

2m11. 2833.1

Université de Montréal

Étude des patrons de méthylation sur le chromosome 22q11

Par
Hélène Lévesque

Faculté des études supérieures
Programme de biologie moléculaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Avril 2000

© Hélène Lévesque, 2000



2011-2012

(Université de Montréal)

(Liste des notes de bacheliers au 15 décembre 2011)

Faculté
Histoire / Géographie

QH
506
U54
2000
N.015

Faculté des études supérieures
Programme de maîtrise en histoire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
pour le diplôme de maîtrise en
histoire (M.A.)
en histoire professionnelle



2011-2012

© Histoire / Géographie 2011

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

« Étude des patrons de méthylation sur le chromosome 22q11 »

Présenté par :

Hélène Lévesque

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mémoire accepté le :

Sommaire

Chez les mammifères, on observe la méthylation au niveau de la cytosine du dinucléotide CpG. La distribution de cette paire de nucléotides à travers le génome n'est pas comme on pourrait le prédire. La fréquence de CpG au niveau du génome est en fait de seulement 5 à 10 % de ce que l'on pourrait prévoir. Cependant, on voit une augmentation de sa fréquence à des niveaux attendus dans des régions riches en CG situées principalement dans les régions promotrices des gènes et que l'on nomme îlots CpG. Les CpG à l'intérieur du génome se trouvent généralement sous une forme méthylée en position 5 de la cytosine. Par contre, les CpG situés dans les régions promotrices des gènes sont normalement non méthylés permettant ainsi l'expression du gène.

La méthylation des îlots CpG joue un rôle important dans deux phénomènes normaux dans la cellule, soit l'inactivation du chromosome X et l'empreinte génomique parentale (*imprinting*). Dans ces deux cas, les dinucléotides CpG sont méthylés au niveau du promoteur inactivant ainsi le gène placé sous leur contrôle. L'empreinte génomique (*imprinting*) est un phénomène présent chez un nombre limité de gènes chez l'humain. La plupart de ces gènes sont regroupés en domaine dans lesquels nous pouvons observer une méthylation différentielle entre les deux allèles du gène. Cette caractéristique rend la méthylation comme un candidat attirant pour identifier d'autres régions pouvant contenir des gènes soumis à l'*imprinting*.

Par une technique servant à isoler des séquences différentiellement méthylées (FP-CGI), nous avons identifié 2 clones localisés sur le bras long du chromosome 22. Ces deux clones sont situés près de la région du gène ZnF74 impliqué dans le syndrome de DiGeorges. De plus, la délétion de DiGeorges semblerait apparaître de façon préférentielle sur le chromosome maternel et certaines des séquences de cette région ont été reportées comme étant répliquées de façon asynchrone. Ces deux observations, ainsi que l'identification de deux clones différentiellement méthylés proche de cette région suggèrent peut-être la présence d'une région soumise à l'*imprinting*.

Par analyse de type Southern d'un des deux clones (L88), nous avons déterminé qu'il y avait bien méthylation différentielle sur le chromosome 22q11. Cependant, il nous a été impossible de conclure à un nouveau domaine soumis à l'*imprinting* car aucune des autres sondes (L53, ZnF74 et Poly-GT) analysées par Southern n'ont montré une méthylation différentielle. Nous avons donc conclu que la méthylation différentielle observée au niveau du clone L88 est spécifique à celui-ci et ne s'étend pas sur une grande région.

Nous avons également approfondi notre étude sur une région du génome de la souris qui présentait une forte homologie avec la région à l'étude chez l'humain (22q11). Par une technique appelée SNUPE nous avons constaté que cette région chez la souris ne semblait pas être soumise au phénomène de l'empreinte génomique parentale.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	i
Table des matières.....	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Dédicace.....	xii
1. INTRODUCTION	1
1.1 La méthylation	3
1.2 La répartition des dinucléotides CpG à travers le génome	6
1.3 Mécanisme de méthylation	10
1.3.1 Les ADN méthyltransférase.....	12
1.3.1.1 DNMT1	12
1.3.1.2 DNMT2.....	13
1.3.1.3 DNMT3	14
1.4 Mécanismes de répression par la méthylation	14
1.4.1 Interférence avec les facteurs de transcription.....	15
1.4.2 Liaison de répresseurs à l'ADN méthylé.....	16
1.4.3 Modification de la structure de la chromatine.....	17
1.5 Rôle de la méthylation dans la cellule.....	19
1.6 Buts et raison de ce mémoire	23
1.6.1 Contexte de recherche.....	23
1.6.2 Problématique	24
1.6.3 Hypothèses de travail	25
1.6.3.1 Délimiter la région différentiellement méthylée.....	25
1.6.3.2 Étude chez la souris.....	26

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	28
2.1 Identification des séquences différentiellement méthylées.....	29
2.1.1 Isolement des granulocytes humains.....	29
2.1.2 Extraction de l'ADN.....	29
2.1.3 Technique de FP-CGI.....	30
2.2 Localisation des clones et choix des sondes.....	32
2.2.1 Recherche d'homologie par BLAST.....	32
2.2.2 Amplification des sondes par PCR.....	32
2.2.3 Extraction des sondes sur gel d'agarose.....	35
2.3 Analyse de méthylation.....	35
2.3.1 Digestion de l'ADN avec les différentes enzymes de restriction.....	35
2.3.2 Préparation de la membrane Southern.....	36
2.3.3 Hybridation des membranes Southern.....	37
2.4 Étude chez la souris.....	38
2.4.1 Technique SNUPE.....	38
2.4.1.1 Digestion de l'ADN génomique de souris avec l'enzyme BstUI.....	39
2.4.1.2 Amplification du fragment polymorphique par PCR.....	39
2.4.1.3 Réaction SNUPE.....	40
2.4.1.4 Migration sur gel.....	41
3. RÉSULTATS.....	43
3.1 Vérification des clones par hybridation de la membrane Southern.....	44
3.1.1 Analyse du clone L88.....	46
3.1.2 Analyse du clone L53.....	48
3.1.3 Analyse du gène ZnF74.....	50
3.1.4 Analyse de la région adjacente au polymorphisme GT.....	54
3.2 Étude chez la souris.....	56
3.2.1 Recherche d'un polymorphisme.....	56
3.2.2 Analyse de méthylation différentielle par SNUPE.....	57

4.DISCUSSION	60
4.1 Étude de méthylation des différents clones	61
4.1.1 Clone L53	62
4.1.2 Gène ZnF74	63
4.1.3 Région du polymorphisme	65
4.1.4 Méthylation différentielle localisée autour du clone L88.....	65
4.2 Défi que représente l'étude de la méthylation chez les mammifères	66
4.2.1 Variation des niveau de méthylation selon le stade de développement	68
5. RÉFÉRENCES.....	70

Liste des figures

Figure 1 :	Structure moléculaire de la 5-méthylcytosine	4
Figure 2 :	Représentation schématique des voies biochimiques pour la méthylation de l'ADN	5
Figure 3 :	Diagramme montrant la structure de trois îlots CpG de gènes humains	8
Figure 4 :	Protéines du système de méthylation de l'ADN chez l'humain.....	11
Figure 5 :	Mécanismes de répression par la méthylation.....	18
Figure 6 :	Position des clones L88, L53 et ZnF74 sur le chromosome 22q11.....	27
Figure 7 :	Représentation schématique de la technique de FP-CGI.....	33
Figure 8 :	Représentation schématique de la technique SNUPE	42
Figure 9 :	Illustration des différents patrons de méthylation possibles lors d'hybridation de type Southern	45
Figure 10 :	Hybridation d'une membrane Southern avec la sonde L88	47
Figure 11 :	Hybridation d'une membrane Southern avec la sonde L53	49
Figure 12 :	Hybridation d'une membrane Southern avec la sonde ZnF74	53

Figure 13 :	Hybridation d'une membrane Southern avec la sonde polymorphisme GT	55
Figure 14 :	Illustration du polymorphisme entre <i>Molossinus</i> et <i>Domesticus</i>	57
Figure 15 :	Autoradiographie de la réaction SNUPE sur l'ADN F1 de souris	59

Liste des tableaux

Tableau I :	Résumé des différentes sondes utilisées, de leurs amorces et des conditions respectives pour l'amplification par PCR.....	34
-------------	---	----

Liste des sigles et abréviations

%	pourcentage
α	alpha
μ	micro
^{32}P	isotope radioactif du phosphore
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNase	Ribonucléase
Ci	Curie
CpG	Dinucléotide CG
cpm	Coups par minute
dATP	Désoxyadénine-5'-triphosphate
dCTP	Désoxycytidine-5'-triphosphate
DGS	Syndrome de DiGeorges
dGTP	Désoxyguanidine-5'-triphosphate
DMR	Région différentiellement méthylée
Dnmt	ADN méthyltransférase
dNTP	Désoxynucléotide-5'-triphosphate
EDTA	Acide éthylèneamide tétraacétique
EST	Séquence exprimée
FP-CGI	F-PERT CpG Island
HAT	Histone acétyltransférase
HCl	Acide chloridrique
M	Molarité
ML	Millilitre
mM	Millimolaire
NaCl	Chlorure de sodium
PAC	Bactériophage P-1 derived artificial chromosome
pb	Paire de base
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase (polymerase chain reaction)

pH	Logarithme de l'inverse de la concentration en ions hydrogènes
rpm	Rotations par minutes
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SNuPE	Single Nucleotide Primer Extension
SSC	Solution 3M chlorure de sodium et 0,3 M citrate de sodium
TDR	Domaine de répression transcriptionnel
TBE	Solution Tris-Borate-EDTA
Tris	Tis(hydroxyméthyl) aminométhane
V	Volt
°C	Degré Celsius

Un travail comme celui-ci n'aurait pu être possible sans la participation et l'encouragement de plusieurs personnes dont je tiens à remercier ici. Merci tout d'abord à mon directeur de maîtrise , le Dr Edward Bradley, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour ses encouragements et son support tout au long de ma maîtrise.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui sont passées dans le laboratoire durant ces deux années pour leur amitié et leurs conseils. Un merci tout spécial à Johane Morin pour avoir partagé avec moi ton expérience et à Miguel Landers pour m'avoir initié à la recherche lors de mon arrivée dans le laboratoire.

Finalement merci à mes parents, Laurier et Lucette, pour leur soutien autant moral que financier. Une grande partie de ce travail leur revient.

À mes parents, Laurier et Lucette, qui ont éveillé chez moi le goût d'apprendre...

1- Introduction

Lever le voile sur les secrets que nous cachent le génome humain est une tâche, qui à ce jour, occupe des milliers de scientifiques à travers le monde entier. Tous ces chercheurs unissent leur effort dans le seul et unique but de voir un jour le code génétique humain séquencé au grand complet. Cette réalisation colossale apportera une quantité impressionnante d'informations qui donneront à la recherche en génétique et en biologie moléculaire une nouvelle ère d'allée. En effet, une meilleure compréhension de notre génome, donc de notre séquence d'ADN, nous permettra de mieux comprendre notre fonctionnement et dans certains cas de répondre à des questions longtemps rester sans réponse. Par contre, il ne faut surtout pas croire que l'achèvement prochain du projet du génome humain nous permettra de guérir toutes les maladies qui sont toujours sans traitement, mais cette réalisation nous donnera accès à une énorme quantité d'informations valables sur un nombre important de gènes spécifiques et de chromosomes (Cuticchia, 2000).

Malgré ce grand pas que consiste le séquençage du génome humain, beaucoup de travail reste encore à faire. Même si nous connaissons dans les moindres détails notre séquence d'acides nucléiques, une tâche encore bien plus colossale nous attends, celle de comprendre comment notre génome s'organise, s'exprime et évolue au cours de notre vie. Bien sûr l'ADN est une suite de nucléotides mais cette unique suite de nucléotides, bien qu'essentielle, n'est pas suffisante pour faire de nous ce que nous sommes. L'ADN doit être organisé et structuré de manière à ce que tous les gènes qui s'y trouvent puissent s'exprimer au bon endroit, au bon moment et

surtout en bonne quantité. La compréhension de tous ces mécanismes complexes de régulation des gènes est un travail laborieux mais tout aussi essentiel que la connaissance même de notre séquence d'acides nucléiques.

1.1 La méthylation

Parmi les nombreuses modifications que comporte le génome, la reconnaissance en 1948 de la cinquième base de l'ADN humain, la 5-méthylcytosine (Figure 1) a généré beaucoup d'intérêt de la part de la communauté scientifique (Weissbach, 1993). Chez les eucaryotes la méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyl (CH_3) sur le carbone en position 5 de la cytosine. Par le fait même, il y a donc conversion de la cytosine en 5-méthylcytosine (Figure 2). Cette réaction est catalysée par une enzyme appelée ADN méthyltransférase. Pour que cette enzyme puisse ajouter le groupement méthyl, elle doit reconnaître la séquence suivante 5'-CG-3' aussi connue sous le nom de dinucléotide CpG. La méthylation est la modification de l'ADN la plus commune et est aussi l'un des nombreux phénomènes épigénétiques (altération de l'expression d'un gène sans changement de sa séquence de nucléotides) que l'on observe dans le génome des eucaryotes (Singal and Ginder, 1999). Bien que la plupart des mammifères montrent une méthylation plutôt abondante, l'absence chez certains organismes comme la drosophile (*Drosophila*) (Urieli-Shoval et al., 1982) et la levure (*Saccharomyces cerevisia*) (Proffitt et al.,

1984) créa un doute quant à l'implication de la méthylation dans le développement normal d'un organisme eucaryote et l'expression tissu-spécifique de certains gènes. Cependant, les récentes études sur les souris déficientes pour l'activité ADN méthyltransférase démontra le rôle critique de la méthylation dans le développement normal des individus (Li et al., 1992). Certains chercheurs attribuèrent même à la méthylation un rôle dans la défense primaire de l'organisme contre les parasites et les bactéries (Yoder et al., 1997).

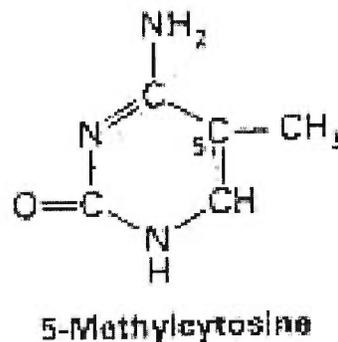


Figure 1 Structure moléculaire de la 5^e base de l'ADN, la 5-méthylcytosine.

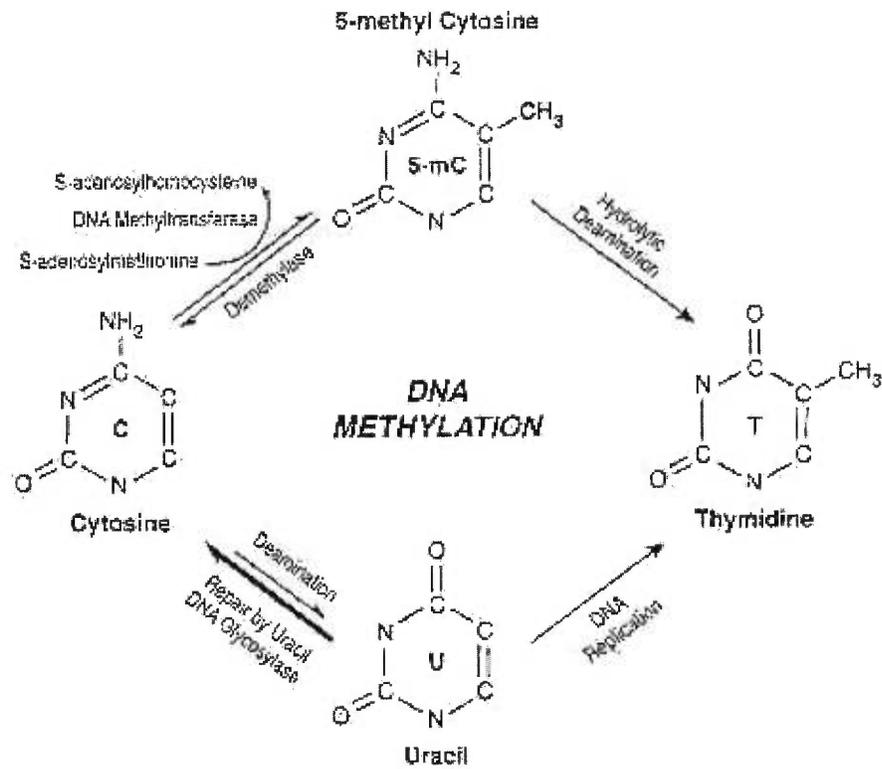


Figure 2 Représentation schématique des voies biochimiques pour la 5-méthylcytosine, la déméthylation et la désamination.

1.2 La répartition des CpG à travers le génome

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'enzyme ADN méthyltransférase n'ajoute pas un groupe méthyl sur chaque cytosine qu'elle rencontre. La présence d'un dinucléotide CpG est donc essentielle. Mais qu'en est-il de la répartition de ceux-ci à travers le génome? Contrairement à ce que l'on pourrait prévoir, la répartition des dinucléotides CpG à travers le génome des eucaryotes n'est pas uniforme. Au cours de l'évolution des eucaryotes plus complexes, les dinucléotides CpG ont été progressivement éliminés pour aujourd'hui être présent de 5 à 10% de la fréquence prévisible. Aujourd'hui 70 à 80% des CpG restant contiennent des cytosines méthylées. C'est en fait cette méthylation de la cytosine qui est responsable de cette sous-représentation car la 5-méthylcytosine a tendance à se convertir en thymine par une désamination spontanée au cours de l'évolution du génome (Singal and Ginder, 1999).

Les CpG méthylés se retrouvent principalement dans des régions d'ADN à réplication tardive ou ce que l'on appelle couramment le « *junk DNA* ». Par opposition à cette première région, une autre partie du génome comporte quant à elle, une concentration beaucoup plus importante de dinucléotides CpG. Ces régions que l'on appelle aussi îlots CpG, s'étendent normalement sur une distance variant entre 0,2 à 3 Kb et sont généralement localisées en 5' des gènes et donc à proximité de leur région promotrice. Une autre différence importante, entre les îlots CpG et le

reste du génome, c'est que les dinucléotides CpG compris dans ces régions promotrices sont normalement non méthylés et donc peu sujet à une désamination spontanée ce qui explique leur concentration beaucoup plus grande (60 à 70%) (Antequera and Bird, 1993). La présence de ces îlots CpG en 5' de certains gènes est d'une grande importance dans la régulation de ceux-ci. En effet, la chromatine contenant les îlots CpG est généralement hautement acétylée au niveau des histones et ne comprend pas d'histone H1 (Tazi and Bird, 1994). Cette conformation de l'ADN permet une interaction entre les différents facteurs de transcription et les promoteurs des gènes. À titre de rappel, la chromatine se retrouve normalement dans la cellule sous une forme inaccessible aux facteurs de transcription (Sally H Cross, 1995). Ces différents facteurs de transcription recrutent généralement des co-activateurs, CBP par exemple, qui eux possèdent une activité histone acétyl transférase (HAT), et donc fixe un groupement acétyl sur la leucine de l'histone H1. Cette perte de charge positive, rend l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription (Sally H Cross, 1995). On connaît plusieurs milliers gènes qui possèdent en 5' des îlots CpG. Parmi ceux-ci on retrouve entre autres des gènes impliqués dans les phénomènes de "*housekeeping*", ou ceux nécessitant une régulation développementale ou spécifique à un tissu donné (Larsen et al., 1992) (Figure 3).

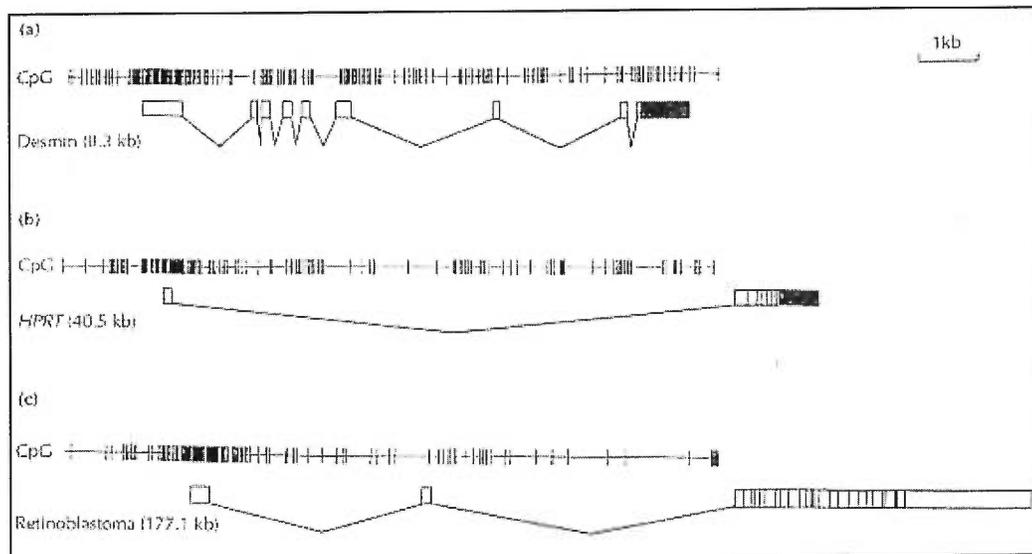


Figure 3 Diagramme montrant trois différent îlots CpG de gènes humains. Les lignes verticales montrent la position des dinucléotides CG dans les 10 premiers Kb du gène.

Bien que nous l'ayons déjà dit, les îlots CpG dans les régions promotrices sont généralement non méthylés dans les tissus normaux. La principale exception à cette affirmation comprend les gènes situés sur le chromosome X inactif et ceux soumis au phénomène de l'empreinte génomique parentale (*imprinting*) qui au contraire présente un allèle avec des dinucléotides CpG qui sont sous la forme méthylée (Baylin, 1997). Nous reviendrons plus loin sur ce phénomène. Il est par contre important de mentionner que la présence d'îlots CpG dans le promoteur de certains gènes consiste en un moyen important de régulation de son expression. En fait, nous pouvons affirmer que le degré de méthylation d'un promoteur est inversement corrélé avec le niveau d'expression du gène qui se trouve sous son contrôle. Cette affirmation ne s'applique pas, par contre, à tous les gènes. Nous pouvons citer comme exemple les gènes H19 et Igf2 qui chez la souris ne se comportent pas de la même façon. Pour H19, le silence de l'allèle paternel est du à la méthylation du gène dans sa région 5'. Ceci concorde avec le dogme exprimé plus haut. Par contre, pour Igf2, qui fait parti du même domaine soumis à l'empreinte génomique parental chez la souris, l'allèle paternel qui est également méthylé est, contre toute attente, exprimé (Jones et al., 1998).

Il est important de soulever ici, le fait que nous ne connaissons très peu de chose quant à l'importance des différents îlots parfois compris dans un même gène. Il est très probable que les différents îlots aient une importance variable sur le niveau d'expression des gènes et que certains soient plus susceptibles que d'autres à modifier l'expression du gène. Un autre point à considérer, est la concentration de

dinucléotides CG méthylés que l'on doit retrouver au sein de l'îlot pour que le statut répressif de la chromatine s'installe (Boyes and Bird, 1991). Il faut bien comprendre que la méthylation différentielle qui s'installe généralement au niveau des gènes soumis à l'*imprinting* n'est pas dans un ratio de 100% de méthylation sur un allèle versus 0% sur l'autre. Il existe sûrement un dosage dans ce pourcentage.

1.3 Mécanisme de méthylation de l'ADN

Pour comprendre comment la méthylation de l'ADN se produit, nous avons besoin de comprendre comment la méthylation des dinucléotides CpG est ciblée et maintenue, comment le signal du méthyl-CpG est décodé et comment cette méthylation aboutit à la répression de la transcription. Toutes ces questions ont finalement trouvé leurs réponses dans la découverte de nombreuses autres protéines avec le temps. Il y a seulement trois ans, on connaissait une ADN méthyltransférase chez l'humain (DNMT 1) et une protéine pouvant se lier à l'ADN méthylé (MeCP2). Aujourd'hui nous connaissons quatre méthyltransférases et cinq protéines se liant aux CpG méthylés (Bird and Wolffe, 1999) (Figure 4).

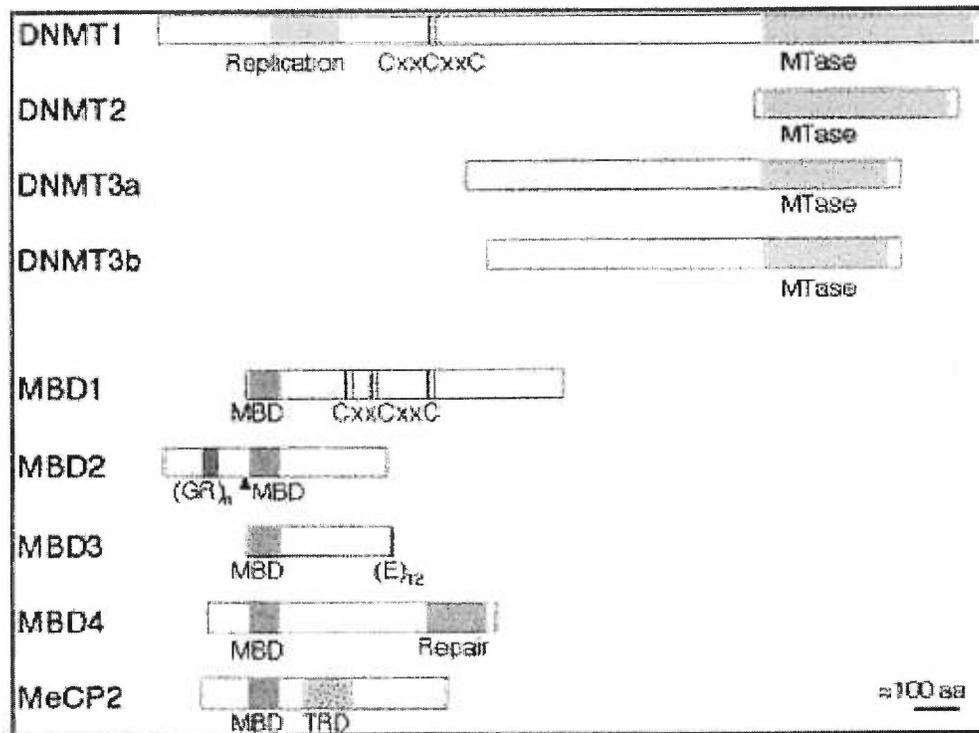


Figure 4 Protéines du système de méthylation de l'ADN chez les mammifères. MBD1 à MBD4 représente des domaines homologues à la protéine MeCP2. Tiré de *Bird and Wolfe, 2000*.

1.3.1 Les ADN méthyltransférases

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ADN méthyltransférase (ADN-Mtase) catalyse l'ajout du groupement méthyl sur la position 5 de la cytosine. La 5-méthyltransférase a, à un ce jour, été caractérisé chez plusieurs eucaryotes et a comme site de reconnaissance le dinucléotide CG, aussi appelé CpG (Singal and Ginder, 1999). Le gène de la première ADN-Mtase fut cloné chez la souris voilà de ça environ dix ans (Bestor, Laudano, et al. 1988) . On parle aujourd'hui de la *Dnmt 1*. Ce gène est hautement conservé à travers les espèces et fut également cloné chez l'humain (DNMT1) (Yen et al., 1992). Il est intéressant de mentionner qu'aucune méthyltransférase ne fut isolée des organismes comme la drosophile et la levure qui, comme nous le savons, ne montrent pas la présence de méthylation dans leur génome.

1.3.1.1 DNMT 1

La *Dnmt 1 méthyltransférase* des mammifères semble avoir une très grande affinité pour les séquences hémiméthylées mais elle semble aussi être capable de méthyler *de novo* des séquences aucunement méthylées (Laayoun and Smith, 1995). Certaines expériences ont par la suite démontrées que certaine interaction protéine-protéine pouvait altérer cette capacité à méthyler *de novo* et qu'au contraire des structures aberrantes ou des résidus 5-mC pouvait stimuler cette même capacité (Christman et al., 1995) (Tollefsbol and Hutchison, 1997). La réalisation de souris déficientes

(*knock-out*) pour la *Dnmt1* apporta la confirmation que d'autres enzymes pouvaient aussi être capable de méthylation. (Lei et al., 1996). En effet, suite à l'inactivation du gène *Dnmt 1*, l'équipe de Lei et al. observa chez ces souris un niveau faible mais stable de méthylcytosines et une activité méthyltransférase détectable.

1.3.1.2 DNMT 2

Les recherches sur les souris *Dnmt 1* *-/-* ont abouti au clonage du gène codant pour une deuxième enzyme, la *Dnmt 2* chez la souris (Okano et al., 1998) et l'humain (*DNMT 2*) (Yoder and Bestor, 1998). L'enzyme *Dnmt 2* est la méthyltransférase dont le rôle dans la cellule est encore ambigu. En effet, la *Dnmt 2* contient tous les motifs hautement conservés communs aux méthyltransférases et est exprimée à un niveau faible dans la plupart des tissus adultes examinés. De plus, l'inactivation du gène la *Dnmt 2* chez les cellules embryonnaires de souris ne provoque aucun effet sur la méthylation *de novo* ou la maintenance des sites déjà méthylés (Okano et al., 1998). Donc, à ce jour une question reste encore en suspend, est-ce que le gène de la *Dnmt 2* encode vraiment une ADN méthyltransférase fonctionnelle?

1.3.1.3 DNMT 3

À l'heure actuelle, deux autres ADN-Mtase sont venues s'ajouter à cette courte liste que compose la 1 et la 2. C'est deux autres enzymes sont en fait, la DNMT 3a et 3b (Xie et al., 1999), dont les gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes 2p23 et 20q11.2. La DNMT 3a est exprimée de façon ubiquitaire et peut facilement être détectée dans la plupart des tissus adultes alors que la DNMT 3b est exprimée à un très faible niveau dans la plupart des tissus excepté les testicules, la thyroïde et la moelle osseuse (Xie et al., 1999).

Le niveau élevé d'expression des deux DNMT 3 dans les lignées cellulaires tumorales souleva la question que ces enzymes pourraient être responsable de la méthylation *de novo* des îlots CpG des gènes suppresseurs de tumeurs lors du développement d'un cancer et ainsi faciliter la progression tumorale (Xie et al., 1999). Tout ceci reste encore à être confirmé.

1.4 Mécanismes de répression par la méthylation

Nous exposions précédemment le dogme qui affirme que plus un promoteur est méthylé moins le gène qui est sous son contrôle est exprimé (Bird and Wolffe, 1999). Bien que cette relation inverse entre la méthylation et la transcription du gène

touche une grande quantité de gènes, elle n'est cependant pas universelle (Igf2 chez la souris) (Jones et al., 1998). Les mécanismes par lesquels la méthylation empêche l'expression des gènes qui présentent des îlots CpG méthylés ont fait l'objet de plusieurs recherches afin de mieux comprendre ce phénomène d'inhibition (Razin and Cedar, 1991). On connaît à ce jour plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer ce phénomène (Singal and Ginder, 1999).

1.4.1 Interférence avec les facteurs de transcription

On proposa tout d'abord que la présence du groupement méthyl sur la cytosine pouvait empêcher la liaison de certains facteurs de transcription à leurs éléments de réponse spécifique (Figure 5a). On confirma plus tard qu'effectivement certains facteurs de transcription avaient dans leurs éléments de réponse des dinucléotides CG pouvant être méthylés. Parmi ces facteurs de transcription, on peut nommer AP-2, CREB, E2F, c-Myc, et plusieurs autres (Singal and Ginder, 1999). D'autres, par contre, ne semblent pas incommodés par la présence de méthylation dans la séquence de leur élément de réponse, comme c'est le cas pour SP1 (Tate and Bird, 1993). Dans le premier groupe, le groupement méthyl provoquerait un encombrement stérique qui empêcherait le facteur de transcription de se lier de façon spécifique à son élément de réponse sur l'ADN.

1.4.2 *Liaison de répresseurs à l'ADN méthylé*

La découverte par la suite de protéines pouvant lier les CpG méthylés permis de postuler une seconde hypothèse, à savoir que les CpG méthylés étaient capables de recruter des protéines pouvant agir comme répresseurs transcriptionnels. Cette hypothèse fut ensuite confirmée par la découverte des protéines liant les CpG méthylés (Figure 5b). On compte à ce jour plusieurs protéines capables de remplir cette fonction dont la MeCP1 et la MeCP2 (méthyl cytosine binding protein 1 et 2) (Bird and Wolffe, 1999). MeCP-1 se lie à l'ADN lorsqu'elle rencontre une série de CpG méthylés de façon symétrique, par opposition à l'ADN hémiméthylé. La répression des gènes hautement méthylés peut être médiée par la MeCP-1 et il a été démontré que les cellules déficientes en MeCP-1 montrent un niveau de répression diminué (Boyes and Bird, 1991).

MeCP-2 est beaucoup plus abondante que MeCP-1 et a seulement besoin de reconnaître un dinucléotide méthylé pour pouvoir se fixer à l'ADN. MeCP-2 possède deux domaines : un de liaison à l'ADN (*methyl-CpG binding domain*) et un de répression transcriptionnelle (TRD). Ce dernier peut inhiber la transcription même à une certaine distance du promoteur ce qui laisse croire qu'il pourrait interférer avec la machinerie transcriptionnelle ou le complexe d'initiation (Nan et al., 1997).

Autant pour MeCP-1 que pour MeCP-2, leur présence est dispensable pour la viabilité des cellules embryonnaires mais on observe dans les deux cas une diminution dans le niveau de répression des gènes (Tate et al., 1996).

1.4.3 Modification de la structure de la chromatine

La troisième et dernière hypothèse découle en fait des deux premières. Autant par la présence d'un groupement méthyl que par la liaison de protéines répresseuses à ceux-ci, la structure de la chromatine s'en trouve modifiée ou altérée. Cette modification dans la structure de la chromatine pourrait être responsable de l'inhibition de la transcription par le fait que les séquences de régulation et/ou de stimulation de l'expression du gène sont maintenant inaccessibles à la machinerie cellulaire (Figure 5c). En effet, il a été proposé que le domaine de répression transcriptionnel (TDR) de MeCP2 interagisse avec la protéine Sin3A, qui elle recrute l'histone déacétylase, qui est connue pour contribuer à l'établissement de l'état inactif de la chromatine (Nan et al., 1998). En accord avec ceci, l'inhibition de l'histone déacétylase élimine partiellement l'effet inhibiteur du domaine TDR de MeCP2.

Bref, on peut donc dire que cette troisième hypothèse est le résultat causé par les deux premières, soit la présence de groupement méthyl sur l'ADN et la liaison de protéines à ces mêmes groupements.

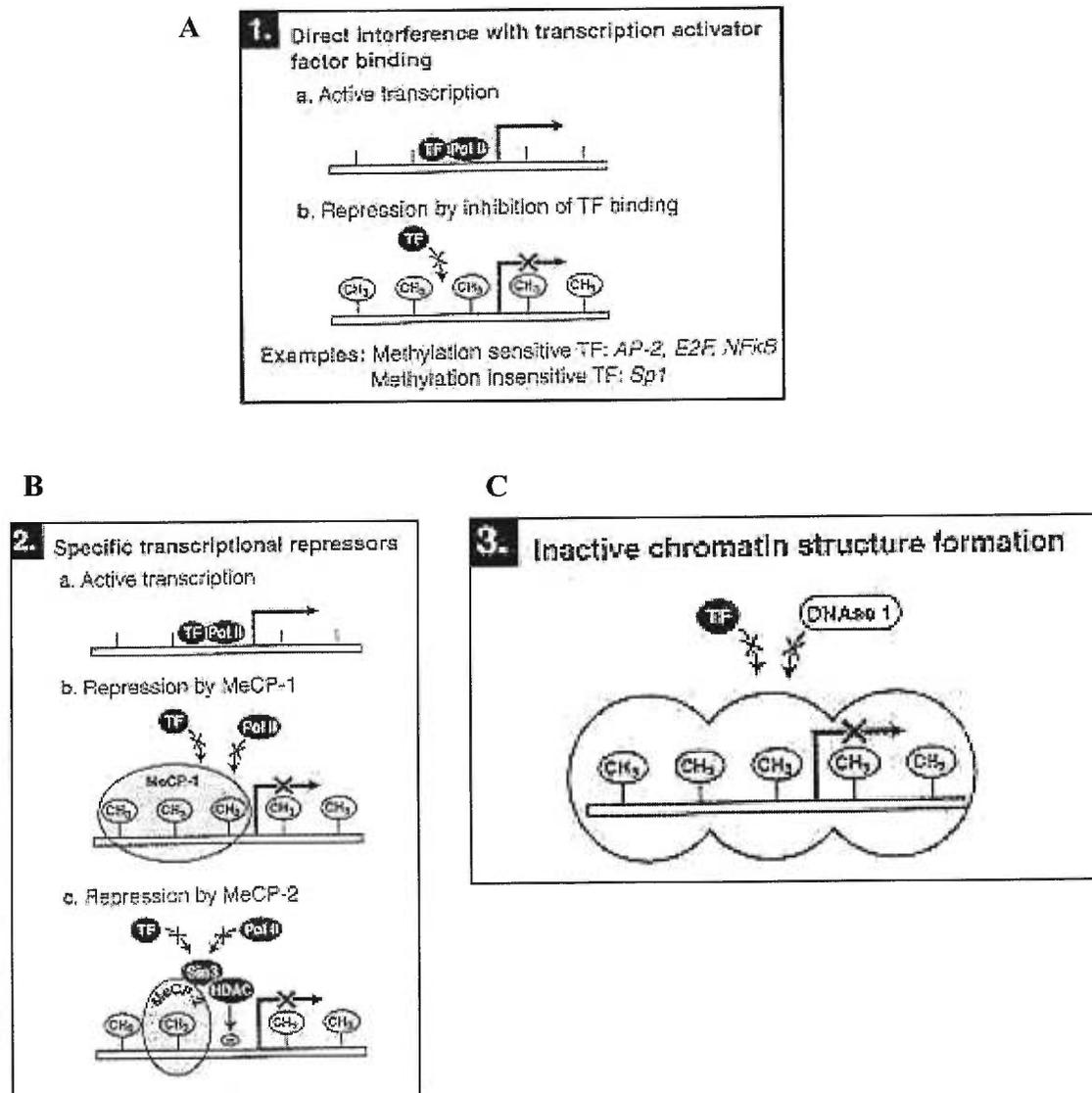


Figure 5 Mécanismes de la répression par la méthylation. A) Interférence avec les facteurs de transcription. B) Liaison de protéines à l'ADN méthylé. C) Formation d'une structure inactive de la chromatine.

1.5 Rôle de la méthylation dans la cellule

Quels sont maintenant les rôles de la méthylation dans la cellule normale? Nous avons déjà dit que la méthylation dans les régions promotrices des gènes pouvait être responsable de l'inactivation de ce gène. Mais cela n'est pas le seul rôle de la méthylation dans la cellule. On attribua tout d'abord à la méthylation un rôle dans la réplication et la réparation de la cellule. En effet, la cellule se sert du brin méthylé pour différencier entre le brin matrice et celui nouvellement synthétisé. Ce phénomène de reconnaissance du brin matrice par la méthylation a très bien été étudié chez les procaryotes (Hubacek, J., 1992) (Knox et al., 2000) Par contre, l'implication de la méthylation n'est plus à être démontré dans la réparation de l'ADN. Il semblerait que la perte de méthylation augmenterait de façon importante le taux de mutations dans le génome ceci par le fait que la cellule se sert normalement du brin méthylé comme repère pour réparer les erreurs commises lors de la réplication ou pour corriger les mutations ponctuelles qui se produisent habituellement dans le génome (Chen et al., 1998). Sans ce repère que constitue la méthylation, les enzymes responsables de la réparation (*Mismatch repair*) sont incapables de corriger les erreurs, ce qui a comme résultats une accumulation progressive de mutations dans l'ADN pouvant avoir des conséquences fatales pour la cellule et même l'individu (Reitmair et al., 1996).

La méthylation est aussi impliquée dans deux phénomènes que nous avons cités plutôt et qui se produisent normalement dans la cellule, soit l'inactivation du chromosome X et l'empreinte génomique parentale (*imprinting*). En effet, l'inactivation du chromosome X est l'exemple d'inhibition de la transcription par la méthylation le plus couramment cité. La plupart des gènes situés sur l'un des chromosomes X chez les femmes sont inactivés très tôt au cours du développement embryonnaire sans égard de la présence ou non d'îlots CpG. La méthylation de l'ADN semble renforcer le statut inactif du chromosome X (Riggs and Pfeifer, 1992).

L'empreinte génomique parentale, quant à elle, est un phénomène beaucoup plus complexe et qui touche un nombre plus restreint de gènes. En effet, en 1980, un groupe de chercheurs démontra qu'il pouvait y avoir des différences fonctionnelles entre les copies maternelles ou paternelles du génome d'un individu. Par de nombreuses manipulations lors de la fertilisation de différentes lignées de souris, ils démontrèrent que la disomie uniparentale, qu'elle soit localisée ou sur l'ensemble du génome, était létale (McGrath and Solter, 1984). À date, près de 30 gènes soumis à l'empreinte génomique parentale (*imprinting*) ont été identifiés chez l'humain et la souris. Plusieurs de ceux-ci jouent un rôle clé dans la croissance et la différenciation, et l'*imprinting* est maintenant reconnu comme étant un facteur important dans plusieurs maladies et cancers (Tilghman, 1999).

On peut définir l’empreinte génomique parentale comme étant une modification épigénétique d’un gène ou d’un chromosome qui mène à une expression différentielle des deux allèles du gène dans les cellules (Feinberg, 1999). Ceci à comme résultat l’expression monoallélique du gène en question. L’allèle exprimé peut autant être celui paternel que celui maternel et peut même varier d’un individu à l’autre. L’empreinte génomique vient donc défier les assomptions conventionnelles de base de la génétique Mendélienne, à savoir que les deux allèles d’un gène sont équivalents (Feinberg, 1999). Ces différences fonctionnelles entre les copies maternelles et paternelles peuvent s’exprimer de différentes façons. L’expression différentielle d’un gène, à savoir que seulement l’allèle maternel ou paternel est exprimé, est l’un des mieux caractérisés. D’autres observations ont révélé la perte préférentielle d’un des deux allèles dans la perte d’hétérozygotie (LOH) chez certaines maladies, ou dans certaines translocations chromosomiques. En effet, un groupe démontra que s’était préférentiellement le chromosome 9 paternel et le chromosome 22 maternel qui se recombinaient pour donner le chromosome de Philadelphie (Haas et al., 1992).

L’empreinte génomique parentale est donc un phénomène qui occupe plusieurs chercheurs à travers le monde entier. Comprendre comment un des allèles est marqué et comment cette marque peut se traduire en une expression parentale spécifique sont les principales questions que se posent actuellement ces scientifiques. Plusieurs éléments jouant un rôle dans ce phénomène ont été identifiés. Parmi ceux-ci on retrouve la méthylation bien sûr, mais aussi la structure

de la chromatine, les séquences répétitives et le synchronisme de réplication (Brannan and Bartolomei, 1999). Bien que tous ces éléments agissent en combinaison, la méthylation de l'ADN s'est révélée comme la composante intégrale du phénomène de l'empreinte génomique. Il semble, en effet, que la méthylation est essentielle pour l'expression monoallélique du gène. Ceci fût démontré chez les souris déficientes pour le gène *Dnmt 1* qui montrent un patron altéré de l'expression des gènes soumis à l'imprinting comme *H19*, *Igf2*, *Igf2r* et *Snrpn* (Shemer et al., 1997).

La plupart des gènes soumis à l'*imprinting* présente des caractéristiques communes. Évidemment, on retrouve la présence d'une méthylation différentielle s'étalant sur une région donnée (DMR) mais, il a été aussi remarqué que ces gènes sont souvent regroupés en domaine (cluster) (Jones et al., 1998). Tout ceci porte à croire que la présence de méthylation différentielle sur une région donnée pourrait être un indice important pour l'identification de nouveaux gènes soumis à l'*imprinting*. Parmi les clusters les plus connus comme ayant une méthylation différentielle ont peu citer le domaine H19/Igf2 sur le chromosome 11p15 et le domaine Prader-Willi/Angelman syndrome sur le chromosome 15q11-q13 (Brannan and Bartolomei,1999)

1.6 Buts et raison de ce mémoire

1.6.1 Contexte de recherche

Le projet de recherche de ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'une étude portant sur l'identification de nouveaux gènes soumis au phénomène de l'empreinte génomique parentale. La première partie de cette étude globale consistait à développer une technique permettant d'isoler des séquences montrant une méthylation différentielle. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la présence de régions d'ADN montrant une méthylation différentielle semble être un bon candidat pour isoler ce genre de séquences. C'est donc en ciblant les séquences hémiméthylées, que notre laboratoire a développé une technique permettant l'identification de ces séquences. La technique FP-CGI, ainsi développée, a permis de générer une multitude de clones qui ont ensuite été soumis à une analyse par buvardage de Southern pour confirmer leur capacité à reconnaître des séquences différenciellement méthylées.

La localisation chromosomique de plusieurs de ces clones a été effectuée et a soulevé des questions importantes pour la suite du projet entrepris dans notre laboratoire. En effet, suite à la localisation de deux des clones isolés par la technique de FP-CGI, soit L88 et L53, il nous a été possible de confirmer qu'ils étaient situés sur le chromosome 22q11 et à seulement quelques mégabases de distance l'un de l'autre (Figure 6). Cette surprenante proximité nous portait à croire que nous étions peut-être en présence d'un domaine chromosomique comprenant des gènes soumis à

l’empreinte génomique parentale. Cette hypothèse découlait du fait que nous savions que la plupart des gènes soumis à l’*imprinting* sont généralement regroupés en domaine (*cluster*).

1.6.2 Problématique

Comme nous venons de le dire, le fait que ces deux clones, L88 et L53, soient situés sur le même chromosome et à une distance relativement proche et qu’en plus, ils aient été générés par une technique permettant l’isolement de séquences montrant une méthylation différentielle, il nous paraissait important de vérifier la pertinence de ces observations avant de conclure à la présence d’un nouveau domaine soumis à l’empreinte génomique parentale.

L’intérêt pour ce domaine chromosomique fût, par la suite, amplifié par la présence dans cette même région du gène *ZnF74* impliqué dans la délétion du syndrome de DiGeorges. Le syndrome de DiGeorges (DGS) est un désordre du développement associé avec de larges délétions hémizygotiques sur le chromosome 22q11 (Ravassard et al., 1999). Le gène *ZnF74* a été reconnu comme étant couramment délété dans ce syndrome et certains auteurs ont observé une prépondérance de délétion pour l’allèle maternel du gène *ZnF74* (Demczuk et al., 1995). Cette prépondérance n’est cependant pas acceptée par toute la communauté scientifique et laisse encore place à beaucoup de discussions contradictoires (Ryan et al., 1997). Cependant, la découverte d’un nouveau domaine de méthylation différentielle englobant le gène

ZnF74 pourrait apporter des réponses importantes sur son implication dans ce syndrome et nous aider à mieux comprendre pourquoi certains chercheurs observent une prépondérance pour un allèle en particulier, autant dans cette maladie que dans la translocation chromosomique donnant le chromosome de Philadelphie.

1.6.3 Hypothèse de travail

1.6.3.1 Délimiter la région différenciellement méthylée

En premier lieu, nous voulons déterminer sur quelle distance s'étale la méthylation différentielle sur le chromosome 22q11. Pour ce faire, nous commencerons par confirmer que tous nos clones localisés dans cette région, peuvent bel et bien reconnaître des séquences différenciellement méthylées par hybridation de membranes Southern. Les sondes utilisées seront L88, L53 et ZnF74. La confirmation de ces résultats, nous permettra de circonscrire une région de méthylation différentielle (DMR) sur le chromosome 22q11.

Comme notre objectif final est l'identification d'un nouveau domaine soumis à l'empreinte génomique parental, nous étudierons également la méthylation autour d'un polymorphisme décrit chez l'humain sur le chromosome 22q11 et localisé à proximité du clone L88 (Marineau, 1999). Ce polymorphisme nous sera utile pour la vérification d'un biais parental dans cette région du chromosome 22 et ainsi l'identification d'un domaine soumis à l'empreinte génomique parentale.

1.6.3.2 Étude chez la souris

Lors des recherches que nous avons effectuées sur les bases de données pour la localisation de nos différents clones, il nous a été possible d'identifier un PAC contenant la plupart de nos clones. Nous avons donc analysé en profondeur ce PAC AA005500 pour identifier des régions potentiellement intéressantes (gènes connus ou *EST* (*Expressed sequence Tag*) intéressants) et pour éviter d'inclure dans nos sondes des séquences répétées qui sont très abondantes dans cette région.

Suite à cette analyse du BAC, nous avons identifié deux *EST* (numéro d'accension AA266135 et AI225814) de souris qui présentaient des homologies très fortes (> à 85%) avec la région du chromosome 22 que nous voulions étudier. Comme la souris est couramment utilisée comme modèle animal pour l'extrapolation future chez l'humain, la confirmation d'un biais parental chez la souris pourrait être un autre indice de la présence sur le chromosome 22q11 d'un domaine soumis à l'empreinte génomique.

Nous avons donc voulu savoir si nous pouvions également identifier la présence d'un biais parental chez la souris au niveau de ces deux *EST*. De plus, la présence dans notre laboratoire d'ADN de souris issus des croisements réciproques entre deux espèces de souris, nous donnaient la possibilité de faire cette étude.

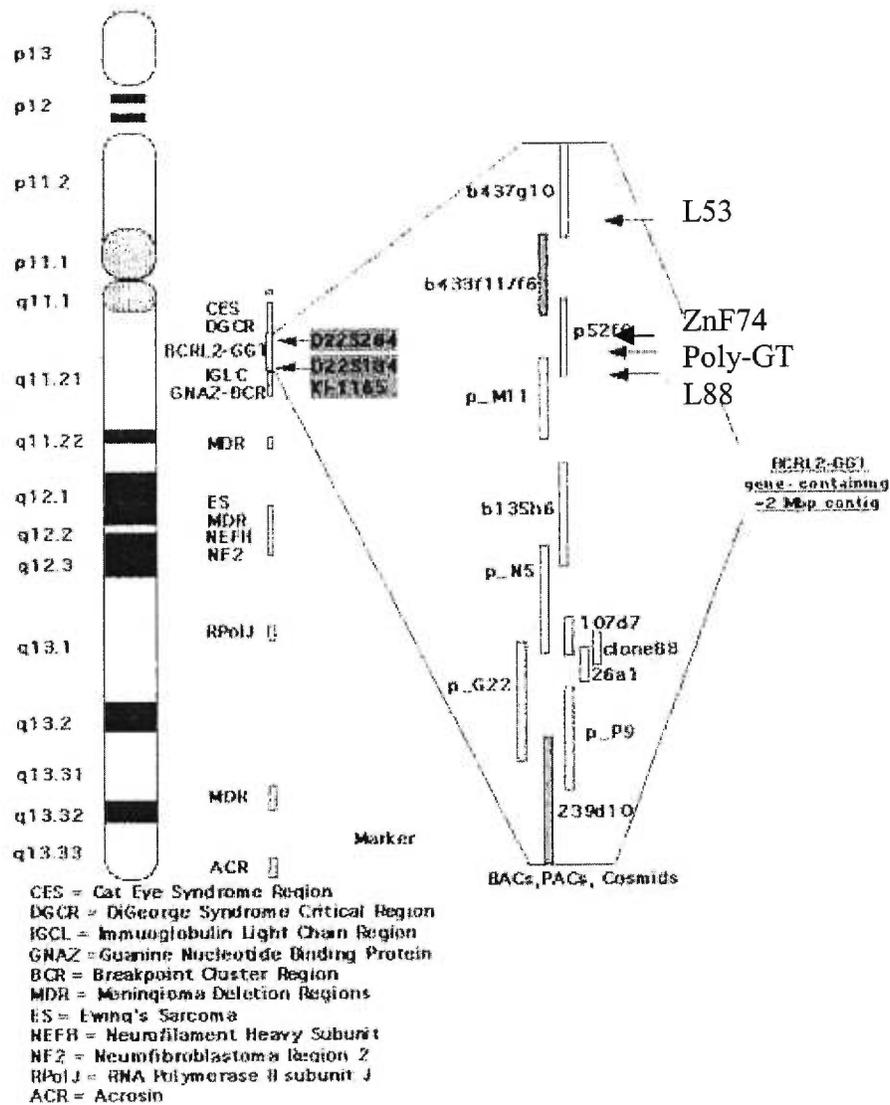


Figure 6 Position des clones L88 et L53 sur le chromosome 22q11. Nous pouvons également visualiser la localisation du gène ZnF74 et du polymorphisme GT par rapport au deux autres clones.

2- Matériel et Méthodes

2.1 Identification des séquences différentiellement méthylées

2.1.1 Isolement des granulocytes humains

L'ADN utilisé pour les différentes étapes de ce projet de recherche provient de granulocytes humains isolés à partir du sang de volontaires. Suite à une simple prise sang, 5 ml de sang est ensuite transféré dans un tube de 15 ml dans lequel on aura préalablement ajouté de 3,5 ml de Polymorphprep (13,8% sodium metrizoate et 8% Dextran 500) . Le tube est ensuite centrifugé à une vitesse de 1100 rpm pour une durée de 35 minutes. À l'aide d'une pipette pasteur, nous recueillerons la phase qui contient les granulocytes et qui se trouve entre le culot, composé des globules rouges et le surnageant qui représente le sérum. Environ 3 ml de NaCl 0,45% sera ajouté aux granulocytes. Le tout sera centrifugé à 1600 rpm pour 7 minutes. Le culot est ensuite rincé avec du PBS et soumis à une dernière centrifugation de 7 minutes à une vitesse de 1600 rpm.

2.1.2 Extraction de l'ADN

Les granulocytes préalablement isolés sont resuspendus dans 700 µl de tampon composé de 5 ml Tris pH 8.0, 20 ml EDTA 0.5M, 2 ml NaCl 5 M et 10 ml SDS 10% et 40 µl de protéinase K (10 mg/ml). Les tubes sont ensuite placés à 55 °C pour la nuit. On procède ensuite à une digestion à la RNase A (10 mg/ml) pendant environ 1h30. Chaque échantillon est ensuite extrait deux fois au phénol-

chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) puis une fois au chloroforme-alcool isoamylique (24:1). L'ADN est ensuite précipité en ajoutant 2,5 volumes d'isopropanol et resuspendu dans 400 µl de TE pH 7,5 (Tris-HCl pH 7,5, EDTA 0,1 mM).

2.1.3 Technique de FP-CGI

Pour isoler les séquences pouvant montrer une méthylation différentielle, nous utilisons une technique appelée FP-CGI pour **F-PERT CpG Island** (Figure 7). Cette technique fût développée dans notre laboratoire par un étudiant au doctorat. Cette méthode est spécialement conçue pour isoler la classe d'îlots CpG hémiméthylés.

Nous procédons tout d'abord à l'extraction de l'ADN provenant d'une population de cellules relativement homogène. Pour ce faire nous avons choisi les granulocytes humains car en plus de représenter une population homogène, ils sont facilement accessibles par une simple prise de sang du volontaire. L'ADN ainsi extrait est digéré avec des enzymes de restriction (6-cutter) qui coupent généralement à l'extérieur des îlots (Mse I TTAA). L'ADN digérée est ensuite séparé sur gel d'agarose par électrophorèse. Les fragments d'une longueur variant entre 0.4Kb à 7Kb en sont extraits. Les fragments ainsi isolés sur gel d'agarose sont dénaturés et réassociés par la technique de F-PERT (formamide phenol-

enhanced reassociation technique) qui permet une réassociation rapide de longs fragments (Casna et al., 1986), (Nelson et al., 1993). Cette association permet la formation de complexes hémiméthylés. L'ADN est alors ligué avec des adaptateurs biotinylés et ensuite mélangé avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Les adaptateurs sont deux oligos, ML-1 et ML-2 (TATGGGCGAATTCCGCTTAAC et GTTAAGCGGAATTCGCCCA) qui ont été hybridé l'un avec l'autre et qui une fois associé sont compatibles avec les sites de restriction des enzymes utilisées lors de la première digestion, soit Mse I (Figure 7 étape #1). L'ADN ainsi couplé est lavé et digéré avec des enzymes sensibles à la méthylation et dont leur site de restriction comprend au moins un CpG (EagI CCGCCG). L'ADN encore attachée aux billes est alors dénaturée (NaOH 0.1N pour 10 minutes à température de la pièce) et lavée avant d'être resuspendu dans 20 µl d'H₂O. On procédera ensuite à une deuxième digestion avec la même enzyme de restriction (EagI). On aura préalablement ajouté un oligonucléotide NGCGGCCGCNC complémentaire au site de restriction de l'enzyme pour former un site double brin. Les fragments simple brin ainsi libérés dans le surnageant seront recueillis et amplifiés par PCR avec une amorce contenant une courte séquence riche en GC. Les fragments amplifiés seront clonés, séquencés et utilisés pour sonder des membranes Southern pour pouvoir ainsi confirmer qu'ils détectent des régions différentiellement méthylées.

2.2 Localisation des clones et choix des sondes

2.2.1 Recherche d'homologie par BLAST

Les différents clones isolés à partir de la technique FP-CGI seront ensuite soumis à une recherche dans les banques de données disponibles, afin d'identifier les clones donnant des similitudes avec des séquences exprimées (EST) et pouvant être potentiellement intéressants. Ceci permet aussi d'éliminer les clones issus de séquences répétées ou ALU.

2.2.2 Amplification des sondes par PCR

Lorsque le choix d'une sonde est effectué, des amorces sont synthétisées pour amplifier le fragment choisi. Pour ce mémoire, un total de 5 sondes différentes seront utilisées et les différentes amorces et conditions de PCR sont résumées dans le tableau 1.

FP-CGI METHOD FOR ISOLATING DMRs

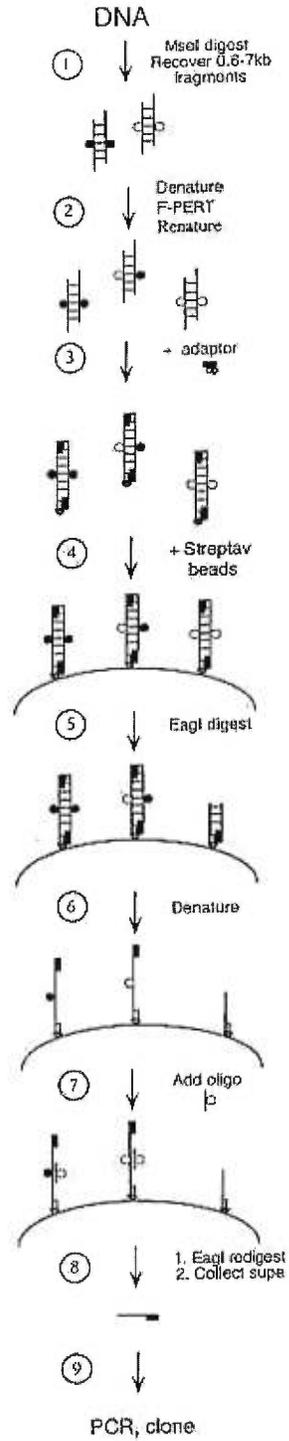
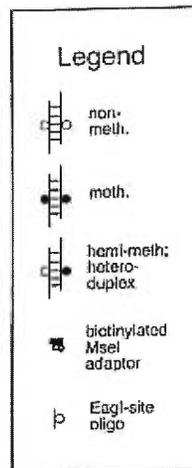


Figure 7 Représentation schématique de la technique de FP-CGI.

Sonde	Amorce	Condition de PCR
L53 (448 pb)	BRA 481 5'-agcaggaatgcaggagctga-3'	93°C-3min 93°C-1min,51°C-1min,72°C-1min (30x) 72°C-10min
	BRA 482 5'-cagcagggtgagaaatcaga-3'	
(232 pb) 1	BRA 412 5'-caagagcatgggggtgccgga-3'	93°C-3min 93°C-1min,63°C-1min,72°C-1min (30x) 72°C-10min
	BRA 464 5'-tgcgactgccacaaagagcagca-3'	
ZnF74 (429 pb) 2	BRA Zn483 5'-gcggtcccctctcaacagca-3'	93°C-3min 93°C-1min,57°C-1min,72°C-1min (35x) 72°C-10min
	BRA Zn484 5'-gggaggagctctggcggaac-3'	
(549 pb) 3	BRA 489 5'-ctacctcatcgtgcaccggc-3'	93°C-3min 93°C-1min,55°C-1min,72°C-1min (35x) 72°C-10min
	BRA 490 5'-agggaggaccagggtgcttt-3'	
Poly-GT (892pb)	Oligo 122 5'-attaactcataaaggagccc-3'	93°C-3min 93°C-1min,60°C-1min,72°C-1min (30x) 72°C-10min
	BRA 477 5'-cctgtctctaaaaatccaag-3'	

Tableau I Résumé des différents sondes utilisées, de leurs amorces respectives et des conditions d'amplification par PCR.

2.2.3 Extraction des sondes sur gel d'agarose

Suite à l'amplification des sondes par PCR, celles-ci sont migrées sur un gel 1,2% agarose à un voltage d'environ 100 V pour une vingtaine de minutes. Les bandes correspondant au fragment espéré sont ensuite coupées à l'aide d'un scalpel. La sonde est ensuite à l'aide du kit d'extraction rapide (GIBCO). Les sondes ainsi isolées sont prêtes à être marquées et hybridées aux membranes Southern pour confirmer leur capacité à reconnaître des séquences différenciellement méthylées.

2.3 Analyse de méthylation

2.3.1 Digestion de l'ADN avec les différentes enzymes de restriction

15 µg d'ADN isolé à partir des granulocytes est tout d'abord digéré avec une enzyme qui n'est pas sensible à la méthylation comme Hind III, BamH I ou Pst I. L'enzyme est ajoutée en excès (4 unités pour 1 µg d'ADN) et le tout est placé à 37 °C pour 16 heures. L'ADN digéré est ensuite extrait une fois au phénol-chloroforme-alcool isoamylque et précipité dans 2,5 volume d'éthanol 100%. L'ADN précipité est ensuite resuspendu dans 25 µl d'eau stérile.

L'ADN est alors soumis à une deuxième digestion avec cette fois-ci une enzyme sensible à la méthylation tel que Hha I (GTTAAC), Hpa II (CCGG) ou Eag I.

(CGGCCG). Cette digestion aura pour effet de couper seulement les allèles non-méthylés aux sites de restriction respectifs des enzymes utilisées et de laisser intacts les allèles montrant une méthylation au niveau de ces mêmes sites de restriction. Une portion de l'ADN sera quant à lui digérée avec l'enzyme Msp I (C[▼]CGG) qui a le même site de restriction que Hpa II, mais qui n'est pas sensible à la méthylation. Cette digestion nous servira de contrôle.

2.3.2 Préparation de la membrane Southern

L'ADN ayant subi la double digestion est encore une fois précipité et resuspendu dans un volume de 20 µl d'H₂O. 5µl de bleu de migration (Bromophénol) est alors ajouté à chaque échantillon et ceux-ci sont ensuite placés sur un gel contenant 1 % d'agarose, 1X TBE et 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est ensuite effectuée pour une période d'environ 16 heures à 45 volts.

L'ADN est ensuite transféré sur une membrane HYBOND (Pharmacia) par capillarité (Sambrook, 1989). Cette membrane est ensuite identifiée et l'ADN est fixé au support de nitrocellulose en la séchant pendant 1 heure à 80 °C.

2.3.3 Hybridation des membranes Southern

La membrane est préhybridée pendant au moins 3 heures à 42 °C dans une solution contenant 50 % formamide, 5X SSC, 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 5X Denhart, 1,25 % SDS, 250 ng/mL d'ADN de saumon dénaturé par ébullition.

Pendant cette période de préhybridation, la sonde est préparée selon la méthode des amorces aléatoires (*random priming*). Le fragment d'ADN (150 ng) est amené à ébullition pour le dénaturer. À ce volume, sont ajoutés du mélange réactionnel 1X, 50 µCi d' α -dCTP³² et une unité du fragment Klenow de l'ADN polymérase I (Pharmacia). On complète le volume à 50 µl et on incube à 37°C pendant une heure. La sonde est alors centrifugé sur une colonne de Séphadex-G50 (Pharmacia) de façon à éliminer les nucléotides demeurés libres. L'activité spécifique de la sonde est ensuite dosée à l'aide d'un compteur à scintillation et un minimum de un million de cpm sont ajoutés au mélange de préhybridation après avoir dénaturer la sonde par ébullition. L'hybridation s'effectue à 42°C pour une durée d'environ 12 heures avec agitation constante.

Le lendemain, la membrane est d'abord lavée avec 2X SSC et 1% SDS à la température de la pièce puis la stringence est augmentée en fonction de la radioactivité toujours liée à la membrane. Lorsque la membrane a bien été lavée, elle est autoradiographiée sur un film XAR-1 (Eastman-Kodak).

2.4 Étude chez la souris

2.4.1 Technique SNUPE

Pour vérifier la présence de méthylation différentielle chez la souris nous utilisons une technique simple qui s'appelle SNUPE pour *Single Nucleotide Primer Extension* (Kuppuswamy et al., 1991). Cette technique peut nous permettre de détecter sur une séquence d'ADN connue des variations aussi petites que le changement d'un simple nucléotide. Pour ce mémoire, nous appliquerons cette stratégie dans le but d'étudier s'il y a une différence dans la méthylation au niveau des deux allèles chez la souris.

Le choix des deux espèces de souris choisies, soit *Molossinus* et *Domesicus*, s'explique par le fait qu'au point de vue de l'évolution elle sont suffisamment éloignées pour avoir des différences au niveau de leurs séquences d'acides nucléiques mais encore suffisamment rapprochées pour pouvoir les accoupler les unes avec les autres. Suite à une analyse de leur séquence respective, nous avons déterminé, sur l'un des EST identifié (AA266135), un fragment qui contient à la fois un polymorphisme d'une seule base entre les deux espèces et qui possèdent également un site de restriction pour l'enzyme BstUI.

2.4.1.1 Digestion de l'ADN génomique de souris avec BstUI

L'ADN des deux espèces de souris, *Molossinus et Domesticus (C57B6/J)*, ainsi que l'ADN des souris de la première génération (F1), est tout d'abord digéré avec l'enzyme sensible à la méthylation BstUI (CGCG). Cette digestion aura pour conséquence de couper l'ADN en fragments variables et uniquement au site de restriction de l'enzyme qui sont non méthylés. Ainsi donc, s'il y a une différence dans le patron de méthylation des deux allèles au niveau du site de restriction de l'enzyme BstUI, seulement l'allèle non méthylé sera digéré.

2.4.1.2 Amplification du fragment polymorphe par PCR

Deux amorces sont alors synthétisées pour amplifier par PCR le fragment non coupé par BstUI. Il faut se rappeler que si le site BstUI est non méthylé, il sera digéré par l'enzyme (2.4.1.1) et donc non amplifiable. Les deux oligos utilisés sont Bra 475 (acc cgt gca cgg tag tcg aa) et Bra 480 (tga cat ggt tgc agg cat gc). La réaction est effectuée dans un volume de 25 µl et est ensuite soumise à un cycle de dénaturation de 1 minute à 93 °C, 35 cycles d'amplification, soit 45 secondes à 93 °C, 45 secondes à 53 °C et 45 secondes à 72 °C, et finalement un dernier cycle de 10 minutes à 72 °C. Le fragment de 155 pb généré par ce PCR (pour séquence complète et emplacement des oligonucléotides, voir annexe 1) est ensuite isolé de la

même façon que l'on a décrit plutôt, soit par extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique et précipitation avec de l'éthanol 100%.

**AACCGTGCACGGTAGTCGAAGGCCGCTGTCTGAC(A/G)TGCGAGCCC
GGCTGGAACGGAACCAAATGTGACCAACCCTGCGCCACCGGTTTCTAC
GGCGAAGGTTGTGGCCACCGCTGCCACCCTGCCGCGACGGCATGCCT
GCAACCATGTCA**

Voici la séquence nucléotidique du fragment de 155 pb généré par PCR (GenBank accession #AA266135). En caractère gras, les deux amorces utilisées pour l'amplification, entre parenthèse le polymorphisme A/G entre les deux espèces et en souligné, l'emplacement du site de restriction de l'enzyme sensible à la méthylation BstUI utilisée.

2.4.1.3 Réaction SNUPE

Nous procédons ensuite à la réaction SNUPE. La réaction est effectuée dans un volume finale de 25 µl qui se compose de 50 ng du fragment isolé sur gel, 10 µM de l'amorce spécifique au polymorphisme Bra 479 (gtc gac ggc cgc tgt ctg ac), 1x du tampon PCR, 1U de Taq Polymérase (Pharmacia). Comme nous voulons distinguer entre les deux allèles du gène, nous effectuerons deux réactions séparées soit l'une contenant le nucléotide marqué correspondant au G ([α-³²P]-dGTP) du polymorphisme de l'espèce *Molocinus* et l'autre contenant le nucléotide A marqué ([α-³²P]-dATP) correspondant au polymorphisme de l'espèce *Domesticus*

(*C57BL/6J*). (Figure 8). Aucun autre nucléotide ne sera ajouté à la réaction, mise à part celui marqué. Ainsi donc, l'oligonucléotide utilisé se retrouvera marqué à son extrémité 3' par un unique nucléotide qui correspondra au polymorphisme de l'espèce en question.

Les deux réactions séparées seront ensuite soumis à un cycle de dénaturation de 2 minutes à 95 °C, à une période d'association de 2 minutes à 50 °C, et une période de polymérisation d'une durée de 2 minutes à 72 °C. On ajoutera ensuite à chaque tube 10 µl de solution STOP (0.05% xylène cyanol, 0.05% bleu de bromohénol, 20mM EDTA dans formamide déionisé) et les échantillons seront dénaturés à 95 °C pendant 5 minutes et mis sur glace jusqu'à la migration sur gel.

2.4.1.4 Migration sur gel

Les échantillons dénaturés sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide-urée (15% acrylamide : bisacrylamide (38 :2), 7M urée, 1x TBE, 0,03% APS, 6,6 mM TEMED). L'électrophorèse est ensuite effectués à 200 V pour une durée de 3 à 4 heures. Le gel est ensuite autoradiographié sur un film XAR-1 (Eastman-Kodak) pour une période pouvant variée entre 30 minutes et 12 heures.

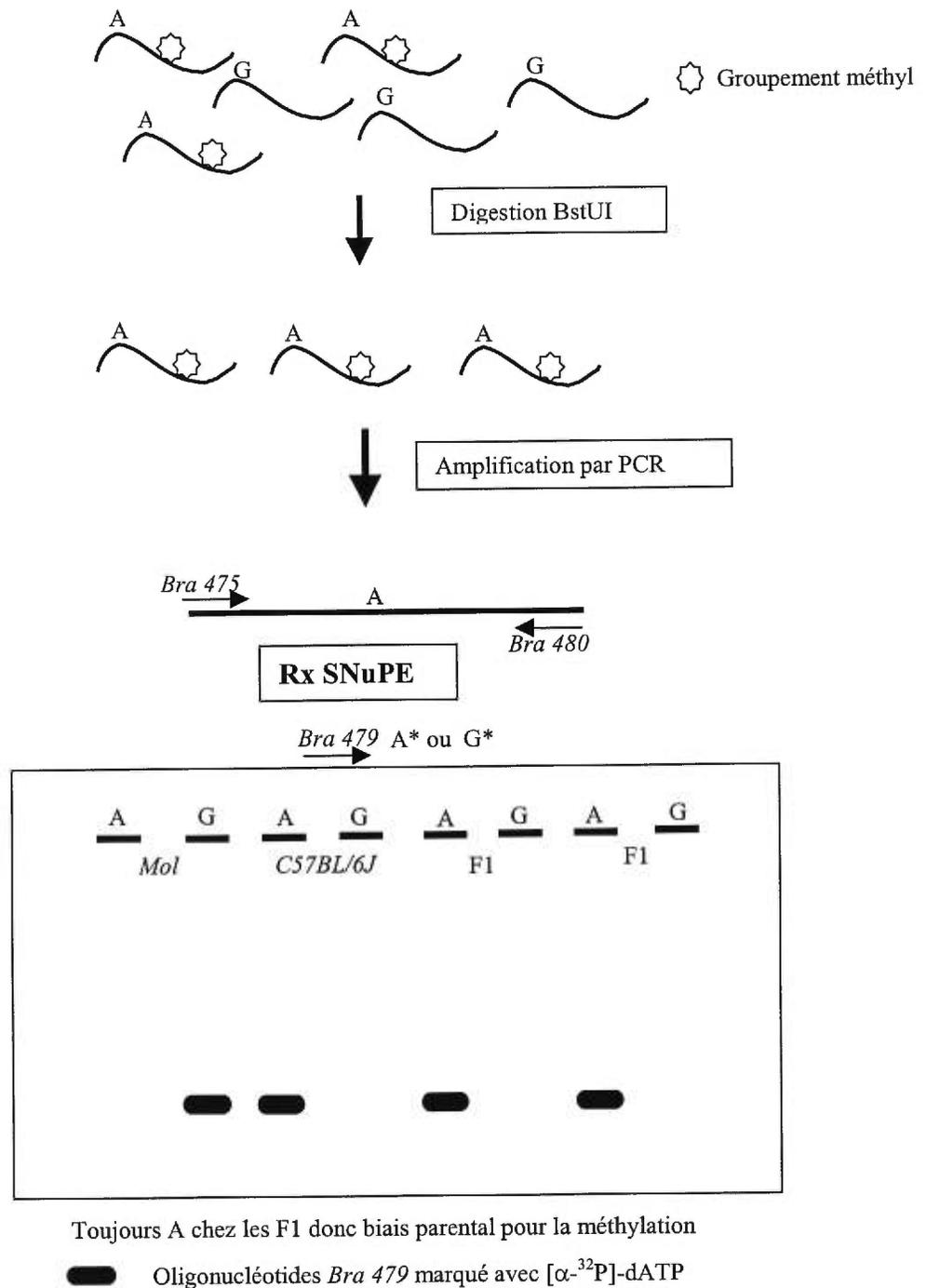


Figure 8

Représentation schématique de la technique SNUPE qui sera utilisée pour l'étude chez la souris. Dans l'exemple illustré, nous pouvons voir le cas où l'allèle provenant du parent *Domesticus* (adénine) est méthylé préférentiellement, non digéré par l'enzyme BstUI et donc amplifié par PCR démontrant ainsi le biais parental au niveau de la méthylation.

3- Résultats

La technique FP-CGI développée dans notre laboratoire, nous a permis d'identifier deux clones potentiellement capables de reconnaître des séquences hémiméthylées par hybridation de membrane Southern et localisés dans la même région, soit sur le chromosome 22q11. C'est dans le but d'identifier une nouvelle région pouvant contenir des gènes soumis à l'empreinte génomique parentale que nous avons entrepris la collecte des résultats que nous vous présentons ici.

3.1 Vérification des clones par hybridation de membrane Southern

Comme nous l'avons mentionné dans les hypothèses de travail, la première étape de ce projet de recherche consiste tout d'abord à confirmer que nos différents clones générés par la technique de FP-CGI reconnaissent bien des séquences montrant une méthylation différentielle.

Pour pouvoir dire qu'un clone reconnaît des séquences hémiméthylées, nous devons observer sur l'autoradiographie de la membrane sondée le patron de bandes spécifiques à des séquences différentiellement méthylées. Le patron de bandes que nous devons obtenir est celui illustré à la figure 9a qui consiste en la rétention d'une bande de haut poids moléculaire correspondant à l'allèle méthylé et l'apparition de bandes secondaires de poids moléculaire inférieur correspondant à l'allèle non méthylé. Nous devons nous souvenir que la deuxième digestion a été faite avec des enzymes qui sont sensibles à la méthylation et donc qui ne coupent

pas lorsqu'il y a un groupement méthyl dans leur site de restriction. Par opposition au patron de séquences hémiméthylées, lorsque la séquence sera complètement méthylé nous n'observerons pas de bandes secondaires alors que lorsqu'elle sera complètement non méthylée il n'y aura pas rétention des bandes de haut poids moléculaire (Figure 9b et 9c).

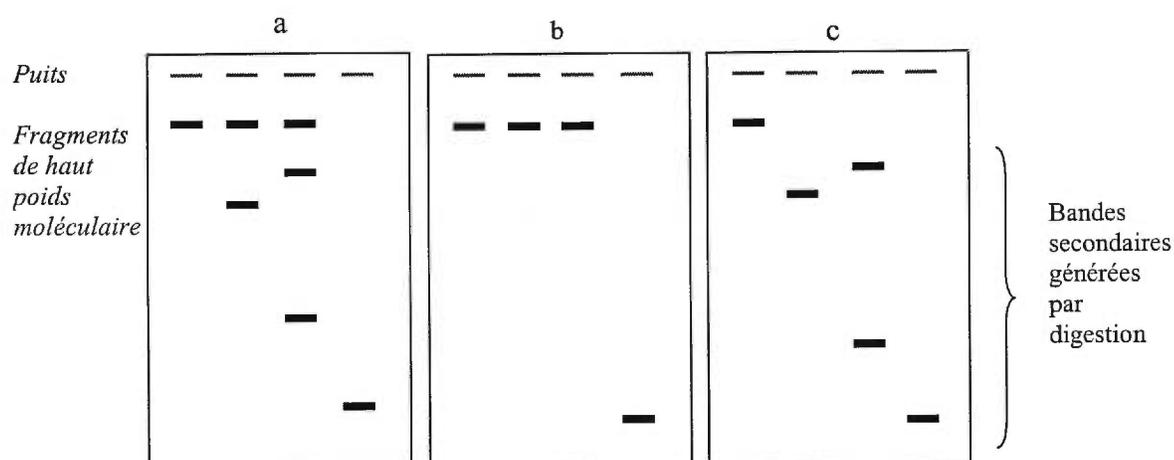


Figure 9 Représentation schématique des différents patrons de méthylation. Pour chaque membrane schématisée, le premier puits est chargé avec de l'ADN digéré avec une enzyme *6-cutter* qui génère la bande de haut poids moléculaire. Les deux puits suivants contiennent l'ADN digéré avec la même enzyme plus une digestion avec une enzyme sensible à la méthylation (ex. Eag I et Hpa II). Le dernier puits contient l'ADN digéré avec une enzyme non sensible à la méthylation. **a)** Partiellement méthylé **b)** Complètement méthylé **c)** Non méthylé.

3.1.1 Analyse du clone L88

Pour le clone L88, qui fût en fait un des premiers générés par cette technique, les études sur membrane Southern avait déjà été effectué pour valider la technique développée dans le laboratoire. Comme nous pouvons le voir sur la photo de la membrane hybridée avec la sonde L88 , le patron de bande obtenue correspond bel et bien à celui d'une séquence hémiméthylée car nous avons rétention de la bande correspondant à l'allèle non coupé et l'apparition des bandes secondaires (Figure 10).

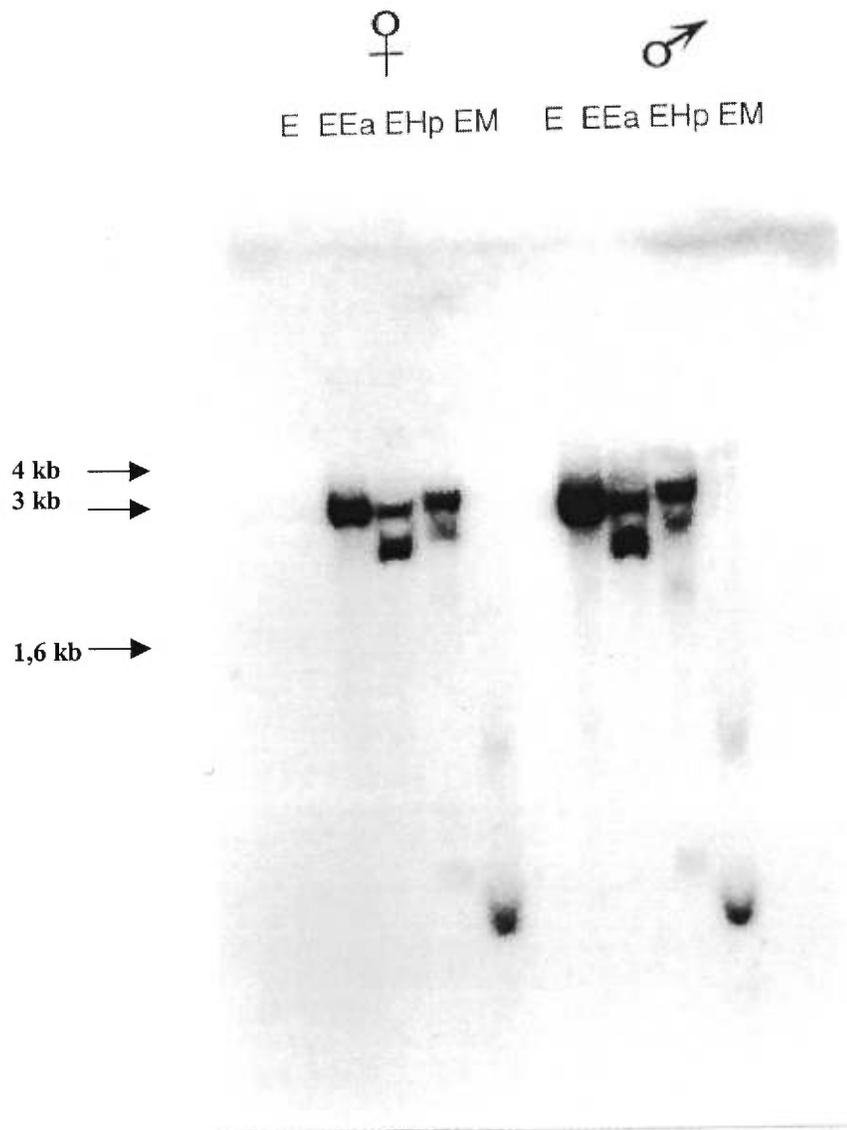


Figure 10

Hybridation d'une membrane Southern avec la sonde L88 montrant le patron caractéristique d'une séquence différenciellement méthylée. Dans les puits digérés avec les enzymes sensibles à la méthylation, soit Eag I et Hpa II, on voit l'apparition de bandes secondaires migrants plus rapidement que le fragment EcoRI.

3.1.2 Analyse du clone L53

Suite à l'amplification du fragment de 448 pb correspondant à la sonde L53 nous avons hybridé une membrane Southern coupé avec l'enzyme Pst I. À partir de recherches effectuées sur les banques de données, nous savions que notre sonde devait reconnaître un fragment de haut poids moléculaire d'environ 1.99 Kb. Ce fragment de 1.99 Kb correspond à l'allèle non coupé et comprend que 5 sites pour l'enzyme de restriction Hpa II. La détection de bandes secondaires dans les puits ayant subis une double digestion (2 à 4), nous permettrait de conclure à une méthylation différentielle. Comme nous pouvons l'observer, l'hybridation de la membrane Southern avec la sonde L53, nous a donné comme patron de bandes, celui correspondant à une séquence complètement méthylée. En effet, nous pouvons clairement visualiser la bande de 1.99 Kb (allèle méthylé) mais nous ne pouvons voir aucune bande secondaire (Figure 11). Les bandes attendues, générées par la digestion par l'enzyme Hpa II, auraient été d'environ 314 pb et 64 pb. Ce résultat a ensuite été confirmé avec l'hybridation d'une seconde membrane (non montrée). Nous pouvons donc dire que le clone L53 ne possède pas la capacité de reconnaître une séquence différentiellement méthylée et le fait qu'il ai été généré par une technique servant à isoler des séquences montrant une méthylation différentielle sera discuté dans la discussion de ce mémoire.

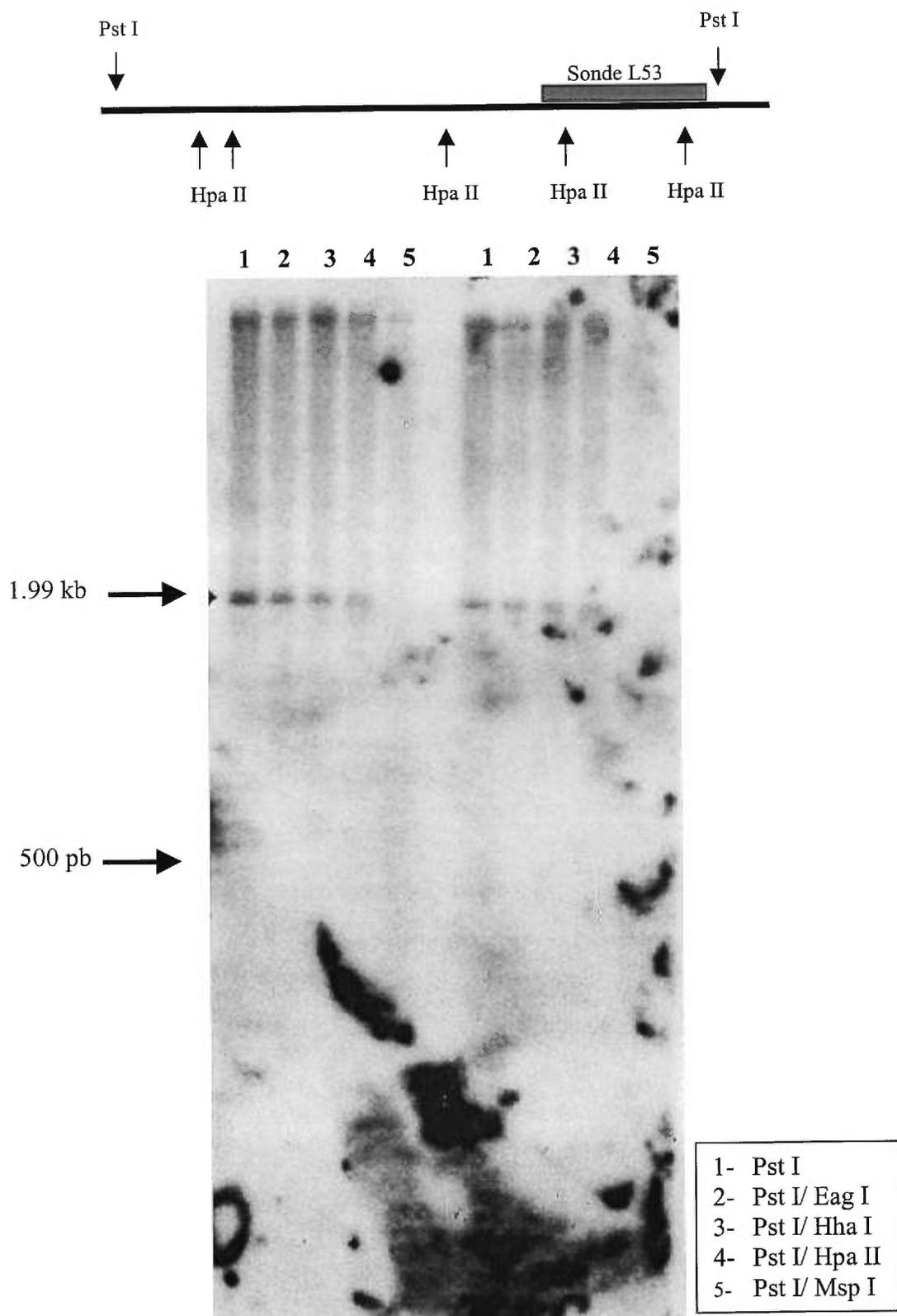


Figure 11 Hybridation d'une membrane Southern avec la sonde L53. Nous pouvons observer le fragment de 1.99 kb qui correspond à l'allèle non coupé et l'absence de bandes secondaires. L53 ne montre pas de méthylation différentielle.

3.1.3 Analyse du gène ZnF74

Comme nous l'avons dit plutôt, la démonstration d'une méthylation différentielle au niveau du gène ZnF74 pourrait avoir des répercussions intéressantes sur son implication dans le syndrome de DiGeorges. La démonstration d'une expression monoallélique du gène ZnF74 pourrait apporter des réponses importantes pour la compréhension de ce syndrome, qui comme on le sait implique dans la plupart des cas une large délétion du chromosome 22. En supposant, une expression monoallélique de ZnF74, la perte de l'unique allèle exprimé lors de la délétion pourrait être cruciale. C'est dans cette optique que nous voulions essayer de démontrer la présence de méthylation différentielle sur le gène ZnF74 en se servant d'une portion du gène comme sonde pour hybrider une membrane Southern.

Nous avons tout d'abord fait une sonde pour le gène ZnF74 au niveau de sa région promotrice. Le fragment ainsi amplifié de 232 pb (Tableau I p.34) contient plusieurs sites Hpa II mais seulement deux sites Eag I qui nous serviront pour analyser la méthylation dans cette région car ces enzymes sont sensibles à la méthylation. L'hybridation d'une membrane Southern avec cette sonde ne nous a pas permis d'obtenir de résultats concluants sur l'état de méthylation de cette région. En effet, après autoradiographie de plusieurs membranes, aucune bande, que ce soit de haut ou de moindre poids moléculaire, n'ont pu être visualisées et cela même après des expositions de plusieurs semaines. Comme cette région du

gène est extrêmement riche en GC et que cela complique de beaucoup l'analyse, nous avons décidé d'employer une nouvelle sonde.

Tout comme la première sonde, la deuxième se trouve dans une région riche en GC mais de façon beaucoup moins impressionnante. Un fragment de 429 pb fut donc amplifié par PCR (Tableau I p. 34) et correspond aux nucléotides 307 à 733 du premier exon du gène ZnF74. Après hybridation, encore une fois, les résultats obtenus avec cette nouvelle sonde ne furent pas concluants car aucun signal ne pu être détecté.

On décida alors de synthétiser des amorces pour une nouvelle sonde, mais cette fois-ci le fragment amplifié ne sera pas à l'intérieur d'un îlot CpG. Nous avons donc amplifié un fragment de 549 pb (Tableau I p.34) toujours sur l'exon 1 mais à l'extrémité 3' de l'îlot contenu dans cette exon du gène ZnF74. Contrairement aux deux premiers essais, nous avons finalement réussi à visualiser un patron de bandes après autoradiographie de la membrane hybridée avec la sonde numéro 3 (Figure 12). Cependant, le patron obtenu correspond à celui d'une séquence complètement méthylée car uniquement le fragment de 958 pb attendu est observé et qu'aucunes bandes secondaires (les bandes attendues sont d'environ 811pb) ne sont visibles dans les puits ayant subi une double digestion avec les enzymes sensibles à la méthylation (2 et 3).

Nous avons par la suite essayer de démontrer qu'il puisse y avoir une différence dans le patron de méthylation au niveau du promoteur versus l'exon 1, mais malgré les différentes sondes utilisées (réutilisation des mêmes régions que les sondes 1 et 2 mais en essayant de limiter le nombre de CpG dans celle-ci) au niveau du promoteur, aucune n'a jusqu'à présent montré un signal convainquant. Nous discuterons plus en détails des approches possibles pour étudier la méthylation au niveau du promoteur du gène ZnF74 dans la prochaine partie de ce mémoire (discussion).

3.1.4 Analyse de la région adjacente au polymorphisme GT

Une autre étape dans cette étude de méthylation sur le chromosome 22q11 était de faire les mêmes expériences avec une sonde proche du polymorphisme GT répété, que celles effectuées pour L53 et ZnF74. Comme nous l'avons mentionné auparavant, la présence d'un polymorphisme sur le chromosome 22q11 nous permettra de distinguer entre les deux allèles parentales d'un gène pour ainsi démontrer la présence d'un biais parental (*imprinting*). Il faut tout d'abord s'assurer que la méthylation couvre aussi cette région.

Nous avons donc généré une sonde à proximité du polymorphisme (nucléotide 12760 à 13652 sur *PAC AC005500*) en prenant la précaution de ne pas inclure le GT répété (environ nucléotide 12300 sur *PAC AC005500*) dans le fragment amplifié pour ainsi éviter les possibles interactions non spécifiques attribuables à répétition de GT.

Suite à l'hybridation de la sonde sur une membrane Southern, nous avons observé une bande de 11.7 Kb (Figure 13). Cette bande correspond à la bande générée par la première digestion par Hind III et est associée à une séquence complètement méthylée. Les bandes secondaires attendues auraient un poids moléculaire soit de 10.6 kb, 9.2 kb ou 6.81 kb. Nous pouvons donc dire qu'encore une fois, la méthylation au niveau de cette région ne semble pas être différentielle mais plutôt présente sur les deux allèles du chromosome.

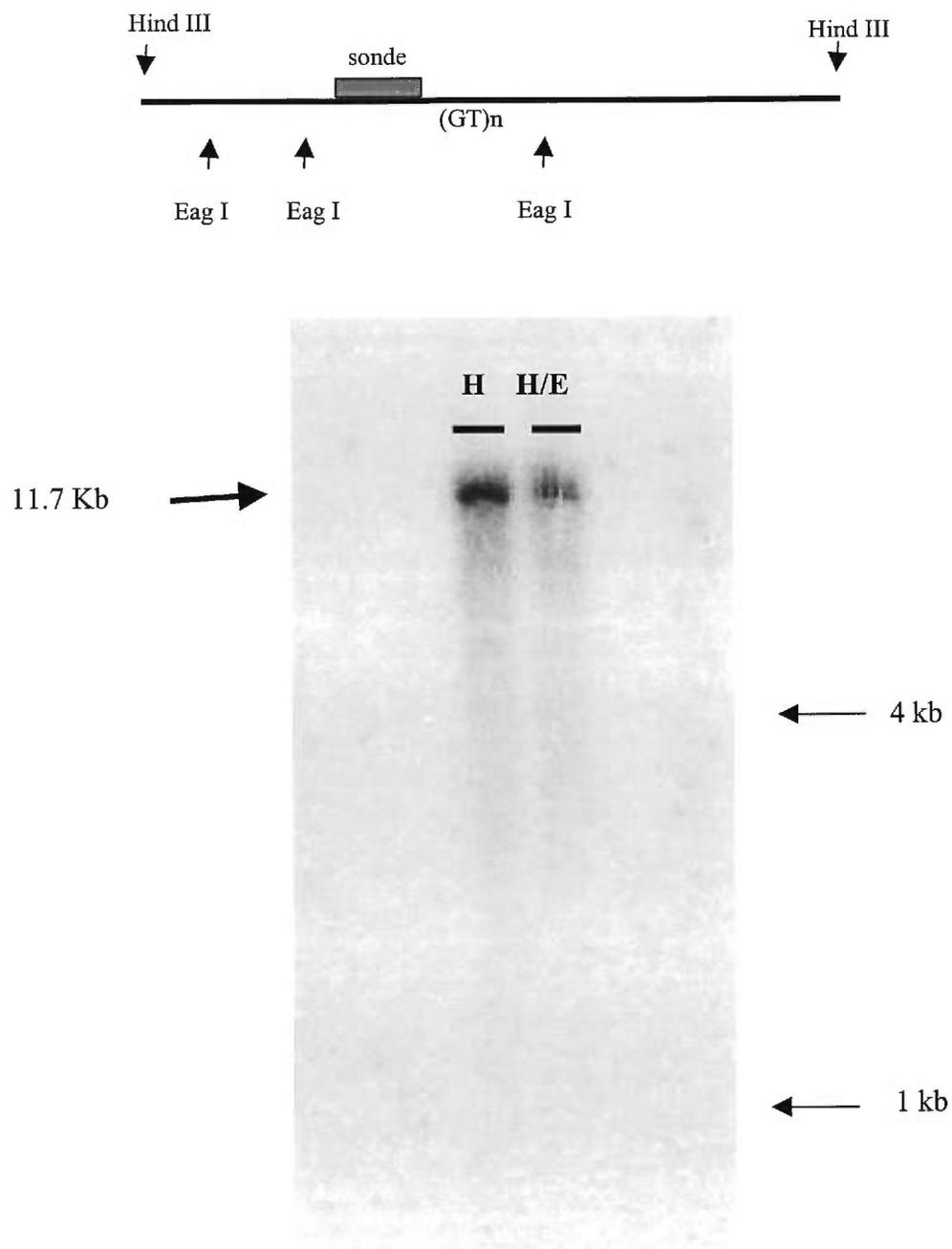


Figure 13 Hybridation d'une membrane Southern, dont l'ADN est coupé avec l'enzyme HindIII (puits 1 et 2) et ensuite avec l'enzyme Eag I (puits 2), avec la sonde Poly-GT de 892 pb. Donne un fragment attendu de 11.7 kb si les deux allèles sont complètement méthylés et non coupé par l'enzyme Eag I.

3.2 Étude chez la souris

Suite à l'analyse, dans les bases de données, du BAC AA005500 contenant nos différents clones (L88, L53, ZnF74), nous avons identifié, des homologies avec deux EST (Expressed Sequence Tag) de souris. Comme nous le savons, la souris est souvent utilisée comme modèle d'étude pour l'extrapolation future chez l'humain. De plus, la disponibilité dans notre laboratoire d'ADN de souris issus des croisements réciproques entre les deux espèces de souris, *Molossinus* et *Domesticus*, nous donnait la chance de vérifier pour la présence d'un biais parental chez la souris.

3.2.1 Recherche d'un polymorphisme

La première étape fut tout d'abord l'amplification de ces deux *EST* sur l'ADN de souris *Domesticus* (C57BL/6J) et le clonage des fragments dans le vecteur d'expression SK+ (*BlueScript*). Uniquement les fragments provenant de *Domesticus* furent clonés. Les deux plasmides contenant leur *EST* respectif furent ensuite séquencés. Nous avons ensuite comparé la séquence avec celle de l'espèce *Molossinus* (disponible dans les bases de données informatiques) pour identifier de possibles polymorphismes. Il faut se rappeler ici que ces deux espèces de souris sont assez éloignées évolutivement pour présenter des différences dans leur séquences d'acides nucléiques mais suffisamment rapprochées pour permettre un accouplement.

Lors de la comparaison des deux fragments amplifiés et séquencés, nous n'avons pu identifier de polymorphismes au niveau du premier EST (no.Accession AI225814). Par contre, nous avons pu observer dans le second (AA266135) une variation d'un seul nucléotide, soit une guanine pour *Molossinus* et une adénine pour *Domesticus* (C57BL/6J).

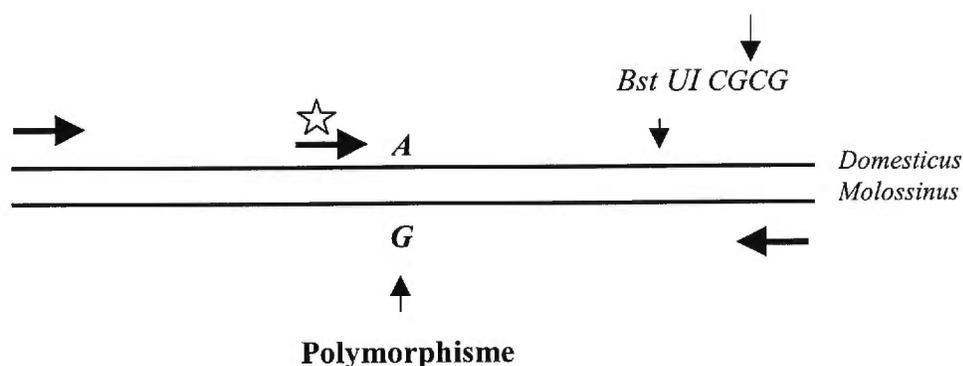


Figure 14 Représentation schématique du fragment contenant le polymorphisme entre les deux espèces de souris. Les flèches pleines correspondent aux amorces utilisés pour l'amplification (Bra 475 et Bra 480) alors que celle marquée d'une étoile correspond à l'oligo utilisé dans la technique *SNuPE* (Bra 479). On peut également visualiser le site de restriction de l'enzyme *BstUI*.

3.2.2 Analyse de méthylation différentielle par *SNuPE*

Pour détecter la présence d'un biais parental dans l'établissement du patron de méthylation chez la souris, nous avons tout d'abord synthétisé une amorce qui viendrait s'hybrider directement en amont du polymorphisme. Ainsi donc, le

prochain nucléotide à être incorporé lors de la réaction de SNUPE sera le nucléotide polymorphique lui-même. Il suffit par la suite de procéder aux étapes de la technique SNUPE expliquée dans la partie *Matériel et Méthodes*.

À la suite de cette expérience, nous pouvons observer les résultats présentés à la figure 14. Comme nous pouvons le voir sur l'autoradiographie du gel de polyacrylamide, il n'y a pas présence d'un biais parental dans le patron de méthylation chez la souris au niveau du foie car les échantillons d'ADN disponibles proviennent du foie murin. En effet, nous pouvons analyser les résultats comme suit. Les puits 1 à 4 correspondent à l'ADN complémentaire des deux espèces de souris. Ces données servent de contrôle pour montrer que le polymorphisme est réel et que *Molossinus* incorpore bien une guanine et que *Domesticus*, une adénine. Nous pouvons observer que le signal est beaucoup plus faible dans le puits 4, mais un faible signal est malgré tout détectable. De plus, des expériences précédentes ont bien démontré la présence du polymorphisme entre les deux espèces. Les 4 puits suivants, soient 5 à 8, montrent la même chose à l'exception qu'il s'agit de l'ADN génomique des deux espèces de souris. Encore une fois, la distinction au niveau des puits 7 et 8 est plus ardue dû au fort bruit de fond, mais nous pouvons voir que le signal est plus intense dans le puits 8. Par contre, ce qui est intéressant, c'est ce que nous voyons dans les puits 9 et 10. Dans ces puits, il s'agit de l'ADN complémentaire d'une souris F1 issue du croisement entre une femelle *Molossinus* et d'un mâle *Domesticus*. Comme nous obtenons un signal dans les deux puits (9 et 10), cela veut dire qu'aucun des deux allèles

parentals n'a été coupé préférentiellement par l'enzyme BstUI et donc que la méthylation ne semble pas répartie de façon différentielle entre les deux allèles chez la souris. Il faut se rappeler que si un des deux allèles auraient été méthylés comparativement à l'autre, uniquement celui-ci aurait été amplifié lors du PCR alors que l'autre allèle n'aurait pu l'être car il aurait été digéré par l'enzyme BstUI et donc non amplifiable.

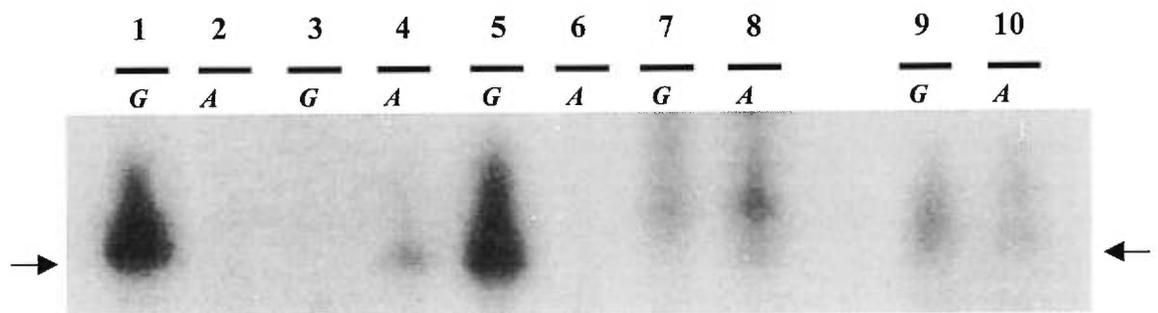


Figure 15

Autoradiographie de la réaction SNUPE sur l'ADN de souris. Les puits 1 à 4 correspondent à l'ADN complémentaire des deux espèces de souris soit *Molossinus* (1 et 2) et *Domesticus* (3 et 4). Les puits 5 à 8 correspondent à l'ADN génomique des deux mêmes espèces alors que les puits 9 et 10 contiennent l'ADN complémentaire de la première génération de souris (F1) issus du croisement entre *Molossinus* (♀) et *Domesticus* (♂).

4- Discussion

4.1 Étude de méthylation des différents clones

Comme nous l'avons mentionné plus tôt dans ce mémoire, il semble que les gènes qui soient soumis au phénomène de l'empreinte génomique parentale aient comme caractéristique commune la présence de méthylation distribuée de façon différentielle entre leur deux allèles. De plus, il a aussi été remarqué que ces mêmes gènes étaient, la plupart du temps, regroupés en domaine (cluster) sur un chromosome donné (Jones et al., 1998). Nous avons donc comme assomption de départ que réussir à démontrer la présence de méthylation différentielle sur une certaine distance pouvait être un bon indice pour l'identification d'un nouveau domaine soumis à l'empreinte génomique parentale.

Ainsi donc, au début de ce travail de maîtrise nous avons comme objectif final, d'identifier une nouvelle région contenant des gènes pouvant être soumis à l'empreinte génomique parentale. Cette hypothèse provenait de l'identification sur le chromosome 22q11, à quelques kilobases de distance de deux clones générés par la technique de FP-CGI, une stratégie conçue dans le laboratoire pour isoler des séquences différentiellement méthylées. Malheureusement, les résultats obtenus au premier objectif intermédiaire, soit de confirmer que chaque sonde sélectionnée au différents endroits sur le chromosome 22q11 puisse reconnaître une séquence différentiellement méthylée, nous a permis de comprendre que nous n'étions probablement pas en présence de ce genre de domaine.

4.1.1 Clone L53

Suite aux hybridations répétées de membranes Southern avec la sonde L53, les résultats obtenus nous ont permis de conclure que la région couverte par cette même sonde était sans aucun doute complètement méthylée. Cette conclusion nous apparaît évidente lorsque nous regardons les différentes hybridations qui nous donnent toujours le même patron de bandes, soit uniquement le fragment de haut poids moléculaire (1.99 kb) qui correspond dans ce cas-ci à un fragment complètement méthylé. Suite à ces observations répétées, nous avons conclu que le clone L53 était possiblement un faux positif généré par la technique de FP-CGI.

Comment ce fait-il alors qu'une technique conçue pour générer des séquences différentiellement méthylées, nous donne un clone comme L53 incapable de reconnaître pareille séquence? Nous pouvons en partie expliquer ceci par la technique, qui n'est malgré tout pas parfaite. En effet, si nous revenons à la figure 8 (page 33) et que nous regardons l'étape #8, nous pouvons voir que suite à la deuxième digestion avec Eag I, nous recueillons le surnageant. Ce surnageant contient les différentes séquences normalement identifiées comme hémiméthylées. Cependant, lors du pipetage du surnageant, il est fort possible qu'une séquence attachée aux billes aimantées se soit détachée et ait été recueillie avec le surnageant. Ce fragment d'ADN aurait alors pu être amplifié par PCR et par la suite cloné. Tout ceci pourrait probablement expliquer pourquoi la sonde L53 faite

à partir du clone du même nom ne puisse pas reconnaître une séquence hémiméthylée lors de l'hybridation avec une membrane Southern.

4.1.2 Gène ZnF74

Pour ce qui est du gène ZnF74, les conclusions obtenues, malgré qu'elles ne soient pas dans le sens que nous aurions voulu, n'en restent pas moins intéressantes. En effet, les résultats obtenus avec certaines sondes utilisées nous démontrent que certaines régions du gène semblent complètement méthylées. C'est ce que nous pouvons observer sur l'exon 1 du gène ZnF74. Malheureusement, les deux sondes couvrant des îlots CpG à l'intérieur du promoteur ou de l'exon 1, ne nous ont pas permis de vérifier s'il pouvait y avoir une différence dans le statut de méthylation de ces dinucléotides CpG versus ceux qui ne se retrouvent pas dans les îlots. Bien sûr, le fait que nous n'avons pas pu vérifier le patron de méthylation au niveau du promoteur nous limite dans nos spéculations. Cependant, nous pouvons affirmer qu'il y a présence de méthylation sur l'exon 1 du gène ZnF74 et que celle-ci ne semble pas distribuer de manière allèle spécifique.

La présence de quantité impressionnante de dinucléotides CG au niveau de la région 5' du gène ZnF74 complique de beaucoup l'étude de celle-ci. Il faut tout d'abord se rappeler que la méthylation bien qu'elle puisse être différenciellement distribuée sur les deux allèles d'un gène n'implique pas cependant que ce soit dans

des proportions de 100% versus 0%. Ainsi donc, la présence de méthylation différentielle ne veut pas dire que sur un des allèles tous les CpG sont méthylés alors que sur l'autre ils sont non méthylés (Salvatore et al., 1998). En considérant ceci, il faut comprendre que lors du choix d'une région d'étude, plus il y a de dinucléotides CpG plus on a de chance que parmi ceux-ci il y en aient qui soient méthylés et d'autres qui ne le soient pas. Il faut donc, lors du choix du fragment de départ qui sera généré par la première digestion avec les enzymes comme Pst I, Hind III ou EcoRI, choisir un fragment qui contient un nombre limité de sites de restriction pour les enzymes qui sont sensibles à la méthylation comme celles utilisées dans cette étude soient Hpa II, Hha I et Eag I. On augmente ainsi nos chances d'obtenir un résultat positif car on restreint notre analyse à seulement quelques dinucléotides CG. Par contre, si la région est très riche en CG, comme c'est le cas du promoteur du gène ZnF74, il devient très difficile de limiter notre analyse à quelques dinucléotides CpG et par conséquent, la possibilité que quelques nucléotides ne soient pas méthylés ou que quelques uns soient méthylés sur l'autre allèle, vient diminuer nos chances d'obtenir un résultat qui va dans le sens de notre hypothèse.

Il existe par contre d'autres techniques pour analyser la méthylation de l'ADN et qui nous permettraient de vérifier le statut de méthylation au niveau du promoteur du gène ZnF74. Une de celle-ci en est en fait une procédure basée sur une désamination oxydative de l'ADN génomique induite par un traitement au bisulfite qui conduit à la conversion de la cytosine en uracil alors que les 5-

méthylcytosine restent inchangées (Frommer et al., 1992). Suite au séquençage, uniquement les résidus 5-méthylcytosine donneront une cytosine. C'est une technique de choix pour une analyse détaillée des 5-méthylcytosines, pour l'ensemble des séquences d'ADN génomique que l'on pourrait cibler (Singal and Ginder, 1999).

4.1.3 Région du polymorphisme

Malgré les résultats obtenus avec les deux premières sondes, nous avons quand même voulu savoir ce qu'il en était de la région adjacente au polymorphisme décrit sur le chromosome 22q11. La présence de ce polymorphisme, nous aurait permis de déterminer s'il y avait présence d'un biais parental dans l'expression des gènes situés à proximité. Comme il n'y a pas de méthylation différentielle au niveau du clone L53 et du gène ZnF74, l'enthousiasme était moins important, mais il y avait toujours le clone L88, qui contrairement aux deux autres montra un patron de bandes différentiellement méthylées lors des hybridations sur membranes Southern.

La sonde fut conçue pour reconnaître la région adjacente au polymorphisme sans toutefois l'inclure, tout ceci dans le but d'éviter les interactions non spécifiques du GT répété avec d'autres séquences répétées nombreuses sur le chromosome 22q11. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure qu'encore une fois, il ne

semblait pas y avoir présence de méthylation différentielle dans cette région. Ceci est la conclusion que nous avons pu formuler en observant uniquement la bande 11.7 kb, correspondant à l'allèle méthylé, sur les différentes membranes hybridées. Nous ne pourrions donc pas nous servir de ce polymorphisme pour analyser le biais parental au niveau de L88 car la méthylation différentielle ne semble pas s'étendre jusque là.

4.1.4 Méthylation différentielle localisée autour du clone L88

Suite aux résultats obtenus pour la première partie de ce mémoire, nous pouvons conclure qu'il ne semble pas y avoir la présence d'un domaine chromosomique soumis à une méthylation différentielle sur cette région du chromosome 22q11. Ceci en partie du aux analyses faites au niveau du clone L53, du gène ZnF74 et du polymorphisme GT répété. Cependant, nous pouvons affirmer qu'il y a bel et bien méthylation différentielle sur ce chromosome au niveau du clone L88 et que les études plus approfondies sur ce clone montrent que celui-ci est spécifique à un allèle en particulier (Thèse de doctorat Miguel Landers, Université de Montréal 2000).

Comme aucune méthylation différentielle n'était observée autour du polymorphisme GT chez l'humain, il nous était impossible de vérifier la présence d'un biais parental sur le chromosome 22q11 malgré que L88 montrait une

méthylation différentielle. Il nous a, par contre, semblé intéressant de faire la même étude chez la souris étant donné que nous avons identifié un polymorphisme pour une région montrant une forte homologie avec la région à l'étude chez l'humain. Par la technique de SNUPE, nous avons démontré que cette région chez la souris cette région n'est pas soumise au phénomène de l'empreinte génomique parentale. Si cela avait été le cas, nous aurions observé un signal que dans un puits à la fois et non dans les deux comme c'est le cas ici.

4.2 Défi que représente l'étude de la méthylation chez les mammifères

L'étude de la méthylation chez les mammifères n'est pas sans embûche. Il faut en fait être conscient de plusieurs paramètres qui parfois peuvent rendre la tâche ardue. Vouloir identifier un nouveau domaine de gènes soumis à l'empreinte génomique parentale en seulement deux années relevait sûrement du miracle lorsqu'on sait que plusieurs chercheurs y consacrent toute leur vie scientifique. Malgré les bonnes conditions de départ que nous avons, il ne faut surtout pas oublier que la méthylation est un phénomène extrêmement variable selon le stade de développement de la cellule, le tissu analysé et parfois même l'individu. Tout ces points, font que parfois la découverte d'un domaine soumis à l'*imprinting* n'est qu'une question de chance et de hasard.

4.2.1 Variation des niveaux de méthylation selon le stade de développement

Une fois établi dans les cellules somatiques, le patron de méthylation à travers le génome est relativement stable et contribue à l'établissement d'une structure de la chromatine plutôt répressive (Kass et al., 1997). Au contraire, la méthylation de l'ADN est remarquablement dynamique durant le développement précoce des mammifères et de certaines cellules tumorales. En effet, en utilisant des enzymes sensibles à la méthylation pour quantifier le niveau général de méthylation, il a été démontré que durant les premiers stades de développement, il y avait une diminution dramatique du niveau de méthylation dans les cellules (Monk et al., 1987). Ceci était ensuite suivi par une vague de méthylation *de novo* impliquant la majorité des dinucléotides CpG. Après l'implantation de l'embryon, la plus grande partie de l'ADN génomique est alors méthylé tandis que les gènes s'exprimant de façon tissu-spécifique sont non méthylés dans leur tissus d'expression (Razin and Cedar, 1991).

Tout ceci rend l'étude de la méthylation plus ardue car un gène peut être soumis à l'empreinte génomique parentale dans seulement quelques tissus alors que dans d'autres, ce même gène à une expression biallélique. Nous pouvons citer comme exemple le proto-oncogène *Mas*. En effet, les premières études faites chez l'humain se sont basées sur les résultats obtenus chez la souris (Villar and Pedersen, 1994). Chez celle-ci, ce gène était exprimé monalléliquement au niveau de la langue, du cœur et des muscles squelettiques alors que tous les autres tissus

étudiés montraient une expression biallélique. Cependant, les mêmes études chez l'humain montrèrent qu'aucun de ces tissus avaient une expression monoallélique pour ce gène (Riesewijk et al., 1996). Il fut démontré par la suite par un autre groupe de chercheur que le proto-oncogène *Mas* était soumis à l'empreinte génomique parental uniquement dans le tissu mammaire adulte (Miller et al., 1997). Les études faites auparavant avaient été effectuées sur des tissus embryonnaires et de nouveaux nés.

Cet exemple avec le gène *Mas* illustre bien la difficulté que peut représenter la recherche de nouveaux gènes soumis à l'empreinte génomique parentale et que parfois le tissu choisi pour faire l'étude ainsi que le stade de développement du même tissu doivent être pris en considération au moment de tirer des conclusions. Dans notre cas, les études que nous avons effectuées chez la souris nous ont permis de conclure que pour la région que nous avons étudiée il ne semblait pas y avoir de biais parental dans l'établissement du patron de méthylation. Ces résultats concordent avec ce que nous avons observé avec la majorité de nos sondes sur le chromosome 22q11. Cependant, il ne faut pas exclure que les mêmes études sur d'autres tissus chez l'humain pourraient aboutir à d'autres conclusions.

6- Références

- Antequera, F. and Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 11995-11999.
- Baylin, S.B. (1997). Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science* 277, 1948-1949.
- Bestor, T.H., Verdine, G.L. (1994). DNA methyltransferase. *Curr Opin Cell Biol* 6 : 380.
- Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454.
- Boyes, J. and Bird, A. (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64, 1123-1134.
- Brannan, C.I. and Bartolomei, M.S. (1999). Mechanisms of genomic imprinting. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9, 164-170.
- Casna, N.J., Novack, D.F., Hsu, M.T. and Ford, J.P (1986) .Genomic analysis II : isolation of high molecular weight heteoduplex DNA following differential methylase protection and formamide-PERT hybridation. *Nucleic Acids Res.* 14, 7285-7303.
- Chen, R.Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., and Jaenisch, R. (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395, 89-93.
- Christman, J.K., Sheikhnejad, G., Marasco, C.J., and Sufirin, J.R. (1995). 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 7347-7351.

- Cuticchia, A.J. (2000). Future vision of the GDB human genome database .
Hum.Mutat;15.(1.):62.-67..
- Demczuk, S., Levy, A., Aubry, M., Croquette, M.F., Philip, N., Prieur, M., Sauer, U.,
Bouvagnet, P., Rouleau, G.A., and Thomas, G. (1995). Excess of deletions of
maternal origin in the DiGeorge/velo-cardio-facial syndromes. A study of 22
new patients and review of the literature. *Hum.Genet.* 96, 9-13.
- Feinberg, A.P. (1999). Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting
in cancer: an introduction. *Cancer Res.* 59, 1743-1746.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W.,
Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields
a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89, 1827-1831.
- Haas, O.A., Argyriou-Tirita, A., and Lion, T. (1992). Parental origin of chromosomes
involved in the translocation t(9;22). *Nature* 359, 414-416.
- Hubacek, J.(1992). Biological function of DNA methylation. *Folia Microbiol.*; 37 : 323-
329
- Jones, B.K., LeVorse, J.M., and Tilghman, S.M. (1998). Igf2 imprinting does not require
its own DNA methylation or H19 RNA. *Genes Dev.* 12, 2200-2207.
- Kass, S.U., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1997). How does DNA methylation repress
transcription? *Trends Genet.* 13, 444-449.

- Knox, JD, Araujo, FD, Bigey, P., Slack, AD, Price, GB, Zannis-Hadjopoulos, M, Szyf, M. (2000). Inhibition of DNA methyltransferase inhibits DNA replication. *J Biol Chem*, Jun 16;275: 17986-17990.
- Kuppuswamy, M.N., Hoffmann, J.W., Kasper, C.K., Spitzer, S.G., Groce, S.L., and Bajaj, S.P. (1991). Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 1143-1147.
- Laayoun, A. and Smith, S.S. (1995). Methylation of slipped duplexes, snapbacks and cruciforms by human DNA(cytosine-5)methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 23, 1584-1589.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13, 1095-1107.
- Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R., and Li, E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122, 3195-3205.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.
- Marineau, C. . Aubry, M., Julien, J-P., and Rouleau, G. A Dinucleotide repeat polymorphism at the D22S264 locus.(1999) *Nucleic Acids Res.* 20;1430-1430.
- McGrath, J. and Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179-183.

- Miller, N., McCann, A.H., O'Connell, D., Pedersen, I.S., Spiers, V., Gorey, T., and Dervan, P.A. (1997). The MAS proto-oncogene is imprinted in human breast tissue. *Genomics* 46, 509-512.
- Monk, M., Boubelik, M., and Lehnert, S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99, 371-382.
- Nan, X., Campoy, F.J., and Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-481.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- Nelson, S., mCusker, J.H., Sander, M.A., Kee, Y., Modrich, P. and Brown, P.O. (1993) Genomic mismatch scanning : a new approach to genetic linkage mapping. *Nature Genet.*, 4, 11-17.
- Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 2536-2540.
- Proffitt, J.H., Davie, J.R., Swinton, D., and Hattman, S. (1984). 5-Methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae* DNA. *Mol.Cell Biol.* 4, 985-988.
- Ravassard, P., Cote, F., Grondin, B., Bazinet, M., Mallet, J., and Aubry, M. (1999). ZNF74, a gene deleted in DiGeorge syndrome, is expressed in human neural crest-derived tissues and foregut endoderm epithelia. *Genomics* 62, 82-85.

- Razin, A. and Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiol.Rev.* 55, 451-458.
- Reitmair, A.H., Cai, J.C., Bjerknes, M., Redston, M., Cheng, H., Pind, M.T., Hay, K., Mitri, A., Bapat, B.V., Mak, T.W., and Gallinger, S. (1996). MSH2 deficiency contributes to accelerated APC-mediated intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 56, 2922-2926.
- Riesewijk, A.M., Schepens, M.T., Mariman, E.M., Ropers, H.H., and Kalscheuer, V.M. (1996). The MAS proto-oncogene is not imprinted in humans. *Genomics* 35, 380-382.
- Riggs, A.D. and Pfeifer, G.P. (1992). X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet.* 8, 169-174.
- Ryan, A.K., Goodship, J.A., Wilson, D.I., Philip, N., Levy, A., Seidel, H., Schuffenhauer, S., Oechsler, H., Belohradsky, B., Prieur, M., Aurias, A., Raymond, F.L., Clayton-Smith, J., Hatchwell, E., McKeown, C., Beemer, F.A., Dallapiccola, B., Novelli, G., Hurst, J.A., Ignatius, J., Green, A.J., Winter, R.M., Brueton, L., Brondum-Nielsen, K., and Scambler, P.J. (1997). Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J.Med.Genet.* 34, 798-804.
- Sally H Cross., Adrian P Bird. (1995). CpG islands and genes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 5, 309-314.
- Salvatore, P., Benvenuto, G., Caporaso, M., Bruni, C.B., and Chiariotti, L. (1998). High resolution methylation analysis of the galectin-1 gene promoter region in expressing and nonexpressing tissues. *FEBS Lett.* 421, 152-158.

- Sambrook, J. Molecular cloning. A laboratory manual. Frishch, E. F. and Maniatis, T. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York . 1989.
- Shemer, R., Birger, Y., Riggs, A.D., and Razin, A. (1997). Structure of the imprinted mouse *Snrpn* gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *94*, 10267-10272.
- Singal, R. and Ginder, G.D. (1999). DNA methylation. *Blood* *93*, 4059-4070.
- Tate, P., Skarnes, W., and Bird, A. (1996). The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat.Genet.* *12*, 205-208.
- Tate, P.H. and Bird, A.P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr.Opin.Genet.Dev.* *3*, 226-231.
- Tazi, J., Bird, AP. (1990). Alternative chromatine structure at CpG islands. *Cell* *60* ; 909.
- Tilghman, S.M. (1999). The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* *96*, 185-193.
- Tollefsbol, T.O. and Hutchison, C.A. (1997). Control of methylation spreading in synthetic DNA sequences by the murine DNA methyltransferase. *J.Mol.Biol.* *269*, 494-504.
- Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, Y., Sedat, J., and Razin, A. (1982). The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *FEBS Lett.* *146*, 148-152.

- Villar, A., and Pedersen, R.A. (1994). Parental imprinting of the Mas proto-oncogene in mouse. *Nature Genet.* 8 : 373-379, 1994.
- Weissbach, A. (1993). A chronicle of DNA methylation (1948-1975). *64*, 1-10.
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K., and Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 236, 87-95.
- Yen, R.W., Vertino, P.M., Nelkin, B.D., Yu, J.J., el-Deiry, W., Cumaraswamy, A., Lennon, G.G., Trask, B.J., Celano, P., and Baylin, S.B. (1992). Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 20, 2287-2291.
- Yoder, J.A. and Bestor, T.H. (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum.Mol.Genet.* 7, 279-284.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P., and Bestor, T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13, 335-340.