelée (Saikali et Sinnett, 2000).

À la lumière de ces résultats, nous avons voulu comprendre les mécanismes qui régulent la transcription du gène *GPC3*. Ce mémoire rend compte des travaux réalisés à cette fin. Mais avant de présenter notre étude, nous passerons d'abord en revue les connaissances actuelles sur le gène *GPC3* et sur les notions de base reliées à la compréhension du mémoire.

1.2 Implication de *GPC3* dans la régulation de la croissance cellulaire et dans l'apoptose

Le gène *GPC3* a été découvert dans le cadre d'une toute autre étude ayant

pour but d'identifier le gène responsable du syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS) par clonage positionnel (Pilia *et al.*, 1996). Ce syndrome est caractérisé par une hyper-croissance pré- et post-natale et par des anomalies viscérales et squelettiques. *GPC3* est le gène homologue humain de OCI-5 qui a été isolé suite à la recherche de transcrits différenciellement exprimés lors du développement de l'intestin chez le rat (Filmus *et al.*, 1988).

Le gène *GPC3* est localisé au niveau du chromosome Xq26.1 et ses huit exons s'étendent sur plus de 500 kb (Pilia *et al.*, 1996) (figure 1). Ce gène code pour un ARNm d'une longueur de 2,4 kb. Son promoteur, qui ne possède pas de boîte TATA, présente un îlot CpG qui chevauche également le premier exon (Huber *et al.*, 1997) (figure 1). *GPC3* code pour une glypican dont la famille compte six membres à ce jour (*GPC1* à *GPC6*). Les glypicanes sont des protéoglycanes à héparan sulfate (HSPG) qui sont composées d'un corps protéique sur lequel sont greffés de façon covalente des groupements glycosaminoglycanes (GAG) à héparan sulfate (Praillet *et al.*, 1998). Le produit du gène *GPC3* est localisé à l'extérieur de la cellule et ancré à la membrane via un résidu glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI).

Les études concernant l'expression de *GPC3*, autant chez le rat que chez l'humain, tirent toutes essentiellement les mêmes conclusions: l'expression de *GPC3* débute et atteint un pic au moment du développement embryonnaire puis diminue graduellement à l'approche de la naissance pour atteindre un niveau à peine détectable dans la période post-natale (Filmus *et al.*, 1988; Pilia *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1997 ; Pellegrini *et al.*, 1998). L'expression embryonnaire est observée de façon prépondérante dans le mésoderme et les tissus qui en sont dérivés (Pilia *et al.*, 1996 ; Pellegrini *et al.*, 1998). Dans les tissus adultes humains, on note une faible expression de *GPC3* dans quelques organes seulement, soit le coeur, les poumons, les reins et les ovaires (Hsu *et al.*, 1997). Tous les tissus adultes étudiés présentent une expression diminuée par rapport aux tissus embryonnaires correspondants (Hsu *et al.*, 1997).

La fonction exacte de *GPC3* demeure pour le moment inconnue. Cependant,

GÈNE GPC3

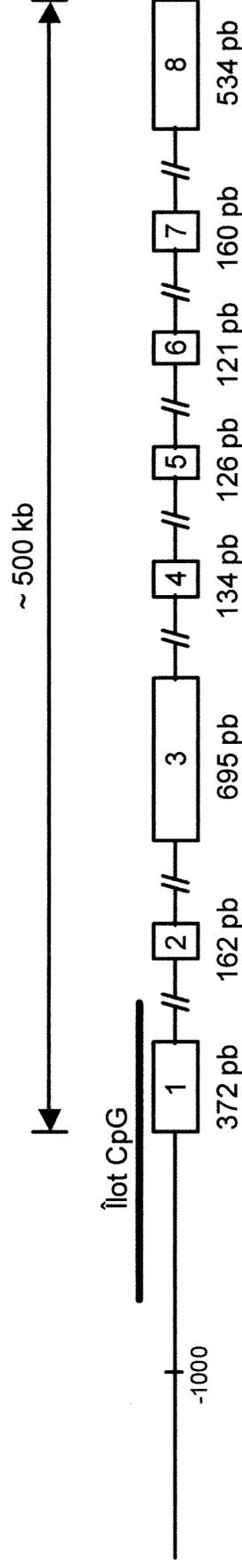


Figure 1. Représentation schématique du gène GPC3

Le gène GPC3 s'étend sur environ 500 kb et est constitué de 8 exons (rectangles). Un îlot CpG, couvrant approximativement 2,5 kb chevauche une partie du promoteur et l'exon 1. La taille des exons est indiquée sous chacun des rectangles les représentant. Le schéma n'est pas à l'échelle.

plusieurs évidences suggèrent que GPC3 serait impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire, d'où l'intérêt de ce gène dans l'étude de tumeurs embryonnaires. Cependant, la nature exacte de son implication dans la croissance cellulaire est toujours incertaine. Plusieurs études parues à ce jour attribuent à GPC3 un rôle d'inhibiteur de la croissance cellulaire (voir plus bas), alors que d'autres études suggèrent une fonction tout à fait opposée, soit la stimulation de la croissance cellulaire (Hsu et al., 1997 ; Saikali et Sinnett, 2000).

L'hypothèse voulant que GPC3 inhibe la croissance cellulaire prend sa source dans son association avec le syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), un syndrome d'hyper-croissance (Pilia *et al.*, 1996). Au moment de la découverte de *GPC3*, cette hypothèse avait été appuyée par l'observation que GPC3 pouvait lier IGF2, un facteur de croissance embryonnaire (Pilia *et al.*, 1996). Le concept voulant que GPC3 puisse être associé à IGF2 venait de la similarité phénotypique entre le SGBS et le syndrome de Beckwith-Wiedeman (BWS), caractérisé aussi par une hyper-croissance (Maher et Reik, 2000). En effet, bien que les bases moléculaires du BWS ne soit pas encore très bien établies, il semble que, dans la plupart des cas, le phénotype lié au BWS puisse être causé par des altérations génétiques du chromosome 11p15 menant à une augmentation de l'expression d'*IGF2* (Weksberg *et al.*, 1996). Considérant que la dérégulation de l'expression d'*IGF2* puisse être la cause du BWS, l'idée que GPC3 soit un acteur impliqué dans la modulation de l'action d'IGF2 pouvait expliquer la grande similarité phénotypique entre les deux syndromes. La génération de souris « knock out » pour le gène du récepteur d'Igf2 (*Igf2r*), dont le produit est connu pour antagoniser l'effet d'Igf2 en le dirigeant vers la voie de dégradation lysosomiale, permettait aussi de soupçonner un lien entre Gpc3 et l'action d'Igf2 puisque celles-ci présentaient un phénotype similaire à celui du SGBS (Wang *et al.*, 1994). Pour ces raisons, Pilia *et al.* (1996) ont émis l'hypothèse que GPC3 inhiberait la croissance en séquestrant IGF2 ou en favorisant sa régulation à la baisse et son « turnover » en augmentant l'affinité d'IGF2 pour IGF2r. Dans cette dernière situation, GPC3 agirait en quelque sorte comme co-récepteur d'IGF2r. Selon cette hypothèse, une mutation germinale amenant la perte de fonction de GPC3 entraînerait une augmentation de l'effet d'IGF2 et ainsi le SGBS (Pilia *et al.*,

1996 et Weksberg *et al.*, 1996).

Il est important ici de noter que les expériences de Pilia *et al.* (1996) concernant la liaison Gpc3-Igf2 n'avaient pas démontré la spécificité entre les deux intervenants et ceci rendait d'autant plus fragile leur conclusion. Une autre étude a démontré que la protéine liante d'IGF2 dans le liquide amniotique était une forme soluble de GPC3 et a mis en évidence pour la première fois la spécificité de cette interaction (Xu *et al.*, 1997). Des études d'hybridation *in situ* effectuées chez la souris ont aussi établi un lien entre Gpc3 et Igf2. Celles-ci ont démontré que non seulement Gpc3 était exprimé dans les tissus qui présentent une croissance excessive dans le SGBS mais que cette expression est en forte corrélation avec celle d'Igf2 (Pellegrini *et al.*, 1998). Une telle corrélation a également été observée chez l'humain (Saikali et Sinnett, 2000). L'implication de GPC3 dans la modulation de l'action d'IGF2 a par contre été remise en question par une étude ayant échoué à reproduire les résultats démontrant une liaison entre GPC3 et IGF2 (Pilia *et al.*, 1996). Cette équipe observait plutôt, chez le rat, une liaison entre Gpc3 et Fgf2 (« fibroblast growth factor ») (Song *et al.*, 1997). Alors que la liaison à Igf2 (Pilia *et al.*, 1996) semblait dépendre du corps protéique de Gpc3, l'interaction avec Fgf2 dépendait plutôt de la présence de résidus héparans sulfates attachés au corps protéique (Song *et al.*, 1997).

GPC3 a aussi été associé à certains cancers. Avant même que l'on ne soupçonne l'implication de GPC3 dans le SGBS, on a rapporté quelques individus atteints de ce syndrome ayant développé des tumeurs embryonnaires, soit un cas de NB et quelques cas de WT (Hughes-Benzie *et al.*, 1992; Neri *et al.*, 1998). C'est à ces publications que l'on réfère lorsqu'on mentionne dans la littérature que les personnes atteintes du SGBS présentent un risque « élevé » de développer une tumeur embryonnaire. Cette relation étant faible, (Hughes-Benzie *et al.*, 1992 ; Neri *et al.*, 1998), il faut considérer ces données avec précaution. En d'autres mots, il n'existe pas d'étude rigoureuse établissant le risque réel qu'ont ces individus de développer une tumeur embryonnaire.

Jusqu'à présent, la littérature rapporte deux études concernant le cancer qui

tendent à appuyer l'hypothèse que GPC3 pourrait inhiber la croissance cellulaire. L'une d'entre elles a montré que *GPC3* était réprimé dans 4 lignées cellulaires de cancer ovarien sur 13 (31 %) et que le promoteur de *GPC3* était méthylé dans les quatre cas (Lin *et al.*, 1999). Étant donné que *GPC3* est transcrit dans l'ovaire, la répression du gène constitue une anomalie d'expression. Une étude de perte d'hétérozygotie (LOH) avait préalablement montré des délétions dans la région Xq26 dans 30 % des cancers ovariens (Choi *et al.*, 1997). Comme les loci présentant des LOH sont considérés comme des sites contenant potentiellement un gène suppresseur de tumeur, Lin *et al.* (1999) ont suggéré que *GPC3* pourrait être un gène suppresseur de tumeur. Cette proposition reste à être confirmée car il est peu probable de rencontrer un gène suppresseur de tumeur sur le chromosome X étant donné l'état hémizygotique chez les mâles. Murthy *et al.* (2000) ont pour leur part publié récemment une étude montrant une expression diminuée de *GPC3* dans les mésothéliomes malins (MM) induits chez le rat par rapport aux cellules de mésothélium normales. Chez l'humain, les résultats ont démontré une diminution marquée de l'expression de *GPC3* dans 89 % (16/18) des MM primaires et 77% (17/22) des lignées cellulaires de MM testées (Murthy *et al.*, 2000). Des études de méthylation réalisées sur les lignées cellulaires de MM ont aussi démontré que le promoteur de *GPC3* était méthylé dans la plupart des échantillons. De plus, les auteurs ont montré que l'expression ectopique de *GPC3* dans deux lignées cellulaires de MM (HMESO et Meso-17) par transfection diminuait de façon marquée la capacité de ces cellules à former des colonies (Murthy *et al.*, 2000). Les auteurs ont donc postulé que *GPC3* serait un régulateur négatif de la croissance des cellules de MM.

D'autres études viennent toutefois compliquer la compréhension du rôle de *GPC3* dans la croissance cellulaire. D'abord, il est connu depuis longtemps que la lignée cellulaire CaCo-2, dérivée d'un carcinome du colon, exprime *GPC3* (étude réalisée avec *Oci-5* qui est l'homologue de *GPC3* chez le rat) (Filmus *et al.*, 1988). Il avait été proposé à l'époque que l'expression de *GPC3* pouvait être reliée aux caractéristiques oncofœtales de CaCo-2 (Filmus *et al.*, 1988).

Une étude menée dans le but d'identifier des transcrits exprimés

différentiellement dans des hépatocarcinomes comparativement aux cellules de foie normal a démontré que l'ARNm de *GPC3* était présent dans 75 % (143/191) des hépatocarcinomes étudiés (Hsu *et al.*, 1997). D'autre part, de tous les échantillons hépatiques non cancéreux étudiés, seulement 3,2 % (5/154) d'entre eux exprimaient *GPC3* (Hsu *et al.*, 1997). Pour réconcilier ces résultats avec l'hypothèse de l'inhibition de croissance, on peut penser que l'expression de *GPC3* pourrait être un événement survenant après l'initiation du processus tumoral et que les tumeurs qui l'expriment pourraient voir leur capacité de prolifération diminuer. Toutefois, il semble que ça ne soit pas le cas. Lorsque cette expression a été analysée en fonction de différentes caractéristiques telles que le stade tumoral, le caractère invasif, le sexe, etc., il s'est avéré que la surexpression de *GPC3* corrélait avec le stade avancé des tumeurs (76 % vs 56 %, $p = 0,05$) et avec le potentiel d'invasion tumoral (76 % vs 55%, $p < 0,05$). Il est intéressant également de mentionner que la surexpression était aussi en corrélation avec le sexe (filles: 95 % vs garçon: 67 %), ce qui pourrait être lié à la localisation de *GPC3* sur le chromosome X.

Les travaux de Lage *et al.* (1997) montrent également un aspect de *GPC3* qui ne cadre pas avec le modèle d'inhibition de croissance cellulaire. Ce groupe s'est intéressé à *GPC3* suite à une étude ayant pour but d'identifier des gènes qui pourraient être responsables de la résistance de certains carcinomes gastriques à la mixantrone, une drogue utilisée en chimiothérapie. Les résultats de ces travaux ont montré que *GPC3* était surexprimé dans une lignée résistante à la mixantrone par rapport à une variante de la même lignée sensible à ce médicament (Lage *et al.*, 1997). Le même groupe montrait par la suite que *GPC3* était régulé à la hausse dans les métastases hépatiques de cancers colorectaux par rapport à leur tumeur d'origine (Lage *et al.*, 1998). Dans cette même publication, les auteurs ont aussi montré que plusieurs carcinomes du système hépatobiliaire surexprimaient *GPC3*.

En plus d'être associé à ces tumeurs chez l'adulte, il semble que *GPC3* pourrait également être impliqué dans l'étiologie de certaines tumeurs embryonnaires. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, une

étude réalisée dans notre laboratoire a montré que *GPC3* est exprimé dans certains NB, dans toutes les WT, mais dans aucun médulloblastome (Saikali et Sinnett, 2000). Bien que, dans le cas de ces tumeurs embryonnaires, l'expression de *GPC3* pourrait laisser supposer que le produit du gène soit impliqué dans une fonction qui se dissocie de celle de l'inhibition de croissance et donc possiblement du rôle potentiel de *GPC3* dans le métabolisme d'IGF2, l'étude de Saikali et Sinnett (2000) met en évidence une corrélation significative entre l'expression de *GPC3* et de *IGF2*.

Jusqu'à maintenant, nous avons vu que la fonction de *GPC3* présente deux facettes qui semblent contradictoires. D'un côté, il semble que *GPC3* puisse être impliqué dans l'inhibition de la croissance cellulaire par une intervention dans la régulation d'Igf2. D'autre part, le fait que *GPC3* soit surexprimé dans certains cancers et que son expression soit parfois associée à des caractéristiques liées à l'agressivité tumorale semble indiquer que, dans certaines situations, *GPC3* pourrait promouvoir la croissance cellulaire ou, à tout le moins, ne pas être impliqué dans l'inhibition de croissance. Est-il possible d'unir ces deux concepts ? Voilà une question encore sans réponse.

Il semble également que *GPC3* pourrait jouer un rôle dans le phénomène de l'apoptose. Gonzalez *et al.* (1998) ont démontré que *GPC3* pouvait induire l'apoptose dans des lignées cellulaires dérivées d'un mésothéliome (II14) et d'un cancer du sein (MCF-7). Cette induction semblait toutefois lignée-cellulaire-dépendante puisque les mêmes essais de transfection effectués avec la lignée de fibroblaste NIH 3T3 et de cancer colorectal HT-29 ont failli à induire une apoptose (Gonzalez *et al.*, 1998). Il semble que cette induction soit dépendante de l'ancrage de *GPC3* à la membrane puisque la transfection d'une construction codant pour une protéine *GPC3* dépourvue de la séquence consensus nécessaire à l'attachement d'un résidu d'ancrage GPI ne pouvait plus induire l'apoptose (Gonzalez *et al.*, 1998). Il est également important de souligner que cet autre aspect fonctionnel de *GPC3* semble encore une fois présenter un lien avec IGF2 : les cellules induites en apoptose par la présence de *GPC3* échappent à la mort cellulaire lorsqu'on ajoute au milieu de culture des quantités d'Igf2 dans des

concentrations physiologiques (Gonzalez *et al.*, 1998). Les auteurs suggèrent que certaines malformations reliées au SGBS pourraient être expliquées par une déficience apoptotique au cours du développement (Gonzalez *et al.*, 1998).

Les études de « knock out » sont souvent très utiles pour apporter des réponses quant aux implications fonctionnelles des produits de gènes. À cet effet, des souris « knock-out » pour le gène *GPC3* ont été générées par Cano-Gauci *et al.* (1999). Ces souris déficientes en *Gpc3* présentaient plusieurs des caractéristiques cliniques du SGBS. De plus, le degré d'hyper-croissance de ces souris était comparable à celui des souris « knock-out » pour le gène *IGF2r*. Cependant, à l'opposé de ces dernières, les souris déficientes en *GPC3* ne montraient pas de taux circulants ou locaux plus élevés en *Igf2*. Ceci suggère que la voie utilisée pour l'inhibition de la signalisation d'*Igf2* par *Gpc3* pourrait être fondamentalement différente de celle utilisée par *Igf2r* (Cano-Gauci *et al.*, 1999). Certaines anomalies observées chez ces souris pourraient résulter d'une déficience en apoptose. L'interprétation des résultats de cette étude n'ont malheureusement pas pris en compte les quelques études en apparence contradictoires avec l'hypothèse de l'inhibition cellulaire. Elle n'apporte en ce sens aucun élément pouvant clarifier cet aspect.

En résumé, de nombreuses études indiquent que *GPC3* pourrait inhiber la croissance cellulaire en agissant au niveau de la voie de signalisation d'*IGF2*. *GPC3* pourrait séquestrer *IGF2* et l'empêcher d'exercer son effet mitogénique. Il pourrait aussi agir comme co-récepteur d'*IFG2R* et ainsi augmenter l'affinité d'*IGF2* pour ce dernier qui le dirigerait vers les voies de dégradation lysosomiale. Par contre, d'autres études montrent une surexpression de *GPC3* dans des cellules cancéreuses et donc, dans des cellules ayant acquis un avantage de croissance. De plus, *Gpc3* peut également induire l'apoptose de façon lignée-cellulaire-spécifique.

1.3 La transcription chez les eucaryotes par l'ARN polymérase II

Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase II (pol II) est affecté à la transcription

des gènes qui encodent les ARN messagers (ARNm) et plusieurs petits ARN nucléaires (snRNA). La transcription nécessite d'abord que la pol II soit recrutée au niveau d'un promoteur de classe II, après quoi elle entame la lecture de la séquence codante du gène correspondant et génère un transcrit d'ARN. Par la suite, le transcrit subit éventuellement une maturation et est traduit en une protéine.

La transcription des gènes est un processus hautement régulé. Cette régulation prend toute son importance dans le fait que le phénotype d'une cellule est conditionné par le profil d'expression de celle-ci. Vu sous un autre angle, on peut dire que les cellules d'un organisme possèdent toutes le même génotype mais que selon la fonction que chacune est « appelée » à remplir, leur génome est géré de façon différente. La transcription joue un rôle fondamental dans cette gestion. De fait, de tous les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression d'un gène, la transcription est souvent le plus déterminant (Holstege et Young, 1999).

1.3.1 La machinerie transcriptionnelle

La régulation de la transcription d'un gène dépend d'éléments situés en *cis* et de facteurs agissant en *trans*. Les séquences régulatrices en *cis* font partie de régions physiques appelées promoteurs. Les promoteurs de classe II peuvent être divisés en trois parties : le promoteur basal, le promoteur proximal et les séquences régulatrices distales (« enhancers ») (Patikoglou et Burley, 1997). Les éléments du promoteur basal les mieux caractérisés sont la boîte TATA, localisée généralement autour de la position -25 relativement au site d'initiation de la transcription, ainsi que l'élément initiateur riche en pyrimidines (Inr), retrouvé au niveau du site d'initiation. Un promoteur peut soit contenir ces deux éléments, un seul d'entre eux ou aucun. Les éléments du promoteur proximal sont généralement situés en position -50 à -200 et ceux des séquences régulatrices distales sont situés plus loin, aussi bien en amont qu'en aval du site d'initiation.

La pol II ne peut reconnaître seule un promoteur et initier efficacement la

transcription; elle doit être accompagnée, entre autres, par les facteurs généraux de transcription (GTF) qui sont nécessaires à l'initiation de la transcription à partir d'un promoteur minimal *in vitro* (Coulombe, 1999a). Chez les mammifères, les GTF sont la « TATA-box binding protein » (TBP) ainsi que les facteurs de transcription (TF), IIB, IIE, IIF et IIH (Coulombe, 1999). Ces facteurs peuvent être purifiés individuellement et assemblés avec la pol II de façon séquentielle afin de former un complexe au niveau d'un promoteur, du moins *in vitro*. Récemment, des études de pontage (« cross-linking ») aux rayons UV et de microscopie électronique ont permis de construire un modèle décrivant l'assemblage tridimensionnel des GTF et de la pol II au niveau du promoteur majeur tardif de l'adénovirus 2 (Coulombe *et al.*, 1994; Coulombe et Burton, 1999; Coulombe, 1999a; Coulombe, 1999b; Douziech *et al.*, 1999; Forget *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1996 et 1998). Ces études ont apporté des évidences suggérant que, lorsque le complexe de pré-initiation est recruté au niveau du promoteur, l'ADN serait enroulé autour de la pol II dans le complexe (figure 2).

Les études de reconstitution *in vitro* d'un complexe minimal de pré-initiation de la transcription ont beaucoup apporté à notre compréhension de ce processus. Cependant, même si *in vitro* un complexe de pré-initiation peut être reconstitué par le recrutement séquentiel des GTF et de la pol II, il est généralement admis qu'*in vivo*, ceux-ci sont recrutés au promoteur sous la forme d'un complexe multiprotéique appelé « holoenzyme pol II » (Greenblatt, 1997). Par contre, *in vivo*, des complexes comme GTF/pol II ou l'holoenzyme pol II ne peuvent à eux seuls mener à une transcription efficace; une autre classe de facteurs, les activateurs de transcription, sont généralement nécessaires. C'est par les interactions de ces facteurs *trans*, entre eux, avec des éléments *cis* du promoteur et avec la machinerie générale de transcription, que la régulation fine du niveau de transcription d'un gène est assurée. On croit que toutes ces interactions seraient de nature à favoriser la formation d'un complexe de pré-initiation stable au niveau du promoteur d'un gène cible et ainsi permettraient une initiation efficace de la transcription (Tjian et Maniatis, 1994; Hahn, 1993; Lin et Green, 1991).

Les auteurs de la base de données TRANSFAC classent les régulateurs de

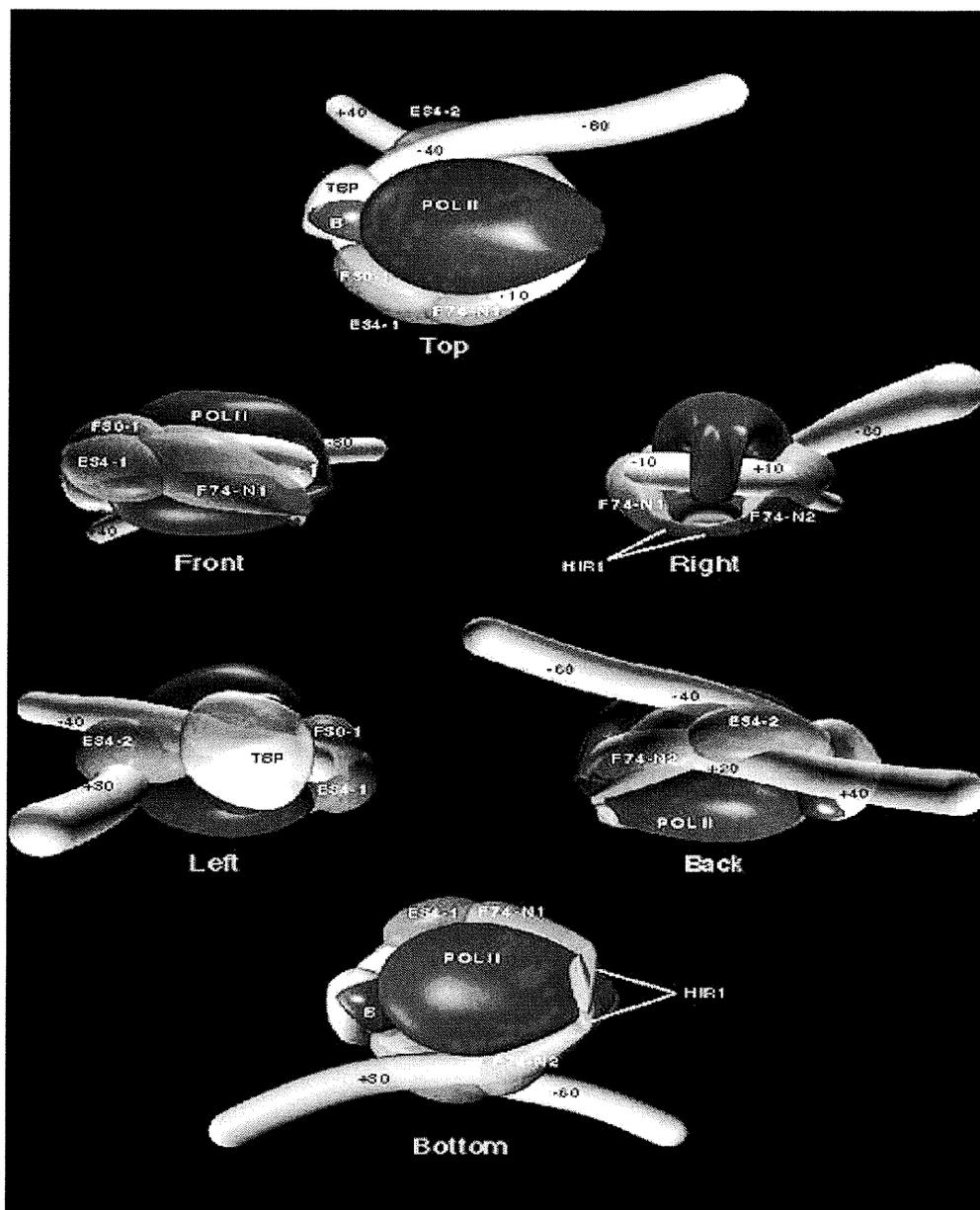


Figure 2: Modèle tridimensionnel d'un complexe de pré-initiation de la transcription

Les données sous-jacentes à la construction de ce modèle suggèrent que l'ADN serait enroulé autour de la pol II dans le complexe de pré-initiation. B : TFIIB ; F30 : TFIIF, sous-unité RAP30 ; F74-N : TFIIF, sous-unité RAP74 (acides aminés 1 à 205) ; E34 : TFIIE, sous-unité 34 kDa ; Pol II : ARN polymérase II ; HIR1 : région de dimérisation de RAP74 (acides aminés 172 à 205). (Tiré de Coulombe, 1999b).

transcription (activateurs/répresseurs) selon cinq super-classes : i) domaines basiques, ii) domaines de liaison à l'ADN coordonnés par un atome de zinc, iii) domaines hélice-tour-hélice, iv) « beta-scaffold factors » avec contact dans le sillon mineur et v) les facteurs qui n'appartiennent à aucune de ces classes (Wingender *et al.*, 2000 ; internet : <http://www.cbi.pku.edu.cn/TRANSFAC/cl/cl.html>). La structure de plusieurs facteurs est disponible sur le site web de NCBI (internet : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>). Ajoutons que malgré tous ces renseignements structuraux, aucune règle générale ne semble pouvoir être dictée pour décrire les interactions ADN-protéines (Matthews, 1988; Patikoglou et Burley, 1997).

Nous avons décrit ici les facteurs de transcription comme étant « les » régulateurs de la transcription des gènes. Cependant, nous devons garder en tête que ces facteurs ne sont que les régulateurs les plus directement impliqués dans la transcription. Ils sont eux-mêmes assujettis à une régulation qui se fait à deux niveaux : celui de leur concentration et celui de leur activité (en revue : Calkhoven et Ab, 1996). Pour ajouter à la complexité, notons que ces mécanismes sont eux-mêmes déclenchés par différents stimuli, chimiques ou physiques, provenant de l'environnement de la cellule.

1.3.2 L'influence du contexte génomique dans la réponse aux facteurs de transcription

Il est difficile de dégager les grands principes de base pour comprendre les interactions ADN-protéines. D'ailleurs les facteurs de transcription eux même n'influencent pas toujours l'activité transcriptionnelle d'un gène de la même façon. Ceci peut être expliqué par le fait que les gènes ont recours à un « pool » de facteurs commun mais sont régulés dans des contextes différents. Plusieurs exemples montrent bien l'influence du contexte dans la régulation de la transcription. En voici quelques-uns.

YY1 est un facteur de transcription qui, selon le contexte dans lequel il agit, peut réprimer, activer ou initier la transcription. En effet, il agit comme répresseur

de la transcription au niveau des gènes *c-fos* (Natesan et Gilman, 1993), *β -caséine* (Raught *et al.*, 1994) et *α -actine* du muscle squelettique (Lee *et al.*, 1994), comme activateur au niveau de *c-Myc* (Shrivastava, 1993) et des gènes des protéines ribosomales L30 et L32 (Hariharan *et al.*, 1991) et finalement, comme initiateur au niveau du promoteur de *p5* du virus adéno-associé (Seto *et al.*, 1993; Usheva et Shenk, 1994). YY1 a une capacité d'interaction énorme. Il peut avoir pour partenaire les protéines p300, TBP, TAF55, TFIIB, Sp1, c-Myc, CBP et la pol II (Fry et Farnham, 1999). Cette grande capacité d'interaction explique probablement pourquoi le contexte dans lequel YY1 agit a une si grande influence sur l'effet de son intervention.

Un autre exemple de l'importance du contexte est présenté dans une étude réalisée par Kim et Shapiro (1996). Ces chercheurs ont construit des promoteurs dans lesquels trois éléments ont été placés dans des ordres différents. Après transfection dans des cellules COS et HeLa, la capacité de ces promoteurs à activer la transcription a été évaluée. Lorsqu'un élément YY1 était placé entre une boîte TATA et un élément NF-1, on observait une forte activation de la transcription alors qu'aucune transcription n'avait lieu lorsque les positions de YY1 et NF-1 étaient inversées. De plus, la transcription était également abolie lorsque seulement 4 pb situées entre les élément YY1 et NF-1 étaient déléetées. Les auteurs croient que YY1, par la courbure qu'il induit à l'ADN, pourrait amener le facteur NF-1 à proximité de la machinerie basale de transcription et ainsi activer la transcription. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'inversion des éléments ou le changement de leur emplacement les uns par rapport aux autres ne peut permettre la promotion de la transcription de la même façon.

Le facteur Sp1, dont l'élément est présent au niveau du promoteur de plusieurs gènes, peut lui aussi activer la transcription de plus d'une façon. Dans plusieurs gènes dépourvus de boîte TATA, la présence d'un élément Sp1 au niveau du promoteur basal est souvent critique pour l'activation de la transcription et le positionnement du site d'initiation (Fry et Farnham, 1999). Ce fait, additionné à celui que Sp1 peut interagir avec les peptides TAF100 (Gill *et al.*, 1994) et

TAF130 (Saluja *et al.*, 1998) du GTF TFIID, suggère que Sp1 pourrait remplir la même fonction que TBP dans ce type de promoteur (Fry et Farnham, 1999 ; Pugh et Tjian, 1991). Dans un autre contexte, lorsque Sp1 est situé à distance du site d'initiation, il a été démontré qu'il peut induire une boucle au niveau de l'ADN en interagissant avec un second facteur Sp1 plus proximal (Su *et al.*, 1991). Cet autre mode d'activation vient appuyer l'hypothèse que Sp1 pourrait, par l'induction d'une telle boucle, activer la transcription en favorisant le rapprochement entre des facteurs liés à des séquences régulatrices distales et le promoteur basal (Ptashne, 1986).

Un dernier exemple concerne le chevauchement de certains éléments parfois observés à l'intérieur d'un même promoteur. Par exemple, dans le promoteur du gène de *résistance multi-drogues 1*, les éléments *Egr1* et *Sp1* se chevauchent. Des études ont montré que la liaison de Sp1 était nécessaire à l'activation du gène médiée par v-Raf dans des cellules NIH 3T3 (Miltenberger *et al.*, 1995) alors que c'est *Egr1* qui doit lier le même site pour l'activation du gène par le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate dans les cellules K562 (McCoy *et al.*, 1995). Cet exemple montre bien l'impact que peut avoir l'environnement cellulaire dans la régulation d'un gène.

1.3.3 Le contrôle de l'empaquetage de l'ADN

Pour qu'un complexe de pré-initiation soit assemblé au niveau d'un promoteur, une condition essentielle doit être remplie : le promoteur doit être accessible. Dans le noyau des cellules, en raison de contraintes d'espace, l'ADN doit être empaqueté sous forme de chromatine. Cet empaquetage peut prendre des formes différentes rendant plus ou moins accessible le promoteur des gènes à la machinerie transcriptionnelle. Il semble que ces formes pourraient avoir un impact direct sur l'activité transcriptionnelle.

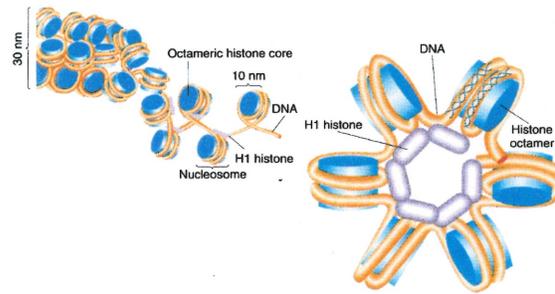
L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Un nucléosome est composé d'un octamère d'histones autour duquel environ 146 pb sont enroulées en 1,65 tour. Les histones entrant dans la composition d'un octamère, nommées

« core histones », sont arrangées en un tétramère central d'histones (H3-H4)₂, avec, placé de chaque côté de celui-ci, un dimère H2A-H2B (Davie et Spencer, 1999). Du nucléosome à la formation d'un chromosome, il y a plusieurs niveaux d'enroulement (figure 3). De fait, les nucléosomes sont eux mêmes enroulés sous forme de sélénoïdes de 30 nm. On pense que les histones H1 stabiliseraient la formation de cette structure (Griffiths *et al.*, 1996). Les sélénoïdes forment à leur tour de longues boucles attachées à une matrice. Cette matrice est constituée, entre autres, de protéines appelées « scaffold attachment region » (SAR) ou « matrix attachment region » (MAR) ainsi que de l'enzyme topoisomérase II (Griffiths *et al.*, 1996). Dépendamment de la phase cellulaire, cette matrice est enroulée de façon plus ou moins condensée (figure 3). Ainsi, durant la mitose, la chromatine est arrangée sous forme de chromosome, qui est la forme la plus condensée, et durant l'interphase, la chromatine est sous sa forme la plus déployée (Griffiths *et al.*, 1996).

L'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle est régulée au niveau du nucléosome. Cette régulation serait assurée par une dynamique d'acétylation/désacétylation de groupements lysines localisés au niveau du domaine N-terminal des « core histones » (Davie et Spencer, 1999). Dans certaines régions du génome, cette dynamique est très active alors que dans d'autres, elle est plutôt « figée » dans un état faiblement ou non-acétylé (Davie et Chadee, 1998).

L'acétylation des histones est associée à une conformation des nucléosomes favorisant la transcription. Bien que les mécanismes exacts liant l'acétylation à l'activité transcriptionnelle soient encore obscurs, deux principaux modèles sont proposés. Un premier modèle postule que l'acétylation, par son effet de neutralisation des charges positives des lysines, diminuerait l'affinité qu'ont les histones pour l'ADN qui est chargé négativement (Berger, 1999). Cette diminution d'affinité aurait pour conséquence de favoriser l'accès de la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur. Un deuxième modèle stipule que l'acétylation des lysines en N-terminal des histones serait de nature à moduler la liaison de protéines régulatrices avec les histones (Berger, 1999; Davie et

A.



B.

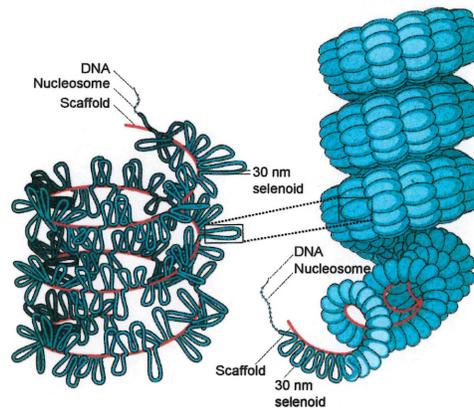


Figure 3 : Empaquetage de l'ADN sous forme de chromatine

A. Un nucléosome est composé d'un octamère d'histones autour duquel environ 146 pb sont enroulés en 1,65 tour. Ces nucléosomes sont eux-mêmes enroulés sous forme de sélénoïde de 30 nm. B. Les sélénoïdes de 30 nm forment de longues boucles qui sont fixées à une matrice (« scaffold »). Selon la phase cellulaire, cette matrice est enroulée de façon plus ou moins condensée. (Tiré de Griffiths *et al.*, 1996).

Spencer, 1999). On sait par exemple que la liaison des protéines HMG-14 et HMG-17 à la queue N-terminale de l'histone H3 est associée à la prise d'une conformation active des nucléosomes et favorise la transcription (Trieschmann *et al.*, 1998). Quant à la densité d'acétylation requise pour la prise d'une conformation active, on sait qu'il n'est pas nécessaire qu'elle soit complète. L'acétylation de seulement 46 % des sites totaux est suffisante pour induire une conformation favorable à la transcription par l'ARN polymérase III (Tse *et al.*, 1998).

L'acétylation des histones est catalysée par des enzymes appelées « histone acétyl transférase » (HAT). La mise en évidence de coactivateurs de la transcription capables d'activité HAT a permis d'établir la connexion entre l'acétylation et l'activité transcriptionnelle. Des exemples de coactivateurs ayant une activité HAT sont présentés dans le tableau 2. La plupart font partie de complexes multi-protéiques et montrent une certaine spécificité de substrat. Un fait intéressant a été soulevé par la caractérisation des co-activateurs présentant une activité HAT : certains de ceux-ci peuvent acétyler d'autres substrats que des histones (Berger, 1999; Davie et Spencer, 1999) (tableau 2). Par exemple, en plus de pouvoir acétyler les quatre « core histones », CBP/p300 peut aussi acétyler les GTF TFIIF, TFIIE et d'autres facteurs comme p53, GATA-1 et EKLF. L'acétylation de facteurs de transcription peut soit favoriser ou défavoriser la liaison d'un facteur à l'ADN (Berger, 1999). Par exemple, l'acétylation de p53 par CBP/p300 augmente la capacité de liaison de p53 à l'ADN (Gu et Roeder, 1997). PCAF peut lui aussi acétyler p53 et générer le même effet. Les sites acétylés par ce dernier sont toutefois distincts de ceux acétylés par CBP/p300 (Liu *et al.*, 1999; Sakaguchi *et al.*, 1998). L'exemple inverse est illustré par la protéine HMG-1, une composante de l'agrégat de facteurs de transcription, appelée « enhanceosome », qui s'assemble au niveau du « enhancer » de l'*INF-β* durant l'infection virale. *In vitro*, son acétylation au niveau de sites importants pour sa liaison à l'ADN déstabilise le enhanceosome et inhibe ainsi la transcription de l'*INF-β* (Munshi *et al.*, 1998).

Tableau 2. Les histones désacétylases (HAT) et leurs substrats

(Données tirées de Berger, 1999; Davie et Spencer, 1999; Davie et Chadee, 1998)

HAT (organisme)	Substrat Histone libre ou autre substrat	Substrat Histone à l'intérieur de nucléosomes
GCN5 (levure, humain, <i>Drosophila</i>)	H3 > H4 et p53	-
Ada (levure)	-	H3 et H2B
SAGA (levure)	-	H3 > H2B
STAGA (humain)	H3 > H4	-
TFTC (mammifères)	H3	H3
PCAF (humain)	H3 > H4, TFIIF et TFIIE	H3
Esa1 (levure)	H4 > H3 > H2A	-
NuA4 (levure)	-	H4 et H2A
NuA3 (levure)	-	H3
CBP/p300 (humain)	H3, H4 > H2A, H2B, TFIIF, TFIIE, p53, EKLF, GATA-1 et HMG-1	H3, H4, H2A et H2B
TAFII250 (humain, <i>Drosophila</i> , levure)	H3 > H4 et TFIIE	-
Tip60 (humain)	H4 > H3 > H2A	-
Elp3 (levure)	H4, H3, H2A et H2B	-
SRC-1 (humain)	H3 > H4	H3, H4, H2A et H2B
ACTR (humain)	H3, H4 > H2B	H3 > H4

Pour remodeler la chromatine, la cellule a également recours à des complexes sans activité HAT mais ATP-dépendants. À ce jour, cinq complexes de cette nature ont été identifiés : SWI/SNF, NURF, RSC, CHRAC, et ACF (Workman et Kingston, 1998). Chacun de ces complexes peut augmenter la capacité de liaison de facteurs de transcription à l'ADN (Workman et Kingston, 1998). Ceci suggère que ces complexes pourraient agir en déstabilisant le contact entre l'ADN et les nucléosomes. Des études ont montré leur importance dans l'activation de la transcription; en exemple, mentionnons les gènes PHO8 et SUC2 (Gavin et Simpson, 1997; Gregory *et al.*, 1999; Wu et Winston, 1997). Le mécanisme impliqué dans ce processus n'est cependant pas encore connu et pourrait différer d'un complexe à l'autre. Il semble également que l'altération de leur fonction ait des impacts tout aussi variables. En effet, il a été démontré que la mutation de composantes du complexe SWI/SNF n'est pas létale alors qu'elle l'est pour celles du complexe RSC (Laurent *et al.*, 1992; Neigeborn et Carlson, 1984; Peterson et Herskowitz, 1992). À l'exception du complexe SWI/SNF, on ne sait pas très bien comment ceux-ci sont recrutés au niveau de l'ADN. Chez la levure, il a été démontré que le complexe SWI/SNF est associé à l'holoenzyme pol II (Wilson *et al.*, 1996). Toutefois, cette association est controversée et apparaît de moins en moins probable (Peterson et Workman, 2000). Il est de plus en plus évident par contre que SWI/SNF est recruté par une variété de facteurs de transcription. Par exemple, des études d'immunoprécipitation ont montré que SWI/SNF co-précipite avec le récepteur des glucocorticoïdes (Yoshinaga *et al.*, 1992). Plus récemment, on a montré que, chez la levure, SWI/SNF peut interagir avec les facteurs GCN4, SWI5, GAL4-VP16 et GAL4-AH (Natarajan *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 1999; Yudkovky *et al.*, 1999). De plus, ces interactions sont médiées par le domaine activateur de ces facteurs et sont sensibles aux mutations dans ces domaines.

Il semble que les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant et les complexes de désacétylation puissent être reliés fonctionnellement. Il a été proposé que le complexe d'acétylation ADA/GCN5 pourrait agir de concert avec le complexe ATP-dépendant SWI-SNF dans l'activation transcriptionnelle (Pollard et Peterson, 1997). Cette proposition découle de travaux ayant mis en évidence que ADA3, ADA2 et GCN5 du complexe d'acétylation ADA/GCN5 sont identiques à

SWI7, SWI8 et SWI9 du complexe SWI/SNF (Barlev *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 1996; Henriksson *et al.*, 1997; Horiushi *et al.*, 1995; Marcus *et al.*, 1994; Melcher et Johnston, 1995; Silverman *et al.*, 1994). Entre autres évidences, ces auteurs ont montré que les sous-unités du complexe ADA/GCN5 sont aussi impliquées dans l'activation de gènes dont l'activité dépend du complexe SWI/SNF, soit *HO*, *SUC2*, *INO1* et l'élément *Ty*.

La désacétylation est assurée par des protéines ayant une activité « histone désacétylase » (HDAC) qui ont pour cible les résidus lysines en N-terminal des histones. Le clonage et la caractérisation du premier HDAC de mammifère, HDAC1, a permis de relier celui-ci au facteur de transcription RPD3 de la levure et ainsi d'établir le lien entre la désacétylation des histones et la répression transcriptionnelle (Tauton *et al.*, 1996). On connaît maintenant cinq HDAC chez la levure, soit HDA1, RPD3, HOS1, HOS2 et HOS3, et six HDAC chez les mammifères, soit HDAC1 à HDAC6 (Davie et Spencer, 1999). Plusieurs HDAC sont associés à des complexes multi-protéiques. Par exemple, les enzymes HDAC1 et HDAC2 sont retrouvées dans les complexes mSin3A et NuRD (Davie et Spencer, 1999). Un nombre croissant d'évidences montre que les HDAC participent à la répression transcriptionnelle. En voici quelques-unes. HDAC2 a été découverte lors d'une étude cherchant à identifier un co-répresseur pouvant lier le facteur de transcription YY1 (Yang *et al.*, 1996). Lorsque HDAC1, HDAC2 ou HDAC3 est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4, il y a répression de la transcription d'un rapporteur sous la dépendance de GAL4 (Kadosh et Struhl, 1997; Nagy *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Les facteurs Mad et Mxi1 semblent réprimer la transcription des gènes sous la dépendance de Myc via leur interaction avec les protéines mSin3A et mSin3B, qui sont associées à des complexes de désacétylation (Ayer *et al.*, 1995; Schreiber-Agus *et al.*, 1995). Un autre exemple illustre bien comment peut être régulée l'activité transcriptionnelle via la dynamique acétylation/désacétylation. On sait que les récepteurs nucléaires activent certains gènes lorsqu'ils sont liés à une hormone. Il a été démontré que, dans leur forme non-liée, certains récepteurs nucléaires recrutent le complexe de désacétylation mSin3 (Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997) alors que dans leur forme liée, ils recrutent

le complexe d'acétylation CBP/p300 (Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996). Une autre évidence montrant l'implication des HDAC dans la répression transcriptionnelle est bien illustrée par le fait que l'utilisation d'inhibiteur d'activité HDAC comme le trapoxine ou la trichostatine A inhibe l'effet de répression médiée par ceux-ci (Hassig *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1997). Les mécanismes sous-jacents à l'effet de la désacétylation des histones sont basés sur les mêmes hypothèses que celles de l'acétylation. On pense que la désacétylation de groupements lysines en N-terminal des histones, qui a pour effet de leur rendre leur charge positive, augmenterait la force d'interaction entre l'ADN et les histones, limitant ainsi l'accessibilité de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle (Berger, 1999). Il est possible également que la désacétylation inhibe l'interaction des histones avec certaines protéines régulatrices (Berger, 1999; Davie et Spencer, 1999).

Les exemples mentionnés ci-dessus nous montrent que les HDAC peuvent être recrutées au niveau de gènes cibles par des facteurs de transcription. Il est important également de mentionner que ce recrutement peut être assuré par des protéines capables de lier les 5-méthylcytosines. La protéine MeCP2 est un des exemples les plus documentés de ce type de protéines. Cette dernière permet l'établissement d'un pont entre les séquences méthylées et le complexe de désacétylation mSin3A (Nan et al., 1998) (section 1.4.3.1). La mise en évidence d'un tel lien entre la méthylation et les HDAC suggère fortement que ces dernières puissent être les principales médiatrices de l'effet de répression lié à la méthylation. Nous discuterons de ce concept plus en détail dans la section 1.4.3.1.

1.4 La méthylation de l'ADN

1.4.1 La méthylation du génome des mammifères

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique qui consiste en la modification d'une base azotée par l'ajout d'un groupement méthyl. Chez les mammifères, la méthylation affecte les cytosines (C) des dinucléotides 5'-CG-3'

(CpG) et plus rarement, des trinuécléotides 5'-CNG-3' (CpNpG) (Clark *et al.*, 1995). On estime qu'environ 70-80 % des CpG du génome sont méthylés (Bird, 1986). Le dinuécléotide CpG est sous-représenté par rapport au GpC dans le génome des mammifères. Sa fréquence globale observée n'est que de 5-10 % par rapport à celle attendue (en revue Antequera et Bird, 1993a et 1993b ; Bird, 1995). Étant donnée que la désamination spontanée du 5-méthylcytosine en thymine (figure 4) se fait à un taux beaucoup plus élevé que celle de la cytosine en uracil (Shen *et al.*, 1994), on pense que la méthylation pourrait avoir contribué fortement à la diminution du nombre de dinuécléotides CpG dans le génome des mammifères au cours de l'évolution. Cependant, la distribution des dinuécléotides CpG n'est pas uniforme dans le génome. Il existe des régions appelées « îlots CpG » qui présentent une plus grande densité de CpG. Par définition, un îlot CpG est une région s'étendant sur plus de 200 pb, caractérisée par un contenu en G+C supérieur à 50 % et un ratio CpG/GpC d'au moins 0,6 (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). La plupart des îlots CpG sont associés à la région régulatrice 5' de gènes (Gardiner-Garden et Frommer, 1987; Antequera et Bird, 1993b). Chez l'humain et la souris, plus de la moitié de tous les gènes ont un îlot CpG en position 5' (Antequera et Bird, 1993a et 1993b). La plupart de ces gènes montre une expression constitutive (« housekeeping genes »), quoique certains sont aussi exprimés de façon tissu-spécifique (Larsen *et al.*, 1992). Dans un contexte physiologique, les îlots CpG ne sont généralement pas méthylés à l'exception de ceux associés à des gènes présentant une empreinte parentale (« imprinting ») (Ferguson-Smith *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 1992 et Stoger *et al.*, 1993) ou liés au chromosome X inactif (Riggs et Pfeifer, 1992). Ceci suggère que le maintien de la fréquence des CpG dans ces régions pourrait avoir une importance dans la régulation de certains gènes et avoir ainsi constitué un avantage sélectif au cours de l'évolution.

La méthylation des sites CpG est un processus enzymatique. Les enzymes responsables de cette activité sont appelées les ADN-méthyltransférases (Dnmt). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyl d'une molécule de S- adénosylméthionine vers le carbone-5 du cycle de la cytosine (Gruenbaum *et al.*, 1982; Juttermann, 1994) (figure 5). On distingue deux principaux types de

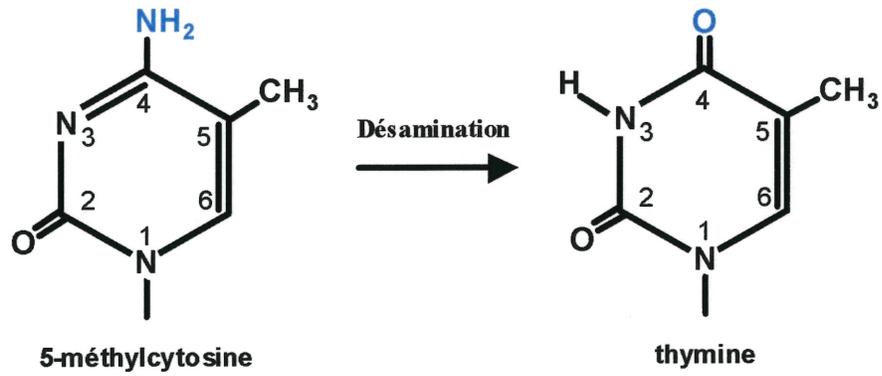


Figure 4. Désamination du 5-méthylcytosine en thymine

Le 5-méthylcytosine peut subir une désamination spontanée et ainsi être converti en thymine. Cette désamination spontanée serait à l'origine du faible ratio CpG/GpC dans le génome des mammifères.

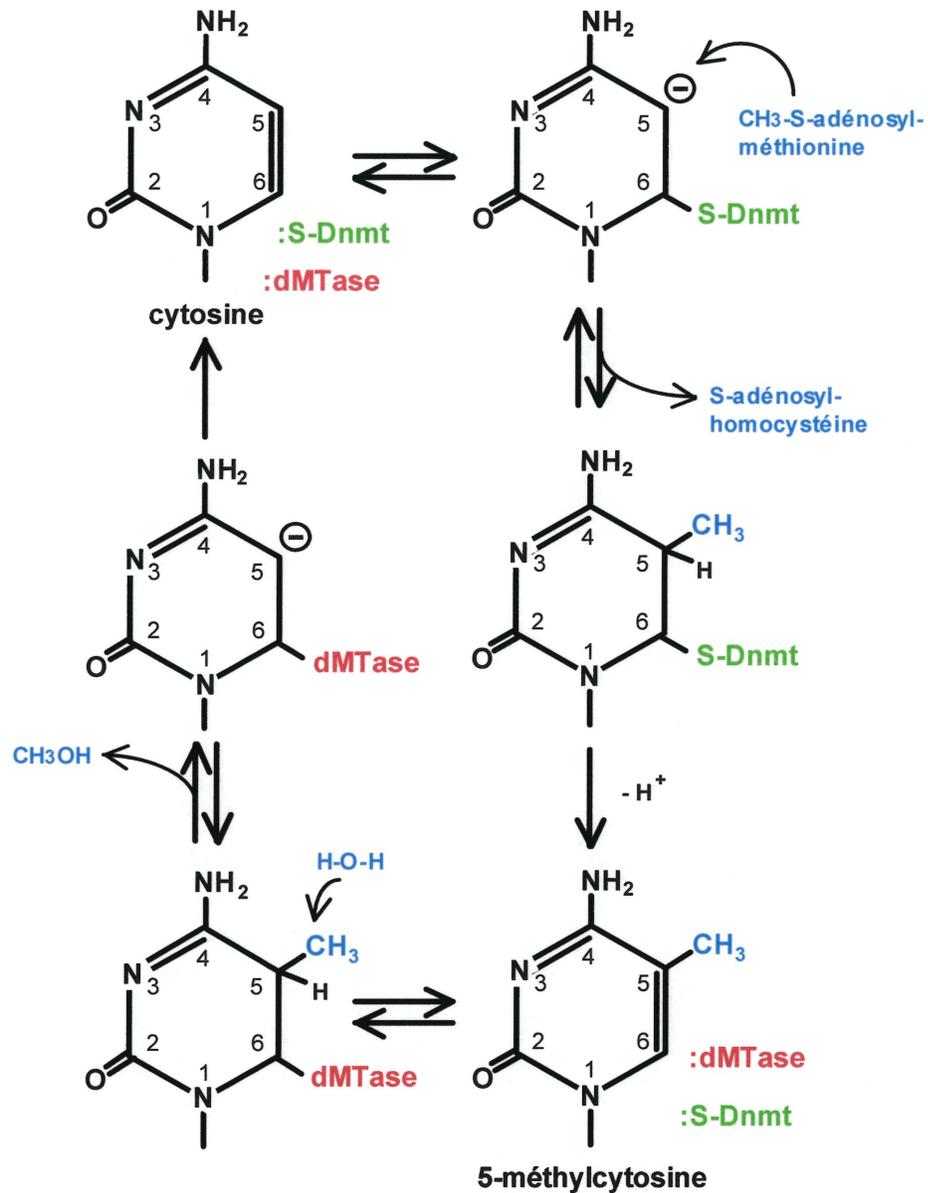
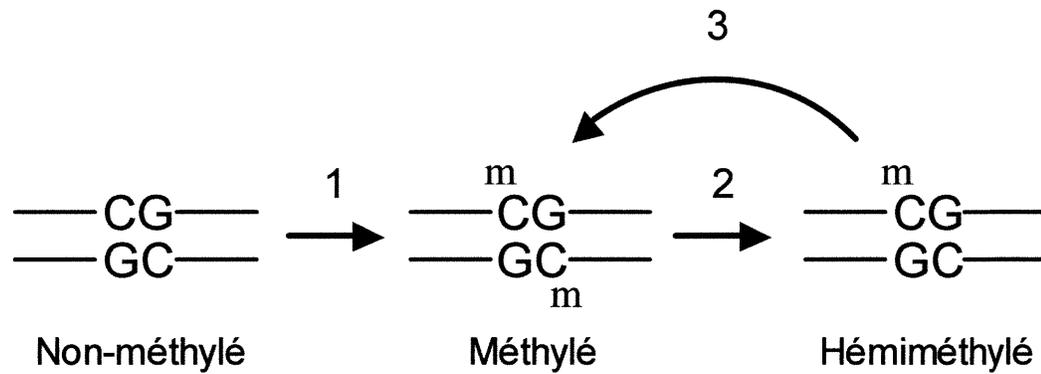


Figure 5. Mécanismes proposés de la méthylation et de la déméthylation de l'ADN

La méthylation est catalysée par les enzymes Dnmt qui transfèrent un groupement méthyl d'une molécule de S-adenosylméthionine vers le carbone 5 de la cytosine (Gruenbaum *et al.*, 1982; Jüttermann *et al.*, 1994). La déméthylation est catalysée par la dMTase qui transfère le groupement méthyl d'une 5-méthylcytosine vers une molécule d'eau générant ainsi une molécule de méthanol (Bhattacharya *et al.*, 1999; Cedar et Verdine, 1999; Ramchandani *et al.*, 1999).

méthylation (figure 6). Un premier type est la méthylation *de novo* qui se caractérise par l'ajout d'un groupement méthyl à un site où aucun des deux brins ne présente de méthylation. L'autre type de méthylation est celle de « maintien » qui survient après la réplication de l'ADN et qui est responsable du maintien des profils de méthylation d'une génération cellulaire à l'autre. Ce type de méthylation se caractérise par l'ajout semi-conservatif d'un groupement méthyl à un brin nouvellement synthétisé et donc complémentaire au brin-mère déjà méthylé.

Jusqu'à tout récemment, seulement une Dnmt était connue, soit la Dnmt1. Cette enzyme semblait avoir pour substrat préférentiel les sites hémi-méthylés (Gruenbaum *et al.*, 1982; Bestor et Ingram, 1983). On sait aujourd'hui qu'elle n'est pas la seule à présenter une activité ADN-méthyltransférase dans les cellules de mammifères car d'autres Dnmt ont été découvertes au cours des trois dernières années. Une étude a montré que des cellules embryonnaires souches de souris, chez qui les deux allèles du gène *Dnmt1* étaient complètement manquants, étaient toujours capables de méthyler *de novo* un provirus rétroviral (Lei *et al.*, 1996). Dernièrement, on confirmait l'existence d'autres Dnmt avec la découverte de trois autres enzymes, soit les Dnmt2, Dnmt3a et Dnmt3b. Leur caractérisation a fait en sorte que nous avons maintenant une vision beaucoup plus claire du rôle de chacune de ces Dnmt (en revue : Bird, 1999). Le criblage des banques d'« expressed sequence tags » (EST) pour des séquences présentant une homologie avec la *Dnmt1* a permis de mettre à jour la séquence codante des deux ADN-méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b (Okano *et al.*, 1998a). L'approche « knock-out » a ensuite été utilisée pour déterminer la fonction de ces enzymes (Okano *et al.*, 1999). Les souris présentant des mutations dans un gène ou dans l'autre avaient des anomalies développementales qui étaient létales quelques jours à quelques semaines après la naissance. Les souris porteuses de mutations dans les deux gènes étaient beaucoup plus sévèrement atteintes et n'ont pas survécu au-delà du stade de gastrulation. Au niveau moléculaire, une variété de séquences répétitives étaient sévèrement hypo-méthylées dans les doubles-mutants et les mutants simples présentaient une réduction partielle de méthylation au niveau de familles de séquences particulières. Une analyse de méthylation d'un provirus chez les doubles-mutants a révélé une incapacité des cellules à



1. Méthylation *de novo*
2. Réplication
3. Méthylation de maintien

Figure 6. Méthylations *de novo* et de maintien

On distingue deux types de méthylation, selon le statut initial de méthylation d'un site CpG particulier. La méthylation *de novo* se caractérise par l'ajout d'un groupement méthyl à un site où aucun des deux brins ne présente de méthylation. La méthylation de maintien est celle qui survient après la réplication de l'ADN et qui est responsable du maintien des profils de méthylation d'une génération cellulaire à l'autre.

méthyliser ces séquences *de novo*. Le fait que le gène *Dnmt1* était intact dans ces cellules venait appuyer l'hypothèse indiquant que la *Dnmt1* n'est pas responsable de ce type de méthylation. Une étude indépendante, effectuée par Lyko *et al.* (1999), est venue appuyer ces conclusions. Ce groupe a produit des *Drosophila melanogaster* transgéniques ayant intégré les gènes *Dnmt3a* et *Dnmt1* clonés dans des vecteurs permettant l'induction de leur expression. L'analyse de la capacité de méthylation de ces enzymes était facilitée par le fait que la drosophile ne présente pas de méthylation endogène. L'expression de *Dnmt1* n'a permis de détecter aucune méthylation (*de novo*) alors que l'induction de *Dnmt3a* a entraîné une méthylation du génome de l'insecte. Lorsque coexprimées, les deux enzymes agissaient en collaboration, permettant l'apparition de la méthylation et le maintien de celle-ci. Ces études suggèrent donc que *Dnmt3a* et *Dnmt3b* assurent la méthylation *de novo* alors que la *Dnmt1* se charge de la méthylation de maintien. À l'opposé, l'inactivation du gène *Dnmt2* dans des cellules embryonnaires de souris n'a montré aucun effet sur la méthylation d'un provirus endogène ou nouvellement intégré, ce qui a amené les auteurs à conclure que ce gène ne semble pas essentiel pour la méthylation *de novo* ni pour celle de maintien (Okano *et al.*, 1998b).

Comme nous le verrons plus loin (section 1.4.2), le génome des cellules embryonnaires subit une déméthylation globale avant l'implantation. La mise à jour de ce phénomène impliquait donc l'existence d'une activité ADN-déméthylase dans les cellules de mammifères. Ce n'est qu'en 1999 qu'on a rapporté l'isolement de l'ADNc de la ADN-déméthylase (dMTase) (Bhattacharya *et al.*, 1999). Cette enzyme catalyse le transfert du groupement méthyl lié au carbone-5 du cycle de la 5-méthylcytosine à une molécule d'eau entraînant la formation de méthanol (Bhattacharya *et al.*, 1999; Cedar et Verdine, 1999; Ramchandani *et al.*, 1999) (figure 5). L'étape critique de la déméthylation est l'interaction de l'enzyme avec le substrat. Une fois la déméthylation initiée, elle se poursuit à un taux élevé et de façon ininterrompue sur une distance d'au moins 250 pb (Cervoni *et al.*, 1999). Tout comme les *Dnmt*, la dMTase présente une spécificité pour le dinucléotide CpG. Elle peut déméthyliser un gabarit méthylé sur ses deux brins ou un gabarit hémi-méthylé (Ramchandani *et al.*, 1999). La découverte de la dMTase a modifié

le concept voulant qu'une fois établie, la méthylation est un processus irréversible. Son existence soulève maintenant la possibilité d'une plasticité des profils de méthylation d'une cellule.

Comme nous l'avons vu précédemment, la plupart des sites CpG sont méthylés dans le génome des mammifères. Les CpG non-méthylés sont généralement regroupés en îlots. Les îlots CpG semblent être protégés de la méthylation par des éléments *Sp1* en *cis*, du moins dans le cas de l'îlot en amont du gène *APRT* (Brandeis *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1994). Par contre, il est difficile d'expliquer comment ces mêmes îlots, associés à des gènes portant une empreinte parentale ou liés au X-inactif, sont méthylés. Nous ne sommes également pas en mesure d'expliquer comment sont établis les profils différentiels de méthylation comme, par exemple, ceux entre les différents tissus ou entre les lignées somatiques et germinales. L'interaction entre des facteurs locaux, les Dnmt et la dMTase pourraient être à l'origine de cette spécificité. Seulement des investigations plus poussées pourront nous permettre de répondre à toutes ces interrogations.

1.4.2 La méthylation au cours du développement embryonnaire

La méthylation est un processus dynamique au cours de l'embryogenèse (Monk *et al.* 1987; Monk *et al.*, 1990; Razin et Cedar, 1993; Razin et Shemer, 1995) (figure 7). Tout d'abord, avant la fécondation, les gamètes possèdent leur propre profil de méthylation. Le génome du spermatozoïde est hyperméthylé comparativement à celui de l'ovule (Goto et Monk, 1998) (figure 7). Après la fécondation, une séquence d'événements relatifs à la méthylation survient. Dès sa formation, le zygote présente le profil de méthylation des gamètes fusionnées. Au cours de la segmentation, ce profil gamétique est effacé, de façon globale, par une vague de déméthylation qui est complétée entre le stade de 8-cellules et de blastocyste. Entre l'implantation et la gastrulation, une vague de méthylation *de novo* vient établir un profil de méthylation qui sera maintenu dans les cellules somatiques de l'organisme pendant toute sa vie. Le tissu extra-embryonnaire subit également une méthylation *de novo* mais son taux de méthylation global demeure

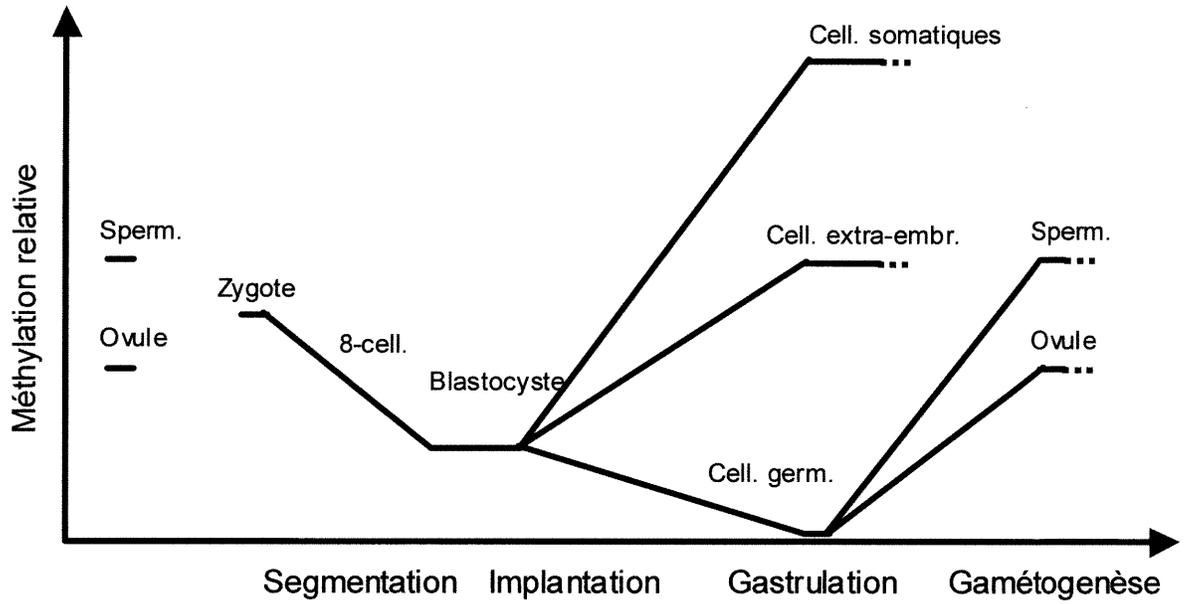


Figure 7. Changements du profil de méthylation au début du développement
 (Adapté de Goto et Monk, 1998 et Jaenisch, 1997) (Voir texte pour détails)

moins que celui des cellules somatiques (Goto et Monk, 1998; Jaenisch, 1997). Durant la même période, contrairement aux cellules somatiques et extra-embryonnaires, la déméthylation du génome des cellules germinales se poursuit. On croit que cette déméthylation continue jusqu'au début de la gaméto-genèse, moment où commence l'établissement du profil de méthylation spécifique à chacun des gamètes, incluant les différences qui persisteront sous forme d'empreintes parentales dans la génération suivante (Monk, 1995).

1.4.3 Les rôles attribués à la méthylation

L'importance de la méthylation a longtemps été controversée étant donné que certains organismes bien étudiés comme *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* sont dépourvus de cette modification (Urieli-Shoval *et al.*, 1982; Simpson *et al.*, 1986). Depuis une quinzaine d'années cependant, plusieurs études ont décrit la participation de la méthylation dans de nombreux processus physiologiques chez les mammifères comme l'inactivation du chromosome X, l'expression mono-allélique par empreinte parentale (« imprinting »), l'immobilisation de transposons ainsi que la stabilité du génome. La méthylation aberrante joue aussi un rôle important dans certaines maladies comme le cancer. Certains des aspects les plus pertinents concernant le rôle de la méthylation sont présentés ci-dessous.

1.4.3.1 Méthylation et transcription

i) *La méthylation de la région promotrice d'un gène inhibe la transcription.* Une abondante littérature montre qu'il y a une corrélation entre la méthylation du promoteur d'un gène et l'inactivité transcriptionnelle de celui-ci. Deux modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Selon le premier modèle, la méthylation inhiberait directement la liaison de facteurs de transcription au niveau du promoteur d'un gène et empêcherait son activation. Pour qu'une telle situation se produise, il faut que les sites méthylés se retrouvent à l'intérieur d'un élément qui lie un facteur de transcription. Bien que certains éléments, comme AP-2 ou E2F, contiennent un dinucléotide CpG, plusieurs en sont dépourvus et pour cette

raison, ce modèle ne peut expliquer tous les cas de répression transcriptionnelle par la méthylation (Bird et Wolffe, 1999).

Le second modèle de répression implique un lien entre la méthylation et l'organisation de la chromatine. Ce modèle est supporté par des études montrant que lorsqu'un gène méthylé *in vitro* est micro-injecté ou transfecté dans des cellules, ce gène est empaqueté sous forme de chromatine inactive (Keshet *et al.*, 1986) et que la répression n'est observée qu'après cet empaquetage (Buschhausen *et al.*, 1987). Il a également été démontré que, bien que la répression de la transcription d'un gène par la méthylation seule puisse être contrecarrée par un activateur fort comme GAL4-VP16, l'empaquetage du même gène sous forme de chromatine inactive ne permet plus à un tel activateur d'exercer son effet (Kass *et al.*, 1997). Malgré cette relation entre la méthylation, la structure inactive de la chromatine et la répression transcriptionnelle, la nature de ce lien commence seulement à être comprise.

Des études concernant la protéine « methyl-binding-CpG protein » (MeCP2) ont démontré pour la première fois le lien direct entre la méthylation et l'organisation de la chromatine. MeCP2 possède un domaine de liaison à la 5-méthylcytosine (« methyl-CpG-binding domain » (MBD)) (Nan *et al.*, 1996) et un domaine de répression transcriptionnelle (« transcriptional-repression domain » (TRD)) (Nan *et al.*, 1997). Des essais de « glutathione S-transferase (GST) pull-down » (précipitation avec des billes de glutathione de protéines de fusion GST-segments de MeCP2) et d'immunoprécipitation ont montré qu'une région de la protéine chevauchant le TRD co-précipite avec un complexe de désacétylation contenant le répresseur transcriptionnel mSin3A et les histones-désacétylases HDAC1 et HDAC2 (Nan *et al.*, 1998). Les complexes de désacétylation inhibent la transcription en modifiant la structure de la chromatine en une forme inactive (voir section 1.3.3). La protéine MeCP2, capable de lier à la fois les 5-méthylcytosines et un complexe de désacétylation, semble constituer le pont entre la méthylation et la compaction de la chromatine en une forme inactive (Nan *et al.*, 1998; Kass *et al.*, 1997).

En plus de réprimer la transcription via un mécanisme de compaction de la chromatine, il semble que la méthylation contribuerait à l'établissement du profil d'acétylation des histones, spécifique à chaque cellule (Eden *et al.*, 1998).

En résumé, il semble que le principal mécanisme par lequel la méthylation réprime la transcription des gènes comporte des étapes menant à l'empaquetage de l'ADN sous forme de chromatine inactive (en revue : Razin, 1998) (figure 8).

La protéine MeCP2 ne semble pas être la seule de sa catégorie, comme le suggère une étude montrant que des cellules HeLa dépourvues de MeCP2 continuent de réprimer des constructions méthylées (Ng *et al.*, 1999). MeCP1, un autre membre de la famille, peut lier 15 CpG méthylés symétriquement ou plus (Meehan *et al.*, 1989). Le criblage de bases de données recherchant des séquences en acides aminés homologues au MBD de MeCP2 a permis d'identifier quatre autres protéines liant les 5-méthylcytosines, soit les MBD1-4 (Cross *et al.*, 1997; Hendrich et Bird, 1998). De ces quatre protéines, MBD2 et MBD3 sont celles qui présentent le plus d'homologie avec 71,1 % (Hendrich et Bird, 1998). MBD1 peut réprimer la transcription et son mécanisme de répression serait relié à la désacétylation des histones (Cross *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 2000). MBD2, qui correspond à la déméthylase dMTase identifiée par Bhattacharya *et al.* (1999) serait également capable de réprimer la transcription (Ng *et al.*, 1999). MBD3 lie préférentiellement l'ADN méthylé et pourrait, tout comme MeCP2, constituer un pont entre les groupements méthyls et les complexes de désacétylation (Wade *et al.*, 1999). MBD4 serait une glycosylase capable d'enlever une thymine ou une uracile opposant un méthyl-CpG (Hendrich *et al.*, 1999).

ii) *La méthylation dans la séquence transcrite d'un gène n'inhibe pas la transcription.* Les îlots CpG sont la plupart du temps associés au promoteur de gènes (Gardiner-Garden et Frommer, 1987; Antequera et Bird, 1993b). Comme nous l'avons vu dans la section précédente, la méthylation de ces îlots a pour effet d'inhiber la transcription des gènes qui y sont associés. Cependant, il existe plusieurs gènes présentant un îlot CpG situé en aval de leur site d'initiation de la transcription. Mentionnons par exemple les gènes *APOE*, *IGF2r*, *p16* et *PAX6*

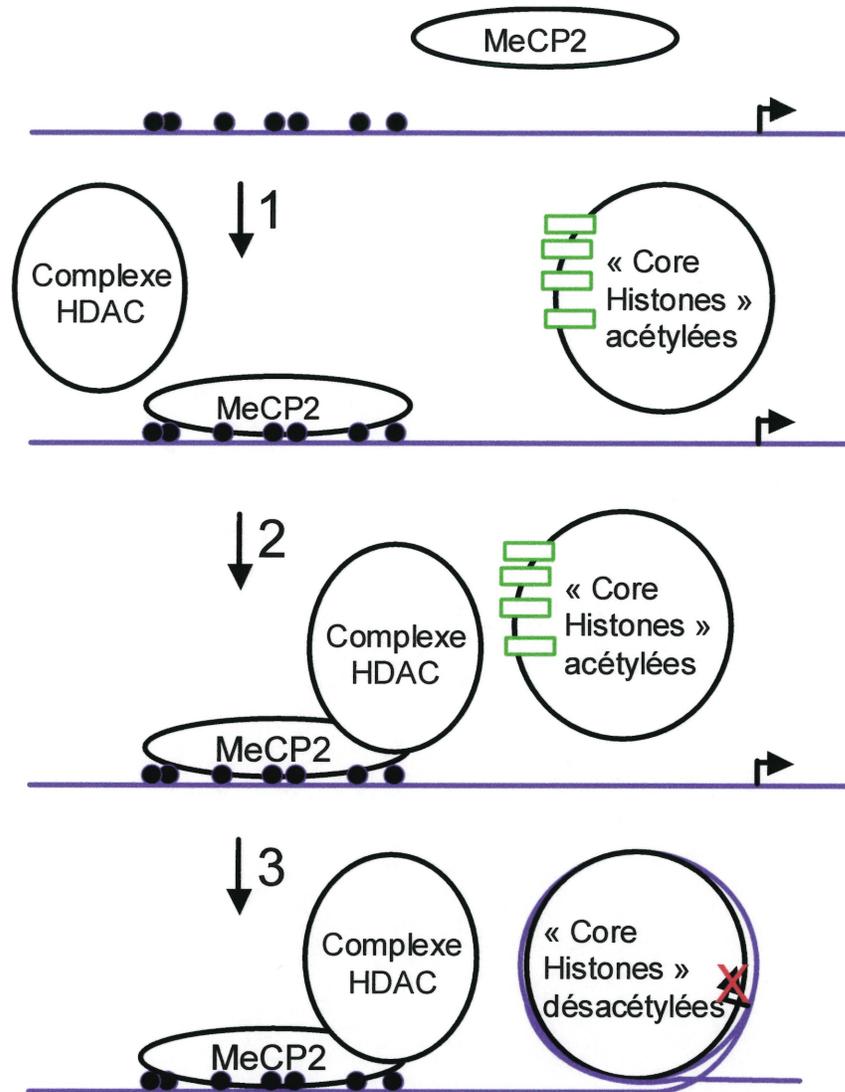


Figure 8. Modèle de la répression transcriptionnelle par la méthylation

La répression transcriptionnelle dépendante de la méthylation se ferait principalement via un mécanisme aboutissant à un empaquetage compact de l'ADN sous forme de chromatine inactive. Ce mécanisme peut être décrit comme suit : i) des protéines capables de lier les groupements méthyls, comme par exemple MeCP2, sont recrutées au niveau du promoteur d'un gène; ii) ces protéines recrutent à leur tour un complexe de désacétylation; iii) les complexes de désacétylation désacétylent des lysines spécifiques au niveau des « core histones », ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité des histones pour l'ADN et de limiter l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. Points noirs : groupements méthyls; rectangles verts : groupements acétyls.

(Jones *et al.*, 1999). Ces îlots sont fréquemment méthylés mais ne semblent pas bloquer la transcription chez les mammifères (Jones, 1999). C'est donc dire que la méthylation affecte différemment l'activité transcriptionnelle des gènes, selon sa localisation par rapport au site d'initiation de la transcription. Ce « paradoxe de la méthylation de l'ADN », proposé par Jones (1999), pourrait être résolu si l'on postule que le mouvement du complexe transcriptionnel à travers un îlot CpG peut cibler ce dernier pour la méthylation *de novo*. Un bon exemple de cette proposition est illustré par le gène *IGF2r*. Ce gène possède un îlot CpG dans son deuxième intron et cet îlot renferme un gène nommé *AS-RNA*, qui code pour un ARN non-traduit. Sur le chromosome maternel, *IGF2r* est transcrit et l'îlot interne est méthylé alors que sur le chromosome paternel, c'est le gène *AS-RNA* qui est transcrit, en sens opposé, et le promoteur d'*IGF2r* qui est méthylé (Wutz *et al.*, 1997). Selon la proposition de Jones, la transcription d'*IGF2r* sur l'allèle maternel pourrait cibler l'îlot interne pour la méthylation *de novo*. Sur le chromosome paternel, la situation serait inversée et la transcription du gène *AS-RNA* ciblerait le promoteur d'*IGF2r* pour la méthylation *de novo* (Jones, 1999). Si cette proposition s'avérait exacte, il faudrait reconsidérer le modèle d'expression-compétition proposé pour expliquer la régulation de ce gène qui présente une empreinte parentale (Barlow, 1997). Il existe également des situations où le degré de méthylation d'un îlot interne corrèle avec l'activité transcriptionnelle du gène. Par exemple, dans la leucémie myéloïde chronique, la translocation *BCR/ABL* positionne le promoteur du gène *ABL* en aval du site d'initiation du gène *BCR* et le degré de méthylation de ce promoteur augmente avec le taux d'expression (Zion *et al.*, 1994). Les gènes *p16* et *PAX6*, qui présentent également un îlot CpG méthylé en aval de leur site d'initiation, dans les exons 2 et 6 respectivement, sont d'autres exemples de gènes pour lesquels le degré de méthylation est corrélé avec le taux d'expression (Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 1998). Cette hypothèse, qui établit une association entre la méthylation et la transcription, bien qu'encore non prouvée pour le moment, s'avère fort intéressante, et ce d'autant plus qu'elle constitue un vision plutôt inhabituelle de la méthylation.

1.4.3.2 L'expression mono-allélique par empreinte parentale (« imprinting »)

L'empreinte parentale définit un phénomène par lequel l'expression de l'allèle d'un gène est déterminée par son origine parentale. L'expression des gènes portant une telle empreinte est mono-allélique et les allèles, transcrits et réprimés, proviennent toujours de la même origine parentale. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi le développement normal requiert une copie maternelle et une copie paternelle de l'ensemble des chromosomes. En effet, des études de transplantation pronucléaire montrent que les embryons androgéniques (ne possédant que des chromosomes paternels) et gynogéniques (ne possédant que des chromosomes maternels) ne parviennent pas à un développement à terme. Les embryons androgéniques présentent une forte prolifération de leurs tissus extra-embryonnaires et une faible croissance de l'embryon proprement-dit alors que l'opposé est observé pour les embryons gynogéniques (Mann *et al.*, 1984; McGrath et Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984). Le fait que l'allèle exprimé ou réprimé d'un gène portant une empreinte provienne toujours de la même origine parentale implique que la cellule a recours à un marqueur quelconque lui permettant de discriminer les deux allèles. La méthylation semble être un bon candidat pour remplir cette fonction. Des profils différentiels de méthylation ont été observés entre l'allèle maternel et paternel des gènes *H19*, *IGF2* et *IGF2r* (Feil *et al.*, 1994; Stoger *et al.*, 1993; Tremblay *et al.*, 1995). De plus, des études avec des cellules embryonnaires souches dépourvues du gène *Dnmt1*, et donc hypométhylées, suggèrent que l'expression mono-allélique des gènes *H19*, *IGF2* et *IGF2r* dépend de la méthylation (Li *et al.*, 1993; Beard *et al.*, 1995; Jaenisch, 1995).

La méthylation spécifique des allèles qui conditionne l'expression mono-allélique de ce type de gènes est vraisemblablement acquise durant la gamétogenèse (figure 7). Cette méthylation différentielle de l'ovule et du spermatozoïde, permettrait ainsi la distinction entre les allèles maternel et paternel lors du développement (Stoger *et al.*, 1993; Tremblay *et al.*, 1995). Mais comment les cellules peuvent-elles reconnaître l'origine des allèles après la vague de déméthylation survenant au cours du développement, au moment de la segmentation (figure 7)? Il semble que cette vague de déméthylation épargnerait certains sites CpG particuliers associés aux gènes *IGF2*, *IGF2r* et *H19* (Brandeis *et*

al., 1993; Kafri *et al.*, 1993).

1.4.3.3 La méthylation et l'inactivation du chromosome X

Chez les mammifères, les femelles ont deux chromosomes X et l'un d'eux est inactivé tôt durant le développement embryonnaire. Ce processus a pour effet d'équilibrer le dosage des gènes liés au X entre les femelles et les mâles, ces derniers n'ayant qu'un seul chromosome X. L'inactivation du X survient tardivement dans le stade de blastocyste dans le trophoctoderme (Takagi, 1974; Monk et Kathuria, 1977) et l'endoderme primitif (Monk et Harper, 1979), structures dont sont issus le placenta et les membranes extra-embryonnaires, exclusivement. Dans l'embryon proprement-dit, l'inactivation est initiée tôt après l'implantation, autour du stade de gastrulation (Monk et Harper, 1979; Rastan, 1982; Takagi *et al.*, 1982). Un modèle *in vitro* du processus d'inactivation est représenté par les cellules embryonnaire souches femelles qui possèdent deux chromosomes X actifs lorsque non-différenciées et qui subissent l'inactivation d'un X au hasard quand elle sont induites pour la différenciation (Rastan et Robertson, 1985). Des études utilisant des cellules présentant des translocations ou des délétions d'un chromosome X ont démontré qu'un seul locus, le centre d'inactivation du chromosome X (*Xic*), contrôle l'inactivation du X (Russell, 1963; Therman *et al.*, 1974; Mattei *et al.*, 1981; Rastan et Robertson, 1985).

Le gène « X inactive specific transcript » (*XIST*) est situé à l'intérieur du *Xic* (Brown *et al.*, 1991; Borsani *et al.*, 1991; Brockdorff *et al.*, 1991) et est responsable de l'initiation de l'inactivation du X (Penny *et al.*, 1996). Des deux allèles *XIST*, celui lié au X inactif est le seul à être exprimé dans les cellules somatiques, et son transcrit agit en *cis* (Borsani *et al.*, 1991; Brockdorff *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1991). *XIST* ne code pas pour une protéine mais pour un ARN qui, lorsque mature, est localisé à l'intérieur du noyau, en association étroite avec le X inactif (Brockdorff *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1992). Dans les cellules non-différenciées, *XIST* est exprimé par les deux allèles et son produit peut être détecté par la technique FISH qui révèle un signal discret au niveau du *Xic*. Au moment de la différenciation, ce signal disparaît sur le X du mâle. Chez la femelle, le signal sur

le X actif disparaît également alors que celui lié au X inactif est remplacé par un fort signal qui co-localise avec le chromosome (Lee et Jaenisch, 1997). Cette augmentation d'expression de *XIST* serait régulée par un mécanisme qui stabiliserait le transcrit plutôt que par un qui augmenterait le taux de transcription (Panning *et al.*, 1997). Au même moment, l'allèle *XIST* lié au X actif est inactivé par hyperméthylation (Hendrich *et al.*, 1993; Lee et Jaenisch, 1997; Norris *et al.*, 1994).

XIST est un gène portant une empreinte parentale. Durant la gamétogenèse, le gène chez la femelle est méthylé alors qu'il ne l'est pas chez le mâle. Dans les cellules somatiques, contrairement à ce qui se produit dans d'autres gènes portant une empreinte parentale, le signal de méthylation du gène *XIST* maternel ne résiste pas à la vague de déméthylation au moment de la segmentation. L'empreinte est donc perdue à ce stade et la méthylation *de novo* subséquente est aléatoire, touchant l'un ou l'autre allèle parental et conditionnant ainsi l'inactivation du X lié au gène exprimé. Dans les cellules extra-embryonnaires, la situation est différente : l'empreinte parentale est préservée de sorte que seul l'allèle paternel est exprimé (Jaenisch, 1997). De ce fait, l'inactivation du chromosome X ne se fait pas aléatoirement et ne concerne que le X paternel (Kay *et al.*, 1993; Norris *et al.*, 1994).

Bien que le gène *XIST* soit nécessaire pour initier l'inactivation du X (Penny *et al.*, 1996), un autre mécanisme semble être responsable du maintien de l'inactivation. C'est à ce niveau que la méthylation jouerait un rôle. Il est bien connu que les îlots CpG liés au chromosome X inactif sont généralement méthylés (Monk, 1986). L'implication de la méthylation dans le maintien de l'inactivation a été suggéré suite à des études démontrant que des gènes sur le chromosome X pouvaient être réactivés *in vitro* par un traitement avec l'agent déméthylant 5-azacytidine (Gartler et Goldman, 1994; Monk, 1986). La méthylation semble se propager sur tout le chromosome de façon linéaire à partir du *Xic* (Grant *et al.*, 1992). Son rôle causal dans l'initiation et la propagation de l'inactivation tout le long du chromosome est pour sa part plutôt controversé. Par exemple, il a été démontré que le gène *HPRT* n'est méthylé que plusieurs jours après l'inactivation,

ce qui suggère que la méthylation serait plutôt une conséquence de l'inactivation (Lock *et al.*, 1987). Un autre facteur qui pourrait également favoriser le maintien de l'inactivation est l'état d'hypoacétylation des histones H4, connu pour limiter la mobilité des nucléosomes et l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux séquences régulatrices de l'ADN (Jeppesen et Turner, 1993). Comme nous l'avons vu dans la section 1.4.3.1, cet état pourrait être, en partie, secondaire au profil de méthylation puisque des études montrent que le profil de méthylation semble influencer le profil d'acétylation (Eden *et al.*, 1998).

1.4.3.4 La méthylation et le cancer

Deux types d'altérations de la méthylation sont souvent observés dans les cellules cancéreuses : i) un état d'hypométhylation global du génome (Gama-Sosa *et al.*, 1983; Feinberg *et al.*, 1998) et ii) une hyperméthylation régionale (en revue : Baylin et Herman, 2000; Momparler et Bovenzi, 2000).

L'hypométhylation globale d'une cellule pourrait provoquer l'activation d'oncogènes et éventuellement mener au développement du cancer. L'existence de ce processus a été démontré par l'étude du gène *K-ras* qui est déméthylé dans des carcinomes du colon et du poumon (Feinberg et Vogelstein, 1983a et 1983b). Abondant dans le même sens, une diète déficiente en S-adénosyl-méthionine imposée à des rongeurs mène à l'hypométhylation d'oncogènes et à l'apparition de cancers du foie (Christman *et al.*, 1993; Pogribny *et al.*, 1995; Wainfan et Poirier, 1992). Cependant, ces analyses ont révélé que l'hypométhylation générale et celle des oncogènes apparaît parfois bien avant même qu'un phénotype tumoral ne soit observé (Christman *et al.*, 1993; Pogribny *et al.*, 1995; Wainfan et Poirier, 1992). Il n'est donc pas clair si l'état d'hypométhylation est responsable de la formation de ces tumeurs. L'hypométhylation globale du génome pourrait bien cependant être à l'origine de l'instabilité génomique qui est caractéristique à une grande majorité de tumeurs (Lengauer *et al.*, 1998). En effet, il est suggéré que la méthylation stabiliserait le génome en inhibant la recombinaison mitotique. Conséquemment, sa diminution globale pourrait, du moins en partie, être responsable de l'instabilité génomique tumorale (Rizwana *et al.*, 1999; Vilain *et al.*,

1999; Lengauer *et al.*, 1997; Lengauer *et al.*, 1998).

Paradoxalement, il est bien connu que les cellules cancéreuses présentent une hyperméthylation régionale, affectant souvent les îlots CpG associés au promoteur de gènes, incluant des suppresseurs de tumeurs (en revue : Baylin et Herman, 2000; Momparler et Bovenzi, 2000). Une telle méthylation aberrante serait à l'origine de l'inactivation de ces gènes (tableau 3). Cette méthylation serait donc associée à une perte de fonction du gène et constitue à ce titre l'un des deux événements du processus d'inactivation en deux stades des gènes suppresseurs de tumeurs proposé par Knudsen (1971). Il semble que presque la moitié des gènes suppresseurs de tumeurs causant des cancers familiaux par une mutation dans les cellules germinales seraient inactivés par la méthylation de leur promoteur dans les cancers sporadiques (Baylin et Herman, 2000). Plusieurs exemples de gènes suppresseurs de tumeurs inactivés par hyperméthylation ont été décrits (tableau 3). Mentionnons par exemple le gène *p16^{INK4A}* qui est l'un des gènes les plus souvent inactivés dans le cancer (Baylin et Herman, 2000). Il est intéressant de noter que, dans certains cancers, par exemple le cancer du colon, l'inactivation de ce gène n'est observée que par hyperméthylation (Herman *et al.*, 1995). Un autre exemple est celui du gène *hMLH1*. L'inactivation de ce gène par méthylation est rencontrée dans 70 % à 80 % des cas de cancers sporadiques du colon, de l'endomètre et de l'estomac présentant une instabilité des microsatellites (Herman *et al.*, 1998).

La méthylation peut aussi jouer un rôle dans le cancer par son impact dans la mutagenèse. Nous l'avons mentionné plus tôt, les 5-méthylcytosines peuvent subir une désamination spontanée et être ainsi converties en thymine (Shen, *et al.*, 1994) (figure 4). Cette désamination expliquerait le haut taux de conversion CpG -> TpG retrouvé dans une région fréquemment mutée de la séquence codante du gène *p53* (Rideout *et al.*, 1990). Alternativement, cette conversion pourrait être secondaire à l'effet de cancérigènes comme le benzopyrène qui peut former des adduits préférentiellement avec ces mêmes 5-méthylcytosines (Denissenko *et al.*, 1997).

Tableau 3. Gènes suppresseurs de tumeurs réprimés par méthylation dans les cancers sporadiques

(Adapté de Baylin et Herman, 2000)

Gène	Fonction	Types de tumeur
<i>VHL</i>	Promouvoir l'angiogenèse	Cellules rénales claires
<i>p16^{INK4A}</i>	Inhibiteur de CDKs	La plupart des tumeurs solides, lymphomes
<i>E-cadherin</i>	Adhésion entre cellules épithéliales	Sein, thyroïde, estomac, autres
<i>hMLH1</i>	Système MMR	Colon, estomac, endomètre
<i>BRCA1</i>	Réparation de l'ADN	Sein, ovaire
<i>LKB1</i>	Sérine et thréonine kinase	Colon, sein
<i>p15^{INK4A}</i>	Inhibiteur de CDKs	Leucémies myéloïde et lymphoïde aiguës
<i>ER</i>	Récepteur nucléaire de l'oestrogène	Sein, colon, leucémies, autres
<i>O⁶-MGMT</i>	Réparation d'adduits de méthyl-guanosine	Cerveau, colon, poumon, lymphomes
<i>GSTP1</i>	Prévention des dommages oxydatifs	Sein, prostate, rein
<i>TIMP3</i>	Inhibiteur de métalloprotéases	Colon, rein, cerveau
<i>DAPK1</i>	Kinase qui médie l'apoptose induite par l'interféron	Lymphomes à cellules B, poumon
<i>p73</i>	Inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose	Lymphomes

Quelle est la cause de la méthylation aberrante observée dans les cellules cancéreuses? La réponse n'est pas encore connue. On sait que les gènes *Dnmt1*, *Dnmt2* et *Dnmt3* sont tous trois sur-exprimés (Robertson *et al.*, 1999). La sur-expression de *Dnmt1* entraîne la transformation de la lignée cellulaire NIH3T3 (Wu *et al.*, 1993) alors que la réduction de son expression par l'utilisation d'ARN antisens inhibe la tumorigenèse (MacLeod et Szyf, 1995). En contrepartie, des cellules de cancer du colon en culture, mutantes homozygotes pour le gène *Dnmt1*, maintiennent l'état de méthylation de la plupart des sites normalement méthylés investigués du promoteur du gène *p16^{INK4A}* et d'autres gènes qui sont hyperméthylés dans cette lignée (Rhee *et al.*, 2000). Ces résultats discordants témoignent de la complexité du problème.

1.5 Ce que nous savons à propos de la régulation transcriptionnelle de *GPC3*

Depuis la découverte du gène *GPC3*, quelques études ont apporté un certain nombre de notions importantes concernant la régulation transcriptionnelle de ce gène. Il semble que la transcription de *GPC3* soit régulée à la hausse dans des conditions qui ont pour effet d'arrondir la forme des cellules (Li *et al.*, 1997). Les évidences supportant cette notion sont liées au fait qu'une augmentation de transcrits dans la lignée cellulaire intestinale IEC-18 est observée : i) lorsque les cellules sont confluentes; ii) lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu faible en calcium et iii) lors d'une culture en agrégats. À l'inverse, une diminution de la production de transcrits de *GPC3* est observée lorsque cette même lignée est cultivée dans des conditions ayant pour effet de donner aux cellules une forme plus allongée ou plus étendue telles que : i) la sous-confluence; ii) la transformation avec ras; iii) la perte de structuration du cytosquelette par la colchicine et iv) le traitement avec de la vandate, un inhibiteur de tyrosine phosphatase qui favorise la perte d'inhibition de croissance et la croissance ancrage-indépendante. Cette notion soulève la possibilité que la transcription de *GPC3* puisse être influencée par un mécanisme appelé « mécanotransduction » qui consiste en une transduction déclenchée par des stress mécaniques conférés au cytosquelette d'une cellule et qui entraînerait des changements d'expression

génique et de comportements (Li et al., 1997).

La publication de Huber *et al.* (1998) a été particulièrement informative quant à la régulation de la transcription de *GPC3*. Celle-ci rapporte, entre autres, une étude de cartographie par délétion effectuée dans le but de déterminer le potentiel promoteur des séquences en *cis* de la région en 5' de *GPC3*. Il s'est avéré qu'un fragment de 3279 pb de séquence promotrice ne semble pas contenir d'élément responsable de la régulation tissu-spécifique du gène puisque, lorsque transfecté dans des cellules HeLa (*GPC3*-), le fragment a été en mesure de stimuler la transcription du rapporteur. Ces études de délétion ont également montré que les 218 pb en amont du site d'initiation de la transcription suffisent à transcrire le rapporteur dans une proportion de 80 % par rapport au fragment contenant les 3279 pb de promoteur. Des études de protection à la DNase I *in vitro*, réalisées sur des fragments couvrant le promoteur de -218 à +112, ont ensuite permis d'identifier des régions protégées allant de -7 à -43 et de -86 à -103 (figure 9). Trois sites putatifs *Sp1* couvrent ces empreintes. La capacité de liaison de ce type de facteurs à ces empreintes a été démontrée par des essais de retardement sur gel (« band shift »). L'utilisation d'un anticorps anti-*Sp1* a pu confirmer la liaison de ce facteur à la sonde. Cette étude a été complétée en testant la fonctionnalité du facteur *Sp1* comme activateur de la transcription de *GPC3*. À cet effet, la lignée cellulaire de *Drosophila* SL2, une lignée déficiente en *Sp1*, a été utilisée. Des co-transfections dans ces cellules d'un vecteur d'expression constitutive contenant l'ADNc de *Sp1*, et d'une construction contenant 82 pb ou 218 pb de la portion proximale du promoteur placée devant un rapporteur *luciférase*, ont démontré la capacité du facteur *Sp1* à stimuler l'activité promotrice.

La méthylation du promoteur de *GPC3* a également été investiguée. Selon les résultats obtenus à partir de quelques échantillons, il semble que la méthylation ne soit pas nécessaire à la répression de *GPC3* étant donné que, dans des échantillons de lymphocytes de garçon, il n'y a pas de méthylation (Huber *et al.*, 1999). Il est toutefois à noter que les échantillons de lymphocytes de fille sont partiellement méthylés, ce qui suggère qu'un seul des deux allèles est méthylé, probablement celui lié au chromosome X-inactif. Bien que la méthylation ne

```

-250  GCGCCCTGTGTAGAGCGGCTGCGAGCGGGCAGCTGGGCTCGGCTGCCGGG  -201
-200  AGCCACCGCGCGGGCTCCGCACCCTCCTCTCGCACTGCCTTCGCCCGGTC  -151
-150  CCCGCGCCGCGGTGCCCCAGTGGCCCCGCGCGCTCCACGCCGCGCCCC  -101
-100  CGCACCCCGCCGGCTACCGGCCGCACAACCGCCACCGCCCCCTGGCCGCG  -51
-50   CGGCTCGCCTCGCCCCGCCCCGTCCC TCCTCGCCCCGCCCCACCCAGTC  -1
+1    AGCCCCGCCCTGCCCGCGCCGCAAGCGGTTCCCGCCCTCGCCAGCGC  +50
+51   CCAGGTAGCTGCGAGGAAACTTTTGCAGCGGCTGGGTAGCAGCACGTCTC  +100
+101  TTGCTCCTCAGGGCCACTGCCAGGCTTGCCGAGTCCTGGGACTGCTCTCG  +150

```

Figure 9. Empreintes à la DNase I obtenues par l'approche *in vitro* au niveau du promoteur de *GPC3*

Les lignes bleues représentent les régions protégées et les séquences en rose sont des éléments Sp1 putatifs. (Huber *et al.*, 1998)

semble pas nécessaire à la répression de *GPC3*, elle semble pouvoir abolir l'activité promotrice. En effet, lorsque le promoteur de *GPC3* placé devant un rapporteur est méthylé *in vitro* puis transfecté dans des cellules HeLa, la promotion de la transcription diminue de façon proportionnelle à la quantité de groupements méthyles ajoutés (Huber *et al.*, 1999).

1.6 Objectifs

Ayant détecté l'ARNm du gène *GPC3* dans certains NB et dans toutes les WT (Saikali et Sinnott, 2000), nous avons voulu comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation transcriptionnelle de ce gène. Pour ce faire, deux principaux objectifs ont été poursuivis : i) établir le profil de méthylation de la région promotrice du gène et ii) cartographier les sites *in vivo* d'interaction ADN-protéines sur 1 kb de promoteur.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Échantillons d'ADN et lignées cellulaires

Le statut de méthylation du promoteur de *GPC3* a été analysé sur des échantillons d'ADN génomique provenant des échantillons de sang périphérique GE, CA, UL, GI, AL, HU, CP41, CP42, CP43, CP111, CP112, CP113, CP114 et PED93 (obtenus de donneurs volontaires à l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada), des échantillons de placentas #11, #20, #23, #24, #25, #26, #27, #28, #29, #32 et #48 (ADN obtenus de C. Deal), des lignées cellulaires de NB SK-N-AS, SK-N-DZ, SK-N-FI, IMR-32, SK-N-SH (obtenues de ATCC, Rockville, MD, É.-U.), NBL-S (obtenue de G.M. Brodeur), SJNB-1, SJNB-7 et SJNB-10 (obtenues de T. Look), des spécimens de NB primaires NB4, NB5, NB8, NB11, NB13 et NB193, des spécimens de WT primaires WT40, WT42, WT51, WT106, WT116, WT130, WT158 et WT177 (obtenus de patients traités à l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada), des échantillons de reins normaux RN40, RN130 et RN177 prélevés au niveau de la partie saine adjacente aux WT WT40, WT130 et WT177 respectivement, puis des échantillons de sang périphérique de patients atteints du syndrome de Turner AC-1 et DC (ADN obtenu de C. Deal).

Les interactions ADN-protéines au niveau du promoteur de *GPC3* ont été analysées dans les lignées cellulaires de NB SJNB-7, qui exprime *GPC3* et SK-N-FI, qui n'exprime pas *GPC3*.

2.2 Essai de méthylation par PCR

Principe. Le principe de l'essai de méthylation par PCR repose sur l'incapacité de certaines endonucléases à cliver un fragment d'ADN lorsque leur site de reconnaissance inclut une 5-méthylcytosine. L'essai consiste à digérer de l'ADN avec une telle enzyme, dite « sensible à la méthylation », préalablement à l'amplification par PCR d'un fragment comprenant le site d'intérêt. La capacité d'amplification de ce fragment nous renseigne sur le statut de méthylation du site

étant donné qu'une amplification exponentielle n'est possible que sur un gabarit d'ADN non digéré (figure 10). Cet essai étant d'une grande sensibilité, il faut garder en tête que l'obtention d'un signal de méthylation ne signifie pas nécessairement que l'ensemble des molécules d'un échantillon est méthylé. Une digestion partielle de l'échantillon devient alors un danger car elle peut générer un résultat faux positif. C'est pour cette raison que nous avons utilisé un contrôle de digestion interne (voir méthodologie).

Méthodologie. Dans le cadre de notre étude, de l'ADN génomique a été digéré avec l'endonucléase HpaII, sensible à la méthylation. Comme contrôle de digestion, nous avons utilisé son isoschizomère MspI, qui est insensible à la méthylation. Les digestions enzymatiques se sont déroulées pendant plus de 16 h à 37° C dans un volume total de 20 µl contenant 200 ng d'ADN génomique, 1 X du tampon réactionnel recommandé par le fabricant pour les enzymes utilisées (NEBuffer 1 : bis Tris propane-HCl pH 7,0 10 mM, MgCl₂ 10 mM et DTT 1 mM, ou NEBuffer 2 : Tris-HCl pH 7,9 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM et DTT 1 mM; New England Biolabs), 1 mM de spermidine, plus de 100 U d'enzyme (HpaII ou MspI; New England Biolabs), et 200 fg d'ADN plasmidique pBSKS+3H (figure 11). Ce plasmide est un vecteur pBlueScript KS+ avec en son insert un îlot CpG contenant trois sites HpaII/MspI. L'ADN plasmidique pBSKS+3H a été ajouté à la solution de digestion en quantité équimolaire par rapport à l'ADN génomique afin d'agir comme contrôle interne de digestion. Après la digestion, un PCR ciblant l'insertion du plasmide a été fait systématiquement. L'ADN plasmidique n'étant pas méthylé, l'obtention d'un produit d'amplification indiquerait que la digestion a été incomplète.

La région du promoteur de *GPC3* située entre -702 et +97 comprend 6 dinucléotides CpG associés chacun à un site HpaII/MspI (figure 12 : sites en bleu). Le statut de méthylation de ces sites a été analysé à l'aide de deux PCR : un premier amplifiant un fragment allant de -343 à +97 avec les amorces B2 et L2 (tableau 4; figure 13) et un second allant de -366 à -702 avec les amorces E2 et J2 (tableau 4; figure 13). Ces deux fragments ont été amplifiés dans un volume

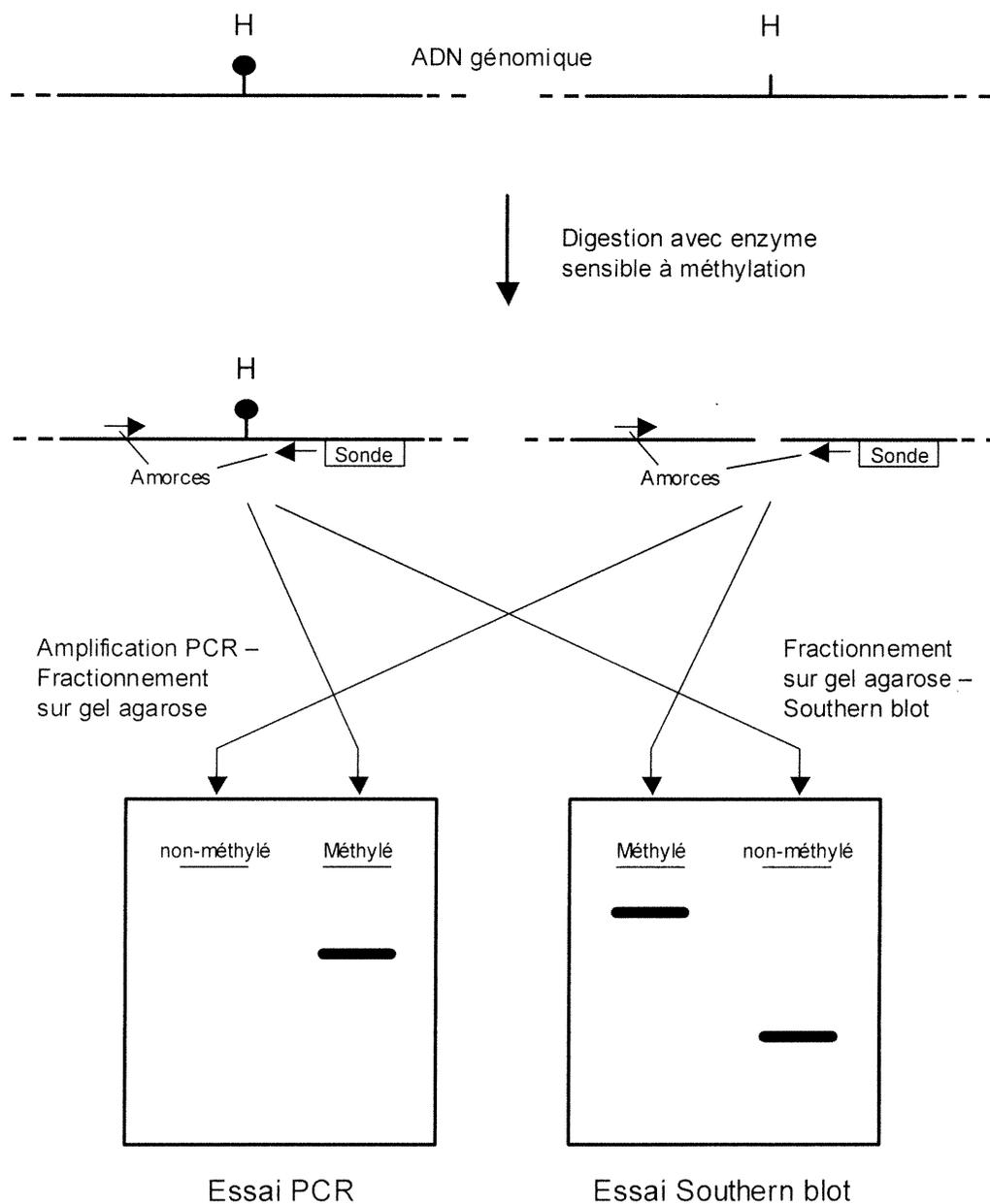


Figure 10. Essais de méthylation par PCR et par hybridation Southern

De l'ADN génomique est digéré avec une enzyme sensible à la méthylation et la capacité de clivage (statut de méthylation) est révélée par l'amplification PCR d'un fragment comprenant le site de digestion avec des amorces flanquant ce dernier (méthode par PCR) ou par hybridation Southern en utilisant une sonde spécifique (méthode par hybridation Southern).

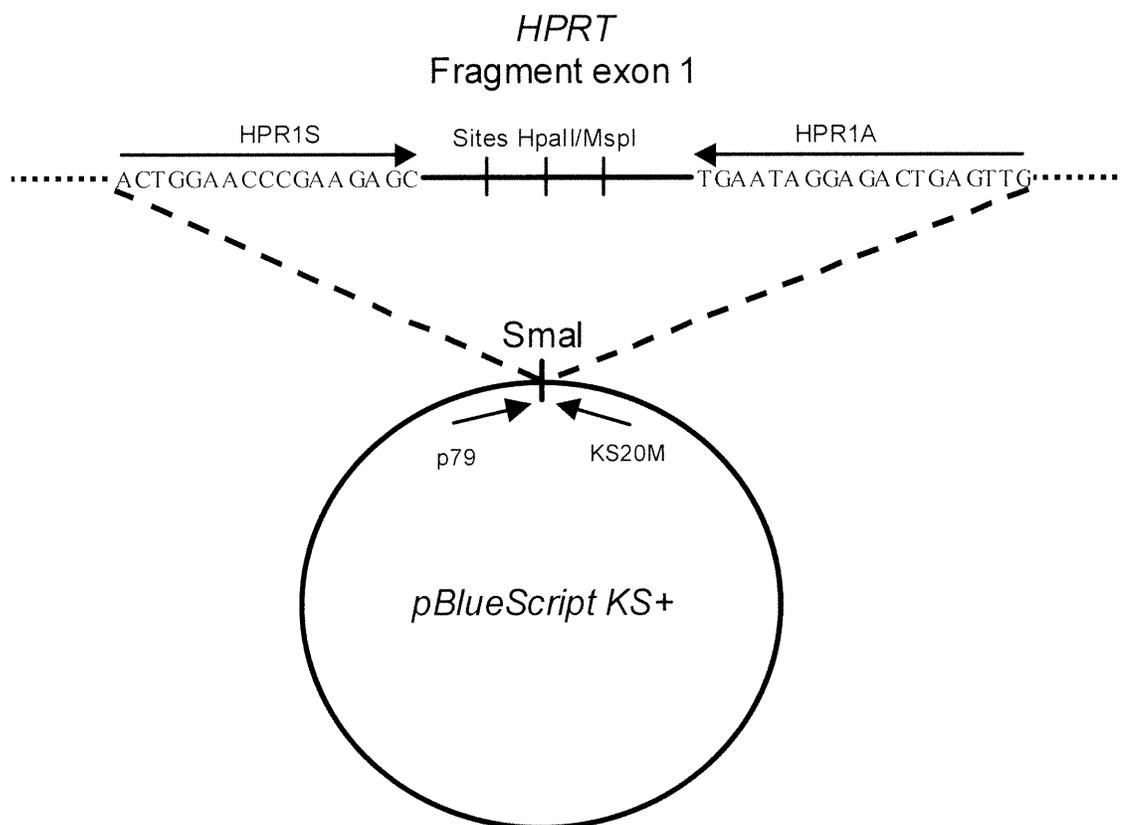
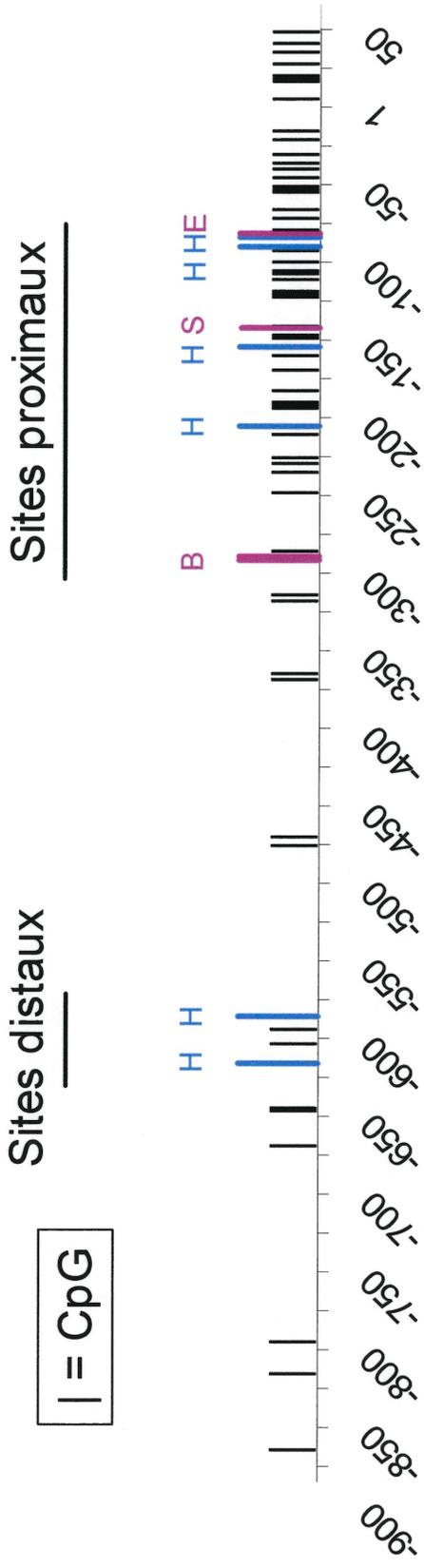


Figure 11. Construction du plasmide pBSKS+3H

Le plasmide pBSKS+3H est un vecteur pBlueScript KS+ dans lequel un fragment de 102 pb du premier exon du gène HPRT a été inséré, au niveau du site SmaI. Les séquences affichées correspondent à celles des amorces qui ont été utilisées pour amplifier ce fragment à partir d'ADN génomique avant d'être inséré. Les sites HpaII/MspI contenus dans le fragment sont illustrés. p79 et KS20M correspondent aux amorces utilisées pour l'amplification de l'insert afin de tester l'efficacité de digestion dans l'essai de méthylation par PCR (contrôle interne de digestion; voir texte pour détails).



Position dans le promoteur

- : essai par PCR
- : essai par hybridation Southern

Figure 12 Dinucléotides CpGs investigués pour la méthylation

Les sites CpGs en couleur ont été investigués pour la méthylation, soit par PCR (bleus) ou par Southern blot (mauves).

Tableau 4. Amorces utilisées pour les réactions de PCR et de LMPCR

Amorce	Séquence (5'-3')	Position relative au gène <i>GPC3</i> (nucl. 5')	T _m (° C)
A1	CCAAGCTGAGCAGCATC	+252	57
A2	GCCACCACCAAGCACGCGGTGCGC	+235	72
B1	GGAGCAAGAGACGTGC	+107	57
B2	ACGTGCTGCTACCCAGCCGCTGCA	+97	69
C1A	GGGCGAGGCGAGCCG	-36	65
C2A	GGGGGCGGTGGCGGTTGTGCGGCC	-59	76
C1B	GGCGAGGAGGGACGG	-12	62
C2B	GGACGGGGCGGGGCGAGGCGAGC	-26	75
C1C	GTGGCGGTTGTGCGG	-66	59
C2C	GGTGCGGGGGCGCGGCGTGGAGC	-95	76
D1	GCAGCCGAGCCCAGC	-205	62
D2	TGCCCGCTCGCAGCCGCTCTACACAG	-220	71
E1	TCCTTCCC GCCGCTCA	-357	59
E2	CCGCTCATTGGCCTACAGCCTGGAGGGC	-366	72
F1	AGGTGTTCTTCACACA	-531	52
F2	CAAATCCACCTCCTCATTCTACTCTCTGAG	-546	65
G1	CTGCCTCACCTTTGAATATTG	-685	56
G2	TGTATCTTAAAAGTCTGAAAGCCTCTGTGGC	-704	63
H1	GAAGTGGATTTCTAATGGTG	-1034	54
H2	TGAAATCTAAGCAGGAGAGGTGGGATTGG	-1016	65
I1	GCTTTAAGCCCTTGTTA	-884	55
I2	TATTCGTTGTAACCAGTTAGGCTTTGCCTC	-868	63
J1	CAGACTTTTAAGATACAATATTC	-720	51
J2	TATTCAAAGGTGAGGCAGGCTGTGAAAAGC	-702	65
K1	CACCTTGTGTGGCTCTG	-535	57
K2	CAGGAAAGAGCTGGCACAAGCTGAAAGAAGG	-513	67
L1	GGAAGGAGGAGTGAGGC	-363	59
L2	GGAACCTTCTCCAGAGCCAGTCAGAGCG	-343	69
M1	GGCTCCGCACCCTCC	-188	62
M2	CCTCTCGCACTGCCTTCGCCCGGTCC	-175	73
N1	CGCCACCGCCCCCTG	-71	65
N2	GCTCGCCTCGCCCCGCCCGTCCCTC	-48	78
MET1S	TTCTCTCGCAGCTACCTG	+68	54
MET1A	GAAGGAGGAGTGAGGCT	-362	54
MET2S	AGCCTCACTCCTCCTTC	-346	54
MET2A	AACGCGACTATTTGCAG	-649	50
MET5S	TTGGTGACAGGTGGCGT	+308	54
MET5A	CAGGTAGCTGCGAGGAA	+52	54
MET6S	GTTCTCAAAGCCAACCTG	-618	54
MET6A	AATAGCCTTCTACTCCATC	-969	54
HPR1S	ACTGGAACCCGAAGAGC	-	54
HPR1A	CAACTCAGTCTCCTATTCA	-	54
p79	GGTGGCGGCCGCTCTAG	-	60
KS20M	CCTCGAGGTGACGGTATCG	-	66
AMXY-F	CTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTG	-	69
AMXY-R	TAAAGAGATTCATTAACCTTGACTG	-	57
DSX102-F	GTAGTCTCAGTCGACATGCTTTGAC	-	66
DXS102-R	GCTGAGAAAAGTAGATCCTAAGTGTTT	-	65
DSX538-F	CTGATTCAGTGTACAATGGT	-	54
DXS538-R	ATGGATAATAAACAGACAGGA	-	53
DXS981-F	TCAGAGGAAAAGAAGTAGACATACT	-	61
DXS981-R	TTCTCTCCACTTTTCAGAGTCA	-	58

total de 20 μ l contenant 10 ng d'ADN génomique digéré avec HpaII ou MspI (i.e. 1 μ l), 1 X de tampon « GC Genomic PCR Reaction Buffer » (Tris-HCl pH 9,3 40 mM, KOAc 85 mM, DMSO 5 % et Triton X-100 0,1 %; Clontech), 1,1 mM Mg(OAc)₂, 200 μ M des quatre dNTP (Pharmacia Biotech ou Gibco-BRL), 1M de GC-melt (composition non-divulguée; Clontech), 0,4 μ M de chacune des amorces (B2/L2 ou E2/J2; tableau 4) et 1 X du mélange polymérase « Advantage-GC Genomic Polymerase Mix » (Tth DNA polymerase 2 U, anticorps TthStart 10 ng/ μ l, glycérol 1 %, Tris-HCl pH 7,5 0,2 mM, EDTA 1,5 μ M, DTT 15 μ M et BSA 3,75 μ g/ml; Clontech). L'amplification par PCR (thermocycleur Perkin-Elmer, modèle 480) de la région +97 à -343 s'est déroulée selon le protocole suivant: 1 cycle à 95° C pour 1 min, 38 cycles à 95° C pour 45 sec et 74° C pour 2 min puis 1 cycle à 74° C pour 10 min. Le PCR de la région -366 à -702 a été produit selon les paramètres suivants: 1 cycle à 95° C pour 1 min, 28 cycles à 95° C pour 30 sec et 68° C pour 2 min puis 1 cycle à 68° C pour 10 min.

Le clivage des plasmides pBSKS+3H a également été vérifié par PCR dans un volume total de 20 μ l contenant 10 fg de plasmides (i.e. 1 μ l) (quantité équimolaire par rapport à l'ADN génomique : ~ 3200 copies) provenant des réactions de digestion, 1 X du tampon pour la Taq DNA polymérase (Tris-HCl pH 8,4 20 mM et KCl 50 mM; Gibco-BRL), 1,5 mM MgCl₂, 50 μ M des quatre dNTP, 0,1 μ M des 2 amorces dérivées du vecteur pBlueScript KS+ (p79 et KS20M; tableau 4) et 0,5 U de Taq DNA polymerase (Gibco-BRL ou Boehringer Mannheim) ou d'AmpliTaq DNA polymerase (Roche). Les réactions se sont déroulées selon la procédure suivante: 1 cycle à 94° C pour 3 min, 31 cycles à 94° C pour 30 s, 60° C pour 30 sec et 72° C pour 30 sec puis 1 cycle à 72° C pour 10 min.

Les produits de PCR ont été fractionnés sur gel d'agarose 1 % puis photographiés sous rayons UV après coloration au bromure d'éthidium.

Construction du plasmide pBSK+3H. Dans le vecteur pBlueScript KS+, nous avons inséré un fragment de 102 pb dérivé du premier exon du gène *HPRT*, contenant trois sites HpaII/MspI (figure 11). Le fragment à sous-cloner a été

amplifié par PCR dans un volume total de 100 μ l contenant 50 ng d'ADN génomique humain, 1 X de tampon pour la Taq DNA polymérase (Tris-HCl pH 8,4 20 mM et KCl 50 mM; Gibco-BRL), 50 μ M des quatre dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 μ M des amorces HPR1S et HPR1A (tableau 4) et 0,5 U d'enzyme Taq polymérase (Gibco-BRL). Les réactions se sont déroulées selon la procédure suivante: 1 cycle à 94° C pour 3 min, 35 cycles à 94° C pour 30 s, 55° C pour 30 sec et 72° C pour 30 sec puis 1 cycle à 72° C pour 10 min. Après migration sur un gel d'agarose 1 %, le produit de PCR a été découpé puis l'agarose a été éliminé par centrifugation sur laine de verre. L'ADN a ensuite été purifié à l'aide d'une colonne « Qiaquick PCR purification kit » (Qiagen) selon la procédure du fabricant.

Environ 700 ng du produit de PCR purifié a été phosphorylé dans un volume total de 25 μ l contenant 1 X de tampon « forward » (Tris-HCl pH 7,6 70 mM, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM et 2-mercaptoethanol 1 mM; Gibco-BRL), 4 mM d'ATP et 0,5 U de T4 polynucléotide kinase (Gibco-BRL). La réaction s'est déroulée à 37° C pendant 30 min. Pour rendre les extrémités du produit de PCR franches, le volume réactionnel a été complété à environ 33 μ l en ajoutant 0,57 mM des quatre dNTP et 3,25 U de polymérase Klenow. Une incubation à 37° C pendant 30 min a suivi. Les fragments ont ensuite été purifiés à l'aide d'une colonne Qiaquick PCR purification kit (Qiagen).

Le produit de PCR, présentant maintenant des extrémités franches et phosphorylées, a été ligué au vecteur pBlueScript KS+ (Stratagene) préalablement digéré avec l'enzyme SmaI et déphosphorylé. La réaction de ligation s'est déroulée dans un volume total de 10 μ l contenant 10 ng (150 fmol) de produit de PCR, 100 ng (50 fmol) de vecteur (vecteur : insert = 1 : 3), 1 X de tampon de ligation (Tris-HCl pH 7,6 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM et polyéthylène glycol 8000 5 % (w/v); Gibco-BRL) et 5 U de T4 ligase (Gibco-BRL). La ligation s'est déroulée à 16° C, pendant plus de 16 h.

Pour la transformation, des dilutions de 1/5 et 1/10 du produit de ligation ont été faites. Des bactéries *E. coli* DH5 α (Gibco-BRL) ont été dégelées sur glace. À

50 μ l de la suspension bactérienne, placée dans une tube de 14 ml (Falcon 2059), 2 μ l de chacune des dilutions a été ajoutée et doucement mélangée. Après une incubation de 30 min sur glace, un choc thermique a été produit en plaçant le mélange à 37° C pendant 45 sec puis de nouveau sur glace pour deux min. Après l'ajout de 0,9 ml de milieu SOB (bactotryptone 2 %, extrait de levure 0,5 %, KCl 2,5 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM et MgSO₄ 10 mM), la suspension bactérienne a été incubée sous agitation (225 rpm) pendant 1 h à 37° C. Un volume de 300 μ l a été ensuite étalé sur des pétris LB-agars 1,5 % contenant 100 μ g/ml d'ampicilline sur lesquels avaient préalablement diffusés 50 μ l d'IPTG 80 mM et 70 μ l d'X-gal 0,020%. Les pétris ont été incubés pendant au moins 16 h à 37° C. Des colonies blanches isolées ont étéensemencées dans 3 ml de bouillon de culture LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. Ces bouillons ont été incubés plus de 16 h sous agitation (225 rpm) à 37° C. Des mini-preps ont été effectuées à l'aide du protocole standard de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). La présence de l'insert a été vérifiée à l'aide de digestions enzymatiques.

2.3 Essai de méthylation par hybridation Southern

Principe. L'essai de méthylation par hybridation Southern met aussi à profit l'incapacité de certaines endonucléases à digérer un site de reconnaissance présentant un 5-méthylcytosine. Par contre, avec cet essai, la détection des sites méthylés se fait par une hybridation Southern. En hybridant les produits de digestion, transférés sur une membrane avec une sonde spécifique, le profil de méthylation est révélé par la taille des fragments (figure 10). Les sites de restriction méthylés, donc résistant au clivage par certaines enzymes, seront associés à des fragments de restriction de plus haut poids moléculaire. Cette méthode offre la possibilité d'évaluer quantitativement la proportion des sites méthylés par rapport à ceux non-méthylés car les molécules non-méthylées sont révélées au même titre que celles qui sont méthylées. L'approche par hybridation Southern présente par contre des désavantages par rapport à celle par PCR. En plus d'être une technique plus laborieuse, une telle analyse nécessite une plus grande quantité d'ADN. Par contre, notre expérience nous porte à suggérer

l'utilisation de ces deux approches complémentaires.

Méthodologie. Nous avons utilisé l'essai de méthylation par hybridation Southern pour analyser le statut de méthylation de quatre dinucléotides CpG situés au niveau du promoteur de *GPC3* et présents à l'intérieur du site de restriction des enzymes BssHII (2 CpG : GCGCGC), SacII (1 CpG : CCGCGG) et EagI (1 CpG : CGGCCG), sensibles à la méthylation (figures 12 et 14). De l'ADN génomique a d'abord été digéré avec l'enzyme de restriction HindIII afin de générer un fragment de restriction d'environ 6,1 kb, qui est d'un ordre de grandeur approprié pour l'analyse par cette approche (figure 15). Ce fragment HindIII contient les trois sites de restriction d'intérêt (figure 15). Cette digestion s'est déroulée pendant 3 à 4 h à 37° C dans un volume total de 25 µl à 50 µl contenant 3,5 µg à 5 µg d'ADN génomique, 0,5 U/µl d'enzyme HindIII (Gibco BRL), 1 X du tampon recommandé REact 2 (Tris-HCl pH 8,0 50 mM, MgCl₂ 10 mM et NaCl 50 mM; Gibco BRL) et 1 mM de spermidine. Nous avons ensuite procédé à une seconde digestion avec chacune des trois enzymes sensibles à la méthylation mentionnées ci-haut (figure 15). Pour la digestion avec BssHII, nous avons simplement ajouté 0,5 U/µl de BssHII (Gibco-BRL), puis incubé les échantillons à 50° C, pendant plus de 16 h. Pour EagI, nous avons ajouté du NaCl pour atteindre une concentration finale de 100 mM et 0,5 U/µl de EagI (New England Biolabs). La digestion s'est déroulée pendant plus de 16 h à 37° C. Pour SacII, une extraction au phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol se sont avérés nécessaires préalablement à la digestion dû à l'incapacité de cette enzyme à fonctionner efficacement en présence du tampon REact 2 utilisé pour la première digestion avec HindIII. Le culot d'ADN digéré avec HindIII a été resuspendu dans un volume total de 20 µl contenant 1 X du tampon NEBuffer 4 (Tris-acétate pH 7,9 20 mM, acétate de potassium 50 mM, acétate de magnésium 10 mM et DTT 1mM; New England Biolabs), 1 mM de spermidine et 20 U d'enzyme SacII (New England Biolabs). La digestion s'est déroulée pendant au moins 16 heures à 37° C.

Les produits de la digestion double ont été fractionnés sur gel d'agarose 1 %, accompagnés parallèlement d'un marqueur de poids moléculaire « 1 kb ladder »

-300 GCCAATCA **BssHII** GCGCGCTCGAGCCTGCAGCCCCTCTGCAGTAGTTATGCCAGA -251
-250 GCGCCCTGTGTAGAGCGGCTGCGAGCGGGCAGCTGGGCTCGGCTGCCGGG -201
-200 AGCCACCGCGCGGGCTCCGCACCCTCCTCTCGCACTGCCTTCGCCC GGTC -151
-150 CCCGCG **SacII** CCGCGGTGCCCCAGTGGCCCCGCGCGCTCCACGCCGCGCCCC -101
-100 CGCACCCCGCCGGCTAC **EagI** CGGCCGCACAACCGCCACCGCCCCCTGGCCGCG -51
-50 CGGCTCGCCTCGCCCCGCCCCGTCCCTCCTCGCCCCGCCCCACCCAGTC -1

Figure 14. Essai de méthylation par hybridation Southern : position des sites de restriction investigués dans le promoteur de *GPC3*

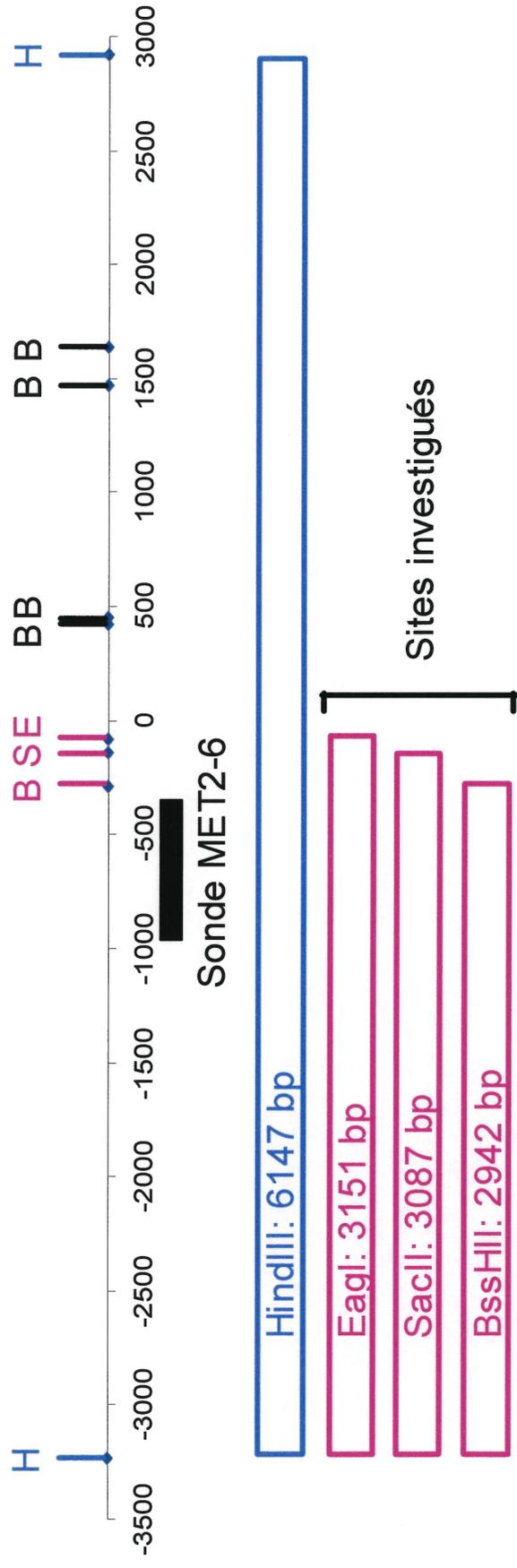


Figure 15. Carte de restriction partielle de la région étudiée par l'essai de méthylation par hybridation Southern

Les sites de restriction HindIII (H) et la taille attendue du fragment sont indiqués en bleu. Les sites de restriction EagI (E), SacII (S) et BssHII (B) présents dans le promoteur ainsi que la taille attendue des fragments sont indiqués en rose. Les sites de restriction BssHII situés à l'extérieur du promoteur sont indiqués en noir.

(Gibco-BRL). Après coloration au bromure d'éthidium, une photographie du gel a été prise sous rayons UV. Le gel a ensuite été incubé dans une solution de NaOH 0,4 M pendant 20 min avant de procéder à un transfert alcalin par capillarité de l'ADN (plus de 16 h) sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond-N+, Amersham ou GeneScreen Plus, NEN Life Science Products) en utilisant la même solution de NaOH 0,4 M comme tampon de transfert. Après le transfert, les membranes ont été rincées 1 à 2 min dans du SSC 2X puis laissées à sécher à température ambiante.

Les membranes séchées ont été préhybridées pendant 2 h, à 42° C, dans une solution contenant 10 % de dextran sulfate, 1 % de SDS, 1 M de NaCl, 50 % de formamide et de l'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé (100 µg/ml final). Toutes les préhybridations et hybridations ont été faites dans un four rotatif (Robbins Scientific, modèle 400). Après la préhybridation, 500 000 cpm/ml de solution de sonde dénaturée ont été ajoutés à la solution de préhybridation/hybridation. L'hybridation s'est déroulée pendant plus de 16 h à 42° C. Une série de lavages ont été effectués comme suit : un lavage à température ambiante avec une solution de SSC 2 X/SDS 1 %, un lavage à 55° C avec une solution de SSC2X/SDS 1 % et trois lavages à 55° C avec une solution de SSC 0,1 X/SDS 1 %. Une autoradiographie a ensuite été faite en exposant un film (Kodak, X-OMAT) à la membrane hybridée pendant 3 à 5 jours à -70° C sous écrans pour amplifier les signaux.

La sonde radioactive utilisée pour les hybridations a été générée à l'aide de la technique d'élongation d'amorces (« random primer extension ») à partir d'un fragment de PCR de 624 pb, appelé MET2-6 (voir section 2.4), correspondant à la région -969 à -346 du promoteur de *GPC3*. D'abord, 30 ng du fragment de PCR MET2-6 a été dénaturé (95° C pendant 4-5 min suivi d'un refroidissement sur glace) en présence de 6 µg d'hexamères de composition aléatoire en dNTP, dans un volume de 25 µl. Ce volume a ensuite été complété à 50 µl en ajoutant 1 X de tampon REact2 (Tris-HCl pH 8,0 50 mM, MgCl₂ 10 mM et NaCl 50 mM; Gibco BRL), 0,25 mM d'un mélange de dATP + dGTP + TTP, 30 µCi de [α ³²P]-dCTP

(Amersham) et 6,5 U de polymérase Klenow. Après une incubation de 30 à 60 min à 37° C, la sonde a été purifiée avec une colonne G-50 (Pharmacia Biotech) selon la procédure recommandée par le fabricant.

2.4 Cartographie *in vivo* des sites d'interactions ADN-protéines

2.4.1 Bases de la technique

L'ADN possède une susceptibilité à des agents endommageants qui est intrinsèque à sa composition chimique. La méthode de cartographie *in vivo* des interactions ADN-protéines est basée sur la modification de cette susceptibilité occasionnée par l'interaction qu'ont certaines régions d'ADN avec des éléments du milieu intra-nucléaire. Par exemple, la liaison d'une protéine à une région d'ADN pourra, dans certains cas, protéger l'ADN contre l'agent alors que dans d'autres cas, des sites d'ADN pourront être exposés davantage à l'agent, ce qui les rendra plus sensibles à celui-ci. En comparant la fréquence des dommages conférés dans un contexte où l'ADN est dépourvu de protéines (ADN purifié) avec une situation où l'ADN se trouve en présence d'un extrait nucléaire (*in vitro*) ou à l'intérieur de cellules vivantes en culture (*in vivo*), on arrive à mettre en évidence des sites d'interaction ADN-protéines ou des structures secondaires reliées à l'organisation nucléaire. Précisons que dans cet ouvrage ainsi qu'ailleurs dans la littérature, l'appellation "*in vivo*", qui est normalement utilisée pour décrire des études réalisées à l'intérieur d'un organisme vivant, fait référence à l'étude d'interactions ADN-protéines à l'intérieur de cellules vivantes (même en culture) par opposition aux études "*in vitro*" qui réfèrent à l'études de ces interactions dans un tube entre une sonde d'ADN et des protéines d'un extrait nucléaire.

L'approche de cartographie *in vivo* que nous avons utilisée pour mettre en évidence les sites d'interaction ADN-protéines au niveau du promoteur de *GPC3* peut être divisée en 8 grandes étapes telles qu'illustrées à la figure 16 (Drouin *et al.*, 2000).

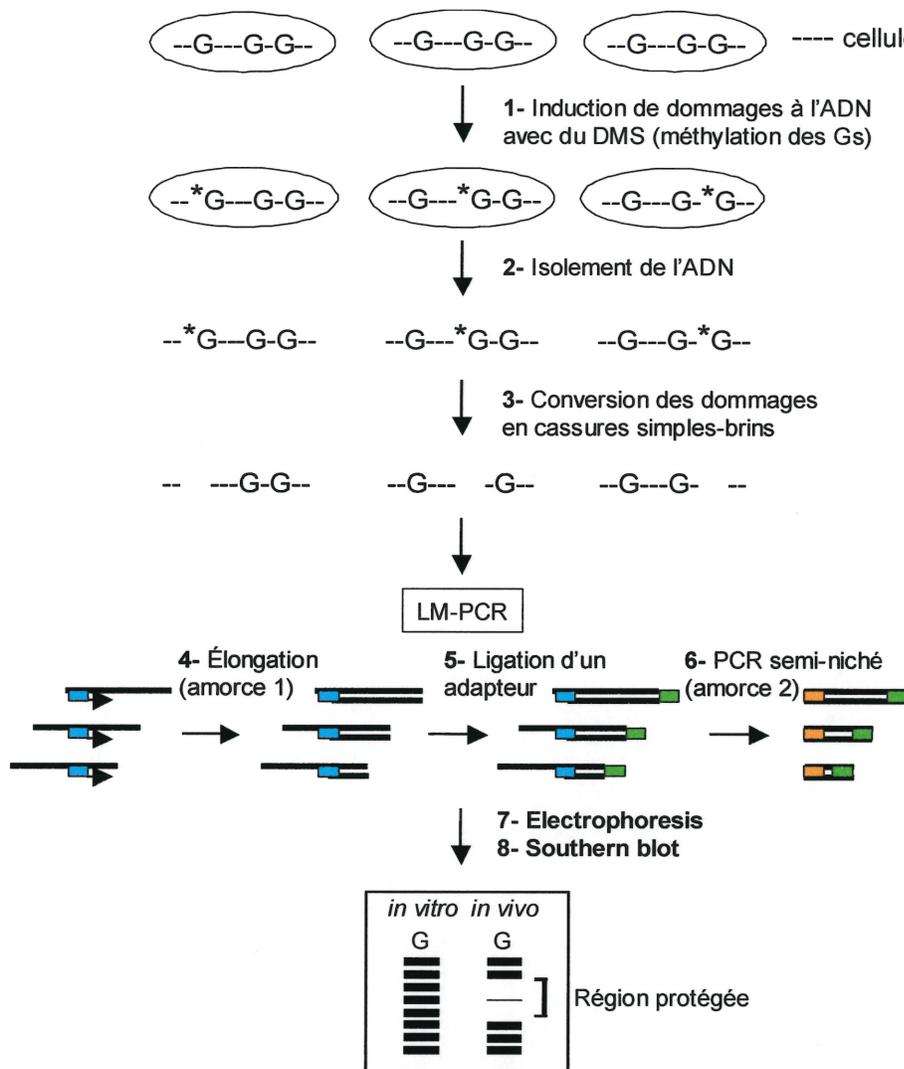


Figure 16. Méthode de cartographie *in vivo* des interactions ADN-protéines : exemple présentant l'approche utilisant le DMS

La méthode peut être divisée en 8 grandes étapes : 1) induction de dommages à l'ADN de cellules en culture; 2) isolement de l'ADN; 3) conversion des dommages induits en cassures simple-brins ; 4) élongation d'une amorce spécifique (amorce 1) hybridée aux fragments simple-brin de la région analysée ; 5) ligation d'un adaptateur double-brin asymétrique (composé d'une extrémité franche et d'une extension 5') ; 6) amplification par PCR utilisant une deuxième amorce spécifique (amorce 2 nichée à l'intérieure le l'amorce 1) et une amorce correspondant à l'adaptateur ; 7) fractionnement des fragments amplifiés sur gel de séquençage ; 8) électro-transfert des fragments d'ADN sur une membrane de nylon et hybridation avec une sonde spécifique.

Alors que la méthode d'empreinte *in vitro* emploie la DNaseI comme agent induisant les dommages, la méthode *in vivo* utilise le plus fréquemment le diméthylsulfate (DMS) ou les rayons ultraviolets de type C (UVC). La DNaseI peut aussi être utilisée *in vivo* bien que la méthode présente de plus grandes difficultés pratiques. Il est à noter que contrairement à la DNaseI, qui clive l'ADN, le DMS et les UVC produisent des dommages qui ne résultent pas en un clivage de l'ADN. Le DMS méthyle préférentiellement les résidus guanines de façon à produire des adduits 7-méthylguanines alors que les UVC produisent des dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) et des photoproduits 6-4. Ces dommages doivent ultérieurement être convertis en cassures simple-brin. La principale différence entre les approches *in vitro* et *in vivo* réside dans la manière de révéler les dommages induits aux sites ciblés par l'agent. Dans un contexte *in vitro*, le système ne fait intervenir que de courts fragments d'ADN représentant une région précise du génome alors que l'approche *in vivo* fait intervenir le génome dans sa totalité, avec toute sa complexité. Il faut donc une méthode suffisamment sensible et capable de révéler la fréquence des dommages spécifiques dans la région d'intérêt, et ce à la résolution désirée. La méthode « ligation-mediated polymerase chain reaction » (LMPCR) rend possible cette révélation. Elle consiste à amplifier les fragments de longueurs hétérogènes, compris à l'intérieur de la région étudiée, générés lors du clivage des sites endommagés. On sait que pour amplifier une matrice d'ADN, il faut connaître la séquence aux deux extrémités d'une région ciblée afin de sélectionner des amorces qui doivent obligatoirement s'y ancrer pour qu'il y ait amplification. Le caractère aléatoire de notre approche limite l'information nécessaire pour le choix d'amorces pour PCR. Pour contourner ce problème, la méthode LMPCR repose sur la ligation bouts-francs d'un adaptateur à l'extrémité 5' de chaque molécule d'ADN clivée dans la région étudiée. De cette façon, il devient possible d'amplifier exponentiellement les fragments compris dans la région d'intérêt en n'imposant la séquence qu'à une seule extrémité, la seconde amorce étant spécifique à l'adaptateur (figures 16 et 17).



Figure 17. Illustration des étapes de la méthode LM-PCR

Séquence noire : ADN initial après conversion des dommages en cassures;
 séquence bleue foncée : amorce spécifique 1; séquence bleue pâle : amorce
 spécifique 2; séquence verte : ADN polymérisé; séquences rose et rouge :
 amorces constituant l'adapteur.

2.4.2 Méthodologie

Les interactions ADN-protéines au niveau du promoteur de *GPC3* ont été analysées dans deux lignées cellulaires de NB : SJNB-7 et SK-N-FI. SJNB-7 est une lignée mâle qui exprime *GPC3* alors que SK-N-FI est une lignée mâle qui n'exprime pas *GPC3*. Nous avons choisi ces lignées en fonction de leur sexe et de leur statut d'expression de *GPC3*. *GPC3* étant localisé sur le chromosome X, la sélection de lignées mâles permet d'éviter toute confusion possible liée à la présence d'un chromosome X inactif chez la fille. Pour ce qui est de l'expression, le fait d'utiliser des lignées ayant des statuts d'expression différents offre la possibilité de mettre en évidence des profils différentiels d'interactions ADN-protéines. Nous avons couvert le promoteur sur presque toute la région allant d'environ -950 à +150, et ce sur les deux brins (figure 18).

2.4.2.1 Culture de cellules, traitements au DMS et irradiations aux UVC

Les lignées SJNB-7 et SK-N-FI ont été cultivées dans des pétris de 150 mm avec du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum fœtal de veau et 1 % d'antibiotiques antimycotiques (Gibco-BRL). Les cellules, à environ 80 % de confluence, ont été traitées avec du DMS ou des UVC. Pour le traitement au DMS, le milieu de culture a été remplacé par 20 ml de milieu DMEM non-supplémenté contenant 0,2 % de DMS (Aldrich). Après une incubation de 6 min à température ambiante, les cellules ont été lavées avec 10 ml de solution HBSS 1 X (Hanks' balanced salt solution) sans sel, puis détachées par trypsinisation. Pour le contrôle *in vitro*, de l'ADN purifié a été traité avec du DMS selon la procédure de Maxam et Gilbert pour le séquençage des guanines (décrite à la section 2.4.2.3). Les irradiations ont été faites à l'aide d'une lampe UVC ($\lambda=254$ nm) (Phillips, TUV 15 W G 15 T8). Le milieu de culture a été remplacé par une solution de NaCl 0,9 % et les cellules ont été irradiées sur glace, pétri découvert, avec une dose de 1500 J/m^2 , déterminée avec un radiomètre (UVP, modèle UVX digital). La solution de NaCl a ensuite été aspirée et les cellules ont été détachées par trypsinisation. L'ADN purifié (*in vitro*), dissous à une concentration de 60 à 70 $\mu\text{g/ml}$ dans du tampon d'irradiation (Tris-HCl pH 8,0 10 mM, KCl 150 mM, NaCl 10 mM et EDTA 1

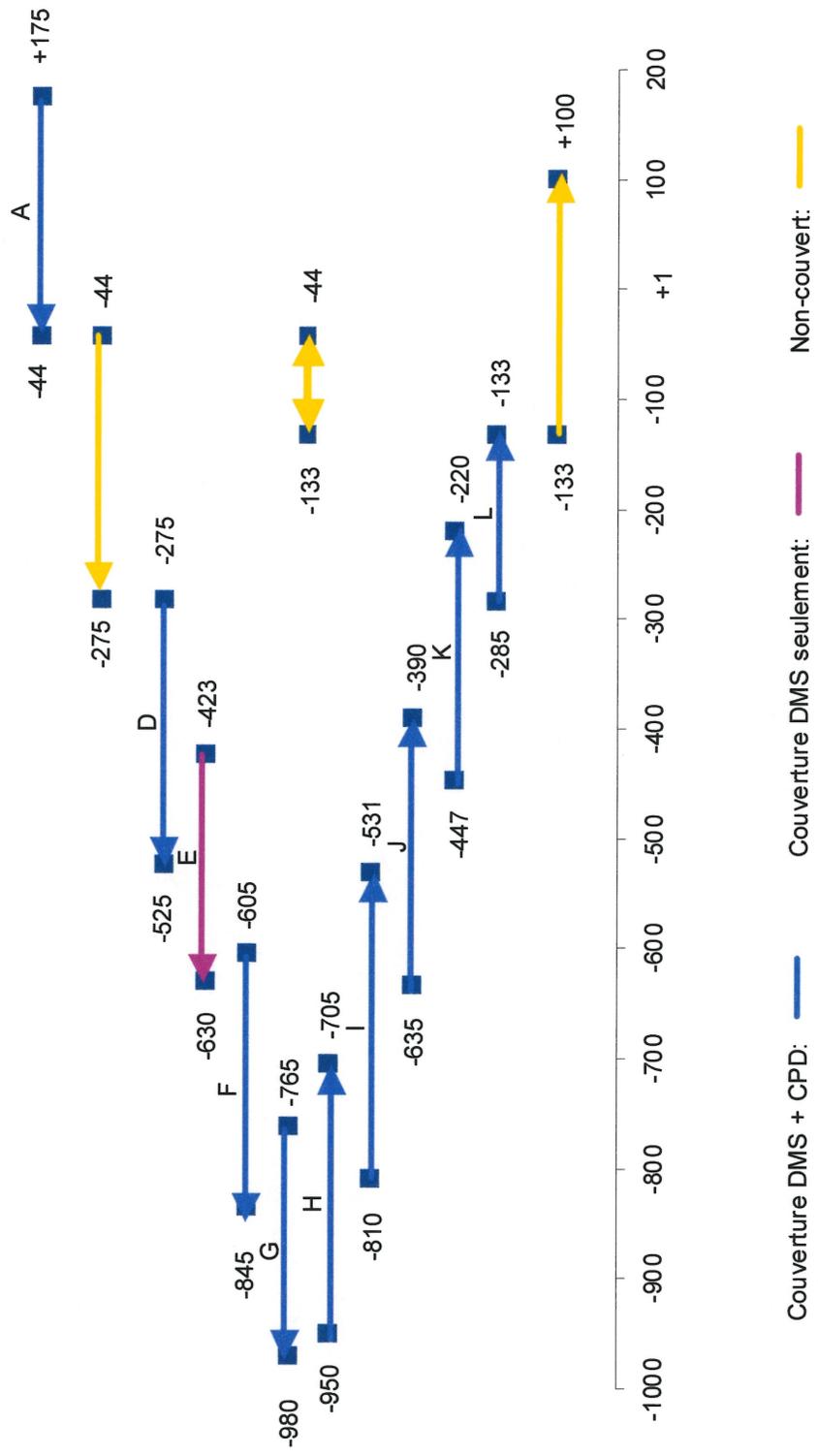


Figure 18. Cartographie des sites interactions ADN-protéines au niveau du promoteur de GPC3

Les lettres au-dessus des flèches correspondent à la paire d'amorces utilisées pour analyser la région indiquée (voir tableau 4). L'intervalle -133 à -44 est non couvert dans les deux directions.

mM) a également été irradié sur glace à une dose de 1500J/m^2 , en plaçant la solution d'ADN dans un plateau de pesée.

2.4.2.2 Isolement de l'ADN traité *in vivo*

Les cellules de trois pétris ont été transférées dans un tube de 50 ml puis lavées une fois avec 5 ml de solution de HBSS 1 X. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 15 ml de tampon A (Tris-HCl pH 8,0 60 mM, sucrose 0,3 M, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, spermidine 0,5 mM, spermine 0,15 mM et EDTA pH 8,0 2 mM) auquel un volume de tampon A contenant 1 % de Nonidet P-40 a été ajouté. Après incubation pendant 5 min sur glace, les noyaux cellulaires ont été culotés par une centrifugation à $4500 \times g$ pendant 10 min. Le surnageant a ensuite été retiré et les noyaux (culot) lavés par une resuspension au vortex (puissance faible à moyenne) dans 10 ml de tampon A. Après centrifugation à $4500 \times g$ pendant 10 min, le surnageant a été retiré. Les noyaux ont ensuite été resuspendus au vortex (puissance faible à moyenne) dans $500 \mu\text{l}$ de tampon A puis, 6 ml de tampon B (NaCl 150 mM et EDTA pH 7,8 5 mM), 6 ml de tampon C (Tris-HCl pH 8,0 20 mM, NaCl 20 mM, EDTA pH 7,8 20 mM et SDS 1 %) et $300 \mu\text{g/ml}$ de protéinase K ont été ajoutés. Après une incubation de 3 h à 37°C avec agitation intermittente, $100 \mu\text{g/ml}$ de RNase a été ajouté au mélange, le tout suivi d'une incubation de 1 h à 37°C , toujours sous agitation intermittente. L'ADN a ensuite été purifié par trois extractions successives : une au phénol, une au phénol-chloroforme et une au chloroforme. L'ADN dissous dans la phase aqueuse a été précipité à l'aide de 2 volume d'éthanol 100 % et de 0,2 M de NaCl. Les culots d'ADN ont été dissous dans de l'eau déionisée sous agitation lente, pendant plus de 16 h. La concentration d'ADN a été mesurée par spectrophotométrie puis ajustée à $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.4.2.3 Réactions de séquençage de Maxam et Gilbert.

Afin de faciliter la localisation des dommages induits par les traitements au DMS et les irradiations aux rayons UVC, des réactions de séquençage ont été

générees et les fragments obtenus après LMPCR ont été migrés parallèlement sur le même gel de séquençage. Les détails de cette procédure ont été décrits par Maxam et Gilbert (1980).

Réaction G. Les réactifs suivants ont été mélangés sur glace : 50 µg d'ADN génomique, 5 µl d'eau, 200 µl de tampon DMS (cacodylate de sodium 50 mM et EDTA pH 8,0 1 mM) et 1 µl de DMS (Aldrich). Après une incubation à 20° C pendant 30 sec, 45 sec et 60 sec, 50 µl de solution DMS stop (acétate de sodium pH 7,0 1,5 M et 2-mercaptoethanol 1 M) et 750 µl d'éthanol 100 % froid (-70° C) ont été ajoutés.

Réaction A. Les réactifs suivants ont été mélangés sur glace : 50 µg d'ADN génomique, 11 µl d'eau et 25 µl d'acide formique (Fluka). Après une incubation à 20° C pendant 4 min, 6 min, 8 min et 10 min, 200 µl de solution DMS stop et 750 µl d'éthanol 100% froid (-70° C) ont été ajoutés.

Réaction T+C. Les réactifs suivants ont été mélangés sur glace : 50 µg d'ADN génomique, 20 µl d'eau et 30 µl d'hydrazine (Aldrich). Après une incubation à 20° C pendant 5 min, 10 min et 15 min, 200 µl de solution hydrazine stop (acétate de sodium pH 7,5 0,3 M et EDTA 0,1 mM) et 750 µl d'éthanol 100% froid (-70° C) ont été ajoutés.

Réaction C. Les réactifs suivants ont été mélangés sur glace : 50 µg d'ADN génomique, 5 µl d'eau, 15 µl de NaCl 5 M et 30 µl d'hydrazine. Après une incubation à 20° C pendant 5, 10 et 15 min, 200 µl de solution hydrazine stop et 750 µl d'éthanol 100% froid (-70° C) ont été ajoutés.

Dans chacune de ces réactions, l'addition d'éthanol froid provoque la précipitation de l'ADN. Ce précipité a été centrifugé puis resuspendu dans 405 µl d'eau avant d'être reprécipité. Le culot d'ADN obtenu a été resuspendu dans 50 µl d'eau. Les dommages induits aux bases azotées au cours des traitements

chimiques ont ensuite été convertis en cassures simple-brin par un traitement à la pipéridine (voir section 2.4.2.4).

2.4.2.4 Conversion des bases endommagées en cassures simple-brin

Les dommages induits à l'ADN par les traitements au DMS et les réactions de Maxam et Gilbert ont été convertis chimiquement en cassures simple-brin avec de la pipéridine (figure 19 A). À 50 μ l de solution d'ADN, 50 μ l de pipéridine 2 M fraîchement préparée a été ajouté puis mélangé. Afin d'éviter que les bouchons n'exploient, ceux-ci ont été fermés avec du ruban de téflon. Les échantillons ont été chauffés à 90° C pendant 30 min puis transférés dans un nouveau tube. Un dixième de volume d'acétate de sodium 3M, 1 μ l de glycogène (20 μ g/ μ l) et 2,5 volume d'éthanol 100 % froid ont ensuite été ajoutés au mélange pour précipiter l'ADN. Le culot d'ADN obtenu a été lavé deux fois avec de l'éthanol 80 % froid. L'ADN a été redissous dans 200 μ l d'eau. Les traces résiduelles de pipéridine ont été éliminées en séchant les échantillons avec un lyophilisateur pendant plus de 16 h. Par la suite, l'ADN a été redissous dans de l'eau pour obtenir une concentration d'environ 0,5 μ g/ μ l.

Les CPD obtenus par irradiation aux rayons UVC ont été convertis enzymatiquement en cassures simple-brin avec la T4 endonucléase V (T4 endo V). Cette enzyme clive au niveau de la structure désoxyribophosphate, entre les bases impliquées dans le dimère sans défaire le lien cyclobutylique de celui-ci (figure 19 B). C'est avec l'enzyme photolyase que ce cycle butylique est subséquentement brisé, laissant ainsi une extrémité 5'-P permettant la ligation bouts-francs d'un adaptateur.

La digestion avec la T4 endo V s'est déroulée dans un volume final de 100 μ l contenant 1 X de tampon « dual » (Tris-HCl pH 7,6 50 mM, NaCl 50 mM et EDTA 1 mM), 1 mM de DTT, 100 μ g/ml de BSA, 40 U de T4 endo V (Epicentre Technologies) et 10-20 μ g d'ADN irradié. Les réactifs ont ensuite été incubés à 37° C pendant 1 h. La digestion avec la photolyase a été faite en ajoutant au

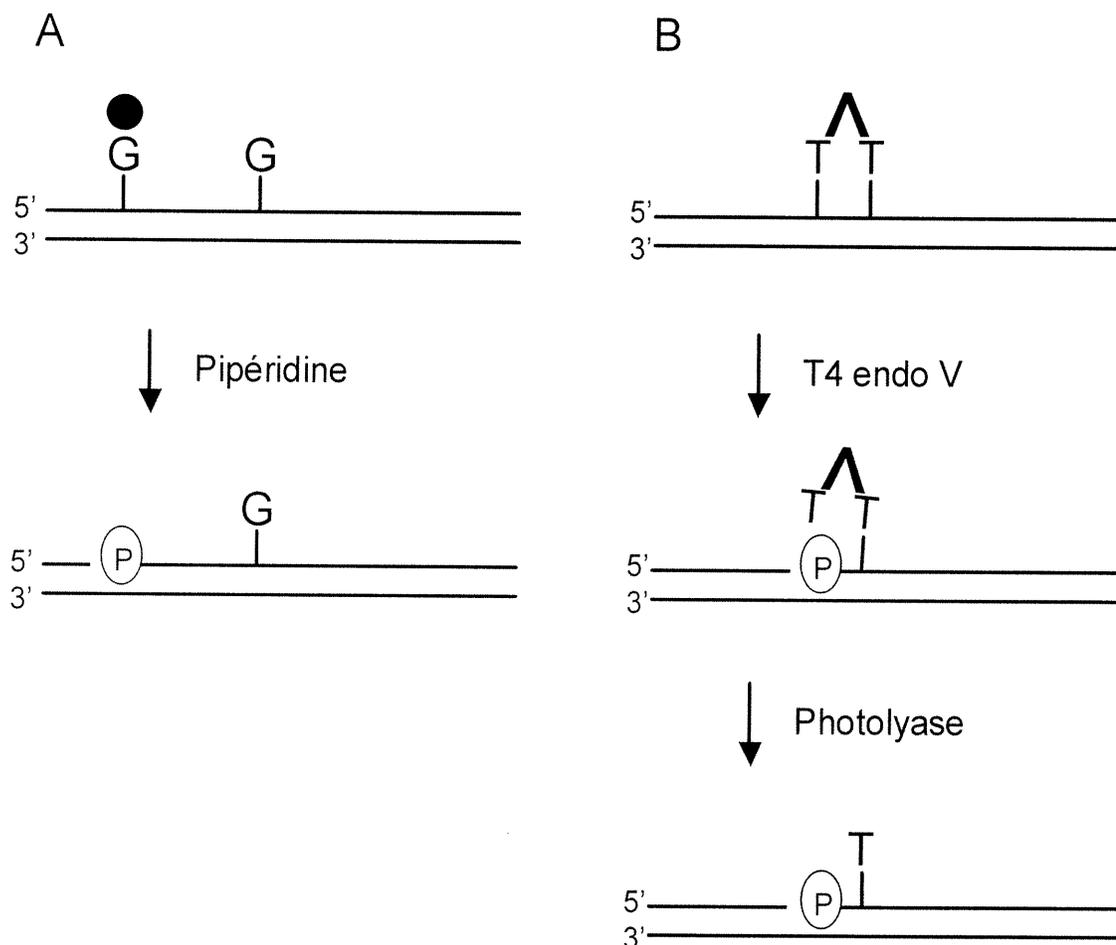


Figure 19. Conversion des dommages 7-méthylguanines et dimères cyclobutyliques de pyrimidines en cassure simple-brin

A. La pipéridine dépurine l'ADN au niveau des 7-méthylguanines et hydrolyse le lien désoxyribosephosphate du nucléotide de façon à laisser une extrémité 5' phosphate. **B.** La T4 endo V clive au niveau de la structure désoxyribosephosphate entre les deux nucléotides impliqués dans le dimère sans défaire le lien cyclobutylique. La photolyase est utilisée pour briser ce lien et laisser une extrémité 5' phosphate. P encadré : groupement phosphate libre en 5'.

mélange précédent 0,5 μg de photolyase (Pharmingén). Il est à noter que la photolyase doit être manipulée sous la lumière jaune. Les tubes ont ensuite été placés à 2-3 cm sous la lumière noire (360 nm), bouchons ouverts, pendant 1 h. À ce mélange, 190 μl de SDS 0,8 % et 2,5 μl de protéinase K 20 mg/ml ont été ajoutés. Une incubation de 2 h à 37° C a suivi. Le volume a ensuite été complété à 400 μl avec de l'eau et trois extractions successives ont été faites : une au phénol, une au phénol-chloroforme et une au chloroforme. L'ADN a ensuite été précipité à l'éthanol de façon standard en présence de 0,2 M de NaCl. Le culot d'ADN a été séché au lyophilisateur et redissous dans de l'eau à une concentration de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.4.2.5 Évaluation de la fréquence de cassure

Pour obtenir des signaux forts en fin de procédure, une fréquence de cassure de 1 cassure/500 b est idéale. Pour déterminer la fréquence de cassure, un échantillon d'ADN a été fractionné sur un gel d'agarose dénaturant. Pour ce faire, un gel d'agarose 1,5% contenant 50 mM de NaCl et 4 mM d'EDTA a été préparé. Ce gel a ensuite été baigné pendant 1 h dans un grand volume de tampon de migration alcalin (NaOH 30 mM et EDTA 2 mM). Les échantillons d'ADN à être chargés ont été préparés dans un volume de 20 μl comprenant 3 μg d'ADN traité, 6 μl de tampon alcalin (NaOH 100 mM et EDTA 4 mM) et 8 μl de tampon de chargement dénaturant (glycérol 50 %, NaOH 1 N et brocresol green 0,05 %). Les marqueurs ΦX 174 RF et lambda/HindIII ont chacun été préparés pour deux couloirs en mélangeant 2 μl de ΦX 174 RF (2 μg) ou 2 μl de lambda/HindIII (2 μg) avec 12 μl de tampon alcalin, 12 μl de tampon de chargement alcalin et 8 μl d'eau. Les échantillons ont été laissés à la température ambiante pendant 15-20 min avant le chargement. Les échantillons ont migré à 40-45 V (80 à 90mA) jusqu'à ce que le marqueur coloré atteigne 40-60% du gel. Le gel a ensuite été neutralisé dans 500 ml de Tris-HCl pH 8,0 0,5 M pendant 30 min. Après coloration au bromure d'éthidium, l'ADN a été photographié sous UV.

2.4.2.6 "Ligation-mediated polymerase chain reaction" (LMPCR)

Élongation. Le but de l'élongation est d'obtenir un bout franc à l'extrémité 5' de chacune des molécules d'ADN simples-brins située dans la région étudiée. La génération d'une extrémité franche est essentielle afin de permettre une ligation bouts-francs d'un adaptateur. Pour l'étape d'élongation avec l'enzyme Pfu DNA polymérase, 0,5 à 2 μg d'ADN sont généralement utilisés. La quantité d'ADN est fixée en fonction d'une fréquence de cassure particulière. Si un échantillon présente une fréquence de cassure supérieure à celle de la référence, on utilise une quantité d'ADN moindre et inversement dans une situation contraire. Notre quantité de référence a été de 1 μg pour une fréquence de cassure d'environ 1 cassure/500 b. Chaque sous-région (correspondant à la région couverte par une paire d'amorces) a été analysée sur des échantillons d'ADN des lignées cellulaires SJNB-7 et SK-N-FI ayant subi un traitement au DMS ou une irradiation aux UVC, *in vivo* ou *in vitro*. Chaque condition a été analysée en duplicata. Les produits des quatre réactions de séquençage selon Maxam et Gilbert ont aussi été analysés pour chaque sous-région.

Dans une première étape, pour chaque tube, l'ADN a été dénaturé par un chauffage à 98° C, pendant 3 min, dans un volume total de 25 μl contenant le tampon Pfu DNA polymérase (Tris-HCl pH 8,8 20 mM, MgSO_4 2 mM, NaCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, Triton X-100 0,1% et BSA 0,1 mg/ml) et 0,05 μM d'amorce 1 (tableau 4). Après refroidissement sur glace, les échantillons ont été incubés à une température de 48° C pendant 20 min. Les tubes ont ensuite été de nouveau refroidis sur glace. Pour l'élongation proprement dite, 5 μl d'un mélange contenant 1,5 mM des quatre dNTP (conc. finale : 0,25 mM) et 1,5 U de Pfu DNA polymérase *exo* a été ajouté aux tubes. Les tubes ont ensuite été incubés à la température correspondant à la température de dénaturation (T_m) de l'amorce 1 pendant 30 sec puis, à 75° C pendant 10 min après augmentation graduelle à un taux de 0,3° C/sec (thermocycleur PTC, MJ Research). Les tubes ont ensuite été placés sur glace.

Ligation de l'adapteur. Cette étape a pour but de liquer un adapteur aux extrémités 5'-P franches des fragments couvrant la région concernée. L'adapteur est asymétrique, c'est-à-dire que l'une de ses extrémités est franche (sans phosphate) alors que l'autre comporte une extension 5' (également non-phosphorylée). Ces caractéristiques permettent de prévenir deux événements: la ligation de l'adapteur aux fragments dans la mauvaise direction et la ligation entre deux molécules d'adapteur.

Aux réactions d'élongation, 45 μ l de mélange de ligation (Tris-HCl pH 7,4 50 mM, DTT 30 mM, ATP 1 mM, BSA 16,67 μ g/ml, adapteur L11-L25 2,22 μ M [L11 : 5'-GAATTCAGATC-3'; L25 : 5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3']) et T4 DNA ligase (BMC) 3,25 U a été mélangé à chaque échantillon. La ligation s'est déroulée pendant plus de 16 h à 18° C.

Amplification par PCR. La Taq DNA polymérase est généralement utilisée pour l'amplification PCR. Lorsque les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants, cette enzyme est remplacée par la Pfu DNA polymérase *exo*. Pour chaque paire d'amorces, l'enzyme qui a été utilisée pour l'amplification est indiquée au tableau 5.

Avant de procéder à l'amplification, l'ADN (produit de la réaction de ligation) a été précipité avec 2 M d'acétate d'ammonium, 1 mM de EDTA pH 8,0, 0,2 μ g/ μ l de glycogène et 2 volumes d'éthanol 100 %. Le culot d'ADN séché a été redissous dans 50 μ l d'eau.

Amplification. À l'ADN redissous dans 50 μ l d'eau, nous avons ajouté 50 μ l de mélange d'amplification pour la Taq DNA polymérase (tampon Taq 2 X [Tris-HCl pH 8,9 20 mM, gélatine 0,02 % (w/v), NaCl 80 mM], MgCl₂ 4 mM, 4 x dNTP 500 μ M, amorce LP25 200 nM, amorce 2 200 nM et Taq DNA polymérase 3 U) ou 50 μ l de mélange d'amplification pour la Pfu DNA polymérase (tampon Pfu 2 X [Tris-HCl pH 8,8 40 mM, MgSO₄ 4 mM, NaCl 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, Triton X-100 0,2 % et BSA 0,2 mg/ml], 4 x dNTP 500 μ M, amorce LP25 200 nM, amorce 2

Tableau 5. Combinaisons d'enzymes utilisées pour les réactions LMPCR dans chaque sous-région

Sous-région	DMS	CPD
	(enz. élong. - enz. amplif.)	(enz. élong. - enz. amplif.)
A1/A2	Pfu – Taq	Pfu – Taq
B1/B2	-	-
C1/C2	-	-
D1/D2	Pfu – Taq	Pfu – Taq
E1/E2	Pfu – Taq	Pfu – Taq
F1/F2	Pfu – Taq	Pfu – Taq
G1/G2	Pfu – Taq	Pfu – Taq
H1/H2	Pfu – Taq	Pfu – Taq
I1/I2	Pfu – Pfu	Pfu – Taq
J1/J2	Pfu – Pfu	Pfu – Taq
K1/K2	Pfu – Pfu	Pfu – Pfu
L1/L2	Pfu – Pfu	Pfu – Pfu
M1/M2	-	-
N1/N2	-	-

200 nM et Pfu polymérase exo⁻ 3,5 U). Les réactions se sont déroulées selon la procédure d'amplification décrite au tableau 6 (thermocycleur PTC, MJ Research).

Après l'amplification, 25 µl de tampon stop (NaOAc pH 5,2 1,56 M et EDTA 0,60 mM) a été ajouté à chacun des tubes. Une extraction avec 2 volumes de phénol-chloroforme (37 : 63) a été faite. L'ADN a ensuite été précipité de façon standard. Tous les culots d'ADN ont été resuspendus dans 7,5 µl de tampon de chargement (formamide 94 %, EDTA 2 mM, xylène cyanol 0,05 % et bromophénol bleu 0,05 %) sauf ceux des échantillons de séquençage Maxam et Gilbert qui l'ont été dans 15 µl du même tampon.

Révélation des produits de LMPCR. Afin de révéler les produits de LMPCR, ceux-ci ont été fractionnés sur un gel de séquençage, transférés sur des membranes de nylon, lesquelles ont été hybridées avec une sonde spécifique à la région étudiée.

Les produits de LMPCR ont d'abord été fractionnés sur un gel de séquençage. Pour ce faire, les échantillons dissous dans le tampon de chargement ont été dénaturés, par un chauffage de 2 min à 95° C, puis ont été placés sur glace. Environ la moitié de chacun des échantillons a été chargée sur le gel (polyacrylamide 8 %, urée 7 M et TBE 0,5 X). La migration a été effectuée à 120 V, à une température n'excédant pas 50° C, jusqu'à ce que le xylène cyanol (bleu migrant le plus lentement) ait atteint le bas du gel (environ 4 h). Les fragments ont ensuite été transférés sur une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim) par électrotransfert à 2 A pendant 45 min avec du TBE 1 X comme tampon. L'ADN transféré a ensuite été fixé à la membrane par une irradiation aux UV.

Les membranes ont été préhybridées à une température de 60-68° C pendant 20 min avec le tampon d'hybridation (phosphate de sodium pH 7,2 250 mM, EDTA 1mM, SDS 7 % et BSA 1 %). Le tampon utilisé pour la préhybridation a été remplacé par du tampon d'hybridation contenant la totalité de la sonde (voir

Tableau 6. Étapes d'amplification de la méthode LMPCR

Cycles	1) Dénaturation		2) Hybridation	3) Élongation
	Pfu	Taq	Pfu et Taq	Pfu (T° = 75° C) et Taq (T° = 74° C)
	T° (° C) et temps (sec)	T° (° C) et temps (sec)	T° (° C) et temps (sec)	Temps (sec)
0	-	93 pour 120	-	-
1	98 pour 300	98 pour 150	Tm pour 180	180
2	98 pour 120	95 pour 60	Tm - 1° C pour 150	180
3	98 pour 60	95 pour 60	Tm - 2° C pour 120	180
4	98 pour 30	95 pour 60	Tm - 3° C pour 120	180
5	98 pour 20	95 pour 60	Tm - 4° C pour 90	150
6 à 18	Répéter le cycle 5, 13 fois en ajoutant 5 sec/cycle à l'hybridation et à l'élongation			
19	98 pour 20	95 pour 60	Tm - 3° C pour 240	240
20	98 pour 20	95 pour 60	Tm - 2° C pour 240	240
21	98 pour 20	95 pour 60	Tm - 1° C pour 240	240
22	98 pour 20	95 pour 60	Tm pour 240	600

L'étape d'amplification de la méthode LMPCR se fait en 22 cycles. Pour chaque cycle, les étapes suivantes se déroulent dans l'ordre : 1) dénaturation, 2) hybridation et 3) élongation. Le tableau présente les conditions qui s'appliquent à chacune des étapes selon l'enzyme utilisée (Pfu DNA polymérase ou Taq DNA polymérase).

plus loin). L'hybridation s'est déroulée pendant plus de 16 h à 60-68° C. Les membranes ont ensuite été lavées pendant 10 min à température ambiante avec une solution contenant 20 mM de phosphate de sodium pH 7,2, 1 mM de EDTA, 0,25 % de BSA et 2,5 % de SDS préchauffée à une température de 4° C supérieure à la température d'hybridation. Trois autres lavages de 10 min à température ambiante ont été faits avec une solution contenant 20 mM de phosphate de sodium pH 7,2, 1 mM de EDTA et 1 % SDS préchauffée à une température de 4° C supérieure à la température d'hybridation. Une autoradiographie a ensuite été faite en exposant un film (Kodak, X-OMAT) à la membrane hybridée pendant 0,5 à 8 h à -70° C sous écrans pour amplifier les signaux.

La sonde a été produite par élongations multiples de l'amorce 2 hybridée à l'un ou l'autre des gabarits correspondant à la région d'intérêt, soit MET1-5 ou MET2-6 (section 2.5). La réaction a été produite dans un volume total de 150 µl contenant 20 ng du fragment MET2-6 ou MET1-5, 1 X de tampon pour la Taq DNA polymérase (Tris-HCl pH 8,9 10 mM, NaCl 40 mM et gélatine 0,01 % (w/v)), 2 mM de MgCl₂, 130 nM des quatre dNTP, 0,5 µM de l'amorce 2 (tableau 4), 2,5 U de Taq DNA polymérase et 100 µCi de [α ³²P]-dCTP (New England Nuclear). La réaction s'est déroulée selon le protocole suivant : 1 cycle à 97° C pour 3 min, 30 cycles à 95 ° C pour 1 min, 60-68° C (selon le T_m de l'amorce) pour 2 min et 74° C pour 3 min (thermocycleur PTC, MJ Research). L'ADN a ensuite été précipité avec 2,5 M d'acétate d'ammonium, 20 µg de glycogène et 2 volume d'éthanol 100 %. Le précipité a été redissous dans 100 µl de TE.

2.5 Synthèse des gabarits MET2-6 et MET1-5 pour la génération de sondes

Les fragments de PCR MET2-6 et MET1-5 ont servi de gabarits pour la synthèse des sondes pour l'étape d'hybridation de la méthode LMPCR. La sonde MET2-6 utilisée dans l'essai de méthylation par hybridation Southern a été synthétisée à partir du fragment MET2-6. Les fragments MET2-6 et MET1-5 n'ont pas été générés directement à partir d'amorces situées à leurs extrémités car nous

n'avons pu réunir les conditions permettant leur amplification. Chacun de ces fragments sont plutôt issus de la fusion de deux produits de PCR, MET2-6 des deux fragments MET2S/2A et MET6S/6A, et MET1-5 des deux fragments MET1S/1A et MET5S/5A (figure 20). Les produits de PCR à fusionner ont été mélangés, après quoi une dénaturation et une réhybridation entre eux ont suivi (figure 20). Les produits de PCR à fusionner se chevauchant à l'une de leurs extrémités, une élongation subséquente a généré des molécules comprenant la séquence des deux fragments de PCR à fusionner (figure 20). Une amplification PCR, utilisant les amorces correspondant aux extrémités des molécules de fusion, a ensuite été faite (figure 20) et le produit d'amplification a été purifié.

Synthèse du fragment MET1S/1A. Ce fragment a été amplifié dans un volume de 100 μ l total contenant 50 ng d'ADN génomique, 1 X de tampon A pour l'eLONGase (Tris-SO₄ pH 9,1 60 mM, (NH₄)₂SO₄ 18 mM et MgSO₄ 1 mM; Gibco-BRL), 200 μ M de chacun des quatre dNTP (Pharmacia Biotech ou Gibco-BRL), 0,2 μ M des amorces MET1S et MET1A (tableau 4), 8 % de DMSO et 2 U d'eLONGase (Gibco-BRL). L'amplification s'est déroulée selon le protocole suivant (Thermocycleur Perkin-Elmer, modèle 480) : 1 cycle à 94° C pour 2 min, 40 cycles à 94° C pour 1 min, 51° C pour 30 sec et 72° C pour 1 min puis 1 cycle à 72 ° C pour 10 min.

Synthèse des fragments MET5S/5A et MET6S/6A. L'amplification de ces fragments a été faite dans un volume total de 100 μ l contenant 50 ng d'ADN génomique, 0,5 X de tampon A pour l'eLONGase (Tris-SO₄ pH 9,1 30 mM, (NH₄)₂SO₄ 9 mM et MgSO₄ 0,5 mM; Gibco-BRL), 0,5 X de tampon B pour l'eLONGase (Tris-SO₄ pH 9,1 30 mM, (NH₄)₂SO₄ 9 mM et MgSO₄ 1 mM; Gibco BRL), 200 μ M de chacun des quatre dNTP (Pharmacia Biotech ou Gibco-BRL), 0,2 μ M des amorces MET5S et MET5A ou MET6S et MET6A (tableau 4) et 2 U d'eLONGase (Gibco-BRL). L'amplification s'est déroulée selon le protocole suivant (thermocycleur Perkin-Elmer, modèle 480) : 1 cycle à 94° C pour 2 min, 40 cycles à 94° C pour 1 min, 51° C pour 30 sec et 72° C pour 1 min puis 1 cycle à 72° C pour 10 min.

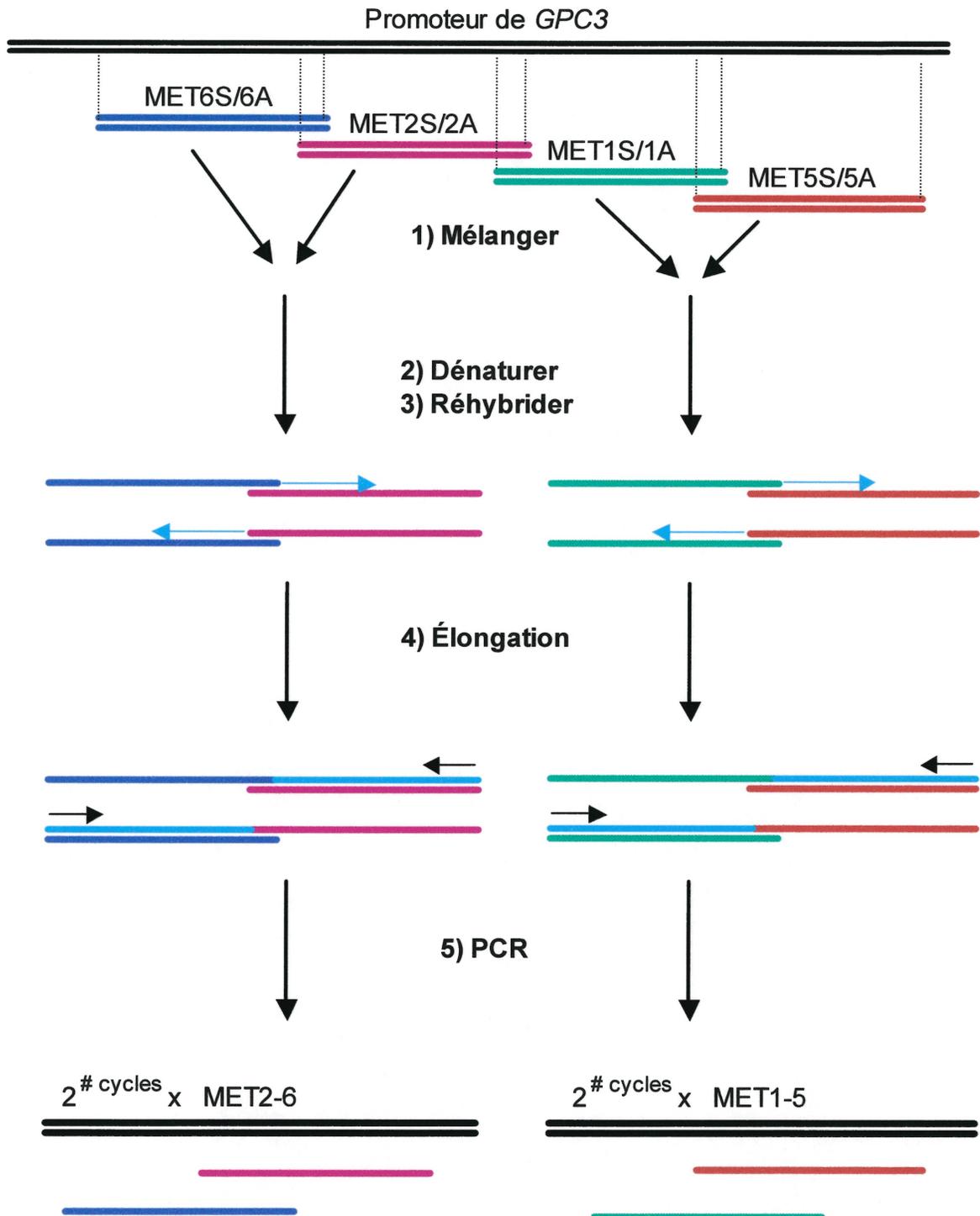


Figure 20. Procédure utilisée pour la synthèse des fragments MET2-6 et MET1-5

Flèches bleues pâles : direction de l'élongation; les couleurs indigo, rose, rouge et vert correspondent aux fragments initiaux à fusionner; bleu pâle : ADN polymérisé lors de l'élongation; flèches noires : amorces pour amplification PCR.

Synthèse du fragment MET2S/2A. Ce fragment a été amplifié dans un volume total de 100 µl contenant 50 ng d'ADN génomique, 1 X de tampon « GC Genomic PCR Reaction Buffer » (Tris-HCl pH 9,3 40 mM, KOAc 85 mM, DMSO 5 % et Triton X-100 0,1 %; Clontech), 1,1 mM Mg(OAc)₂, 200 µM de chacun des quatre dNTP (Pharmacia Biotech ou Gibco-BRL), 1 M de GC-melt (composition non-divulguée; Clontech), 0,4 µM des amorces MET2S et MET2A (tableau 4) et 1 X du mélange polymérase « Advantage-GC Genomic Polymerase Mix » (Tth DNA polymerase 1 U, anticorps TthStart 0,01 µg/µl, glycérol 1 %, Tris-HCl pH 7,5 0,2 mM, EDTA 1,5 µM, DTT 15 µM, BSA 3,75 µg/ml; Clontech). L'amplification s'est déroulée selon le protocole suivant (thermocycleur Perkin-Elmer, modèle 480) : 1 cycle à 95° C pour 1 min, 40 cycles à 95° C pour 30 sec, 58° C pour 30 sec et 68° C pour 2 min puis 1 cycle à 68° C pour 10 min.

Après migration sur un gel d'agarose 1 %, les quatre produits de PCR (MET1S/1A, MET2S/2A, MET5S/5A et MET6S/6A) ont été découpés puis l'agarose a été éliminé par centrifugation sur laine de verre. L'ADN a ensuite été purifié à l'aide d'une colonne « Qiaquick PCR purification kit » (Qiagen) selon la procédure du fabricant.

Fusion des fragments MET1S/1A-MET5S/5A et MET2S/2A-MET6S/6A. Les fragments MET1S/1A et MET5S/5A puis MET2S/2A et MET6S/6A ont été fusionnés dans un volume total de 10 µl contenant 10 ng de chacun des deux fragments à fusionner, 1 X de tampon « GC Genomic PCR Reaction Buffer » (Tris-HCl pH 9,3 40 mM, KOAc 85 mM, DMSO 5 % et Triton X-100 0,1 %; Clontech), 1,1 mM Mg(OAc)₂, 200 µM de chacun des quatre dNTP (Pharmacia Biotech ou Gibco-BRL), 1 M de GC-melt (composition non-divulguée; Clontech) et 1 X du mélange polymérase « Advantage-GC Genomic Polymerase Mix » (Tth DNA polymerase 1 U, anticorps TthStart 0,01 µg/µl, glycérol 1 %, Tris-HCl pH 7,5 0,2 mM, EDTA 1,5 µM, DTT 15 µM et BSA 3,75 µg/ml; Clontech). Les fragments ont été fusionnés en faisant 10 cycles d'élongation selon la procédure suivante (thermocycleur Perkin-Elmer, modèle 480) : pour MET1-5, 1 cycle à 95° C pour 1 min, 10 cycles à 95° C

pour 1 min, 55° C pour 1 min et 68 ° C pour 2 min puis 1 cycle à 68° C pour 5 min; pour MET2-6, 1 cycle à 95° C pour 1 min, 10 cycles à 95° C pour 30 sec et 68° C pour 2 min puis 1 cycle à 68° C pour 5 min. Pour l'amplification des produits de fusion, un volume de 10 µl contenant 1 X de tampon « GC Genomic PCR Reaction Buffer », 1,1 mM Mg(OAc)₂, 200 µM des quatre dNTP, 1 M de GC-melt, 0,4 µM des amorces MET1A et MET5S ou MET6A et MET2S (tableau 4) et 1 X du mélange polymérase « Advantage-GC Genomic Polymerase Mix » a été ajouté. L'amplification s'est déroulée selon le protocole suivant (thermocycleur Perkin-Elmer, modèle 480) : 1 cycle à 95° C pour 1 min, 40 cycles à 95° C pour 30 sec, 50° C pour 30 sec et 68° C pour 2 min puis 1 cycle à 68° C pour 10 min. Après migration sur un gel d'agarose 1 %, le fragment fusionné a été découpé puis l'agarose a été éliminé par centrifugation sur laine de verre. L'ADN a ensuite été purifié à l'aide d'une colonne « Qiaquick PCR purification kit » (Qiagen) selon la procédure du fabricant.

2.6 Essai de détermination du sexe par PCR

L'essai de détermination du sexe par PCR est basé sur le fait que les chromosomes X et Y présentent chacun une région étant homologue à 90 %, lesquelles correspondent aux gènes *amélogénine*, situé sur le chromosome X et *amélogénine-like*, situé sur le chromosome Y (Nakahori *et al.*, 1991). Ces deux gènes peuvent être amplifiés à l'aide des mêmes amorces générant des produits de PCR de tailles différentes, spécifiques à chacun des gènes (Nakahori *et al.*, 1991).

Les réactions d'amplification ont été faites dans un volume total de 20 µl contenant 100 ng d'ADN génomique, 1 X de tampon pour la Taq DNA polymérase (Tris HCl pH 8,4 20 mM et KCl 50 mM; Gibco-BRL), 1,5 mM de MgCl₂, 150 µM des quatre dNTP, 0,5 µM des amorces AMXY-F et AMXY-R (tableau 4) et 0,5 U de Taq DNA polymérase (Gibco-BRL). Les réactions se sont déroulées selon la procédure suivante : 1 cycle à 94° C pour 5 min, 30 cycles à 94° C pour 45 sec, 60° C pour 1 min et 72 ° C pour 45 sec puis 1 cycle à 72 ° C pour 7 min. Les

produits de PCR ont été fractionnés sur un gel de polyacrylamide 8 % et photographiés sous rayons UV après coloration au bromure d'éthidium.

2.7 Amplification PCR des marqueurs microsatellites

Nous avons amplifié par PCR les microsatellites DXS102, DXS538 et DXS981 afin de mettre en évidence la présence éventuelle de deux chromosomes X dans un échantillon d'ADN de garçon.

Les amplifications PCR ont été faites dans un volume total de 20 μ l contenant 100 ng d'ADN génomique, 1 X de tampon pour la Taq DNA polymérase (Tris HCl pH 8,4 20 mM et KCl 50 mM; Gibco-BRL), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 μ M de dATP + dGTP + TTP, 0,025 μ M de dCTP, 1,25 μ Ci de $[\alpha^{32}P]$ -dCTP, 0,6 μ M d'amorces (DXS102-F/DXS102-R ou DXS538-F/DXS538-R ou DXS981-F/DXS981-R; tableau 4) et 0,5 U de Taq DNA polymérase (Gibco-BRL). L'amplification du microsatellite DXS102 s'est déroulée selon la procédure suivante : 1 cycle à 95° C pour 2 min, 30 cycles à 94° C pour 45 sec, 55° C pour 45 sec et 72° C pour 1 min puis 1 cycle à 72° C pour 10 min. L'amplification des microsatellites DXS538 et DXS981 s'est déroulée selon la procédure suivante : 1 cycle à 95° C pour 2 min, 30 cycles à 94° C pour 45 sec, 57° C pour 45 sec et 72° C pour 1 min puis 1 cycle à 72° C pour 10 min. Les produits de PCR ont été migrés sur un gel de séquençage (polyacrylamide 6 % et urée 7 M). Une autoradiographie a ensuite été faite en exposant un film (Kodak, X-OMAT) au gel à -70° C sous écrans pour amplifier les signaux.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

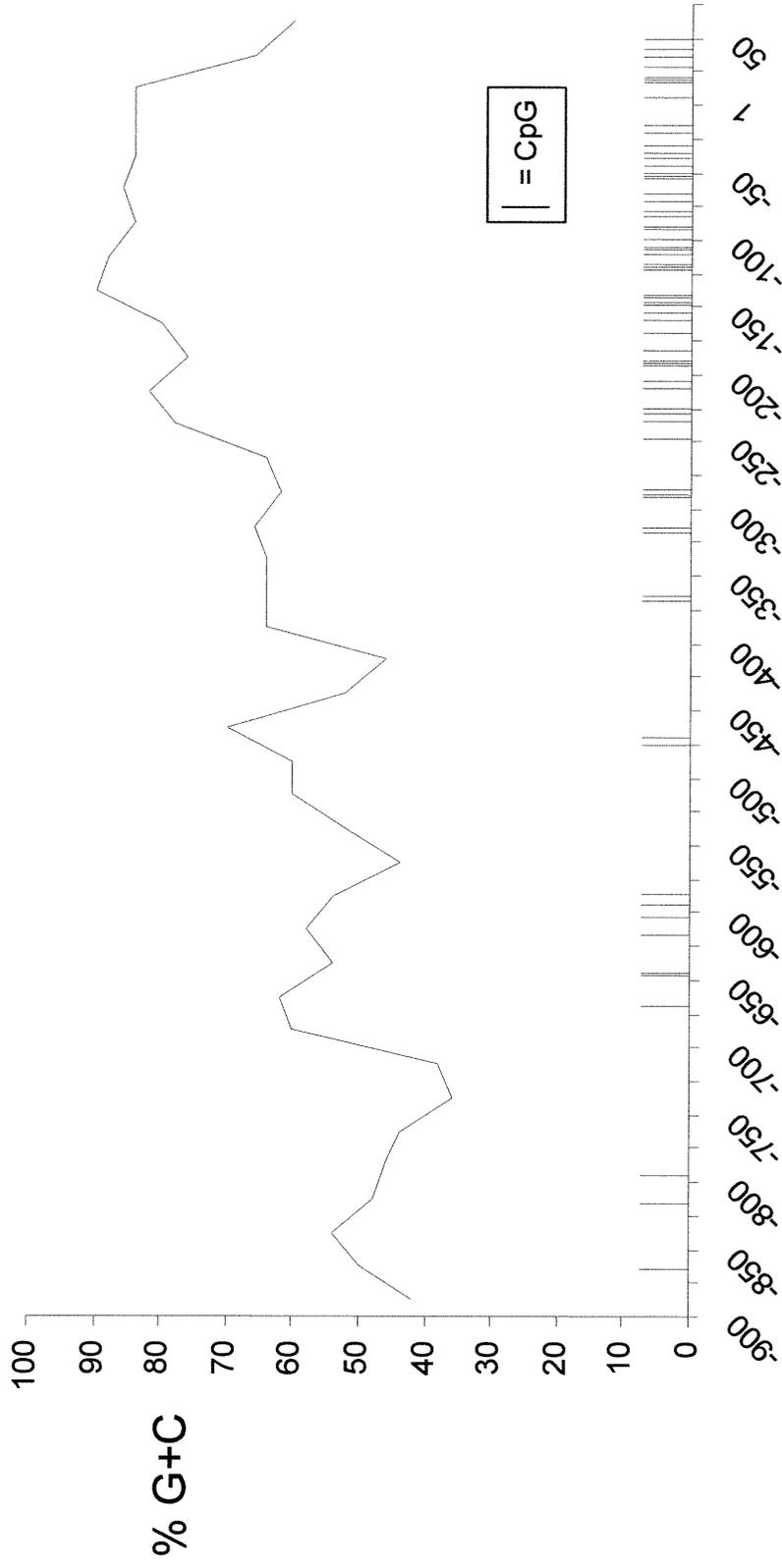
Suite à la mise en évidence de l'expression du gène *GPC3* dans certains NB et dans toutes les WT analysées (Saikali et Sinnett, 2000), nous avons voulu comprendre les mécanismes de régulation impliqués dans la transcription de ce gène. À cette fin, nous avons déterminé le profil de méthylation et cartographié les sites d'interactions ADN-protéines au niveau du promoteur du gène *GPC3*.

3.1 Étude de la méthylation

Une étude d'expression effectuée sur des carcinomes hépatiques a montré que *GPC3* était surexprimé de façon préférentielle chez les femmes (femmes : 95 % vs hommes : 67 % ; Hsu *et al.*, 1997). Du fait que *GPC3* est un gène lié au chromosome X et qu'il est généralement accepté que la méthylation est impliquée dans le maintien de l'inactivation des gènes sur le chromosome X inactif (Monk, 1986), l'étude de Hsu *et al.* (1997) soulevait la possibilité que des anomalies de méthylation puissent être impliquées dans la dérégulation de l'expression de *GPC3* telle que celle observée dans les tumeurs embryonnaires qui nous intéressent. Nous avons donc mené une étude visant à évaluer l'implication de la méthylation dans l'expression de *GPC3*.

Un îlot CpG, s'étendant sur environ 2,5 kb, chevauche le promoteur et le premier exon de *GPC3* (Huber *et al.*, 1997) (figures 1 et 21). La densité des sites CpG est particulièrement élevée dans la partie proximale du promoteur où la composition en nucléotides G+C atteint un pic de 90 % (figure 21).

Les CpG situés à l'intérieur de 6 sites de restriction HpaII, soit 2 sites distaux (-616 et -586) et 4 sites proximaux (-204, -155, -90 et -83), ont été investigués à l'aide de l'essai de méthylation par PCR (figure 12 : sites en bleu; figure 13). Cette méthode présente l'avantage d'être relativement rapide en plus d'être très sensible et de nécessiter peu d'ADN (voir section 2.2 pour détails). Après digestion de



Position dans le promoteur

Figure 21. Contenu en nucléotides G+C et en dinucléotides CpG du promoteur du gène GPC3

La courbe a été réalisée en calculant le pourcentage en G+C d'une fenêtre de 50 nucléotides en aval de chaque position évaluée allant de -900 à +100 par bonds de 25 nucléotides.

l'ADN génomique de différents échantillons avec les enzymes HpaII (sensible à la méthylation) et MspI (isoschizomère de HpaII, insensible à la méthylation), une amplification par PCR de fragments comprenant ces sites a été faite avec les paires d'amorces B2-L2 et E2-J2 (tableau 4; figure 13). L'obtention d'un signal d'amplification, qui n'était possible qu'à partir de molécules non-clivées, signifiait que des groupements méthyles étaient présents au niveau des sites investigués (figure 10).

Quatre autres sites CpG ont été investigués à l'aide de l'essai de méthylation par hybridation Southern (figure 12 : sites en rouge). Ceux-ci sont situés à l'intérieur de 3 sites de reconnaissance d'endonucléases sensibles à la méthylation, soit BssHII (2 sites : -291 et -289), SacII (1 site : -141) et EagI (1 site : -83) (figure 14). Un fragment HindIII, d'une longueur d'environ 6,15 kb, a d'abord été généré, après quoi une digestion avec l'une ou l'autre de ces trois enzymes a été effectuée (figure 15). Le profil de méthylation a ensuite été révélé par hybridation Southern avec la sonde MET2-6 (figures 10 et 15). L'obtention d'un signal de haut poids moléculaire signifiait que des molécules méthylées au niveau des sites investigués étaient présentes dans l'échantillon alors qu'un signal de plus faible poids moléculaire correspondait à des molécules non-méthylées (figures 10 et 15). Bien que l'essai de méthylation par hybridation Southern nécessite une plus grande quantité et une meilleure qualité d'ADN que l'essai par PCR, il a le grand avantage d'être quantitatif en plus de permettre la visualisation des molécules non-méthylées aussi bien que de celles méthylées.

3.1.1 La méthylation du promoteur de *GPC3* dans les cellules normales

Puisque le statut de méthylation du promoteur d'un gène corrèle souvent avec le statut d'expression, notre analyse a été faite sur des cellules normales exprimant ou non *GPC3* (*GPC3+* et *GPC3-*, respectivement). Ainsi, l'essai de méthylation par PCR a été effectué sur de l'ADN génomique de 14 échantillons de sang périphérique (*GPC3-*) et de 11 échantillons de placentas (*GPC3+*) (voir section 2.1). L'essai de méthylation Southern a également été effectué sur les échantillons parmi ceux-ci dont la quantité d'ADN était suffisante et l'intégrité

adéquate.

Les résultats de l'essai de méthylation par PCR sur les échantillons normaux ont révélé une tendance nette : les échantillons de filles étaient méthylés alors que ceux des garçons ne l'étaient pas, et ce indépendamment du statut d'expression (figure 22 et 23, tableau 7). L'essai par hybridation Southern a révélé que la méthylation chez les filles était partielle et que le rapport entre les signaux de méthylation et de non-méthylation étaient d'environ 1:1 (figure 24; tableau 7). Ces résultats suggèrent que la méthylation observée chez les filles ne touche qu'un seul allèle, probablement celui lié au X inactif. De plus, le fait que *GPC3* ne soit pas exprimé dans le sang périphérique des garçons indique que la méthylation ne semble pas nécessaire à la répression du gène.

Les résultats de deux échantillons dérogent à la tendance observée, soit ceux des placentas #25 et #32 (figures 23 et 24). Dans le cas de l'échantillon de fille #25, l'essai par PCR a montré qu'au moins un site de la région proximale n'était pas méthylé (figure 23; tableau 7). Toutefois, le fait que l'essai par hybridation Southern sur cet échantillon montre un profil tout à fait semblable aux autres échantillons de filles suggère que la méthylation du promoteur de *GPC3* de cet échantillon n'affecte pas la totalité des sites CpG (tableau 7). L'échantillon du garçon #32 ne présentait pas lui non plus un profil semblable à celui de la tendance, ni à l'essai par PCR (méthylation), ni à l'essai par hybridation Southern (méthylation partielle) (figures 23 et 24; tableau 7). Cette méthylation partielle peut être expliquée de trois façons: i) il y a eu erreur sur le sexe ; ii) le garçon présentait un syndrome de Klinefelter (caryotype 47,XXY) ou iii) les cellules de placenta étaient hétérogènes du point de vue de la méthylation de *GPC3*. Afin d'écarter la première hypothèse, nous avons fait un test PCR avec des amorces capables d'amplifier des régions de différentes longueurs au niveau des chromosomes X et Y. Il s'est avéré que l'échantillon #32 est de sexe masculin puisque des bandes correspondant au fragment du X et du Y ont été obtenues (figure 25 A). Ensuite, nous avons amplifié, par PCR, trois marqueurs microsatellites situés sur le chromosome X (DXS102, DXS528 et DXS981) afin de déterminer si l'échantillon contenait plus d'un chromosome X. Des bandes uniques ont été obtenues avec

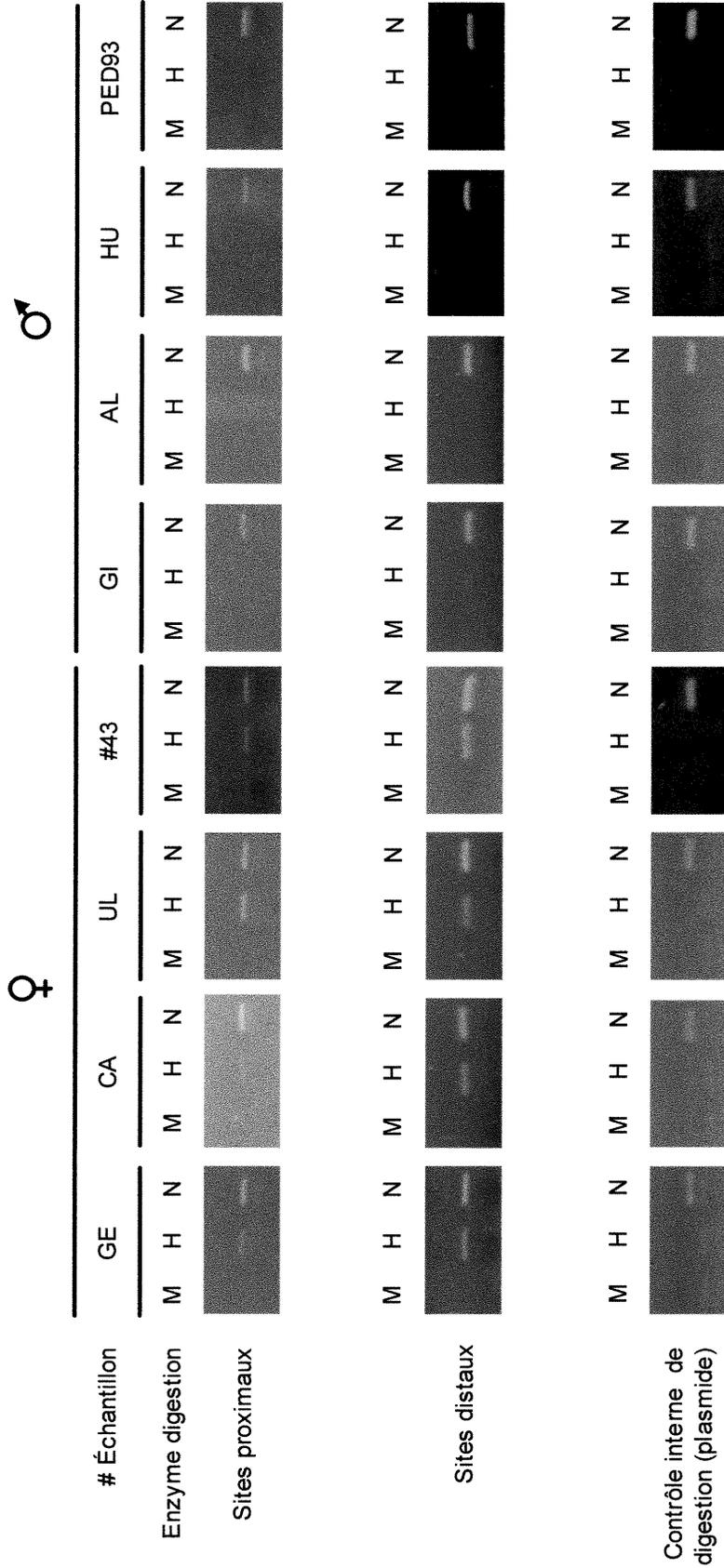


Figure 22. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de sang périphérique, qui n'expriment pas GPC3
 Pour chaque échantillon : H : digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation; M : digestion avec l'enzyme MspI, insensible à la méthylation; N : ADN non-digéré. Se référer aux figures 12 et 13 pour les détails concernant les sites proximaux et distaux étudiés. ♀ : femme; ♂ : homme.

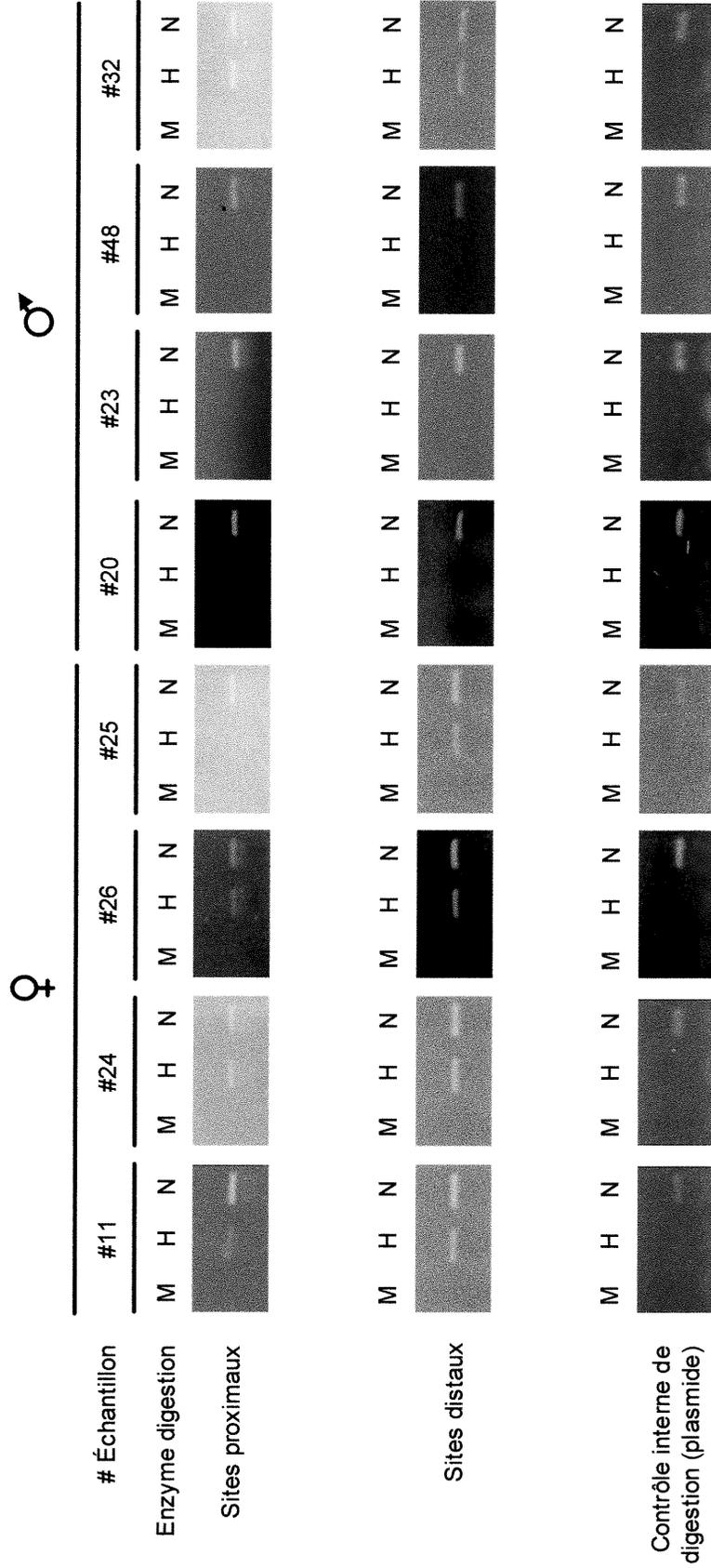


Figure 23. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de placentas, qui expriment GPC3

Pour chaque échantillon : H : digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation; M : digestion avec l'enzyme MspI, insensible à la méthylation; N : ADN non-digéré. Se référer aux figures 12 et 13 pour les détails concernant les sites proximaux et distaux étudiés. ♀ : femme; ♂ : homme.

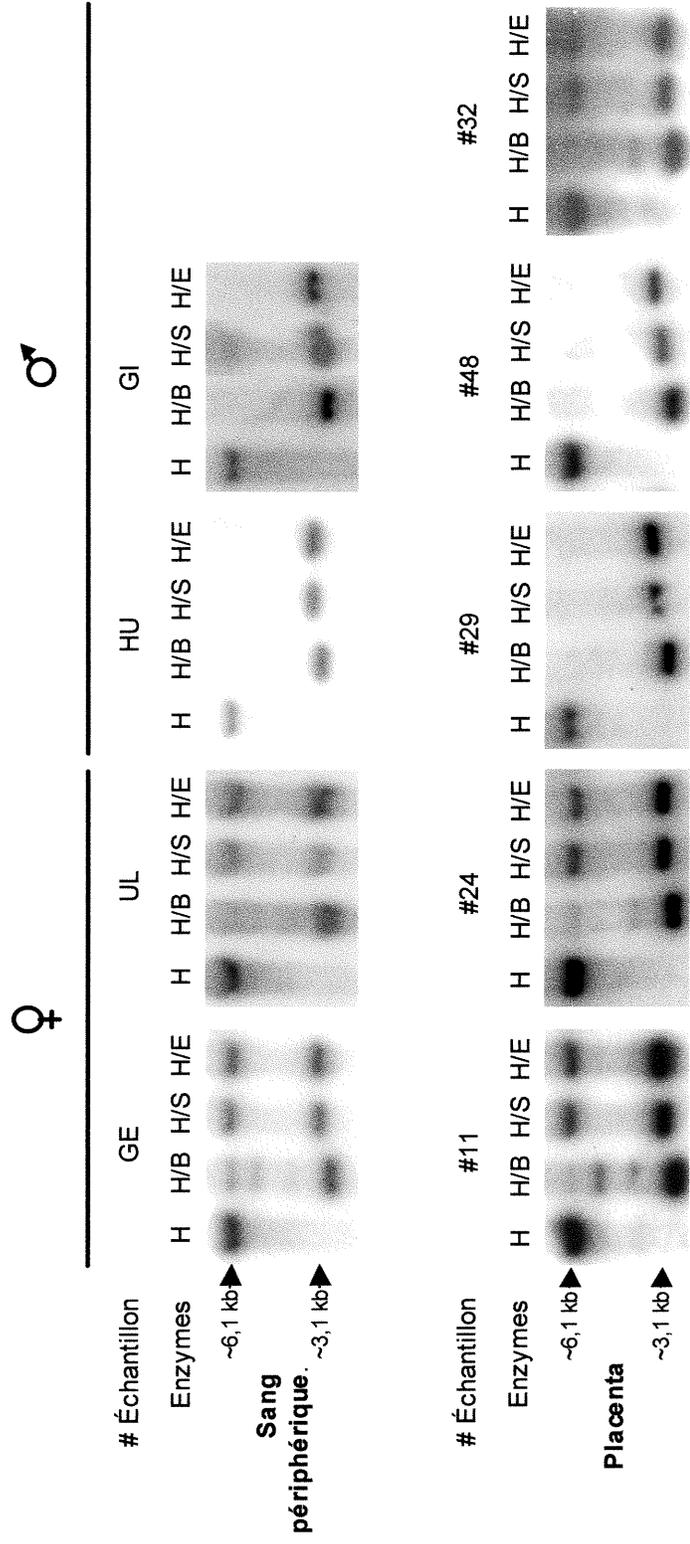


Figure 24. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des cellules normales
 Enzymes de restrictions : H : HindIII; B : BssHII; S : SacII; E : EagI. ♀ : femme; ♂ : homme.

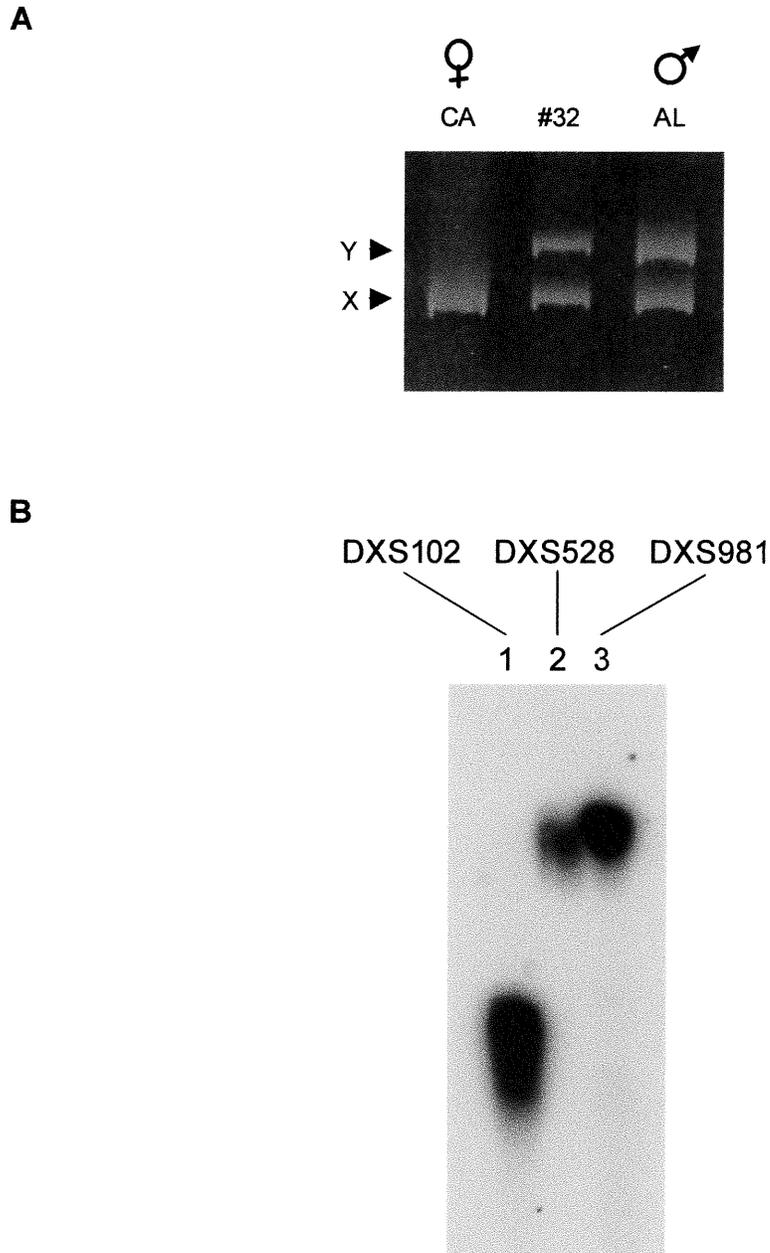


Figure 25. Détermination du sexe et du nombre de chromosomes X présents dans l'échantillon de placenta #32

A. Un PCR capable d'amplifier des fragments de différentes longueurs sur les chromosomes X et Y a été fait avec de l'ADN génomique des échantillons CA (contrôle fille), #32 et AL (contrôle garçon). **B.** Autoradiographie des produits de PCR des microsatellites DSX102, DSX528 et DSX981 amplifiés à partir d'ADN génomique provenant de l'échantillon de placenta #32.

Tableau 7. Sommaire des résultats de l'étude de méthylation dans les cellules normales

Échantillon	Origine	^a Sexe	^b Statut de méthylation (essai PCR)			^c Statut de méthylation (Essai Southern-blot)		
			Sites proximaux	Sites distaux	Eagl	SacII	BssHI	
			+	+	+/-	+/-	+/-	
GE	Sang périph.	F	+	+	+/-	+/-	+/-	
CA	Sang périph.	F	+	+	+/-	+/-	+/-	
UL	Sang périph.	F	+	+	+/-	+/-	+/-	
CP41	Sang périph.	F	+	+	nd	nd	nd	
CP42	Sang périph.	F	+	+	nd	nd	nd	
CP43	Sang périph.	F	+	+	nd	nd	nd	
GI	Sang périph.	M	-	-	-	-	-	
AL	Sang périph.	M	-	-	-	-	-	
HU	Sang périph.	M	-	-	-	-	-	
PED 93	Sang périph.	M	-	-	nd	nd	nd	
CP111	Sang périph.	M	-	-	nd	nd	nd	
CP112	Sang périph.	M	-	-	nd	nd	nd	
CP113	Sang périph.	M	-	-	nd	nd	nd	
CP114	Sang périph.	M	-	-	nd	nd	nd	
#11	Placenta	F	+	+	+/-	+/-	+/-	
#24	Placenta	F	+	+	+/-	+/-	+/-	
#25	Placenta	F	-	+	+/-	+/-	+/-	
#26	Placenta	F	+	+	nd	nd	nd	
#27	Placenta	F	+	+	nd	nd	nd	
#28	Placenta	F	+	+	nd	nd	nd	
#20	Placenta	M	-	-	nd	nd	nd	
#23	Placenta	M	-	-	nd	nd	nd	
#29	Placenta	M	-	-	-	-	-	
#32	Placenta	M	+	+	nd	nd	+/-	
#48	Placenta	M	-	-	-	-	-	

a : F : féminin; M : masculin. b : + : méthylé; - : non-méthylé. c : + : signal de méthylation; - : signal de non-méthylation; nd : non-déterminé.

les trois marqueurs (figure 25 B). Étant donné le caractère hautement polymorphique de ces marqueurs, ces résultats suggèrent fortement que l'échantillon #32 ne possède pas deux chromosomes X. Il semble donc que les cellules du placenta #32 étaient hétérogènes du point de vue de la méthylation du gène *GPC3*.

Afin d'appuyer l'hypothèse que la méthylation partielle observée chez les filles soit liée au chromosome X inactif, nous avons déterminé le profil de méthylation du promoteur de *GPC3* dans des échantillons d'ADN de sang périphérique provenant de filles présentant le syndrome de Turner (voir section 2.1). Ce syndrome est caractérisé cytogénétiquement par la présence d'un seul chromosome X complet, ce dernier étant toujours actif (Ross *et al.*, 2000). L'analyse du profil de méthylation de filles dépourvues de chromosome X inactif nous permettrait d'associer par défaut la méthylation observée chez les filles normales au chromosome X inactif. Deux échantillons de caryotype 45, X (Catherine Hamelin, communication personnelle) ont été analysés au niveau des sites proximaux et distaux du promoteur de *GPC3* et aucun signal de méthylation n'a été détecté (figure 26). La méthylation observée chez les filles est donc le plus vraisemblablement liée au X inactif.

Malgré les exceptions observées, la méthylation partielle chez les filles et l'absence de méthylation chez les garçons semble constituer la tendance générale dans les tissus normaux évalués. Par conséquent, cette tendance sera considérée comme la « normalité » pour l'interprétation des résultats des tissus tumoraux.

3.1.2 La méthylation du promoteur de *GPC3* dans les tumeurs embryonnaires

Avant d'aborder cette section, il importe de mentionner la convention utilisée pour faciliter l'interprétation des résultats à la limite de détection. Pour l'essai par PCR, lorsque le signal de méthylation observé était d'une intensité à peine perceptible à l'œil nu et que cette intensité ne représentait qu'une faible proportion par rapport à celle du contrôle positif, l'appellation « trace » (tr) a été utilisée pour

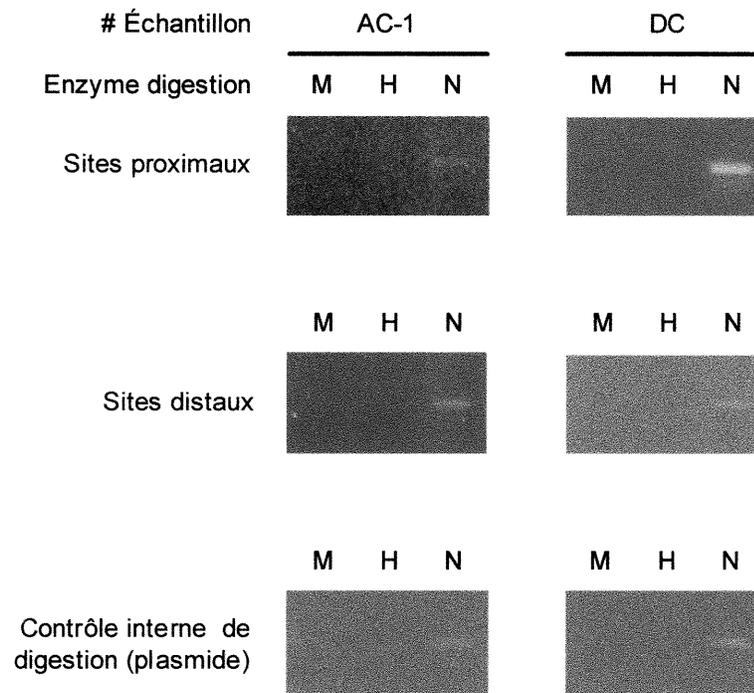


Figure 26. Essai de méthylation par PCR sur de l'ADN génomique d'échantillons de caryotype 45,X (syndrome de Turner)

Pour chaque échantillon : H : digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation; M : digestion avec l'enzyme MspI, insensible à la méthylation; N : ADN non-digéré. Se référer aux figures 12 et 13 pour les détails concernant les sites proximaux et distaux étudiés.

décrire le résultat. De même, pour l'essai par hybridation Southern, lorsqu'un signal était d'une intensité très faible par rapport à un autre situé dans le même couloir, l'appellation « trace » (tr) a aussi été utilisée pour décrire le résultat.

Le profil de méthylation du promoteur de *GPC3* a été déterminé par l'essai PCR dans des échantillons d'ADN de 9 lignées cellulaires de NB (voir section 2.1). Dans les lignées de garçons, le profil de méthylation suivait la tendance observée dans les tissus normaux, soit une absence de méthylation (figure 27; tableau 8). Toutefois, chez les filles, deux échantillons sur trois présentaient des anomalies de méthylation par rapport aux tissus normaux, soit SK-N-AS et SK-N-SH (figure 27; tableau 8). L'essai de méthylation par hybridation Southern a ensuite été effectué avec 6 de ces échantillons. Les résultats ont été similaires à ceux obtenus avec l'essai par PCR, ne relevant d'anomalies de méthylation que dans les échantillons de filles SK-N-AS et SK-N-SH (figure 28; tableau 8). Dans les tumeurs primaires de NB (voir section 2.1), un profil normal de méthylation a été détecté dans 5 des 6 échantillons analysés avec l'essai par PCR (figure 29; tableau 8). Le seul échantillon présentant une méthylation aberrante était NB5 (sexe féminin) (figure 29; tableau 8). L'essai par hybridation Southern a cependant révélé des anomalies dans 3 des 4 échantillons analysés, soit les filles NB4 et NB5 et le garçon NB11 (figure 30; tableau 8). En résumé, pour les 15 échantillons de NB (lignées cellulaires et tumeurs primaires), 1 garçon sur 9 (11 %) et 4 filles sur 6 (67 %) présentaient une anomalie de méthylation (tableau 8). Il semble donc que dans les NB, les aberrations de méthylation touchent davantage les filles que les garçons (test de Fisher : $p = 0,047$).

L'analyse de méthylation par PCR du promoteur de *GPC3* dans les WT primaires (voir section 2.1) a aussi mis en évidence des anomalies de méthylation dans la moitié des échantillons, soit 1 de fille (WT51) et 3 de garçons (WT177, WT116 et WT158) (figure 31, tableau 8). L'essai par hybridation Southern n'a pu être effectué que sur 5 de ces 8 échantillons en raison de la quantité disponible d'ADN. Les résultats ont été similaires à ceux obtenus par PCR, révélant une méthylation aberrante dans les échantillons WT51 (fille) et WT177 (garçon) (figure 32). En résumé, 1 fille sur 4 (25 %) et 3 garçons sur 4 (75 %) présentaient des

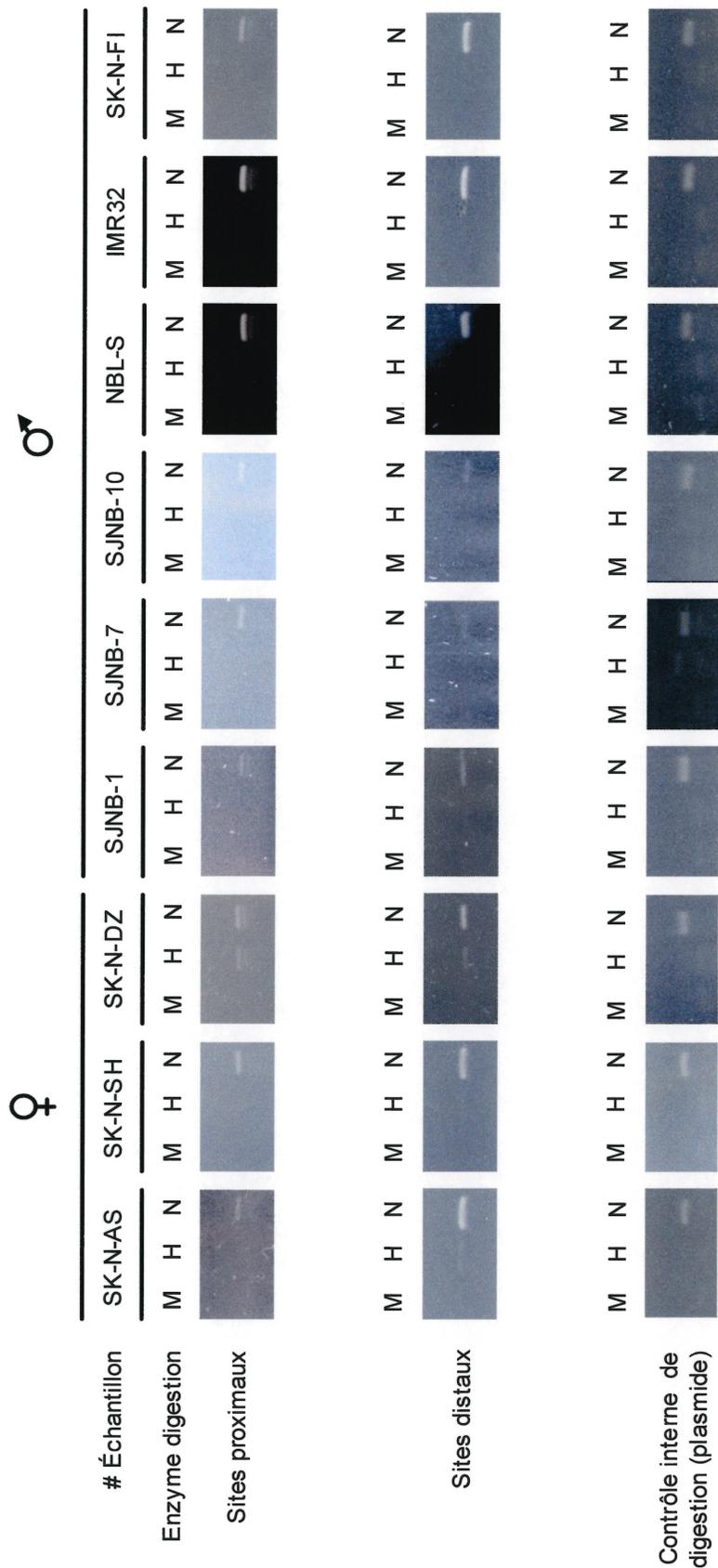


Figure 27. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de lignées cellulaires de NB

Pour chaque échantillon : H : digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation; M : digestion avec l'enzyme MspI, insensible à la méthylation; N : ADN non-digéré. Se référer aux figures 12 et 13 pour les détails concernant les sites proximaux et distaux étudiés. ♀ : fille; ♂ : garçon.

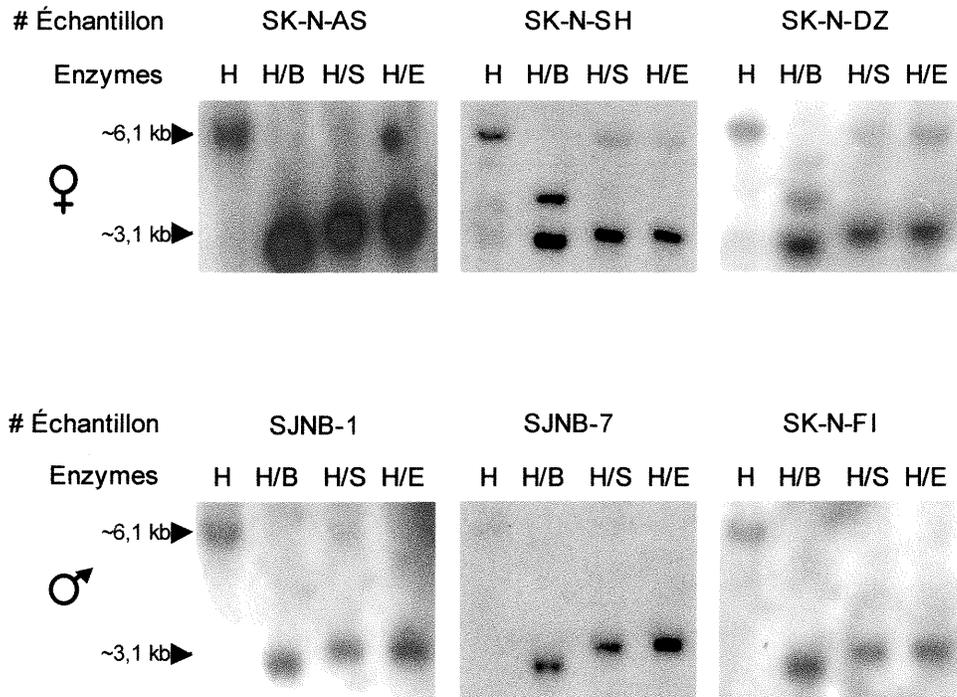


Figure 28. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des échantillons d'ADN de lignées cellulaires de NB

Enzymes de restrictions : H : HindIII; B : BssHIII; S : SacII; E : EagI. ♀ : femme; ♂ : homme.

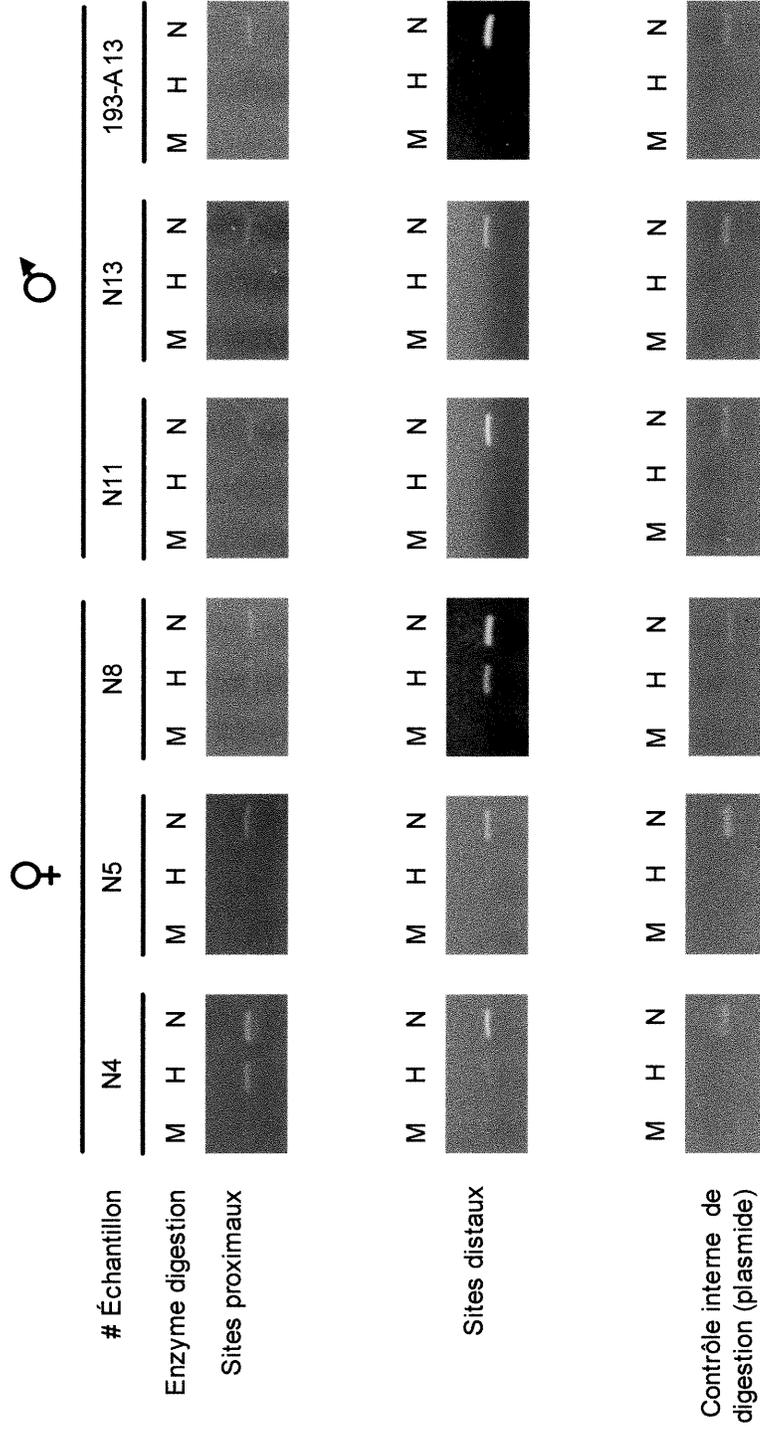


Figure 29. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de NB primaires

Pour chaque échantillon : H : digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation; M : digestion avec l'enzyme MspI, insensible à la méthylation; N : ADN non-digéré. Se référer aux figures 12 et 13 pour les détails concernant les sites proximaux et distaux étudiés. ♀ : fille; ♂ : garçon.

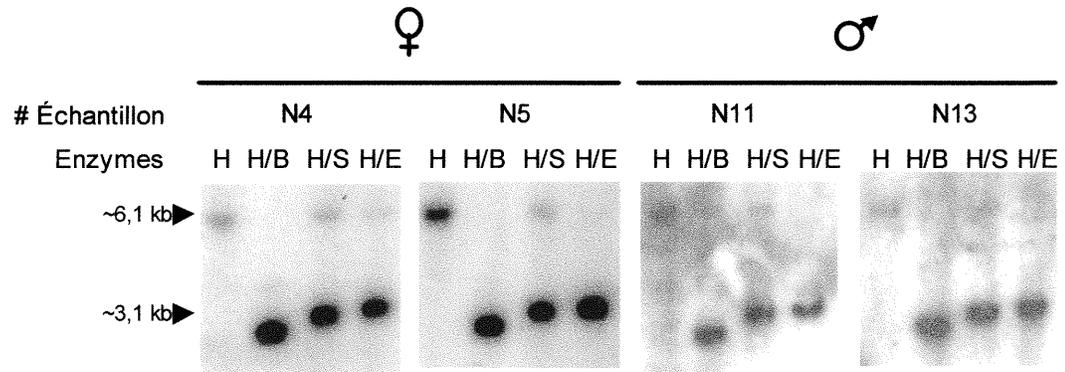


Figure 30. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des échantillons d'ADN de NB primaires

Enzymes de restrictions : H : HindIII; B : BssHII; S : SacII; E : EagI. ♀ : femme;
♂ : homme.

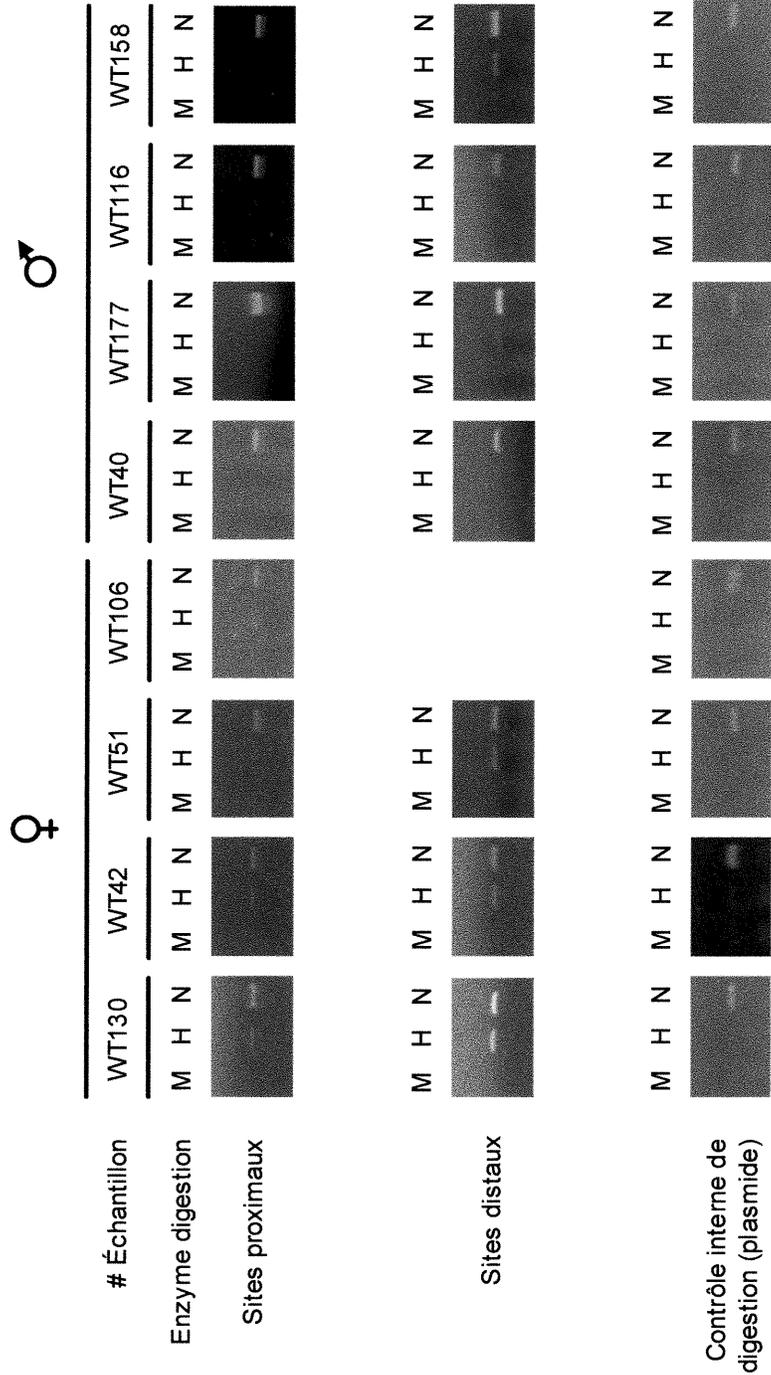


Figure 31. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN de WT primaires

Pour chaque échantillon : H : digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation; M : digestion avec l'enzyme MspI, insensible à la méthylation; N : ADN non-digéré. Se référer aux figures 12 et 13 pour les détails concernant les sites proximaux et distaux étudiés. ♀ : fille; ♂ : garçon.

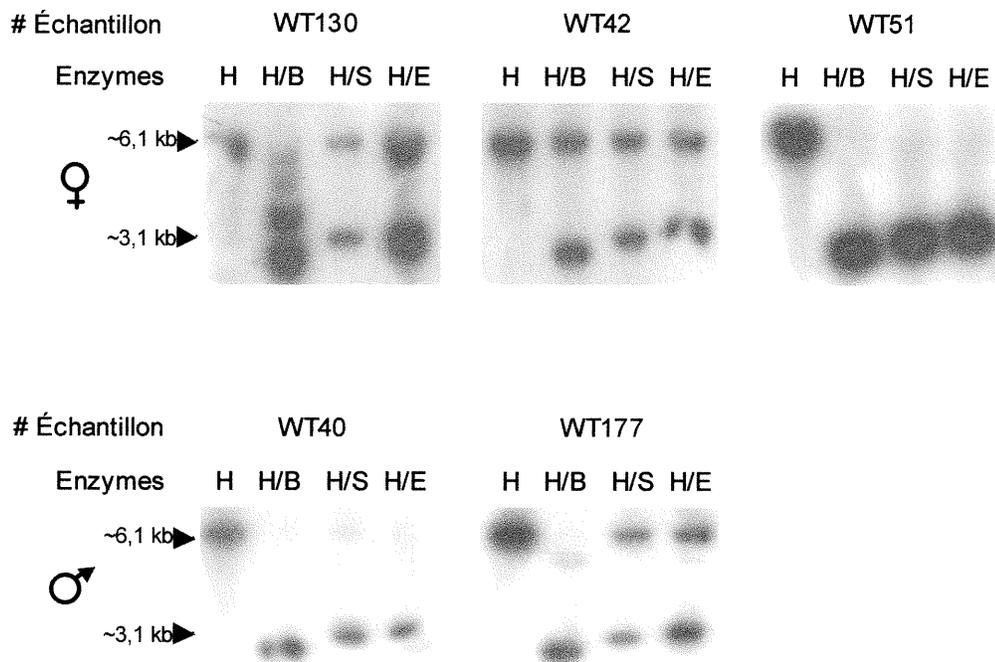


Figure 32. Essai de méthylation par hybridation Southern sur des échantillons de WT primaires

Enzymes de restrictions : H : HindIII; B : BssHIII; S : SacII; E : EagI. ♀ : femme; ♂ : homme.

Tableau 8. Sommaire des résultats de l'étude de méthylation dans les cellules tumorales

Échantillon	Origine	aSexe	bExpression	cStatut de méthylation (essai PCR)			dStatut de méthylation (essai Southern-blot)		
				Sites proximaux	Sites distaux	Eagl	SacII	BssHI	
SK-N-AS	Lignée cell. NB	F	+++	-	tr	-	-	-	
SK-N-SH	Lignée cell. NB	F	++	-	tr	tr/-	tr/-	+/-	
SK-N-DZ	Lignée cell. NB	F	-	+	+	+/-	+/-	+/-	
SJNB-1	Lignée cell. NB	M	++	-	-	-	-	-	
SJNB-7	Lignée cell. NB	M	+++	-	-	-	-	-	
SJNB-10	Lignée cell. NB	M	+++	-	-	nd	nd	nd	
NBL-S	Lignée cell. NB	M	++	-	-	nd	nd	nd	
IMR-32	Lignée cell. NB	M	++	-	-	nd	nd	nd	
SK-N-FI	Lignée cell. NB	M	-	-	-	-	-	-	
NB4	NB primaire	F	+	+	+	tr/-	tr/-	tr/-	
NB5	NB primaire	F	+	-	tr	-	tr/-	tr/-	
NB8	NB primaire	F	nd	+	+	nd	nd	nd	
NB11	NB primaire	M	-	-	-	-	tr/-	-	
NB13	NB primaire	M	+	-	-	-	-	-	
NB193	NB primaire	M	nd	-	-	nd	nd	nd	
WT130	WT primaire	F	++	+	+	+/-	+/-	+/-	
WT42	WT primaire	F	+	+	+	+/-	+/-	+/-	
WT51	WT primaire	F	++	-	+	-	-	-	
WT106	WT primaire	F	+	+	nd	nd	nd	nd	
WT40	WT primaire	M	+++	-	-	-	-	-	
WT177	WT primaire	M	++	-	tr	+/-	+/-	+/-	
WT116	WT primaire	M	+	tr	-	nd	nd	nd	
WT158	WT primaire	M	nd	tr	+	nd	nd	nd	

a : F : féminin; M : masculin. b : expression transcriptionnelle : - : expression nulle; + : expression faible; ++ : expression modérée; +++ : forte expression. c : + : méthylié; - : non-méthylié. d : + : signal de méthylation; - : signal de non-méthylation; tr : trace; nd : non-déterminé.

anomalies de méthylation. Donc, contrairement aux observations concernant le NB, les anomalies de méthylation dans les WT semblent toucher davantage les garçons que les filles (tableau 8). Cependant, trop peu d'échantillons ont été testés pour appuyer cette hypothèse statistiquement (test de Fisher : $p = 0,243$).

Le statut d'expression transcriptionnelle de *GPC3* de la plupart des échantillons tumoraux a été déterminé dans notre laboratoire (tableau 8; Saikali et Sinnott, 2000). Nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de relation évidente entre la méthylation et l'expression de *GPC3* (tableau 8).

Ayant à notre disposition de l'ADN provenant de spécimens de reins normaux adjacents aux WT de 3 des échantillons étudiés (voir section 2.1), nous avons évalué le statut de méthylation par PCR sur ces ADN et l'avons comparé aux échantillons des tumeurs adjacentes. Un changement de statut de méthylation a été observé dans l'échantillon de garçon WT177 ; celui-ci présentait des traces de méthylation en position distale du promoteur comparativement au rein normal RN177, qui ne présente aucune méthylation (figure 33). Puisque la tumeur WT177 exprime plus fortement *GPC3* que le rein normal RN177 et que la méthylation dans le promoteur est reconnue comme étant associée à une inhibition transcriptionnelle, il est probable que les cellules de l'échantillon WT177 étaient hétérogènes du point de vue de la méthylation du promoteur de *GPC3* et que l'expression plus marquée de la tumeur ne représentait possiblement que la contribution des cellules non méthylées au niveau de *GPC3*.

3.2 Cartographie des sites d'interactions ADN-protéines

La transcription constitue une étape-clé dans le processus de régulation de l'expression génique. Cette régulation fait intervenir, entre autres, des facteurs de transcription agissant en *trans* au niveau d'éléments *cis* du promoteur des gènes (voir section 1.3). L'identification des TF liant un promoteur apporte donc des renseignements importants quant à la régulation de l'expression d'un gène particulier. Il existe différentes façons de procéder pour identifier les TF. Dans notre étude, nous avons utilisé une approche permettant de mettre en évidence

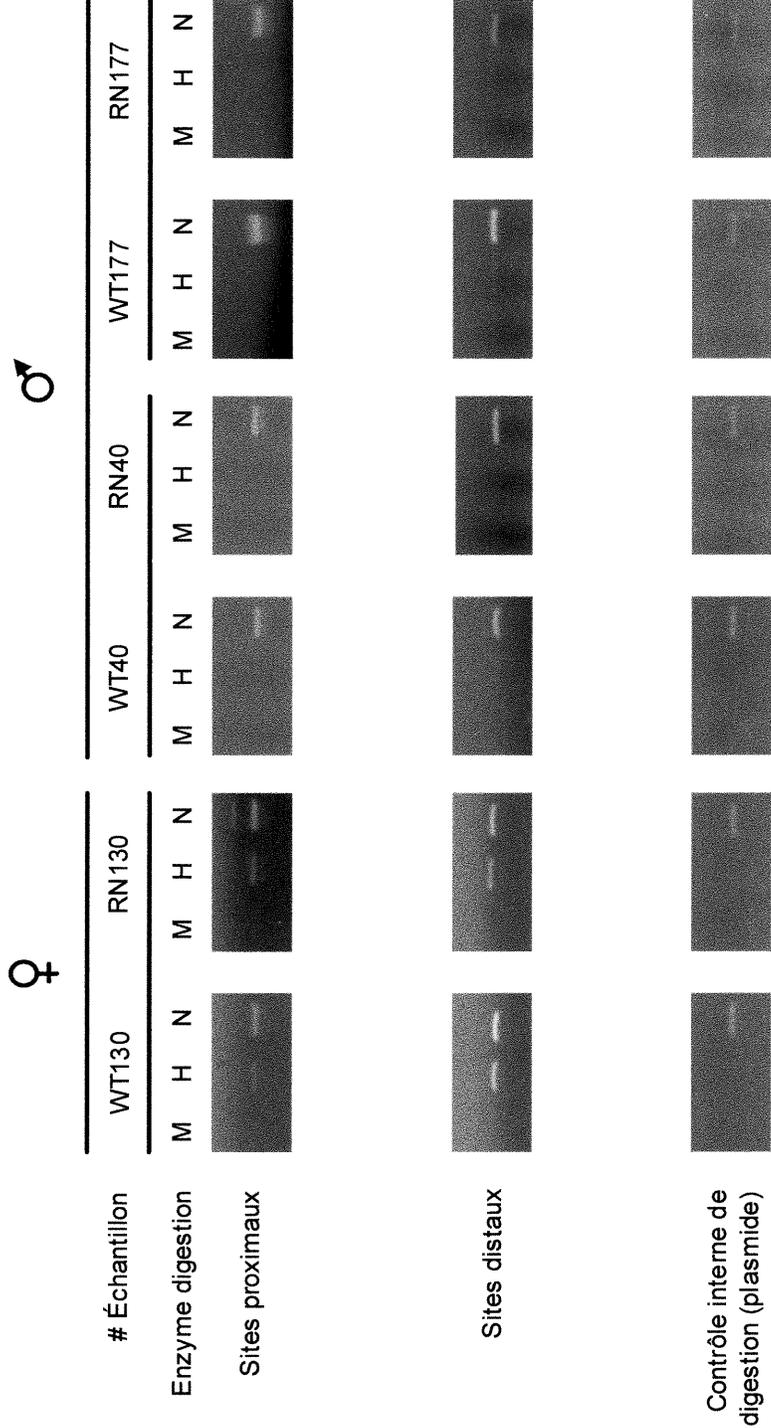


Figure 33. Essai de méthylation par PCR sur des échantillons d'ADN provenant de WT's primaires et de cellules rénales normales adjacentes
 Pour chaque échantillon : H : digestion avec l'enzyme HpaII, sensible à la méthylation; M : digestion avec l'enzyme MspI, insensible à la méthylation; N : ADN non-digéré. Se référer aux figures 12 et 13 pour les détails concernant les sites proximaux et distaux étudiés. ♀ : fille; ♂ : garçon.

des empreintes témoignant d'une interaction ADN-protéine au niveau d'un promoteur et ainsi de déduire les TF pouvant potentiellement s'y lier. La cartographie des sites d'interactions ADN-protéines a été effectuée dans un contexte *in vivo*.

Tel que décrit dans la section 2.4, la méthode de cartographie des interactions ADN-protéines *in vivo* comporte plusieurs étapes dont la première est l'induction de dommages à l'ADN de lignées cellulaires en culture (*in vivo*). Dans notre étude, nous avons induit des dommages à l'ADN à l'aide de deux types d'agents, soit le diméthylsulfate (DMS) ou les rayons ultra-violet C (UVC). Le DMS méthyle préférentiellement les guanines alors que les UVC produisent des dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) et des photoproduits 6-4. L'emploi de ces deux agents donne l'avantage de pouvoir détecter des interactions au niveau de l'ADN entre des guanines (DMS) ou des dinucléotides de pyrimidines (UVC) et des protéines, plutôt qu'au niveau d'un seul de ces deux éléments. Il faut aussi mentionner que, de par leur nature, les agents n'ont pas tous la même capacité de révéler certains contacts (voir discussion), ce qui justifie d'autant plus l'utilisation de plus d'un agent.

Pour faire la cartographie des sites d'interactions ADN-protéines au niveau du promoteur de *GPC3*, nous avons choisi deux lignées cellulaires dérivées de NB de garçons exprimant ou non *GPC3*, soit SJNB-7 et SK-N-FI respectivement (Saikali et Sinnott, 2000; tableau 8). Le choix d'utiliser des lignées de sexe masculin avait pour but d'éliminer toute confusion liée au X inactif qui aurait pu découler de l'utilisation de lignées de filles. Quant au statut d'expression, l'utilisation de lignées exprimant différemment *GPC3* était justifiée par la perspective éventuelle de mettre en évidence des sites d'interaction différentiels entre les deux lignées, en relation avec le statut d'expression de *GPC3*.

Dans le cadre de notre étude, nous avons révélé des interactions ADN-protéines dans la région située entre -980 et +175 à l'exception de l'intervalle -133 à -44 (figure 18) où notre incapacité à tirer de l'information de cette région pourrait être liée à la forte densité en nucléotides G+C (figure 21). Des résultats

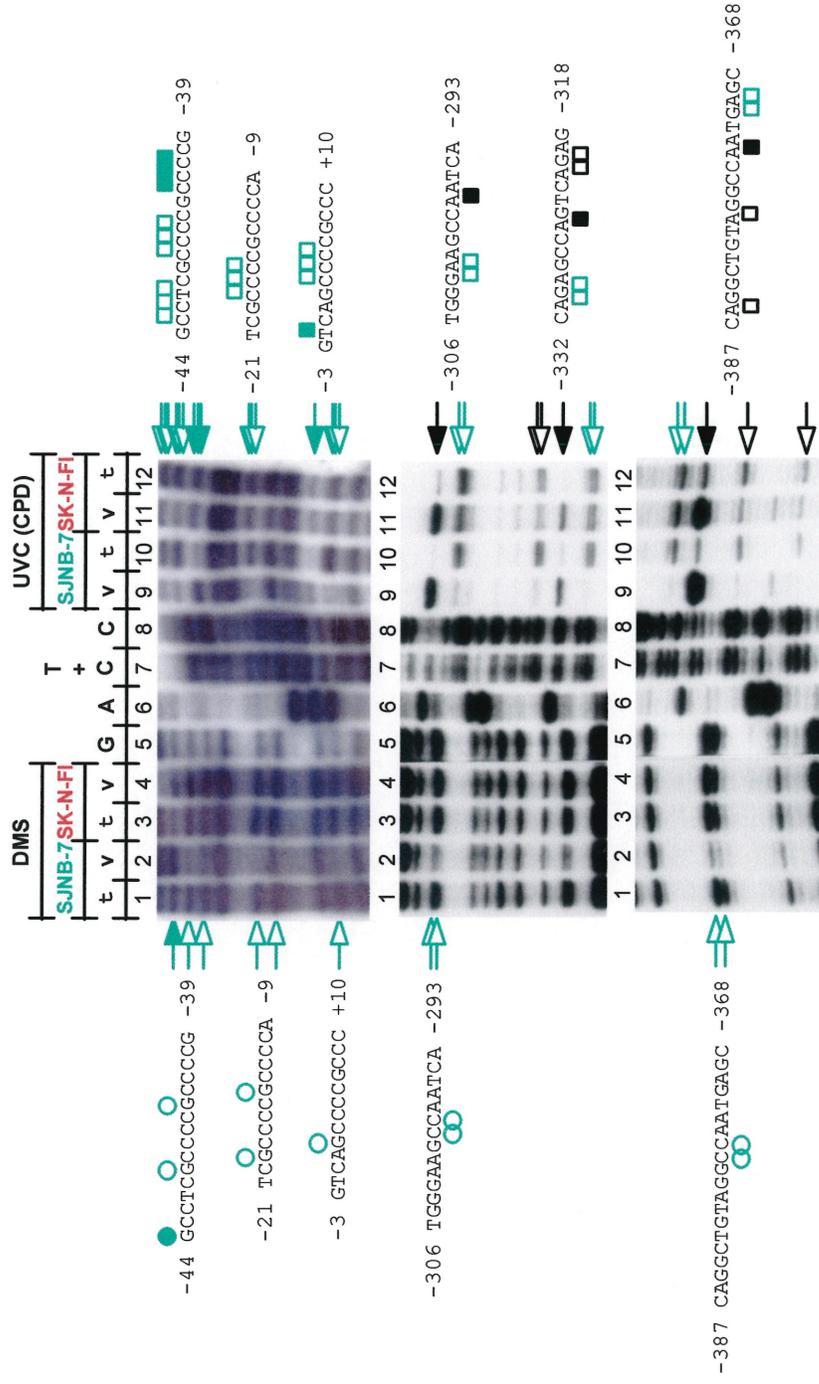


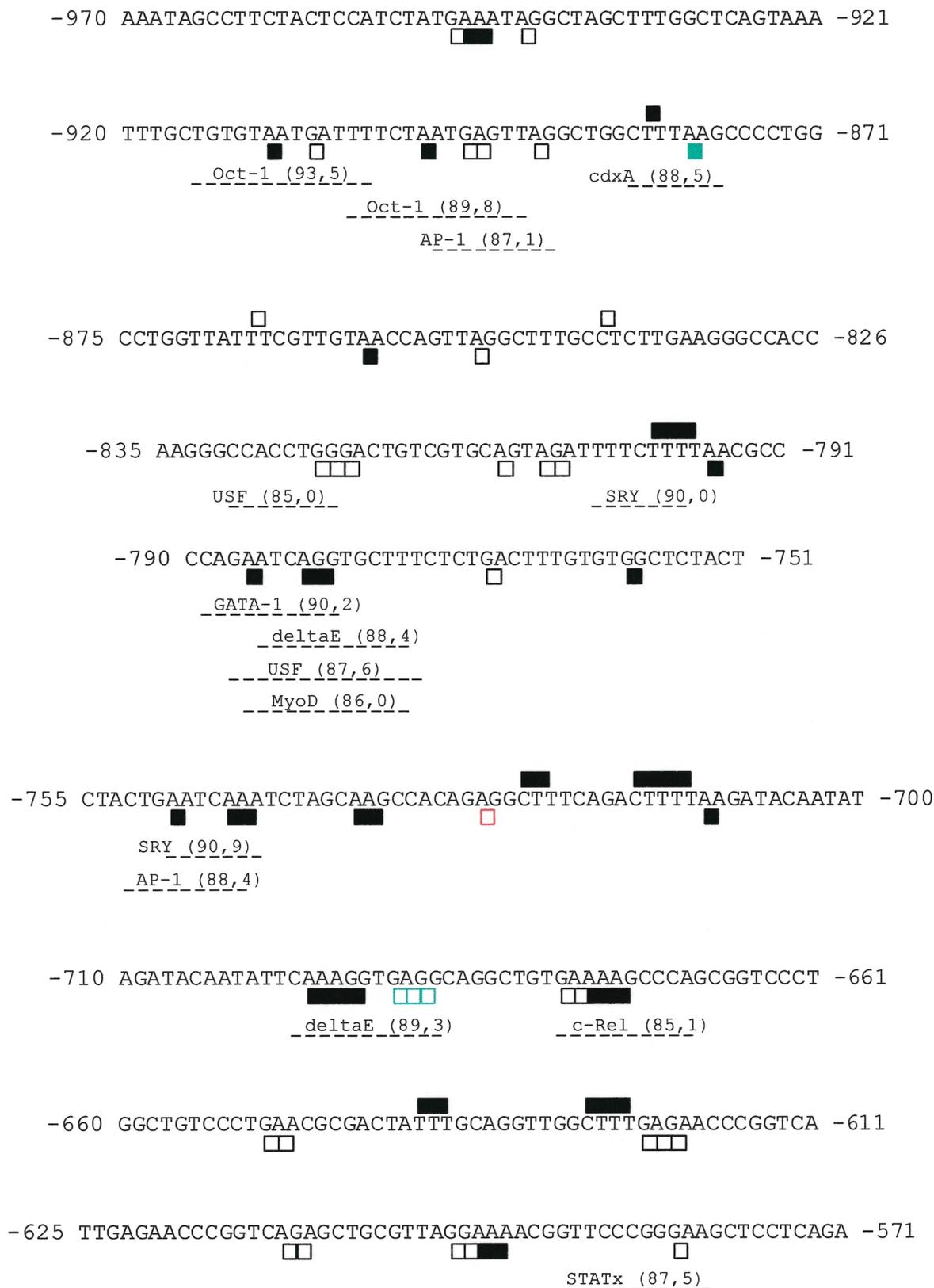
Figure 34. Empreintes *in vivo* au niveau du promoteur du gène *GPC3*

Les cellules provenant des lignées cellulaires SJNB-7 (*GPC3+*) et SK-N-FI (*GPC3-*) ont été traitées avec du diméthyl sulfate (**DMS**) ou des rayons ultra-violets C (**UVC**), *in vitro* (t) ou *in vivo* (v). Empreintes générées par le traitement aux UVC : □, □ ou □ : site protégé; ■, ■ ou ■ : site sur-exposé. Empreintes générées par le diméthylsulfate (**DMS**) : ○, ○ ou ○ : site protégé; ●, ● ou ● : site sur-exposé. Les symboles verts indiquent les empreintes spécifiques à la lignée SJNB-7 (*GPC3+*), les symboles rouges, les empreintes spécifiques à la lignée SK-N-FI (*GPC3-*) et les symboles noirs, les empreintes communes aux deux lignées cellulaires.

représentatifs sont présentés à la figure 34. On note la présence de régions protégées (□, □, ○ ou ○) et de sites hyper-réactifs (■, ■, ● ou ●) (figure 34). Une protection suggère qu'un facteur interagissant avec l'ADN a protégé le site en question au moment de l'induction des dommages alors qu'un site hyper-réactif suggère que la région, de par son interaction avec le milieu environnant, a été sur-exposée à l'agent endommageant. Un très grand nombre d'empreintes ont été détectées dans la région étudiée (carte détaillée : figure 35). Ces empreintes appartiennent à trois catégories : i) celles communes aux deux lignées cellulaires; ii) celles spécifiques à la lignée SJNB-7, qui exprime *GPC3* et iii) celles spécifiques à la lignée SK-N-FI, qui n'exprime pas *GPC3* (figure 35). Les empreintes générées peuvent être attribuables non seulement à la liaison de TF aux éléments *cis* qui les chevauchent mais également à la présence de structures secondaires.

Afin de guider notre démarche visant à identifier les TF participant à la régulation transcriptionnelle de *GPC3*, nous avons soumis la séquence promotrice au programme TFSEARCH (internet : <http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Ce programme prédit quels TF peuvent potentiellement lier une séquence. Nous avons fixé le seuil de probabilité à 85 points (seuil par défaut du programme). La figure 35 montre les éléments au niveau du promoteur de *GPC3* chevauchant les empreintes qui peuvent potentiellement lier un facteur de transcription, tel que prédit par le programme. Le tableau 9 fait la liste des facteurs prédits et présente certaines de leurs caractéristiques.

**Carte détaillée des empreintes *in vivo* identifiées au niveau du promoteur de
GPC3 et des sites de liaison putatifs de facteurs de transcription**



-584 GGAAGCTCCTCAGAGAGTAGAATGAGGAGGTGGATTTTGTGTGAAGGAACACCTTGTGTG -525

-530 TGTGTGGCTCTGGTGGCCAGGAAAGAGCTGGCACAAGCTGAAAGAAGGCC -481

-482 CCTGTGGCGAAGCGGAGGGGACCTAAGTCAGGGACCCACCTGCCCCAGGAAGGA -425

AP-1 (85,1) E47 (89,4)
USF (89,4)
MyoD (88,4)
deltaE (85,9)

-430 GAAGGATGAAAAGGAGACAAAAATCCTAAAGGGAAAAGCC -391

CdxA (87,2)
CdxA (85,9)

-400 GGGAAAAGCCCTCCAGGCTGTAGGCCAATGAGCGGGCGGAAGGAGGAGTGAGGCTGGGGGA -341

c-Rel (90,9) Oct-x (82,6) p300 (88,1)
NF-κB (87,4)

-350 AGGCTGGGGAACCTTCTCCAGAGCCAGTCAGAGCGGACGG -311

MZF1 (90,4) Lyf-1 (92,2)

-318 GCGGACGGCTGCTGGGAAGCCAATCAGCGCGCTCGAGCCTGCAGCCCC -271

GATA-1 (91,8)
NF-Y (89,4)
Ik-2 (85,1)

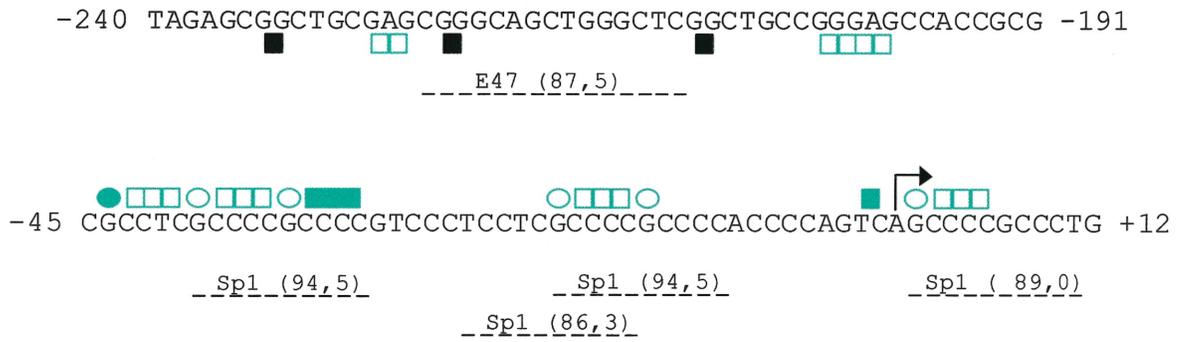


Figure 35. Carte détaillée des empreintes *in vivo* identifiées au niveau du promoteur de *GPC3* et des sites de liaison putatifs de facteurs de transcription

Empreintes générées par le traitement aux UVC : □, ◻ ou ◻ : site protégé; ■, ■ ou ■ : site sur-exposé. Empreintes générées par le diméthylsulfate (DMS) : ○, ◐ ou ◑ : site protégé; ●, ● ou ● : site sur-exposé. Les symboles verts indiquent les empreintes spécifiques à la lignées SJNB-7 (*GPC3*+), les symboles rouges, les empreintes spécifiques à la lignées SK-N-FI (*GPC3*-) et les symboles noirs, les empreintes communes aux deux lignées cellulaires. Lignes pointillées : sites prédits de liaison à un facteur de transcription superposant une empreinte (prédiction à l'aide du programme TFSEARCH).

Tableau 9. Caractéristiques des facteurs de transcription prédicts pour lier le promoteur de GPC3

Facteur	Classification	Facteurs interagissant	Caractéristiques fonctionnelles	Expression	Référence TRANSFAC
AP-1	région basique + fermeture éclair à leucines	GR α , GR β , NF-ATc et NF-ATx	-Dimère formé par Fos, Jun ou ATF (Karin et al., 1997). -Proto-oncogène. -Impliqué dans régulation de plusieurs processus cellulaires dont prolifération, différenciation et apoptose (mitigé) (Karin et al., 1997). -Régulé à la baisse par glucocorticoïdes via interaction directe avec GR. -Inclut par TPA <5287>.		T00029 T00133 T00123
Cdx-1 (CdxA-poulet)	homéodomaine; protéine homéobox		-Impliqué dans le développement de l'intestin (contrôle prolifération et différenciation (Freund et al., 1998). -Régulé à la baisse durant la carcinogénèse colorectale (Mallo et al., 1997).	Épithélium de l'intestin foetal et adulte (Subramanian et al., 1998).	T01999
c-Rel	« β -scaffold factors » avec contact dans le sillon mineur	RelA, v-Rel, c-Rel, NF- κ B et TBP	Activateur transcriptionnel sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère avec RelA.		T00168
deltaEF1 (poulet)	doigts de zinc + homéodomaine		Répresseur de l'activité transcriptionnelle médiée via boîte E2 (Sekido et al., 1994).		T01467
E47	région basique + hélice-boucle-hélice	BETA2, Tal-1, E12, MyoD, HEN1, Tal-1 β , Th1, MATH-2, Tal-2, Myf-5, HES-5, Id4, Tal-2, Id2, AS-C T3, myogenin, Id1, MEF1, MRF-4, Myf-4, Myf-5, Myf-6 et E47	-Fait partie du complexe MEF-1. -Inclut phosphorylation de MyoD en s'y associant. -Inclut transcription d'IgH, du gène Oct-2 stimulant IgH et des gènes « recombination-activating genes » RAG-1 et RAG-2, stimulant le réarrangement de IgH.	Ubiquitaire	T00207
GATA-1	doigts de zinc	FOG, Sp1 et EKLF	-Activateur. -Coordination d'événements multiples durant la maturation terminale des érythrocytes. -Participe à la transcription des facteurs spécifiques aux érythrocytes, bloque l'apoptose des cellules-précurseurs et contrôle l'équilibre entre la prolifération et l'arrêt du cycle cellulaire. -Régulateur négatif du gène γ -globin chez adulte. -Agit sur promoteur de PBGD et γ -globin en association avec Sp1 ou « CCACC binding proteins ».	Érythrocytes, megakaryocytes, mastocytes, eosinophiles, cellules de Sertoli.	T00306
Ik-2 (souris)	doigts de zinc		Pourrait jouer un rôle dans le développement des lignées de lymphocytes.	Lymphocytes précoces, lymphocytes T matures, corpus striatum, foie foetal précoce, thymus durant la maturation et rate post-natale.	T01470
Lyf-1 (Ik-1)	doigts de zinc		Pourrait jouer un rôle dans le développement des lignées de lymphocytes.	Lymphocytes précoces, lymphocytes T matures, corpus striatum, foie foetal précoce, thymus durant la maturation et rate post-natale.	T02702

MyoD	région basique + hélice-boucle-hélice	E47, MEF-2D, MEF-2, MEF-2DAB, Id2, ITF-2, ITF-1, Id1, MEF1 et E12	Facteur de transcription myogénique; impliqué dans le programme de différenciation.	Cellules myogéniques.	T00525
MZF1	doigts de zinc		-Régulateur négatif de CD34 et c-Myb. -Répond à acide rétinolique. -Possiblement impliqué dans développement hématopoïétique.	Cellules myéloïdes.	T00529
NF-κB	« β-scaffold factors » avec contact dans le sillon mineur	-Sp1, v-Rel, c-Rel et IκB-β	-Régulateur de gènes impliqués dans l'infection, l'inflammation, le stress -Activateur inducible par plusieurs agents dont TNF, ARNdb, signaux médiés par PKC et PKA.		T00590
NF-Y (CBF, CP1)	« histone fold »	hGCN5, P/CAF (Currie, 1998) et p300 (Li et al., 1998)	-Activateur transcriptionnel. -Possède trois sous-unités. -Lie boîte CCAAT.	Ubiquitaire (Mantovani)	T00150
Oct-x	domaine POU	OCA-B, CFF, Oct-2, TBP, Vmw65, CCF, GR, PR, HMG-2, Sp1, AP-1, VP16, TFIIB, Pit-1 et SNAPc	-Oct-1 : active des gènes spécifiques aux lymphocytes B (Matthias, 1998; Singh, 1994; Kemler et Schaffner, 1990); autres gènes comme celui de l'hormone GnRH (Chandran et DeFranco, 1999), H2B, les gènes snRNA, LPL, PU.1, IL-2 et IL-3 (Veenstra et al., 1997). -Oct-2 : principalement activateur dans les lymphocytes B et répresseur dans certains neurones (Latchman, 1999). -Oct-4 : lié au phénotype de totipotente (Pesce et Scholer, 2000). -Oct-6 : contrôle la myélinisation des neurones périphériques (Kamholz et al., 1999).	-Oct-1 : ubiquitaire. -Oct-2 : lymphocytes B et certains neurones (Latchman, 1999). -Oct-4 : cellules totipotentes et germinales (Pesce et Scholer, 2000). -Oct-6 : cellules de Schwann (Kamholz et al., 1999).	T00641
p300	autres	CREB, E1A T3S protein (adenovirus type 2), YY1, E1A 12S protein (adenovirus), RAR, ER TR, RXR, STAT-1, STAT-2, c-Jun, Tax, c-Myb, Sap-1a, c-Fos, pp90RSK, Tag, MyoD, TFIIB, TBP, antigène grand T, p53 et NF-κB.	-Coactivateur. -Induit entrée des cellules quiescentes en phase S par liaison à E1A. -Apparenté à CPB (n'ont cependant pas exactement le même effet). -Présente une forte activité HAT. -Capable de lier ADN (contrairement à CBP). -Médie interaction entre YY1 et E1A. -Participe au développement embryonnaire.	Hela	T0142Z
Sp1	doigts de zinc	TBP, Vpr, NS-1, TAF(II)110, p107, YY1, TAF(II)55, Sp1, NF-κB, E2, Oct-1; E2F1; E2F2 et p74	-Multimérisation mène à superactivation. -Effet dépend de distance par rapport à boîte TATA. -Agit en synergie avec E2 et BPV. -Coopération hautement spécifique avec NF-κB. -Lie son élément même s'il est inclus dans un nucléosome (affinité réduite). -Régule l'expression de MeCP2. -Important pour recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base dans promoteurs sans boîte TATA (Pugh et Tijian 1991). -« Testis-determining factor ».	Ubiquitaire	T00759
SRY	« high-mobility group protein-like factors »		-Mutation entraînant filles XY. -Reconnait certains angles dans l'ADN (60°-120°) sans spécificité de séquence. -Produit une angulation dans l'ADN quand lié au consensus		T0099Z

AACAAAG.	
-Mutations affectant l'affinité et la structure du complexe SRY-ADN retrouvées dans patients avec anomalies des gonades.	
STAT1α	<p>STAT1α, STAT2, STAT1β et STAT1</p> <p>« β-scaffold factors » avec contact dans le sillon mineur</p> <p>« β-scaffold factors » avec contact dans le sillon mineur</p> <p>Médiateur de la réponse induite par les interférons.</p> <p>-Inductible par INF-α, INF-γ, facteurs de croissance et hormones.</p> <p>T01492</p>
TFIID (TATA)	<p>TFIIA et TFIIH</p> <p>« β-scaffold factors » avec contact dans le sillon mineur</p> <p>-Complexe liant la boîte TATA composé de TBP et de TAFs.</p> <p>-Fait partie des facteurs GTFs (voir section 1.3.1).</p> <p>-Peut entrer en compétition avec <i>E_h</i>.</p> <p>Ubiquitaire</p> <p>T00820</p>
USF	<p>USF2, USF2b et TAF(II)55</p> <p>région basique + hélice-boucle-hélice + fermeture éclair à leucines</p> <p>-Activateur transcriptionnel.</p> <p>-Pourrait participer à formation stable du complexe de préinitiation durant l'assemblage des chromosomes.</p> <p>-Activation du gène <i>C/EBPα</i>.</p> <p>Ubiquitaire</p> <p>T00874</p>

Référence TRANSFAC : Wingender *et al.* 2000; <http://www.cbi.pku.edu.cn/TRANSFAC/index.html>)

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 La méthylation du promoteur de *GPC3*

4.1.1 Méthylation du promoteur de *GPC3* dans les tissus normaux

Nous avons démontré que dans le sang périphérique et le placenta, le promoteur de *GPC3* est partiellement méthylé chez les filles alors qu'il ne l'est pas chez les garçons. L'essai de méthylation par hybridation Southern et l'étude d'échantillons de filles atteintes du syndrome de Turner (caryotype 45, X) appuient l'hypothèse que la méthylation partielle observée chez les filles serait associée au chromosome X inactif. Une étude similaire a aussi révélé une méthylation partielle du promoteur de *GPC3* dans des échantillons d'ADN de leucocytes de filles (Huber *et al.*, 1999). Ce même groupe a aussi observé une méthylation complète du promoteur de *GPC3* dans une lignée cellulaire hybride hamster-humain ne contenant qu'un X inactif (Huber *et al.*, 1999). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que le promoteur de *GPC3* serait méthylé sur le chromosome X inactif. Ceci est en accord avec le concept que les îlots CpG présents sur le X inactif sont généralement méthylés (Goto et Monk, 1998). Cette méthylation serait impliquée dans le maintien de l'inactivation des gènes liés au chromosome X inactif (Monk, 1986). Ces résultats impliquent également que *GPC3* n'échapperait pas à l'inactivation du X chez l'humain. En effet, la littérature rapporte de plus en plus d'exemples de gènes qui échappent à l'inactivation du X (e.g. dans Carrel et Willard, 1999; Tsuchiya et Willard, 2000) et il semble que ceux-ci ne soient pas méthylés au niveau de leur promoteur (Goldman *et al.*, 1998).

L'étude d'échantillons de sang périphérique et de placentas provenant de garçons a révélé une absence de méthylation au niveau du promoteur de *GPC3*. Le gène *GPC3* ne fait donc pas exception à la règle qui suggère que les îlots CpG ne sont généralement pas méthylés, à l'exception de ceux soumis à une empreinte parentale ou ceux liés au X inactif (Ferguson-Smith *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 1992 et Stoger *et al.*, 1993). Nos résultats indiquent également que la méthylation du

promoteur de *GPC3* n'est pas nécessaire à la répression transcriptionnelle du gène (sur le chromosome X actif). En effet, les échantillons de sang périphérique, qui n'expriment pas *GPC3*, ne présentent pas de méthylation au niveau du promoteur chez les garçons.

4.1.2 Méthylation du promoteur de *GPC3* dans les tumeurs embryonnaires.

Nous avons démontré que la majorité des échantillons tumoraux présentaient un profil de méthylation similaire à celui observé dans les échantillons normaux étudiés. Cependant, nous avons aussi observé des anomalies de méthylation dans certains échantillons. Dans les cellules de NB, les anomalies ont été observées principalement chez les filles. Inversement, les anomalies observées dans les WT concernaient davantage les garçons. Ces anomalies ne présentaient pas de corrélation avec le statut d'expression. Elles reflètent possiblement le fait que les cellules tumorales présentent souvent une méthylation aberrante, soit une hypométhylation généralisée du génome et une hyperméthylation régionale, souvent observée au niveau d'îlots CpG (Baylin *et al.*, 1998; Momparler et Bovenzi, 2000; Robertson et Jones, 2000).

La perte de méthylation observée dans certains échantillons de filles pourrait être à l'origine d'une réactivation de la transcription de *GPC3*. Les expériences de déméthylation utilisant le 5-aza-dC et entraînant la réactivation de gènes liés au X inactif montrent bien que la perte de méthylation peut entraîner la réactivation génique (Gartler et Goldman, 1994; Monk, 1986). Il y a toutefois peu de données dans la littérature démontrant la réactivation d'un gène lié au X par perte de méthylation dans les cellules cancéreuses. Cette situation, même si elle est peu probable, demeure néanmoins théoriquement possible.

La méthylation d'un promoteur réprime normalement la transcription d'un gène. Pour *GPC3* plus spécifiquement, nous l'avons mentionné, des expériences de transfection ont montré que son promoteur réprime la transcription d'un gène rapporteur lorsqu'il est préalablement méthylé *in vitro* (Huber *et al.*, 1999). Étant donné que *GPC3* est exprimé dans toutes les WT analysées, la méthylation

observée chez les garçons est probablement partielle et l'expression détectée provient vraisemblablement des cellules non-méthylées. Ceci semble au moins être le cas pour l'échantillon WT177 qui présente effectivement une méthylation partielle.

Les aberrations de méthylation observées dans les tumeurs embryonnaires peuvent-elles avoir un impact sur le développement et/ou l'évolution de la tumeur? Bien que la méthylation semble réprimer la transcription de *GPC3* (Huber *et al.*, 1999), son absence n'entraîne pas nécessairement l'activation du gène. Le fait que la méthylation aberrante ne corrèle pas avec l'expression de *GPC3* suggère que la régulation de la transcription du gène n'est pas nécessairement dépendante de la méthylation et donc que celle-ci, dans l'ensemble, pourrait n'avoir que peu d'impact sur le processus tumoral, ne reflétant qu'un défaut généralisé de méthylation affectant souvent les cellules tumorales (Baylin *et al.*, 1998; Momparler et Bovenzi, 2000; Robertson et Jones, 2000).

4.2 Facteurs de transcription et régulation de l'expression de *GPC3*

4.2.1 Identification de sites de liaison de facteurs de transcription au niveau du promoteur de *GPC3*

Dans le but ultime d'identifier les TF impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *GPC3*, nous avons utilisé une stratégie nous permettant de cartographier les interactions ADN-protéines *in vivo* au niveau du promoteur du gène. Bien que la méthode de cartographie *in vitro* soit plus simple à réaliser, elle comporte le désavantage de sonder les interactions ADN-protéines dans un contexte non physiologique. On accorde de plus en plus d'importance à la structure native des promoteurs dans la régulation transcriptionnelle des gènes. Une approche *in vitro* ne peut évidemment pas tenir compte de cet aspect et peut de ce fait ne pas refléter la réalité intra-nucléaire. La méthode *in vivo* est cependant beaucoup plus complexe et laborieuse. Ceci tient principalement au fait que l'analyse de la région d'intérêt se fait en présence du génome dans sa totalité et toute sa complexité, et non pas à l'aide de sondes de quelques centaines de

paires de bases seulement. Nous avons tout de même choisi de préconiser une approche *in vivo*, décision d'autant plus justifiée que le groupe de Huber *et al.* (1998) a rapporté les résultats d'une étude *in vitro* qui n'a pas pu expliquer la tissu-spécificité d'expression de *GPC3*.

Avant d'aller plus loin, mentionnons quelques points importants nous permettant d'interpréter les résultats de façon plus juste. Il faut d'abord rappeler que les empreintes détectées peuvent être attribuables à la liaison de TF aux éléments *cis* qui les chevauchent ou à la présence de structures secondaires. De même, il est important de bien connaître les propriétés des agents endommageants que nous avons utilisés pour générer les empreintes. Le DMS ne permet pas de détecter toutes les interactions ADN-protéines (Drouin *et al.*, 2000; Pfeifer et Riggs, 1993). Les interactions ADN-histones par exemple ne sont généralement pas détectées par le DMS (Pfeifer et Riggs, 1993). Par contre, les empreintes détectées par le DMS reflètent habituellement de réelles interactions ADN-protéines (Régen Drouin, communication personnelle). Les UVC, pour leur part, ont une meilleure capacité à détecter les interactions ADN-protéines que le DMS mais sont aussi très sensibles aux structures secondaires de l'ADN (Drouin *et al.*, 2000). Ces dernières permettent donc plus difficilement de faire la différence entre les empreintes associées aux structures secondaires de l'ADN et celles résultant d'interactions ADN-protéines (Drouin *et al.*, 2000).

Un grand nombre d'empreintes ont été mises en évidence au niveau du promoteur de *GPC3*. Celles-ci peuvent être réparties en trois catégories : i) celles communes aux deux lignées cellulaires investiguées ; ii) celles spécifiques à la lignée SJNB-7 (*GPC3+*) et iii) celles spécifiques à la lignée SK-N-FI (*GPC3-*).

La densité des empreintes identifiées au niveau du promoteur de *GPC3* est exceptionnellement élevée. Une telle densité est parfois observée lorsque l'ADN est empaqueté sous forme de nucléosomes; à l'intérieur de nucléosomes, les empreintes générées par les UVC présentent une périodicité aux 10 pb (Drouin *et al.*, 2000). Les empreintes détectées au niveau du promoteur de *GPC3* ne présentent pas ce type de périodicité et donc, la forte densité d'empreintes ne

semble pas être liée à une conformation nucléosomale typique. Ces empreintes pourraient néanmoins refléter la présence de structures secondaires particulières au contexte nucléaire. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la très grande majorité des empreintes détectées avec les UVC, qui sont sensibles aux structures secondaires, ne l'ont pas été avec le DMS, pour sa part insensible à ces structures. Aucune donnée disponible ne nous permet à ce stade-ci d'expliquer comment le promoteur de *GPC3* peut présenter une conformation particulière à l'intérieur du noyau. Peut-être que le fait que celui-ci soit riche en nucléotides G+C (figure 21) pourrait expliquer la prise d'une telle conformation. Une meilleure connaissance de l'organisation de la chromatine permettra éventuellement d'expliquer nos observations.

Quels sont les TF les plus probablement impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *GPC3*? Les facteurs chevauchant les empreintes communes aux deux lignées présentent peu d'intérêt en lien avec notre objectif puisqu'ils ne peuvent expliquer la régulation (activation ou répression) de l'expression transcriptionnelle de *GPC3* dans les cellules de NB (figures 34 et 35, indiquées en noir). Les empreintes spécifiques à la lignée cellulaire SK-N-FI (*GPC3*-) (figure 34, indiquées en rouge) chevauchent des éléments susceptibles de lier les facteurs E47, USF, MyoD et deltaE (figure 35). Parmi ceux-ci, le facteur deltaE est particulièrement intéressant, compte tenu de son rôle connu d'inhibiteur de l'activité transcriptionnelle médiée via les boîtes E2 chez le poulet (deltaEF1) (figure 35 et tableau 9). Quant aux empreintes spécifiques à la lignée cellulaire SJNB-7 (*GPC3*+) (figures 34 et 35, indiquées en vert), elles chevauchent des éléments qui peuvent potentiellement lier les facteurs CdxA, deltaE, E47, USF, MyoD, p300, Lyf-1, GATA-1, NF-Y, Ik-2, Sp1 (Figure 35). En tenant compte du profil d'expression de ces facteurs et de leurs rôles connus, certains facteurs semblent moins probablement impliqués dans la régulation de *GPC3* dans le NB. En effet, CdxA est impliqué dans le développement de l'intestin, deltaE nous l'avons dit, est associé à la répression transcriptionnelle, MyoD joue un rôle important dans la différenciation myogénique, Lyf-1 et Ik-2 sont impliqués dans le développement des lymphocytes et GATA-1 joue un rôle important dans la différenciation des érythrocytes (tableau 9). Certaines empreintes chevauchant les

facteurs candidats n'ont cependant été détectées que par l'approche utilisant les UVC, sensibles aux structures secondaires de l'ADN (figure 35). Parce qu'il n'est pas possible de différencier les empreintes détectées par les UVC qui sont liées à une interaction ADN-protéine réelle de celles reflétant une structure secondaire, et parce que des évidences suggèrent que le promoteur de *GPC3* présente des structures secondaires particulières au milieu intra-nucléaire (voir le paragraphe précédent), nous accordons plus de crédibilité aux empreintes détectées par les deux approches (DMS et UVC). Trois empreintes ont été détectées par les deux approches et chevauchent les éléments Sp1, NF-Y et un élément situé autour de -375, pour lequel aucun TF n'est prédit au seuil de 85 points avec le programme TFSEARCH (figure 35). Étant donné la forte probabilité qu'une protéine puisse lier cet élément (région -375), nous avons abaissé le seuil de détection du programme à 80 points de façon à obtenir une prédiction. À ce seuil, un membre de la famille Oct est prédit pour lier la région -375 (figure 35). Bien que nous n'excluons pas la possibilité que d'autres facteurs prédits soient impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *GPC3*, nos résultats actuels suggèrent que Sp1, NF-Y et Oct-x sont les TF les plus probablement impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *GPC3*. Ceci suggère que la régulation nécessiterait l'intervention d'activateurs au niveau du promoteur et non l'absence d'un ou plusieurs répresseur(s) pour l'activité transcriptionnelle. D'autres études seront nécessaires pour valider cette hypothèse. Pour le reste de la discussion, notre attention sera portée sur les facteurs Sp1, NF-Y et Oct-x.

Sp1. Sp1 appartient à la famille de facteurs de transcription Sp/XKLF. Cette famille est caractérisée essentiellement par son domaine de liaison à l'ADN, soit trois doigts de zinc de type C2H2 séparés par des boucles d'acides aminés de séquence similaire et de longueur identique (Philipsen et Suske, 1999). Étant donné la similarité du domaine de liaison à l'ADN de ces facteurs, Sp1 n'est pas le seul à pouvoir lier l'élément Sp1. Les facteurs Sp3, Sp4, BTEB-1 et TIEG-2 reconnaissent aussi cet élément (Philipsen et Suske, 1999). Ces derniers sont tous exprimés de façon ubiquitaire à l'exception de Sp4 retrouvé de façon prédominante dans le cerveau (Philipsen et Suske, 1999). Il importe cependant de mentionner que la plupart des études d'expression ont été faites au niveau de

l'ARNm seulement (Philipsen et Suske, 1999). Le facteur Sp1 est impliqué dans la transcription de gènes régulés selon différents modes de contrôles, soit la régulation selon le cycle cellulaire, l'activation hormonale et selon les périodes du développement (Philipsen et Suske, 1999). Étant donné l'abondance de gènes ciblés par Sp1 pour la transcription, il est difficile de lui attribuer un rôle précis. La génération de souris « knock-out » montre que les embryons Sp1^{-/-} présentent un retard et des anomalies diverses de développement (Marin *et al.*, 1997). Certains de ces embryons ont la forme d'une masse indifférenciée de cellules alors que d'autres présentent des caractéristiques typiques du développement précoce. Ces embryons meurent autour du jour E11. Il apparaît donc que Sp1 est essentiel à l'embryogenèse et au maintien de la survie cellulaire après le jour E10 (Marin *et al.*, 1997). De façon surprenante, plusieurs gènes reconnus comme étant des cibles de Sp1 présentaient une expression normale dans les embryons Sp1^{-/-} (Marin *et al.*, 1997). L'expression du gène *MeCP2*, dont le produit est impliqué dans la répression transcriptionnelle liée à la méthylation, était pour sa part diminuée d'environ 20 fois (Marin *et al.*, 1997). Les auteurs ont proposé que cette déficience en MeCP2 contribuerait de façon significative au phénotype des embryons Sp1^{-/-}. Les cellules embryonnaires souches dans lesquelles les deux allèles du gène Sp1 ont été inactivés présentaient pour leur part une croissance et une apparence normale (Marin *et al.*, 1997).

NF-Y/CBF/CP1. NF-Y est un facteur de transcription qui lie les boîtes CCAAT. En fait, NF-Y est le seul facteur liant cette séquence à nécessiter absolument les cinq nucléotides dans leur intégralité (Mantovani, 1999). On estime que la boîte CCAAT est présente dans environ 30% des promoteurs eucaryotes (Bucher, 1990). NF-Y est un facteur composé de trois sous-unités : NF-YA (CBF-B), NF-YB (CBF-A) et NF-YC (CBF-C) (Mantovani, 1999). Ces trois sous-unités sont nécessaires pour la liaison à l'ADN (Sinha *et al.*, 1995). NF-YB et NF-YC présentent un domaine de dimérisation dont la séquence en acides aminés est similaire à celle des motifs « histone-fold » des histones H2B et H2A respectivement et à la protéine HMF-2 des archaebactéries (Kim *et al.*, 1996a; Sinha *et al.*, 1996). Ces motifs ont donc été très bien conservés au cours de l'évolution. Les boîtes CCAAT au niveau des promoteurs sont invariablement

flanquées d'au moins un autre élément *cis* important d'un point de vue fonctionnel (Mantovani, 1999). C'est donc dire que NF-Y active probablement toujours la transcription en coopération avec d'autres facteurs. NF-Y présente une expression ubiquitaire mais son activité peut tout de même être régulée par différents mécanismes. Sa capacité à activer la transcription peut être conditionnelle à une coopération avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, on sait que dans le cas du gène de l'albumine sérique spécifique au foie, NF-Y active la transcription en synergie avec C/EBP dans des extraits nucléaires. Cette synergie n'est cependant plus observée lorsque l'élément liant NF-Y est déplacé de 10 pb (Milos et Zaret, 1992), démontrant que la distance entre les intervenants est cruciale pour l'activation et donc, que l'activité de NF-Y peut dépendre d'une coopération avec un cofacteur. L'activité de NF-Y peut aussi être régulée par l'expression différentielle de NF-YA. Par exemple, la transcription du gène de la chaîne lourde de la ferritine est activée par un traitement avec des hèmes dans les cellules de « Friend leukemia » et durant la différenciation de monocytes en macrophages (Marziali *et al.*, 1997). Cette activation est dépendante de la liaison du facteur NF-Y au promoteur du gène et il a été démontré que l'expression de NF-YA est augmentée par un traitement avec des hèmes (Marziali *et al.*, 1997). La « CCAAT-displacement protein » (CDP/cut) est un facteur qui peut également modifier la capacité de NF-Y à activer la transcription. Un exemple de ceci est illustré avec la régulation de la transcription du gène humain de la thymidine kinase (*hTK*). Dans des cellules cultivées en présence de sérum, NF-Y est nécessaire pour assurer la transcription maximale de *hTK* alors que dans les cellules quiescentes, le site de liaison de NF-Y interagit avec CDP/cut (Kim *et al.*, 1997). La mise en évidence que NF-Y peut lier des cofacteurs présentant une activité histone acétyltransférase (HAT) comme hGCN5, P/CAF (Currie, 1998) et p300 (Li *et al.*, 1998) suscite actuellement un intérêt particulier. Il est aussi intéressant de mentionner que NF-YB est un substrat d'acétylation de p300 (Li *et al.*, 1998), ce qui pourrait constituer un autre moyen de réguler l'activation transcriptionnelle par NF-Y.

Oct-x. Les membres Oct font partie de la famille de facteurs de transcription POU (Pit-Oct-Unc) (Latchman, 1999). La caractéristique commune des facteurs

de cette famille se situe au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Ce dernier est constitué d'un domaine spécifique aux facteurs POU et d'un homéodomaine qui s'apparente à celui des protéines homéoboxes (Latchman, 1999). Plusieurs membres de la famille POU sont impliqués dans le développement et le fonctionnement du système nerveux (Latchman, 1999). Le facteur Oct-1 est le seul facteur de la famille Oct à être exprimé dans virtuellement toutes les cellules à l'exception des neurones qui ne se divisent plus (Lakin et al., 1995). Par conséquent, il est impliqué dans plusieurs fonctions. Entre autres, mentionnons qu'il stimule la réplication de l'ADN (de Jong et van der Vliet, 1999; Matheos *et al.*, 1998; Hatfield et Hering, 1993; Verrijzer *et al.*, 1992; Verrijzer *et al.*, 1990), qu'il active la transcription de gènes spécifiques aux lymphocytes B (Matthias, 1998; Singh, 1994; Kemler et Schaffner, 1990) ainsi que celle d'autres gènes comme celui de l'hormone GnRH (Chandran et DeFranco, 1999), H2B, les gènes snRNA, LPL, PU.1, IL-2 et IL-3 (Veenstra et al., 1997). Oct-2 est également exprimé dans les lymphocytes B dans lesquels il active des gènes comme celui des immunoglobulines, CD36 et CRISP-3 (Latchman, 1999). On retrouve aussi Oct-2 dans certains neurones où il joue davantage un rôle de répresseur transcriptionnel (Latchman, 1999). Oct-4 (aussi connu sous le nom de Oct-3) est pour sa part exprimé de façon prédominante dans les cellules totipotentes embryonnaires et les cellules germinales (Pesce et Scholer, 2000). Au moment de la différenciation des cellules totipotentes, Oct-4 est régulé à la baisse ce qui, entre autres évidences, suggère que ce facteur serait lié au maintien du phénotype de totipotence (Pesce et Scholer, 2000). Pour sa part, le facteur Oct-6 est impliqué, avec Krox 20, dans le processus de la myélinisation du système nerveux périphérique où il est nécessaire pour la transition de la phase de promyélinisation à celle de myélinisation dans le développement des cellules de Schwann (Kamholz et al., 1999). De fait, Oct-6 est exprimé principalement dans les cellules de Schwann durant la phase de promyélinisation et est régulé à la baisse avant la myélinisation. La myélinisation étant retardée en son absence, il semble nécessaire à la synchronisation de cette transition (Kamholz et al., 1999).

4.2.2 Pertinence des trois facteurs de transcription potentiels dans l'expression de *GPC3*

Une étude de cartographie par délétions ayant pour but de déterminer les régions fonctionnelles du promoteur de *GPC3* a récemment été réalisée (Huber *et al.*, 1998). Des fragments de promoteur de différentes longueurs, allant en 5' de -3279 à -82 et se terminant tous en 3' à +112, ont été sous-clonés devant un gène rapporteur, soit la luciférase. Après transfection dans des lignées cellulaires Caco-2 (dérivée d'un cancer colorectal) et NT2 (dérivée de cellules progénitrices neuronales), l'activité transcriptionnelle pour chacun des fragments a été quantifiée. Il semble que la région -218 à +112 soit suffisante pour conférer environ 80% de l'activité transcriptionnelle. Un élément important pour cette activité semble situé dans la région -218 à -82 puisque l'activité du rapporteur est réduite à 20 % lorsque sa transcription est sous la dépendance du fragment -82 à +112 du promoteur de *GPC3*. Nos empreintes *in vivo* chevauchant les sites *NF-Y* et *Oct-x* sont situés autour de -375 et -300 respectivement, alors que les trois empreintes liant possiblement le facteur *Sp1* sont situés entre -45 et +10. Rappelons qu'il nous a été impossible jusqu'à maintenant de tirer quelque information que ce soit de la région -133 à -44 (figure 18). C'est donc dire que le site *Sp1* fait partie intégrante du promoteur minimal, alors que les sites *NF-Y* et *Oct-x* en sont exclus. Huber *et al.* (1998) sont également les auteurs d'une étude de cartographie d'interactions ADN-protéines; cette étude a été réalisée *in vitro* avec la DNaseI. La région du promoteur allant de -218 à +112 a été analysée en utilisant des extraits nucléaires de la lignée cellulaire Caco-2, qui exprime *GPC3*. Deux régions protégées ont été observées, l'une allant de -43 à -7 et l'autre de -103 à -86 (figure 36). Ces empreintes chevauchent des éléments *Sp1* (figure 36). Notre étude *in vivo*, qui dans cette région a couvert le brin antisens de -44 à +175, a pour sa part révélé trois empreintes, une première allant de -2 à +6, une deuxième de -19 à -14 et une troisième de -44 à -30 (figure 35). Ces dernières chevauchent également des éléments *Sp1* (figure 35). Si l'on compare nos empreintes à celles obtenues *in vitro*, on voit que les empreintes -19 à -14 et -44 à -30 (*in vivo*) chevauchent l'empreinte allant de -43 à -7 (*in vitro*) (figure 36). Les résultats des deux types d'études sont donc concordants pour

```

-250  GCGCCCTGTGTAGAGCGGCTGCGAGCGGGCAGCTGGGCTCGGCTGCCGGG  -201
-200  AGCCACCGCGCGGGCTCCGCACCCTCCTCTCGCACTGCCTTCGCCCGGTC  -151
-150  CCCGCGCCGCGGTGCCCCAGTGGCCCCGCGCGCTCCACGCCGCGCCCC  -101
-100  CGCACCCCGCCGGCTACCGGCCGCACAACCGCCACCGCCCCCTGGCCGCG  -51
-50   CGGCTCGCCTCGCCCCGCCCCGTCCCTCCTCGCCCCGCCCCACCCAGTC  -1
+1    AGCCCCGCCCTGCCCGCGCCGCCAAGCGGTTCCCGCCCTCGCCAGCGC  +50
+51   CCAGGTAGCTGCGAGGAAACTTTTGCAGCGGCTGGGTAGCAGCACGTCTC  +100
+101  TTGCTCCTCAGGGCCACTGCCAGGCTTGCCGAGTCCTGGGACTGCTCTCG  +150

```

Figure 36. Comparaison des empreintes générées *in vivo* à celle générées *in vitro* au niveau de la région proximale du promoteur de *GPC3*

Les lignes bleues représentent les empreintes générées *in vitro* (Huber *et al.*, 1998) et les lignes vertes représentent les empreintes générées *in vivo* (figures 38 et 39). Les séquences en rose sont des éléments Sp1 putatifs.

cette région. On remarque toutefois que les empreintes relevées *in vivo* sont moins larges que celles *in vitro* (figure 36). Ces différences de taille sont vraisemblablement liées à l'agent utilisé pour générer les empreintes. Il semble logique que les UVC puissent avoir un meilleur accès à certains nucléotides en liaison avec une protéine qu'une enzyme comme la DNaseI qui est contrainte à un encombrement dû, d'une part, à la protéine liée à l'ADN et, d'autre part, à sa propre taille. Ceci est encore plus vrai avec l'utilisation du DMS qui, de par sa très petite taille, a plus de facilité à s'infiltrer entre les macromolécules nucléaires et à atteindre l'ADN. L'interprétation doit donc tenir compte de l'agent utilisé. Par ailleurs, on constate que l'empreinte -2 à -6, révélée *in vivo*, n'a pas été détectée *in vitro* (figure 36). Ceci s'explique vraisemblablement par les différences reliées aux approches expérimentales utilisées pour sonder les interactions. L'approche *in vivo* a l'avantage de sonder les interactions à l'intérieur de noyaux intacts. Le fait que cette empreinte (*in vivo*) ait été détectée avec les deux types d'approches (DMS et UVC) suggère qu'elle n'est pas le résultat d'un artéfact. Cette empreinte, qui chevauche à la fois le site d'initiation de la transcription et un élément *Sp1*, pourrait cependant ne pas refléter la présence de *Sp1* mais celle d'un ou plusieurs facteur(s) relié(s) à la machinerie transcriptionnelle basale posté(s) là où débute la transcription. Ainsi, dans une étude *in vitro*, les conditions pourraient ne pas être réunies et ne pas permettre la liaison d'un (de) tel(s) facteur(s), ce qui pourrait expliquer sa (leur) non-détection. Il est aussi possible que le gène *GPC3* soit régulé de façon différente selon les types cellulaires, ce qui pourrait expliquer la différence de résultats.

Les sites NF-Y et Oct-x ne font pas partie du promoteur minimal de *GPC3* mais pourraient jouer un rôle dans l'expression tissu-spécifique du gène. Il est aussi possible que le contexte nucléaire dans lequel se trouve *GPC3* à l'état naturel puisse nécessiter ces facteurs pour activer la transcription du gène. Certains faits viennent appuyer cette hypothèse. Huber *et al.* (1998) ont montré que des cellules HeLa, qui n'expriment pas *GPC3* de façon endogène, sont capables d'exprimer le gène de la luciférase lorsqu'un fragment de promoteur allant de -3279 à +112 est cloné en amont. Bien qu'il soit possible qu'un élément lié à l'inhibition du gène se trouve à l'extérieur de cette région, il est aussi

envisageable que, sorti de son contexte nucléaire naturel, le promoteur de *GPC3* ne puisse plus assurer l'état d'inactivité transcriptionnelle du gène en aval. Autrement dit, on peut concevoir que, de par son environnement ou sa conformation dans le noyau, l'activation de la transcription de *GPC3* puisse nécessiter des facteurs liant des séquences situées à l'extérieur du promoteur minimal déterminé par Huber *et al.* (1998) mais que, sorti de ce contexte (transfection), le promoteur minimal puisse être suffisant. Aussi, le fait que de nombreuses empreintes aient été obtenues avec l'approche utilisant les UVC, agent sensible aux structures secondaires, suggère que le promoteur de *GPC3* pourrait adopter une conformation particulière dans le noyau. Ces résultats appuient l'hypothèse que le contexte nucléaire puisse influencer l'activité transcriptionnelle de *GPC3*.

Le fait de mettre en évidence une empreinte au niveau du promoteur d'un gène et d'associer cette empreinte à un facteur de transcription ne signifie pas automatiquement que ce facteur soit impliqué dans la transcription du gène en question. La liaison d'une protéine à l'élément doit être démontrée, la protéine doit être identifiée et sa capacité à réguler la transcription du gène doit être évaluée. De telles expériences ont été réalisées pour évaluer l'implication de Sp1 dans la transcription de *GPC3*. Des études de retardement et de super-retardement sur gel (« gel shift » et « super-shift ») ont montré que Sp1 lie bel et bien le promoteur de *GPC3* (-218 à +112) (Huber *et al.*, 1998). De plus, une expérience a montré que le promoteur minimal de *GPC3* (-218 à +112) pouvait activer la transcription de la luciférase lorsque co-transfecté avec un vecteur d'expression contenant le gène Sp1 dans la lignée cellulaire SL2 (déficiente en Sp1), dérivée de *Drosophila* (Huber *et al.*, 1998). La démonstration de l'implication de Sp1 dans l'activation de la transcription de *GPC3* est donc chose faite. Pugh et Tjian (1991) ont proposé que dans les promoteurs sans boîte TATA, Sp1 agirait en recrutant TFIID et ainsi la machinerie transcriptionnelle basale. L'intervention de ce facteur semble donc d'autant plus probable. Pour ce qui est de la démonstration de l'implication des facteurs NF-Y et Oct-x dans la transcription de *GPC3*, elle reste à faire puisque notre étude est la première à suggérer leur implication.

L'hypothèse que les facteurs NF-Y et Oct-x puissent agir en synergie avec Sp1 pour activer la transcription de *GPC3* est envisageable. Deux études ont montré, par l'utilisation du système deux-hybrides, que Sp1 interagit physiquement avec Oct-1 (Strom *et al.*, 1996; Gunther *et al.*, 2000). D'autres études suggèrent que ces deux facteurs peuvent agir de concert pour activer la transcription des gènes bêta-galactoside alpha2,6-sialyltransférase (hST6Gal I) (Taniguchi *et al.*, 2000), PU.1 chez la souris (Chen *et al.*, 1996), et U2 snRNA (Strom *et al.*, 1996). Il existe également des exemples de gènes dont la transcription serait régulée à la fois par Sp1 et NF-Y, soit les gènes alpha-globin chez le lapin (Yost *et al.*, 1993) et Thy-1 chez la souris (Spanopoulou *et al.*, 1991) puis entre des membres de la famille Oct et NF-Y, soit les gènes MHC classe II (Boss, 1997) et la lipoprotéine lipase (LPL) (Morin *et al.*, 1995). Un autre exemple, particulièrement intéressant en ce qui nous concerne, est celui du gène humain « aromatic L-amino acid decarboxylase » (*AADC*) pour qui la transcription nécessiterait l'intervention à la fois de Sp1, de NF-Y et d'un membre de la famille Oct dans la lignée de neuroblastome SK-N-BE (Raynald *et al.*, 1998). Ces exemples laissent donc à penser que la coopération entre ces facteurs est possible.

4.2.3 Mécanismes hypothétiques de la régulation transcriptionnelle de *GPC3*

Par quel mécanisme la transcription tissu-spécifique de *GPC3* est-elle régie? Mentionnons d'abord que les résultats disponibles actuellement ne sont pas suffisants pour concevoir un modèle rigoureux. Les propos qui suivent seront donc hautement spéculatifs. Le fait que le promoteur de *GPC3* (-3279 à +112) puisse activer la transcription d'un rapporteur dans un type cellulaire n'exprimant pas *GPC3* (HeLa) (Huber *et al.*, 1998) nous contraint à envisager les deux scénarios suivants : i) un élément *cis* nécessaire à la répression du gène est situé à l'extérieur de la région -3279 à +112 ou ii) le contexte nucléaire du promoteur est impliqué dans la régulation du gène. Si la première hypothèse est vraie, il faudra trouver l'élément en question, l'éventuel répresseur qui s'y lie et tracer un lien entre l'activité de ce dernier et l'état de répression de *GPC3*. L'élément peut aussi bien se trouver en amont du site d'initiation de la transcription qu'en aval, dans les introns. La recherche de celui-ci pourrait alors s'avérer très longue puisqu'il

faudrait éventuellement analyser plusieurs kb de séquence dans les introns, le gène *GPC3* s'étendant sur environ 500 kb. Si par contre la seconde hypothèse correspond à la réalité, les considérations suivantes peuvent s'appliquer.

Discutons d'abord de la nature des facteurs et de leur rôle potentiel comme régulateur. Sp1, étant exprimé de façon ubiquitaire (Philipsen et Suske, 1999), ne semble pas pouvoir réguler l'expression tissu-spécifique de *GPC3*. Nous avons vu cependant que d'autres facteurs de cette famille peuvent lier le même élément, dont Sp4 qui est retrouvé de façon prépondérante dans le cerveau (Philipsen et Suske, 1999). *GPC3* n'est pas exprimé dans le cerveau (Hsu *et al.*, 1997) et, par conséquent, si la tissu-spécificité ne tenait qu'à ce facteur, une expression dans ce tissu devrait être observée. NF-Y est également exprimé dans virtuellement tous les tissus. Cependant, nous avons vu que NF-YA est exprimé différemment dans certaines cellules et dans certaines situations, empêchant ainsi l'activation par l'hétérotrimère (Marziali *et al.*, 1997). Bien qu'on ne puisse écarter ce mécanisme pour expliquer la régulation de *GPC3* dans les neuroblastomes étudiés, celui-ci pourrait difficilement expliquer la répression observée dans la plupart des tissus adultes. En effet, dans tous ces tissus, un grand nombre de gènes est susceptible de nécessiter la participation de NF-Y (présence de NF-Y dans 30 % des promoteurs; Bucher, 1990) et donc, l'expression de NF-YA. Les membres de la famille Oct constituent les candidats les plus intéressants pour expliquer l'expression tissu-spécifique, du moins dans le NB, du fait que ces facteurs font partie de la famille POU dont plusieurs membres sont impliqués dans le développement et le fonctionnement du système nerveux, par exemple Oct-2, Oct-6, Brn-1, Brn-2, Brn-3.0, Brn-3.1 et Brn-3.2 (Latchman, 1999; Schonemann *et al.*, 1998). Si l'on s'en tient aux facteurs Oct, considérant la prédiction par TFSEARCH (figure 35), il semble improbable que Oct-2 soit impliqué dans l'activation de *GPC3* étant donné son rôle prépondérant de répresseur dans les neurones (Latchman, 1999). Pour ce qui est de Oct-6, qui joue un rôle connu dans la myélinisation des neurones périphériques (Kamholz *et al.*, 1999), son rôle n'est pas impossible mais aucun indice ne permet d'avancer une telle hypothèse. Il reste alors Oct-1 qui, malgré son expression dans pratiquement tous les tissus, semble régulé à la baisse dans les neurones qui ne se divisent plus (Lakin *et al.*,

1995). On pourrait donc penser que, dans les neurones normaux du système nerveux sympathique, *Oct-1* ne serait pas exprimé, *GPC3* non plus, alors que dans certains NB, *Oct-1* serait exprimé de nouveau, activant alors *GPC3*. Par contre, ce modèle ne semble pas pouvoir, lui non plus, réguler la transcription de *GPC3* dans l'ensemble des tissus d'un organisme étant donné son expression ubiquitaire.

Si la régulation de la transcription de *GPC3* ne s'opère pas selon les spéculations discutées ci-haut, il reste la possibilité qu'un cofacteur tissu-spécifique soit impliqué dans des interactions protéines-protéines avec les TF énumérés ci-dessus. Un exemple de ce mécanisme est représenté par l'activation transcriptionnelle tissu-spécifique du gène *probasin* dans la prostate par le récepteur aux androgènes (AR) agissant de concert avec le cofacteur FHL2, lui-même spécifiquement exprimé dans la prostate et le myocarde (Muller et al., 2000). Le facteur NF1 pourrait également réguler la transcription par l'emploi de ce mécanisme. Ce facteur peut activer ou réprimer la transcription d'un même gène, en l'occurrence celui du récepteur adrénergique α_{1B} (α_{1B} AR), dépendamment du type cellulaire (Gao et Kunos, 1998). Les auteurs de cette étude ont mis en évidence des domaines activateur et répresseur et ont isolé une protéine qui ne lie pas l'ADN mais qui interagit avec le domaine activateur de NF1. Il a été suggéré que cette protéine puisse être un cofacteur de NF1 impliqué dans l'activation de la transcription cellule-spécifique de α_{1B} AR (Gao et Kunos, 1998). Étant donné que les résultats de notre étude suggèrent l'intervention de trois facteurs ubiquitaires pour l'activation transcriptionnelle de *GPC3*, la tissu-spécificité d'expression pourrait être expliquée par l'intervention d'un cofacteur tissu-spécifique capable de stabiliser la liaison de l'un ou l'autre de ces facteurs au niveau du promoteur du gène. Un tel mécanisme pourrait expliquer le fait que les empreintes qui chevauchent les éléments Oct et NF-Y dans la lignée qui exprime *GPC3* (SJNB-7) semblent être des formes simplement élargies des empreintes situées aux mêmes endroits dans la lignée qui ne l'exprime pas (SK-N-FI) (figure 35), suggérant qu'un intervenant, comme un cofacteur, pourrait favoriser une meilleure interaction entre les TF et l'ADN.

Finalement, comme nous l'avons mentionné précédemment, la configuration du promoteur de *GPC3* pourrait être impliquée dans la régulation du gène, par exemple, en limitant l'accessibilité des facteurs activant le gène ou en facilitant des interactions en *cis* à distance. Dans une telle situation, des études plus poussées devront être menées afin de déterminer comment cet accès pourrait être régulé.

4.3 Conclusion

Nous avons démontré que le promoteur de *GPC3* est partiellement méthylé chez les filles et que cette méthylation est vraisemblablement liée au X inactif, suggérant que *GPC3* n'échappe pas à l'inactivation du X chez l'humain. Outre l'inactivation du X, la méthylation ne semble pas être nécessaire à la répression de *GPC3*, du moins dans les tissus normaux. Dans les cellules tumorales embryonnaires investiguées, bien que la plupart des échantillons présentent un profil de méthylation semblable à celui des cellules normales, des anomalies de méthylation ont été observées dans certains échantillons, essentiellement dans des NB de filles et dans des WT de garçons, sans toutefois présenter de lien clair avec le statut d'expression. La méthylation, bien que susceptible d'influencer le niveau d'expression, ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans l'expression de *GPC3* dans les tumeurs embryonnaires.

Notre étude de cartographie des interactions ADN-protéines a mis en évidence un grand nombre d'empreintes communes aux deux lignées de NB exprimant différemment le gène *GPC3*. Celles-ci ne présentent toutefois pas le profil typique des interactions rencontrées à l'intérieur des nucléosomes. Le fait que la plupart de ces empreintes ait été détectées avec les UVC, qui sont sensibles aux structures secondaires, et que peu d'entre elles l'ont été avec le DMS, suggère que le promoteur de *GPC3* pourrait adopter une conformation particulière au contexte intra-nucléaire. Des empreintes spécifiques à la lignée qui exprime *GPC3*, détectées par des traitements au DMS et aux UVC, ont été mises en évidence et celles-ci chevauchent des éléments susceptibles de lier Sp1, NF-Y et Oct-x. Bien que des études ont confirmé l'implication de Sp1 dans l'activation transcriptionnelle de *GPC3*, il n'en est pas encore de même pour NF-Y et Oct-x.

En ce qui a trait au mécanisme de régulation de la transcription de *GPC3*, nous en venons aux conclusions suivantes : i) la régulation transcriptionnelle tissu-spécifique de *GPC3* implique un élément *cis* répresseur situé à l'extérieur des régions investiguées jusqu'à présent inconnu ou ii) les éléments *cis* connus actuellement, et éventuellement leur TF correspondant, sont les seuls à participer à la régulation transcriptionnelle et leur accès au promoteur pourrait être régulé par la conformation particulière du promoteur à l'intérieur du noyau et peut-être aussi par l'intervention d'un cofacteur tissu-spécifique encore inconnu pour le moment.

Les étapes suivantes de cette étude consisteront éventuellement à : i) terminer l'étude de cartographie des interactions ADN-protéines entreprise (approches DMS et UVC); ii) valider ou infirmer certaines empreintes mises en évidence avec l'approche UVC en utilisant une tierce approche, la DNaseI *in vivo*; iii) vérifier la capacité des éléments *cis* identifiés à lier des facteurs nucléaires par des études de retardement sur gel et identifier ces facteurs immunologiquement par des expériences de super-retardement sur gel ; iv) vérifier la capacité de ces facteurs à réguler la transcription de *GPC3* dans le contexte nucléaire endogène, en inactivant les facteurs impliqués à l'intérieur de cellules exprimant *GPC3* en étudiant, par exemple, l'effet produit par la transfection d'ADNc antisens de ces facteurs.

RÉFÉRENCES

Alland, L., R. Muhle, H.Jr. Hou, J. Potes, L. Chin, N. Agus-Schreiber et R.A DePinho (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387** : 49-55

Antequera, F. et A. Bird (1993a) Dans : DNA methylation : molecular biology and biological significance (Édité par J.P. Jost et H.P. Saluz), pp. 169-185. Basel, Birkhauser Verlag.

Antequerra, F. et A. Bird (1993b) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 11995-11999

Ayer, D.E., Q.A. Lawrence et R.N. Eisenman (1995) Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* **80** : 767-776

Barlev, N.A., R. Candau, L. Wang, P. Darpino, N. Silverman et S.L. Berger (1995) Characterization of physical interactions of the putative transcription adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **270** : 19337-19344

Barlow, D.P. (1997) Competition – a common motif for the imprinting mechanism ? *EMBO J.* **16** : 6869-6905

Baylin, B.B. et J.G. Herman (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis. *Trends Genet.* **16** : 168-174

Baylin, B.B., J.G. Herman, J.R. Graff, P.M. Vertino et J.-P. Issa (1998) Alteration in DNA methylation : a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **72** : 141-196

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

Berger, S. (1999) Gene activation by histone and factor acetyltransferase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11** : 336-341

Bestor, T.H. et V.M. Ingram (1983) Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80** : 5559-5563

Bhattacharya, S.K., S. Ramchandani, N. Cervoni et M. Szyf (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* **397** : 579-583

Bird, A. (1999) DNA methylation *de novo*. *Science* **286** : 2287-2288

Bird, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321** : 209-213

Bird, A.P. (1995) Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.* **11** : 94-100

Bird, A.P. et A.P. Wolffe (1999) Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. *Cell* **99** : 451-454

Borsani, G., R. Tonlorenzi, M.C. Simmler, L. Dandolo, D. Arnaud, V. Capra, M. Grompe, A. Pizzuti, D. Muzny, C. Lawrence, H.F. Willard, P. Avner et A. Ballabio (1991) Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* **351** : 325-329

Boss, J.M. (1997) Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr. Opin. Immunol.* **9** : 107-113

Brandeis, M., D. Frank, I. Keshet, Z. Siegfried, M. Mendelsohn, A. Nemes, V.

Temper, A. Razin et H. Cedar (1994) Sp1 elements protect a CpG island from the novo methylation. *Nature* **371** : 435-438

Brandeis, M. T. Kafri, M. Ariel, J.R. chaillet, J. McCarrey, A. Razin et H. Cedar (1993) The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *EMBO J.* **12** : 3669-3677

Brockdorff, N., A. Ashworth, G.F. Kay, P. Cooper, S. Smith, V.M. McCabe, D.P. Norris, G.D. Penny, D. Patel et S. Rastan (1991) Conservation of position and exclusive expression of mouse *Xist* from inactive X chromosome. *Nature* **351** : 329-331

Brockdorff, N., A. Ashworth, G.F. Kay, V.M. McCabe, D.P. Norris, P.J. Cooper, S. Swift et S. Rastan (1992) The product of the mouse *Xist* gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* **71** : 515-526

Brodeur, G.M. (1995) Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur. J. Cancer* **31A** : 505-510

Brodeur, G.M., J.M. Maris, D.J. Yamashiro, M.D. Hogarty et P.S. White (1997) Biology and genetics of human neuroblastomas. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **19** : 93-101

Brown, C.J., A. Ballabio, J.L. Rupert, R.G. Lafreniere, M. Grompe, R. tonlorenzi et H.F. Willard (1991a) A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349** : 38-44

Brown, C.J., B.D. Hendrich, J.L. Rupert, R.G. Lafreniere, Y. Xing, J. Lawrence et H.F. Willard (1992) The human *XIST* gene : analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* **71** : 527-542

Brown, C.J., R.G. Lafreniere, V.E. Powers, G. Sebastio, A. Ballabio, A.L. Pettigrew, D.H. Ledbetter, E. Levy, I.W. Craig et H.F. Willard (1991b) Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature* **349** : 82-84

Bucher, P. (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* **212** : 563-578

Buschhausen, G., B. Wittig, M. Graessmann et A. Graessmann (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

Calkhoven, C.F. et G. Ab (1996) Multiple steps in the regulation of transcription-factor level activity. *Biochem. J.* **317** : 329-342

Cano-Gauci, D.F., H.H. Song, H. Yang, C. McKerlie, B. Choo, W. Shi, R. Pullano, T.D. Piscione, S. Grisaru, S. Soon, L. Sedlackova, A.K. Tanswell, T.W. Mak, H. Yeger, G.A. Lockwood, N.D. Rosenblum et J. Filmus (1999) Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J. Cell Biol.* **146** : 255-264

Carrel, L. et H.F. Willard (1999) Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96** : 7364-7369

Cedar, H. et G.L. Verdine (1999) The amazing demethylase. *Nature* **397** : 568-569

Cervoni, N., S. Bhattacharya et M. Szyf (1999) DNA demethylase is a processive enzyme. *J. Biol. Chem.* **274** : 8363-8366

Chakravarti, D., V.J. LaMorte, M.C. Nelson, T. Nakajima, I.G. Schulman, H. Juguilon, M. Montminy et R.M. Evans (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383** : 99-103<

Chandran, U.R. et D.B. DeFranco (1999) Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription. *Behav. Brain Res.* **105** : 29-36

Chen, H., P. Zhang, H.S. Radomska, C.J. Hetherington, D.E. Zhang et D.G. Tenen (1996) Octamer binding factors and their coactivator can activate the murine PU.1 (spi-1) promoter. *J. Biol. Chem.* **271** : 15743-15752

Chiang, Y.C., P. Komarnitsky, D. Chase et C.L. Denis (1996) ADR1 activation domains contact the histone acetyltransferase GCN5 and the core transcriptional factor TFIIB. *J. Biol. Chem.* **271** : 32359-32365

Choi, C., S. Cho, I. Horikawa, A. Berchuck, N. Wang, E. Cedrone, S.W. Jung, J.B. Lee, J. Kerr, G. Chenevix-Trench, S. Kim, J.C. Barrett et M. Koi (1997) Loss of heterozygosity at chromosome segment Xq25-26.1 in advanced human ovarian carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **20** : 234-242

Christman, J.K., G. Sheikhnejad, M. Dizik, S. Abileah et E. Wainfan (1993) Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis* **14** : 551-557

Clark, S.J., J. Harrison et M. Frommer (1995) CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat. Genet.* **10** : 20-27

Coulombe, B. (1999a) DNA wrapping in transcription initiation by RNA polymerase II. *Biochem. Cell. Biol.* **77** : 257-264

Coulombe, B. (1999b) Modèles.

Internet : http://labcoulombe.usherb.ca/html/mod_les.htm

Coulombe, B. et Z.F. Burton (1999) DNA bending and wrapping around RNA polymerase : a revolutionary model describing transcriptional mechanisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** : 457-478

Coulombe, B., J. Li et J. Greenblat (1994) Topological localization of the human transcription factors IIA, IIB, TATA box-binding protein, and RNA polymerase II-associated protein 30 on a class II promoter. *J. Biol. Chem.* **269** : 19962-19967

Cross, S., R. Meehan, X. Nan et A. Bird (1997) A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat. Genet.* **13** : 256-259

Currie, R.A. (1998) NF-Y is associated with the histone acetyltransferases GCN5 and P/CAF. *J. Biol. Chem.* **273** : 1430-1434

Davie, J.R. et D.N. Chadee (1998) Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J. Cell. Biochem.* **S30/31** : 203-213

Davie, J.R. et V.A. Spencer (1999) Control of histone modifications. *J. Cell. Biochem.* **S32/33** : 141-148

de Jong, R.N. et P.C. van der Vliet (1999) Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells : cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene* **236** : 1-12

Denissenko, M., J.X. Chen, M.-S. Tang et J.P. Pfeifer (1997) Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human *p53* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 3893-3898

Douziech, M., D. Forget, J. Greenblatt et B. Coulombe (1999) Topological localization of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in the initiation complex. *J. Biol. Chem.* **274** : 19868-19873

Drouin, R., J.-P. Therrien, M. Angers et S. Ouellet (2000) *In vivo* DNA analysis. Dans : *Methods in molecular biology* (Édité par T. Moss), seconde édition, chapitre 13. Humana Press, Totowa, NJ (sous presse)

Eden, S., T. Hashimshony, I. Keshet, H. Cedar et A.W. Thorne (1998) DNA methylation patterns histone acetylation. *Nature* **394** : 842

Feil, R., J. Walter, N.D. Allen et W. Reik (1994) Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *IGF2* and *H19* genes. *Development* **120** : 2933-2943

Feinberg, A.P., C.W. Gehrke, K.C. Kuo et M. Ehrlich (1998) Reduced genomic 5-méthylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res.* **48** : 1159-161

Feinberg, A.P. et B. Vogelstein (1983a) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301** : 89-92

Feinberg, A.P. et B. Vogelstein (1983b) Hypomethylation of raas oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111** : 47-54

Filmus, J., J.G. Church et R.N. Buick (1988) Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine. *Mol. Cell. Biol.* **8** : 4243-4249

Forget, D, F. Robert, G. Grondin, Z.F. Burton, J. Greenblatt et B. Coulombe (1997) RAP74 induces promoter contact by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 7150-7155

Fry, C.J. et P.J. Farnham (1999) Context-dependent transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **274** : 29583-29586

Fujita, N., N. Shimotake, I. Ohki, T. Chiba, H. Saya, M. Shirakawa et M. Nakao (2000) Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol. Cell. Biol.* **20** : 5107-5118

Furgurson-Smith, A.C., H. Sasaki, B.M. Cattnach et M.A. Surani (1993) PARENTAL

origin specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature* **362** : 751-755

Gama-Sosa, M.A., V.A. Slagel, R.W. Trewin, R. Oxenhandler, K.C. Kuo, C.W. Gehrke et M. Ehrlich (1983) The 5-méthylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* **11** : 6883-6894

Gao, B. et G. Kunos (1998) Cell type-specific transcriptional activation and suppression of the alpha1B adrenergic receptor gene middle promoter by nuclear factor 1. *J. Biol. Chem.* **273** : 31784-31787

Gardiner-Garden, M. et M. Frommer (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196** : 261-282

Gartler, S.M. et M.A. Goldman (1994) Reactivation of inactive X-linked genes. *Dev. Genet.* **5** : 504-514

Gavin, I.M. et R.T. Simpson (1997) Interplay of yeast global transcriptional regulators Ssn6p-Tup1p and Swi-Snf and their effect on chromatin structure. *EMBO J.* **16** : 6263-6271

Gill, G., E. Pascal, Z.H. Tseng et R. Tjian (1994) A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 192-196

Gonzalez, A.D., M. Kaya, W. Shi, H. Song, J.R. Testa, L.Z. Penn et J. Filmus (1998) OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J. Cell Biol.* **141** : 1407-1414

Goldman, M.A., P.S. Reeves, C.M. Wirth, W.J. Zupko, M.A. Wong, S. Edelhoff et C.M. Disteché (1998) Comparative methylation analysis of murine transgenes that

undergo or escape X-chromosome inactivation. *Chromosome Res.* **6** : 397-404

Gonzalez-Zulueta, M., C.M. Bender, A.S. Yang, T. Nguyen, R.W. Beart, J.M. Van Tornout et P.A. Jones (1995) Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res.* **55** : 4531-4535

Goto, T. et M. Monk (1998) Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** : 362-378

Grant, M., M. Zuccotti et M. Monk (1992) Methylation of CpG sites of two X-linked genes coincides with X-inactivation in the female mouse embryo but not in the germ line. *Nat. Genet.* **2** : 161-166

Greenblatt, J. (1997) RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9** : 310-319

Gregory, P.D., A. Schmid, M. Zavari, M. Munsterkotter et W. Horz (1999) Chromatin remodelling at the PH08 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* **18** : 6407-6414

Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin et W.M. Gelbart (1996) An introduction to genetic analysis. 6ième édition, W.H. Freeman and company, New York, NY

Gruenbaum, Y., H. Cedar et A. Razin (1982) Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature* **295** : 620-622

Gu, W. et R.G. Roeder (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90** : 595-606

Gunther, M., M. Laithier et O. Brison (2000) A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening. *Moll. Cell. Biochem.*

210 : 131-142

Hahn, S. (1993) Structure(?) and function of acidic transcription activators. *Cell* **72** : 481-483

Hariharan, N., D.E. Kelley et R.P. Perry (1991) Delta, a transcription factor that binds to downstream elements in several polymerase II promoters, is a functionally versatile zinc finger protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 9799-9803

Hassig, C.A », T.C. Fleischer, A.N. Billin, S.L. Schreiber et D.E. Ayer (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* **89** : 341-347

Hatfield, L. et P. Hearing (1993) The NFIII/OCT-1 binding site stimulates adenovirus DNA replication *in vivo* and is functionally redundant with adjacent sequences. *J. Virol.* **67** : 3931-3939

Hendrich, B.D., C.J. Brown et H.F Willard (1993) Evolutionary conservation of possible functional domains of the human and murine XIST genes. *Hum. Mol. Genet.* **2** : 663-672

Hendrich, B., U. Hardeland, H.-H. Ng, J. Jiricny et A. Bird (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* **401** : 301-304

Heinzel T., R.M. Lavinsky, T. M. Mullen, M. Soderstrom, C.D. Laherty, J. Torchia, W.M. Yang, G. Brard, S.D. Ngo, J.R. Davie, E. Seto, R.N. Eisenman, D.W. Rose, C.K. Glass et M.G. Rosenfeld (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387** : 43-48

Hendrich, B. et A. Bird (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **18** : 6538-6547

Henriksson, A., T. Almlöf, J. Ford, I.J. McEwan, J. Gustafsson et A.P.H. Wright (1997) Role of the Ada adaptor complex in gene activation by the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* **17** : 3065-3073

Herman, J.G., A. Merlo, L. Mao, R.G. Lapidus, J.P. Issa, N.E. Davidson, D. Sidranski et S.B. Baylin (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* **55** : 4525-4530

Herman, J.G., A. Umar, K. Polyak, J.R. Graff, N. Ahuja, J.P. Issa, S. Markowitz, J.K. Willson, S.R. Hamilton, K.W. Kinzler, M.F. Kane, R.D. Kolodner, B. Vogelstein, T.A. Kunkel et S.B. Baylin (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 6870-6875

Holstege, F.C.P. et R.A. Young (1999) Transcriptional regulation : Contending with complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** : 2-4

Horiuchi, J., N. Silverman, G.A. Marcus et L. Guarente (1995) ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 1203-1209

Hsu, H.-C., W. Cheng et P.-L. Lai (1997) Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma : biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res.* **57** : 5179-5184

Huber, R., L. Crisponi, R. Mazzarella, C.-N. Chen, Y. Su, H. Shizuya, E.Y. Chen, A. Cao et G. Pilia (1997) Analysis of exon/intron structure and 400 kb of genomic sequence surrounding the 5'-promoter and 3'-terminal ends of the human glypican 3 (GPC3) gene. *Genomics* **45** : 48-58

Huber, R., S. Hansen, M. Strazzullo, G. Pengue, R. Mazzarella, M. D'Urso, D. Schlesinger, G. Pilia, S.M. Gartler et M. D'Esposito (1999) DNA methylation in

transcriptional repression of two differentially expressed X-linked genes, *GPC3* and *SYBL1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** : 616-621.

Huber, R., D. Schlessinger, G. Pilia (1998) Multiple Sp1 sites efficiently drive transcription of the TATA-less promoter of the human glypican 3 (*GPC3*) gene. *Gene* **214** : 35-44

Huddart, S.N. et J.R. Mann (1991) Screening for neuroblastoma. *Arch. Dis. Child* **66** : 1272-1274

Hughes-Benzie, R.M., A.G.W. Hunter, J.E. Allanson et A.E. Mackenzie (1992) Simpson-Golabi-Behmel syndrome associated with renal dysplasia and embryonal tumor. *Am. J. Med. Genet.* **43** : 428-435

Jaenisch, R. (1997) DNA methylation and imprinting : why bother ? *Trends Genet.* **13** : 323-329

Jeppesen, P. et B.M. Turner (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* **74** : 281-289

Jones, P.A. (1999) The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15** : 34-37

Jüttermann, R., E. Li et R. Jaenisch (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 11797-11801

Kadosh, D. et K. Struhl (1997) Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89** : 365-371

Kafri, T., X. Gao et A. Razin (1993) Mechanistic aspects of genome-wide

demethylation in the preimplantation mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 10558-10562

Kamei, Y., L. Xu, T. Heinsel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S.C. Lin, R.A. Heyman, D.W. Rose, C.K. Glass et M.G. Rosenfeld (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **84** : 403-414

Kamholz, J., R. Awatramani, D. Menichella, H. Jiang, W. Xu et M. Shy (1999) Regulation of myelin-specific gene expression. Relevance to CMT1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **883** : 91-108

Kass, S.U., N. Landsberger et A.P. Wolffe (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.* **7** : 157-165

Kay, G.F., G.D. Penny, D. Patel, A. Ashworth, N. Brockdorff et S. Rastan (1993) Expression of Xist during mouse development suggests a role in the initiation of X chromosome inactivation. *Cell* **72** : 171-182

Kemler, I. et W. Schaffner (1990) Octamer transcription factors and the cell type-specificity of immunoglobulin gene expression. *FASEB J.* **4** : 1444-1449

Keshet, I., I. Lieman-Hurwitz et H. Cedar (1986) DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* **44** : 535-543

Kim, E.C., J.S. Lau, S. Rahlwings et A.S. Lee (1997) Positive and negative regulation of the human Thymidine Kinase promoter mediated by CCAAT binding transcription factors NF-Y/CBF, dpbA and CDP3/cut. *Cell. Growth Diff.* **8** : 1329-1338

Kim, I.-S., S. Sinha, B. Crombrugghe et S.N. Maity (1996) Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex : CBF-B interacts simultaneously with both

the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol. Cell. Biol.* **16** : 4003-4013

Kim, J et D.J. Shapiro (1996) In simple synthetic promoters YY1-induced DNA bending is important in transcription activation and repression. *Nucleic Acids Res.* **24** : 4341-4348

Knudsen, A.G. (1971) Mutation and cancer : Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** : 820-823

Lage, H. et M. Dietel (1997) Cloning and characterization of human cDNAs encoding and protein with high homology to rat intestinal development protein OCI-5. *Gene* **188** : 151-156

Lage, H., M. Dietel, G. Fröschle et A. Reyman (1998) Expression of the novel mitoxantrone resistance associated gene MXR7 in colorectal malignancies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **36** : 58-60

Laherty, C.D. W.-M. Yang, J.-M. Sun, J.R. Davie, E. Seto et R.N. Eisenman (1997) Histone deacetylase associated with the mSin3 corepressor mediate Mad transcriptional repression. *Cell* **89** : 349-356

Lakin, N.D., R. Palmer, K.A. Lillycrop, M.K. Howard, L.C. Burke, N.S.B. Thomas et D.S. Latchman (1995) Down regulation of the octamer binding protein Oct-1 during growth arrest and differentiation of a neuronal cell line. *Mol. Brain Res.* **28** : 47-54

Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez et H. Prydz (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13** : 1095-1107

Latchman, D.S. (1999) POU family transcription factors in the nervous system. *J. Cell. Physiol.* **179** : 126-133

Laurent, B.C., X.L. Yang et M. Carlson (1992) An essential *Saccharomyces*

cerevisiae gene homologous to SNF2 encodes a helicase-related protein in a new family. *Mol. Cell. Biol.* **12** : 1893-1902

Leclerc, J.M. et D. Dupuis-Lalonde (2000) Mise à jour sur le neuroblastome. (internet : <http://hemato-onco.justine.umontreal.ca/misneuro.htm>)

Lee, J.T. et R. Jaenisch (1997) The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7** : 274-280

Lee, T.C., Y. Zhang et R.J. Schwartz (1994) Bifunctional transcriptional properties of YY1 in regulating muscle actin and c-myc gene expression during myogenesis. *Oncogene* **9** : 1047-1052

Lei, H., S.P. Oh, M. Okano, R. Jutterman, K.A. Goss, R. Jaenisch, E. Li (1996) *De novo* DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* **122** : 3195-3205

Lengauer, C., K.W. Kinzler et B. Vogelstein (1997) DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 2545-2550

Lengauer, C., K.W. Kinzler et B. Vogelstein (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396** : 643-649

Li, E., C. Beard et R. Jaenisch (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366** : 362-385

Li, M., B. Choo, Z.-M. Wong, J. Filmus et R.N. Buick (1997) Expression of OCI-5/Glypican 3 during intestinal morphogenesis : regulation by cell shape in intestinal epithelial cells. *Exp. Cell. Res.* **235** : 3-12

Li, Q., M. Herrler, N. Landsberger, N. Kaludov, V.V. Ogryzko, Y. Nakatani et A.P. Wolffe (1998) *Xenopus* NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the *Xenopus hsp70* promoter *in vivo*.

EMBO J. **17** : 6300-6315

Liang, G., C.E. Salem, M.C. Yu, H.D. Nguyen, F.A Gonzales, T.T. Nguyen, P.W. Nichols et P.A. Jones (1998) DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics* **53** : 260-268

Lin, H., R. Huber, D. Schlessinger et P.J. Morin (1999) Frequent silencing of the *GPC3* gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* **59** : 807-810

Lin, Y.S. et M. Green (1991) Mechanism of action of an acidic transcriptional activator *in vitro*. *Cell* **64** : 971-981

Liu, L. D.M. Scolnick, R.C. Trievel, H.B. Zhang, R. Marmostein, T.D. Halazonetis et S.L. Berger (1999) p53 sites acetylated *in vitro* by PCAF and p300 are acetylated *in vivo* in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **19** : 1202-1209

Lock, L., N. Takagi et G.R Martin (1987) Methylation of the HPRT gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell* **48** : 39-46

Lyco, F., B.H. Ramsahoye, H. Kashevsky, M. Tudor, M.-A. Mastrangelo, T.L. Orr-Weaver et R. Jaenish (1999) Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. *Nat. Genet.* **23** : 363-366

Macleod, D., J. Charlton, J. Mullins and P.A. Bird (1994) Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev.* **8** : 2282-2292

MacLeod, A.R. et M. Szyf (1995) Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **270** : 8037-8043

Maher, E.R. et W. Reik (2000) Beckwith-Wiedemann syndrome : imprinting in clusters revisited. *J. Clin. Invest.* **105** : 247-252

Mallo, G.V., H. Rechreche, J.M. Frigerio, D. Rocha, A. Zweibaum, M. Lacasa, B.R. Jordan, N.J. Dusetti, J.C. Dagorn et J.L. Iovanna (1997) Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **74** : 35-44

Mann, J.R. et R.H. Lovell-Badge (1984) Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature* **310** : 66-67

Mantovani, R. (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239** : 15-27

Marcus, G.A., N. Silverman, S.A. Berger, J. Horiushi et L. Guarente (1994) Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: a putative transcriptional adaptor. *EMBO J.* **13** : 4807-4815

Marin, M., A. Karis, P. Visser, F. Grosveld et S. Philipsen (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89** : 619-628

Maris, J.M. et K.K. Matthay (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **17**: 2264-2279.

Marziali, G., E. Perrotti, R. Ilari, U. Testa, E.U. Coccia et A. Battistini (1997) Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in heme-treated Friend Leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **17** : 1387-1395

Matheos, D.D., M.T. Ruiz, G.B. Price et M. Zannis-Hadjopoulos (1998) Oct-1 enhances the *in vitro* replication of a mammalian autonomously replicating DNA sequence. *J. Cell. Biochem.* **68** : 309-327

Mattei, M.G., J.F. Mattei, I. Vidal et F. Giraud (1981) Structural anomalies of the X chromosome and inactivation center. *Hum. Genet.* **56** : 401-408

Matthews, B.W. (1988) Protein-DNA interaction. No code for recognition. *Nature* **335** : 294-295

Matthias, P. (1998) Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site : who is doing what? *Semin. Immunol.* **10** : 155-163

Maxam, A.M. et W. Gilbert (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65** : 499-560.

McCoy, C., D.E. Smith et M.M. Cornwell (1995) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the MDR1 promoter is mediated by EGR1. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 6100-6108

McGrath, J. et D. Solter (1984) Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* **226** : 1317-1319

Meehan, R.R., J.D. Lewis, S. McKay, E.L. Kleiner et A.P. Bird (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58** : 499-507

Melcher, K. et S.A. Johnston (1995) GAL4 interacts with TATA-binding protein and co-activators. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 2839-2848

Miltenberger, R.J., P.J. Farnham, D.E. Smith, J.M. Stommel et M.M. Cornwell (1995) v-Raf activates transcription of growth-responsive promoters via GC-rich sequences that bind the transcription factor Sp1. *Cell Growth Differ.* **6** : 549-566

Momparler, R.L. et V. Bovenzi (2000) DNA methylation and cancer. *J. Cell. Physiol.* **183** : 145-154

Monk, M. (1986) Methylation and the X chromosome. *Bioessays* **4** : 204-208

Monk, M. (1995) Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev. Genet.* **17** : 188-197

Monk, M., M. Boubelik et S. Lenhert (1987) Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* **99** : 371-382

Monk, M. et M.I. Harper (1979) Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature* **281** : 311-313

Monk, M. et H. Kathuria (1997) Dosage compensation for an X-linked gene in pre-implantation mouse embryos. *Nature* **270** : 599-601

Morin, C.L., I.R. Schlaepfer et R.H. Eckel (1995) Tumor necrosis factor-alpha eliminates binding of NF-Y and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L1 adipocytes. *J. Clin. Invest.* **95** : 1684-1689

Muller, J.M., U. Isele, E. Metzger, A. Rempel, M. Moser, A. Pscherer, T. Breyer, C. Holubarsch, R. Buettner et R. Schule (2000) FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J.* **19**: 359-369

Munshi, N., M. Merika, J. Yie, K. Senger, G. Chen et D. Thanos (1998) Acetylation of HMG 1(Y) by CBP turns off IFN expression by disrupting the enhanceosome. *Mol. Cell* **2** : 457-467

Murthy, S.S., T. Shen, A. De Rienzo, W.-C. Lee, P.C. Ferriola, S.C. Jhanwar, B.T. Mossman, J. Filmus et J.R. Testa (2000) Expression of *GPC3*, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene* **19** : 410-416

Nagy, L., H.Y. Kao, D. Chakravarti, R.J. Lin, C.A Hassig, D.E Ayer, S.L. Schreiber

et R.M. Evans (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A and histone deacetylase. *Cell* **89** : 373-380

Nakahori, Y., K. Hamano, I. Makoto et Y. Nakagome (1991) Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primers. *Am. J. Med. Genet.* **39** : 472-473.

Nan, X., F.J. Campoy et A. Bird (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88** : 471-481

Nan, X., H.H. Ng, C.A. Johnson, C.D. Laherty, B.M. Turner, R.N. Eisenman et A. Bird (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393** : 386-389

Nan, X., P. Tate, E. Li et A. Bird (1996) DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol. Cell. Biol.* **16** : 414-421

Natarajan, K., B.M. Jackson, H. Zhou, F. Winston et A.G. Hinnebusch (1999) Transcriptional activation by Gcn4p involves independent interactions with SWI/SNF complex and SRB/Mediator. *Mol Cell* **4** : 657-664

Natesan, S. et M.Z. Gilman (1993) DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. *Genes Dev.* **7** : 2497-2509

Neely, K.E., A.H. Hassan, A.E. Wallberg, D.J. Steger, B.R. Cairns, A.P.H. Wright et J.L. Workman (1999) Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol. Cell* **4** : 649-655

Neigeborn, L. et M. Carlson (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **108** : 845-858

- Neri, G., F. Gurrieri, G. Zanni et A. Lin (1998) Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am. J. Med. genet.* **79** : 279-283
- Ng, H.-H., Y. Zhang, B. Hendrich, C.A. Johnson, B.M. Turner, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. Reinberg et A. Bird (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* **23** : 58-61
- Norris, D.P., D. Patel, G.F. Kay, G.D. Penny, N. Brockdorff, S.A. Sheardown et S. Rastan (1994) Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell* **77** : 41-51
- Okano, M. D.W. Bell, D.A. Haber et E. Li (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* **99** : 247-257
- Okano, M., S. Xie et E. Li (1998a) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19** : 219-220
- Okano, M., S. Xie et E. Li (1998b) Dnmt2 is not required for *de novo* and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **26** : 2536-2540
- Panning, B., J. Dausman et R. Jaenisch (1997) X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* **90** : 907-916
- Patikoglou, G. et S.K. Burley (1997) Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26** : 289-325
- Pellegrini, M., G. Pilia, S. Pantano, F. Lucchini, M. Uda, M. Fumi, A. Cao, D. Schlessinger et A. Forabosco (1998) *Gpc3* Expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Dev. Dyn.* **213** : 431-439

Penny, G.D., G.F. Kay, S.A. Sheardown, S. Rastan et N. Brockdorff (1996) Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* **379** : 131-137

Pesce, M. et H.R. Scholer (2000) Oct-4 : control of totipotency and germline determination. *Mol. Reprod.* **55** : 452-457

Peterson, C.L. et I. Herskowitz (1992) Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* **68** : 573-583

Peterson, C.L. et J.L. Workman (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10** : 187-192

Pfeifer, G.P. et A.D. Riggs (1993) Genomic footprinting by ligation mediated polymerase chain reaction. Dans *PCR Protocols: Current methods et Applications. Methods in Molecular Biology*, Vol. 15 (Édité par B. White), pp. 153-168. Humana Press, Totowa, NJ.

Pfeifer, G.P., R.L. Tanguay, S.D. Steigerwald et A.D. Riggs (1990) In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes Dev.* **4** : 1277-1287

Philipsen, S. et G. Suske (1999) A tale of three fingers : the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **27** : 2991-3000

Pilia, G., R.M. R.M. Hughes-Benzie, A. MacKenzie, P. Baybayan, E.Y. Chen, R. Huber, G. Neri, A. Cao, A. Forabosco et D. Schlessinger (1996) Mutations in *GPC3*, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat. Genet.* **12** : 241-247

Pogribny, I.P., L.A. Poirier et S.J. James (1995) Differential sensitivity to loss of cytosine methyl groups within the hepatic p53 gene of folate/methyl deficient rats.

Carcinogenesis **16** : 2863-2867

Pollard, K.J. et C.L. Peterson (1997) Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **17** : 6212-6222

Praillet, C., J.-A. Grimaud et H. Lortat-Jacob (1998) Les protéoglycanes I. Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ? *Médecine/Sciences* **14** : 412-120

Ptaschne, M. (1986) Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* **322** : 697-701

Pugh, B.F. et R. Tjian (1991) Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* **5** : 1935-1945

Ramchandani, S., S.K. Bhattacharya, N. Cervoni et M. Szyf (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** : 6107-6112

Rastan, S. (1982) Timing of X-chromosome inactivation in postimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **71** : 11-24

Rastan, S. et E.J. Robertson (1985) X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **90** : 379-388

Raught, B., B. Khursheed, A. Kazanski et J. Rosen (1994) YY1 represses beta-casein gene expression by preventing the formation of a lactation-associated complex. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 1752-1763

Raynal, J.F., C. Dugast, A. Le Van Thai et M.J. Weber (1998) Winged helix hepatocyte nuclear factor 3 and POU-domain protein brn-2/N-oct-3 bind overlapping sites on the neuronal promoter of human aromatic L-amino acid

decarboxylase gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **56** : 227-237

Razin, A. (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing – a three-way connection. *EMBO J.* **17** : 4905-4908

Razin, A. et H. Cedar (1993) DNA methylation and embryogenesis. *EXS* **64** : 343-357

Razin, A. et R. Shemer (1995) DNA methylation in early development. *Hum. Mol. Genet.* **4 Spec.** :1751-5

Rhee, I., K.W. Jair, R.W. Yen, C. Lengauer, J.G. Herman, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, S.B. Baylin et K.E. Schuebel (2000) CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* **404** : 1003-1007

Rideout, W.M.I., G.A. Coetzi, A.F. Olumi et P.A. Jones (1990) 5-méthylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and *p53* gene. *Science* **249** : 1288-1290

Riggs, A.D. et G.P. Pfeifer (1992) X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet.* **8** : 169-174

Rizwana, R. et P.J. Hahn (1999) CpG methylation reduces genomic instability. *J. Cell Sci.* **112** : 4513-4519

Robert, F., M. Douziech, D. Forget, J.-M. Egly, J. Greenblatt, Z.F. Burton et B. Coulombe (1998) Wrapping of promoter DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIIF. *Mol. Cell* **2** : 341-351

Robert, F., D. Forget, J. Li, J. Greenblatt et B. Coulombe (1996) Localization of subunits of transcription factors IIE and IIF immediately upstream of the transcriptional initiation site of the adenovirus major late promoter. *J. Biol. Chem.* **271** :8517-8520

Robertson, K. D. et P.A. Jones (2000) DNA methylation : past, present and future directions. *Carcinogenesis* **21** : 461-467

Robertson, K.D., E. Ulzvolgyi, G. Liang, C. Talmadge, J. Sumegi, F.A. Gonzales et P.A. Jones (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

Ross J., A. Zinn et E. McCauley (2000) Neurodevelopmental and psychosocial aspects of Turner syndrome. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **6** : 135-141

Rountree, M.R. et E.U. Selker (1997) DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **11** : 2383-2395

Russel, L.B. (1963) Mammalian X-chromosome action : Inactivation limited in spread and in region of origin. *Science* **140** : 976-978

Saikali, Z. et D. Sinnett (2000) Expression of Glypican 3 (*GPC3*) in embryonal tumors. *Int. J. Cancer* **89** : 418-422

Sakaguchi, K., J.E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C.W. Anderson et E. Appella (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* **12** : 2831-2841

Saluja, D., M.F. Vassallo et N. Tanese (1998) Distinct subdomains of human TAFII130 are required for interactions with glutamine-rich transcriptional activators. *Mol. Cell. Biol.* **18** : 5734-5743

Sambrook, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis (1989) Molecular cloning : A laboratory manual. 2ième édition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY

Sasaki, M., P.A. Jones, J.R. Chaillet, A.C. Ferguson-Smith, S.C. Barton, W. Reik

et M.A. Surani (1992) Parental imprinting : potentially active chromatin of the repressed maternal allele of the mouse insulin-like growth factor II (Igf-2) gene. *Genes Dev.* **6** : 1843-1856

Schonemann, M.D., A.K. Ryan, L. Herkman, R.J. McEvelly, J. Bermingham et M.G. Rosenfeld (1998) POU domain factors in neural development. *Adv. Exp. Med. Biol.* **449** : 39-53

Sekido, R., K. Murai, J. Funahashi, Y. Kamachi, A. Fujisawa-Sehara, Y. Nabeshima et H. Kondoh (1994) The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 5692-5700

Seto, E., B. Lewis et T. Shenk (1993) Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature* **365** : 462-464

Shen, J.C., W.M. Rideout et P.A. Jones (1994) The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* **22** : 972-976

Shrivastava, A., S., Saleque, G.V. Kalpana, S. Artandi, S.P. Goff et K. Calame (1993) Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* **262** : 1889-1892

Silverman, N., J. Agapite et L. Guarente (1994) Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc. Acad. Sci. USA* **91** : 11665-11668

Simpson, V.J., T.E Johnson et R.F. Hammen (1986) *Caenorhabditis elegans* DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Res.* **14** : 6711-6719

Singh, H. (1994) Genetic analysis of transcription factors implicated in B lymphocyte development. *Immunol. Res.* **13** : 280-290

Sinha, S., I.-S. Kim, K.Y. Sohn, B. de Crombrughe et S.N. Maity (1996) Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Mol. Cell. Biol.* **16** : 328-337

Sinha, S., S.N. Maity, J. Lu et B. de Crombrughe (1995) Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NF-Y, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 1624-1628

Song, H.H., W. Shi et J. Filmus (1997) OCI-5/Rat Glypican-3 binds to fibroblast growth factor-2 but not to insulin-like growth factor-2. *J. Biol. Chem.* **272** : 7574-7577

Spanopoulou, E., V. Giguere et F. Grosveld (1991) The functional domain of the Thy-1 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* **11** : 2216-2228

Stoger, R., P. Kubicka, C.G. Liu, T. Kafri, A. Razin, H. Cedar et D.P. Barlow (1993) Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf-2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* **73** : 61-71

Strom, A.C., M. Forsberg, P. Lillhager et G. Westin (1996) The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression. *Nucleic Acids Res.* **24** : 1981-1986

Su, W., S. Jackson, R. Tjian et H. Echols (1991) DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev.* **5** : 820-826

Subramanian, V., B. Meyer et G.S. Evans (1998) The murine Cdx-1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* **64** : 11-18

Surani, M.A., S.C. Barton, M.L. Norris (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308** : 548-550

Takagi, N. (1974) Differentiation of X chromosome in early female mouse embryos. *Exp. Cell. Res.* **86** : 127-135

Takagi, N., O. Sugawara et M. Sasaki (1982) Regional and temporal changes in the pattern of X-chromosome replication during the early post-implantation development of the female mouse. *Chromosoma* **85** : 275-286

Taniguchi, A., Y. Hasegawa, K. Higai et K. Matsumoto (2000) Transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene during differentiation of the HL-60 cell line. *Glycobiology* **10** : 623-628

Tauton, J., C.A. Hassig et S.L. Schreiber (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272** : 408-411

Therman, E., G.E. Sarto et K. Patau (1974) Center for Barr body condensation on the proximal part of the human Xq : a hypothesis. *Chromosoma* **44** : 361-366

Tjian, R. et T. Maniatis (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* **77** : 5-8

Tremblay, K.D., J.R. Saam, R.S. Ingram, S.M. Tilghman et M.S. Batolomei (1995) A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nat. Genet.* **9** : 407-413

Trieschmann, L., B. Martin et M. Bustin (1998) The chromatin unfolding domain of chromosomal protein HMG-14 targets the N-terminal tail of histone H3 in nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 5468-5473

Tse, C., A.P. Wolffe et J.C. Hansen (1998) Disruption of high order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **18** : 4629-4638

Tsuchiya, K.D. et H.F. Willard (2000) Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. *Mamm. Genome* **11** : 849-854

Urieli-Shoval, S., Y. Gruenbaum, J. Sedat et A. Razin (1982) The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *FEBS Lett.* **146** : 148-152

Usheva, A. et T. Shenk (1994) TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* **76** : 1115-1121

Veenstra, G.J., P.C. van der Vliet et O.H. Destree (1997) POU domain transcription factors in embryonic development. *Mol. Biol. Rep.* **24** : 139-155

Verrijzer, C.P., A.J. Kal et P.C. van der Vliet (1990) The DNA binding domain (POU domain) of transcription factor oct-1 suffices for stimulation of DNA replication. *EMBO J.* **9** : 1883-1888

Verrijzer, C.P., M. Strating, Y.M. Mul et P.C. van der Vliet (1992) POU domain transcription factors from different subclasses stimulate adenovirus DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **20** : 6369-6375

Vilain, A., N. Vogt, B. Dutrillaux et B. Malfoy (1999) DNA methylation and chromosome instability in breast cancer cell lines. *FEBS Lett.* **460** : 231-234

Wade, P.A., A. Geronne, P.L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry et A.P. Wolffe (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* **23** : 62-66

Wainfan, E. et L.A. Poirier (1992) Methyl groups in carcinogenesis ; effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res.* **52**: 2071s-2077s

Wang, Z.Q., M.R. Fung, D.P. Barlow et E.F. Wagner (1994) Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* **372** : 464-467

Weksberg, R., J.A. Squire et D.M. Templeton (1996) Glypicans : a growing trend. *Nat. Genet.* **12** : 225-227

Wilson, C.J., D.M. Chao, A.N. Imbalzano, G.R. Schnitzler, R.E. Kingston et R.A. » Young (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* **84** : 235-244

Wingender, E., X. Chen, R. Hehl, H. Karas, I. Liebich, V. Matys, T. Meinhardt, M. Prüß, I. Reuter et F. Schacherer (2000) Transfac: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* **28** : 316-319

Internet : <http://transfac.gbf-braunschweig.de/TRANSFAC/index.html>

Workman, J.L. et R.E. Kingston (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **67** : 545-579

Wu, J., J.P. Issa, J. Herman, D.E. Jr. Basset, B.D. Nelkin et S.B. Baylin (1993) Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 8891-8895

Wu, L. et F. Winston (1997) Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **25** : 4230-4234

Wutz, A., O.W. Smrzka, N. Schweifer, K. Schellander, E.F. Wagner et D.P. Barlow (1997) Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island.

Nature **389** : 745-749

Xu, Y., A. Papageorgiou et C. Polychronakos (1998) Developmental regulation of the soluble form of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor in human serum and amniotic fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83** : 437-442

Yang, W.M., C. Inouye, Y.Y. Zeng, D. Bearss et D. Seto (1996) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 12845-12850

Yang, W.M., Y.L. Yao, J.M. Sun, J.R. Davie et E. Seto (1997) Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J. Biol. Chem.* **272** : 28001-28007

Yoshinaga, S.K., C.L. Peterson, I. Herskowitz et K.R. Yamamoto (1992) Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* **258** : 1598-1604

Yost, S.E., B. Shewchuk et R. Hardison (1993) Nuclear protein-binding sites in a transcriptional control region of the rabbit alpha-globin gene. *Mol. Cell. Biol.* **13** : 5439-5449

Yudkovky, N., C. Logie, S. Hahn et C.L. Peterson (1999) Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* **13** : 2369-2374

Zion, M., D. Ben-Yehuda, A. Ayraham, O. Cohen, M. Wetzler, D. Melloul et Y. Ben-Neriah (1994) Progressive *de novo* DNA methylation at the bcr-abl locus in the course of chronic myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 10722-10726

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier :

-le Dr Daniel Sinnett pour m'avoir guidé dans ce projet, pour son soutien et surtout pour sa grande disponibilité, particulièrement dans les moments de difficultés;

-Zeina Saikali pour ses conseils et pour la grande générosité qu'elle m'a constamment manifestée;

-toute l'équipe de l'étage B du Centre de Cancérologie Charles Bruneau de l'Hôpital Sainte-Justine pour les discussions à propos du projet et tout le plaisir partagé;

-le Dr Régen Drouin pour sa participation au projet de cartographie et pour m'avoir guidé dans l'interprétation des résultats;

-Stéphane Ouellet et Isabelle Paradis qui ont participé au projet de cartographie;

-Pascale pour la lecture de ce document, son soutien quotidien et ses encouragements;

-mon fils Simon pour sa participation à la précipitation d'ADN, durant son temps de vacance!

-la Fondation Charles Bruneau et le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour le soutien financier.