



S&P Laboratories

Venelle de Sart, 8 - 1300 Wavre - Belgique
Tel : +32 (0)10 245772 - Fax : +32 (0)10 246676

E-mail : info@labosp.com

Web : www.labosp.com



METHYLATION DE L'ADN

par [Dr UME](#)

Vos réactions, vos avis à cafaitdebat@labosp.com

Résumé

Le programme génétique, s'il est très important, est loin d'être le seul responsable du développement de l'organisme. De nombreuses maladies, et notamment le cancer, sont aussi liées à de nombreux autres facteurs dits épigénétiques.

L'environnement produit des génotoxiques, ou substances à potentiel mutagène, d'une part et, d'autre part des substances non génotoxiques qui déstabilisent l'ADN sans modifier le génome. Le processus de méthylation de l'ADN est un de ces facteurs épigénétiques.

L'expression de nombreux gènes dépend fortement de la conformation de la chromatine, c'est à dire de son degré de condensation.

Les régions de l'ADN qui doivent à un instant donné être plus ou moins actives sur le plan transcriptionnel sont déterminées par les signaux que la cellule reçoit de son environnement. Les modifications chimiques responsables du changement de conformation n'influencent en aucun cas la séquence codante et sont réversibles. La conformation dépend du degré de méthylation ou d'acétylation des histones et, en ce qui concerne directement l'ADN, la méthylation au niveau des bases cytosine, elles-mêmes au sein d'îlots riches en CpG.

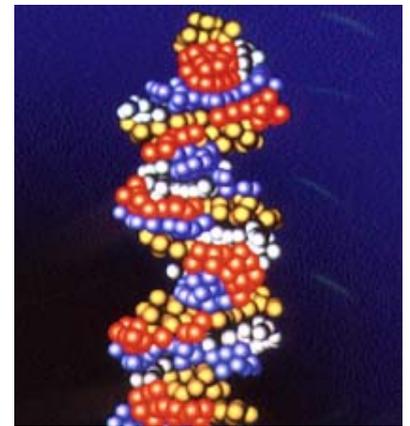
Des souris *knock out* chez qui était inactivés les gènes codant pour les protéines impliquées dans la méthylation mouraient au cours de l'embryogenèse, démontrant l'importance de ces méthyltransférases dans le développement des organismes.

La plus belle réussite de la biologie moderne est la découverte des fondements génétiques du vivant. Mais une conception plus dynamique de la génétique s'est aussi imposée.

Toutes les instructions nécessaires à la constitution d'un organisme, quel qu'il soit, sont codées dans son ADN.

Reste un grand mystère : le fait que des cellules ayant le même ADN soient capables d'exprimer des fonctions différentes et uniques.

Chaque organe, chaque tissu des organismes complexes, comme le nôtre, est formé de nombreuses cellules différentes, unités élémentaires du vivant. Les cellules qui composent un tissu expriment des fonctions spécifiques, caractéristiques de ce tissu. Pourtant, l'ADN est identique dans toutes les cellules d'un organisme

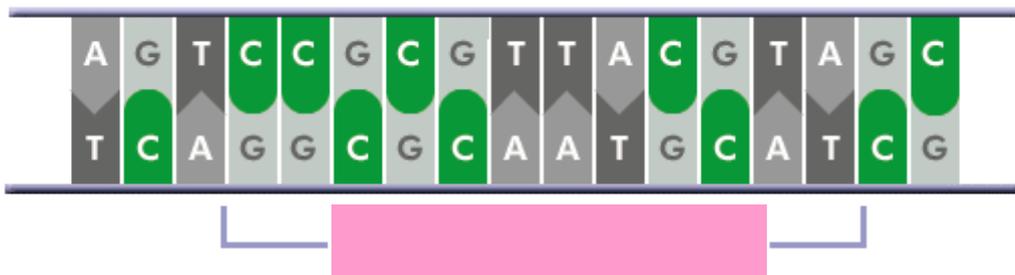




donné, car tous les organismes complexes se développent à partir d'une cellule unique, formée lors de la fécondation. L'ADN de cette première cellule se divise de nombreuses fois et se réplique fidèlement au fil du développement dans toutes les cellules filles.

L'énigme de la différenciation. Comment l'expliquer ?

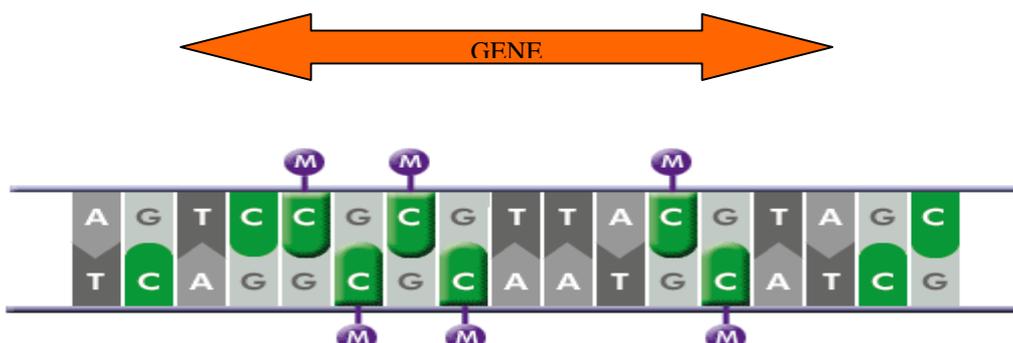
C'est pendant l'embryogenèse que les cellules acquièrent la capacité d'exprimer certains fragments de leur ADN, les gènes à l'exclusion des autres (chez homme 100.000 gènes)



On sait que le processus de différenciation est orchestré par une interaction entre l'ADN et différentes protéines. Celles-ci agissent sur l'ADN à des moments précis et activent ou inactivent tel ou tel gène spécifique. Dans les cellules, l'ADN est associé à des structures composées de multiples protéines pour former la chromatine. Certaines de ces protéines, comme les histones, sont communes à tous les gènes alors que d'autres, qui activent ou inactivent les gènes auxquels elles sont associées sont spécifiques de ceux-ci. La disposition et la répartition des protéines qui interagissent avec l'ADN déterminent si la chromatine d'un gène se présente sous une conformation active permettant sa transcription ou sous une forme inactive qui réduit le gène au silence. Ce sont ces différentes interactions entre protéines et ADN qui expliquent comment le même génome peut exprimer différentes fonctions dans différentes cellules.

En outre, les vertébrés, mais aussi les végétaux et les bactéries, disposent d'un mécanisme qui confère à l'ADN une identité spécifique de cellule. Leur génome est modifié par un processus enzymatique qui attache à l'ADN de petits groupes chimiques, les groupements méthyle (CH₃).

La méthylation de l'ADN est une modification de l'une des quatre bases azotées (thymine, adénine, guanine et cytosine) de l'ADN. Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH₃) à la place d'un atome d'hydrogène. Bien que les quatre types de base puissent être méthylés, la cytosine est la plus fréquemment méthylée.





S&P Laboratories

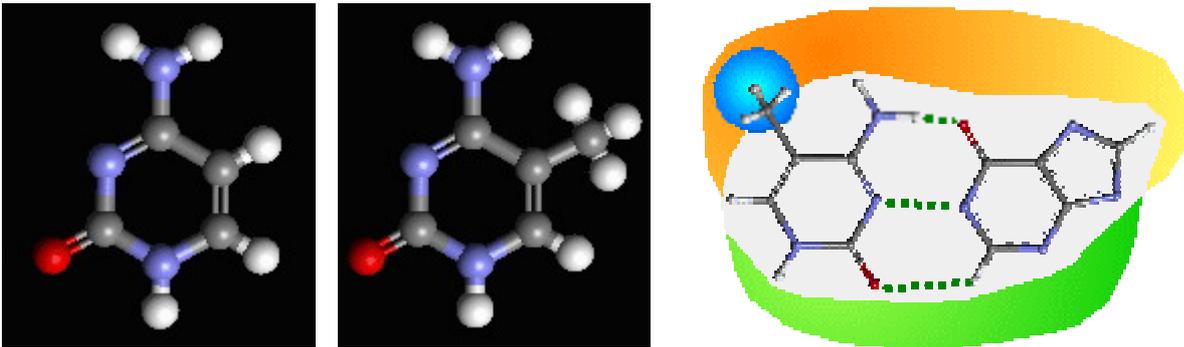
Venelle de Sart, 8 - 1300 Wavre - Belgique
Tel : +32 (0)10 245772 - Fax : +32 (0)10 246676

E-mail : info@labosp.com

Web : www.labosp.com

Le groupement CH₃ se fixe à la cytosine mais seulement lorsque celle-ci se trouve à côté d'une autre base, la guanine (séquence CG). Cependant, la méthylation ne concerne pas toutes les séquences CG du génome, mais seulement 80 % d'entre elles environ.

Méthylation de la cytosine



Le groupement CH₃ s'ajoute au carbone 5 de la cytosine. L'une des caractéristique importante de la méthylation de l'ADN est le fait que les groupements méthyles se loge dans le grand sillon de l'ADN sous forme B, dont la conformation en double hélice tourne vers la droite, est l'agencement naturel de l'ADN quand l'humidité est élevée et la salinité basse et la forme d'ADN la plus commune dans l'organisme.

Ce changement a non seulement d'importantes répercussions sur le génome, puisque c'est la structure même de l'ADN qui est modifiée, mais il modifie radicalement les interactions des protéines avec l'ADN

Alors que chaque cellule humaine contient 100 000 gènes, seulement un petit nombre d'entre eux est activé dans une cellule en fonction du stade du développement de l'organisme, du type cellulaire, de signaux extérieurs à l'organisme...

Le fait que les groupements méthyle dans le génome se caractérisent par une distribution spécifique de chaque type cellulaire a conduit les biologistes à penser qu'ils jouent un rôle important dans la programmation de l'expression des gènes propre à chaque cellule. De fait, une longue série d'expériences réalisées dans de nombreux laboratoires a révélé que l'état de méthylation d'un gène traduit son état d'activité. Dans la plupart des cas décrits jusqu'à présent, la méthylation de régions ou sites régulateurs précis d'un gène réduisent ce dernier au silence.

En effet, puisque seulement une fraction des gènes d'une cellule s'exprime, le reste des gènes doit être inactivé. Chaque type de cellule aurait donc un patron de méthylation qui déterminerait quels gènes sont activés. Ce patron serait héritable aux cellules filles après une division cellulaire, c'est pourquoi le type cellulaire reste généralement le même dans une même lignée de cellule.

On a également observé que les patrons de méthylation sont spécifiques aux tissus, c'est-à-dire qu'ils sont différents pour chaque type cellulaire.

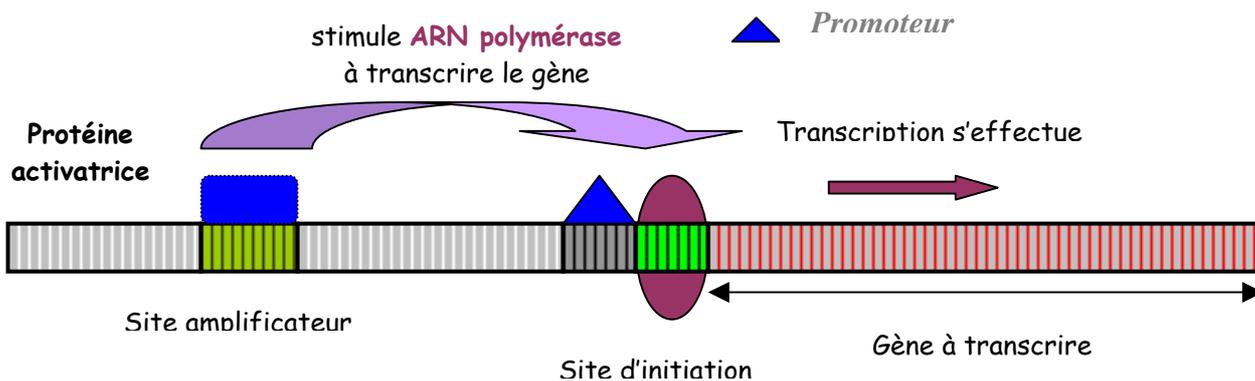


Méthylation et expression des gènes

On a également compris selon quels mécanismes moléculaires le gène est inactivé. La présence d'un groupement méthyle en un site précis empêche l'interaction entre le gène et les protéines activatrices, c'est-à-dire les facteurs de transcription.

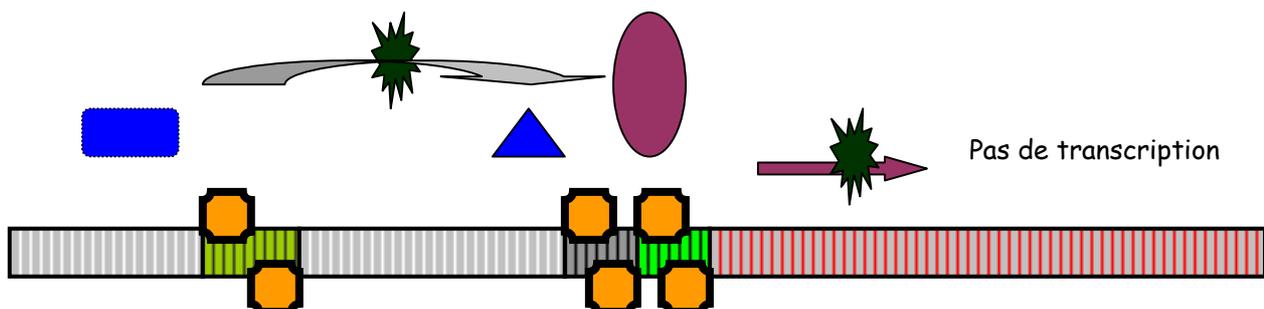
Mais il arrive, à l'inverse, aussi que la méthylation de la région régulatrice d'un gène attire des protéines spécifiques qui reconnaissent l'ADN méthylé. Lorsqu'elles interagissent avec le gène, ces protéines en recrutent d'autres qui bloquent la capacité d'expression du gène en générant une chromatine de structure inactive

Transcription normale



En fait, la méthylation modifie beaucoup les interactions entre les protéines et l'ADN. Les enzymes de restriction ont une forte affinité pour les sites non-méthylés et une affinité et une activité réduite pour les sites méthylés. De plus, il semble que la méthylation des régions régulatrices correspond à l'inactivation des gènes.

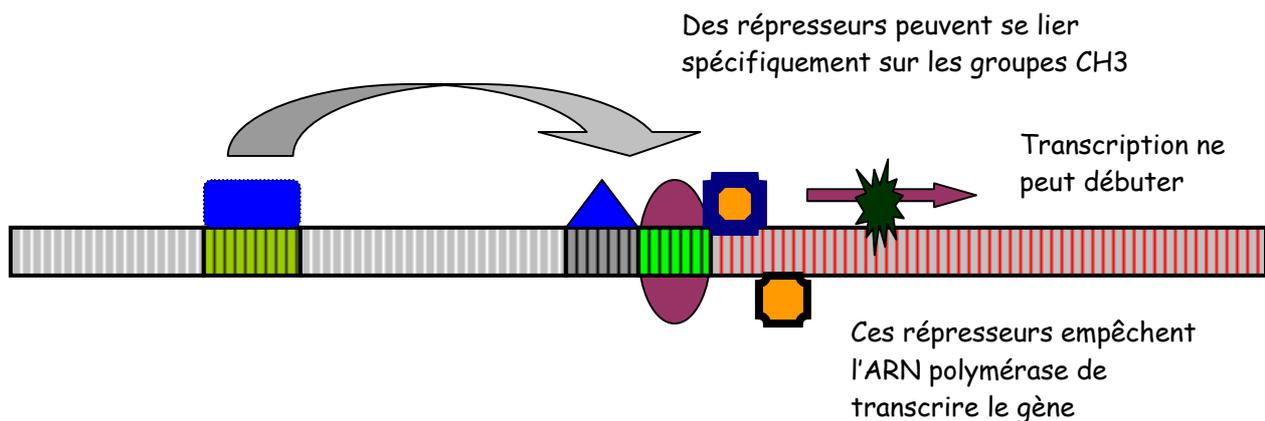
Présence de groupes méthyles





Les groupes CH₃ empêchent les facteurs d'activation de se fixer sur le site d'amplification, et au promoteur et à l'ARN polymérase de se fixer sur le site d'initiation.

D'autre part, la 5-mCyt semble empêcher la fixation des activateurs de transcription ou favoriser la fixation des inhibiteurs.



On a trouvé que la répression dépendait de la densité de méthylation du gène. Un gène faiblement méthylé peut inhiber un gène complètement, mais l'inhibition sera contrecarrée par l'effet des amplificateurs, des séquences de nucléotides éloignées du promoteur où se fixent des protéines stimulant la transcription

Quel est le rôle véritable de la méthylation ?

La relation entre la méthylation et l'expression des gènes ne peut être mise en doute.

La méthylation intervient aussi dans la réparation de l'ADN et joue un rôle dans la capacité de l'organisme à réparer les cellules endommagées avant qu'elles ne deviennent cancéreuses. Après lésion du DNA, les enzymes de réparation vont être impliqués pour une transmission fidèle du DNA. Les mécanismes appelés conservatifs maintiennent l'intégrité de l'information génétique. Ils sont constitutifs et toujours présents dans la cellule, prêts à intervenir à tout instant. On décrit des **insérases**, des **glycosylases** et **méthyltransférases** qui réparent les liaisons localisées à une base.

En cas de lésion plus importante, le mécanisme d'excision et de resynthèse intervient, faisant appel aux protéines de reconnaissance **uvrA**, **uvrB** et **uvrC** (uvr pour ultraviolet rays), à l'endonucléase, à l'exonucléase, à l'ADN polymérase puis à une ligase.

Les mécanismes de réparation 'fautifs' (système SOS) prennent le relais des systèmes de réparation conservatifs. En cas d'une agression massive, les systèmes conservatifs sont saturés, pouvant aboutir à la mort cellulaire. Les systèmes fautifs suppléent au prix d'un manque de fidélité dans la transmission du code génétique

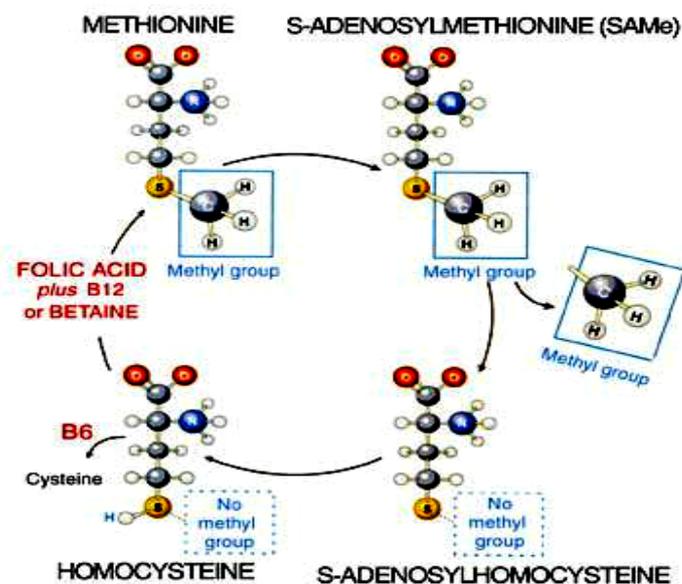
La méthylation des protéines (par d'autres méthyltransférases que l'ADN méthyltransférase) est essentielle à la communication entre les cellules par l'activation des récepteurs membranaires tandis que la méthylation des phospholipides, permet de maintenir la flexibilité et la perméabilité des membranes cellulaires, indispensables



aux échanges entre les cellules. La méthylation est nécessaire à la fabrication de notre plus important anti-oxydant qui est le Glutathion. Elle fabrique aussi l'adrénaline à partir de la norépinéphrine, et la mélatonine à partir de la sérotonine et régule en grande partie l'activité cérébrale. Outre le cerveau, le foie utilise aussi la méthylation pour effectuer son rôle de détoxification de l'organisme.

Insuffisance de Méthylation

Les effets de la sous-méthylation peuvent être observés dans le vieillissement prématuré, le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les affections hépatiques, la dépression.



Toutes les réactions de méthylation exigent de la S-adenosylmethionine (SAME) qui est fabriquée dans le corps à partir de la méthionine et de l'ATP. [applications](#)

Puisque le SAME est la substance de méthylation par excellence, tout ce qui épuise le SAME abaisse la méthylation.

Tout ce qui entrave la synthèse de l'ATP (tel que l'alcool) épuise le SAME. Le manque de vitamines B6, B12 et acide folique [applications](#) épuise également le SAME.

Si la séquence des quatre bases de l'ADN est la même dans tous les tissus, le génome n'est pas partout marqué de la même façon par la méthylation.

Comment est générée cette diversité des motifs de méthylation ?

Trois mécanismes interviennent dans la mise en place de la distribution des groupements méthyle.

1. Après la fécondation, le schéma de méthylation hérité des parents est effacé pour permettre la mise en place d'un nouveau schéma dans l'embryon. C'est ce que l'on appelle la **déméthylation globale**.
2. Une fois que les différents types cellulaires de l'embryon sont formés, des groupements méthyle sont transférés en des sites spécifiques de l'ADN par une enzyme, l'ADN méthyltransférase, qui catalyse leur transfert à partir d'une molécule donneuse, appelée S-adenosyl-méthionine (SAM) : c'est la **méthylation de novo**.
3. Enfin, lorsque le schéma de méthylation d'un type cellulaire est établi, il est fidèlement reproduit par l'ADN méthyltransférase. C'est la **méthylation de maintenance**.



Méthylation de l'ADN et cancer

Longtemps, la quasi-totalité des biologistes restèrent persuadés que la méthylation de l'ADN n'était qu'un phénomène épigénétique sans importance, un épiphénomène sur lequel il ne fallait pas s'attarder.

Depuis le début des années 1990, la méthylation de l'ADN est considérée comme un phénomène majeur. Il y a déjà 20 ans, des cancérologues de Baltimore avaient montré que les cellules cancéreuses peuvent présenter des aspects inhabituels de la méthylation de l'ADN.

Des altérations relatives à la méthylation de l'ADN sont présentes dans plus de 65 % des cancers. Victimes d'un excès de méthylation, des gènes suppresseurs de tumeurs (p53, p21) sont anormalement réduits au silence et ne peuvent plus freiner la croissance tumorale.

Pour le chercheur belge F. Fuks, un des spécialistes de la méthylation de l'ADN (ULB-FNRS), ce processus a 2 caractéristiques essentielles :

- d'une part, elle est un marqueur de silence des gènes
- d'autre part, elle ne s'opère pas au hasard, mais en des positions bien précises du génome.

On a longtemps étudié la régulation des gènes en se focalisant sur leur activation, alors qu'il apparaît aujourd'hui que la répression de l'expression est une clé d'importance similaire pour le devenir de la cellule.

En réalité, la méthylation de l'ADN ne fait pas cavalier seul. Un autre élément semble agir de concert avec elle pour réguler l'expression des gènes : la structure d'une entité compacte mais dynamique, la chromatine ouverte (expression du gène) ou fermée (gène silencieux)

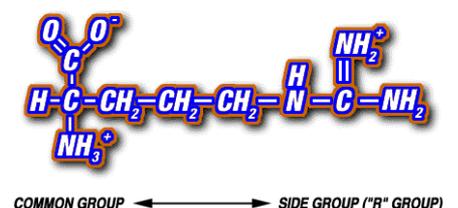
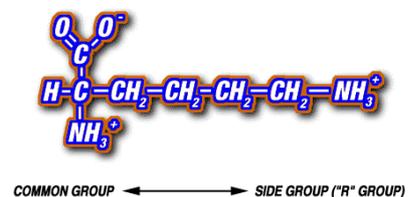
La chromatine est la substance constitutive du noyau. Elle se condense lors de la division cellulaire pour former les chromosomes. Son unité de base est le nucléosome, association de l'ADN et de protéines, les histones.

Quand on parle d'un changement de structure de la chromatine, on se réfère à la modification des histones par des enzymes dites modificatrices de la chromatine (HMT fermeture, HDAC ouverture).

Les histones sont les protéines basiques de la chromatine (pH voisin de 10). On trouve 5 types d'histones qui se distinguent par leur richesse en lysine et arginine et par leur mobilité électrophorétique.

- H1 très riche en lysine
- H2A et H2B, modérément riche en lysine
- H3 et H4 riches en arginine
- H2A, H2B, H3 et H4 sont présentes dans la chromatine en quantité équimoléculaires et tendent à se combiner entre elles ainsi qu'à un fragment d'ADN de 140 paires de nucléotides .

Les histones peuvent être phosphorylées sur les sérines et thréonines, acétylées et méthylées sur l'amine distale des lysines par des enzymes spécifiques.





S&P Laboratories

Venelle de Sart, 8 - 1300 Wavre - Belgique
Tel : +32 (0)10 245772 - Fax : +32 (0)10 246676

E-mail : info@labosp.com

Web : www.labosp.com

H1 est présente en quantité deux fois plus petite que les autres et forme un pont entre le nucléosome et l'ADN voisin. La phosphorylation de H1 pourrait être le signal déclenchant de la mitose en provoquant la condensation des chromosomes au cours du cycle cellulaire.

L'acétylation de H3 et H4 pourrait être un signal de mise en activité des gènes, la méthylation une interruption du signal.

Les modifications épigénétiques sont probablement aussi importantes que les mutations génétiques dans l'apparition et le développement des cancers. Et même dans la plupart des cas, plusieurs mécanismes génétiques et épigénétiques se conjuguent. La cancérogénèse est multifactorielle et la combinaison de ces deux types de défauts aboutit à une activation d'oncogènes et/ou à une désactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.

Mais contrairement aux mutations, les phénomènes épigénétiques (méthylation de l'ADN, fermeture de la chromatine) sont réversibles. L'administration de drogues inhibant la méthylation de l'ADN a conduit à des rémissions chez certains cancéreux mais sans aucune sélectivité. La découverte inattendue d'une enzyme capable de briser cette carapace moléculaire ouvrirait d'immenses perspectives.

Plusieurs équipes ont mis en évidence des altérations multiples de la méthylation de l'ADN dans les cellules tumorales. Cependant, ces modifications vont dans un sens qui ne répond pas à un modèle simple. Si les cellules cancéreuses sont globalement hypométhylées, certains gènes - et surtout les gènes dits suppresseurs de tumeurs dont le rôle est de freiner la croissance tumorale - sont hyperméthylés, comme l'ont montré plusieurs équipes dont celle de Stephen Baylin à John Hopkins.

Le mystère de la déméthylation a persisté jusqu'à ces derniers temps.

Comment interpréter la coexistence d'une hypométhylation globale et d'une hyperméthylation localisée dans les cellules cancéreuses?

Une hypothèse a été proposée pour expliquer cette hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs : le gène codant l'ADN méthyltransférase s'exprimerait davantage dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines.

De fait, beaucoup de processus connus pour transformer une cellule normale en cellule cancéreuse majorent le niveau d'expression de l'ADN méthyltransférase.

En se fondant sur cette observation, on peut supposer que cette enzyme est un acteur crucial et commun à de nombreux mécanismes de cancérisation. L'ADN méthyltransférase pourrait donc être la cible de traitements anticancéreux, et ses inhibiteurs pourraient bloquer la croissance tumorale. (De tels inhibiteurs sont d'ailleurs actuellement à l'étude en tant qu'agents anticancéreux dans le cadre d'essais de phase I conduits par l'entreprise MethylGeneInc. à Montréal)



S&P Laboratories

Venelle de Sart, 8 - 1300 Wavre - Belgique

Tel : +32 (0)10 245772 - Fax : +32 (0)10 246676

E-mail : info@labosp.com

Web : www.labosp.com

Ce modèle est séduisant, mais subsiste une question gênante. Pourquoi le génome des cellules cancéreuses est-il globalement hypométhylé si ces cellules expriment abondamment l'ADN méthyltransférase ?

Comme la déméthylation globale se produit à un stade très précoce de l'embryogenèse, suite à l'action probable d'une déméthylase, on pense que les cellules cancéreuses expriment sans doute, elles aussi, une déméthylase.

A partir de cellules de cancer bronchique, on a pu isoler et purifier une fraction protéique ayant une activité de déméthylation de l'ADN. Elle a pour le dinucléotide CG la même spécificité que l'ADN méthyltransférase. En effet, seules sont déméthylées les cytosines appartenant à une séquence mCG, à l'exclusion de toutes celles faisant partie de séquences différentes.

Cette déméthylase existe et catalyse une réaction nouvelle, où le groupement hydroxyle (OH) de l'eau réagit avec le groupement méthyle pour donner du méthanol, le proton libre de la molécule d'eau réagissant alors avec l'anneau de la cytosine pour reconstituer la molécule.

D'importantes questions restent en suspens !

D'abord, les vertébrés possèdent-ils d'autres ADN déméthylases, et jouent-elles des rôles différents au cours du développement ?

Ensuite, y a-t-il déméthylation dans les cellules totalement différenciées qui ne se divisent pas ? Comme la déméthylase pourrait avoir la capacité de supprimer la méthylation de l'ADN qui ne se réplique pas, il se peut que la méthylation soit un signal transitoire d'activation ou de désactivation des gènes, non seulement pendant le développement, mais également chez l'animal pleinement différencié. Si tel est le cas, nous sommes peut-être passés à côté de tout un pan de la régulation physiologique des gènes.

La déméthylase peut-elle servir à reprogrammer des cellules différenciées pour les faire redevenir plus primitives et pluripotentes ? Ces cellules pourraient-elles alors être utilisées pour des clonages et des transplantations expérimentales et thérapeutiques ?

A quoi tient la spécificité de la déméthylase ? Pourquoi la déméthylation ne porte-t-elle que sur certaines séquences même lorsque la déméthylase est présente ?

L'hypométhylation globale est l'un des faits les plus constants dans le cancer : la déméthylase est-elle, tout comme l'ADN méthyltransférase, surexprimée dans les cellules cancéreuses ?

Les régions hypométhylées dans ces cellules jouent-elles un rôle important dans le contrôle de leur multiplication ?

La déméthylase joue-t-elle un rôle causal dans le cancer et si oui, représente-t-elle alors une cible unique et spécifique pour mettre au point de nouveaux traitements anticancéreux ?

Le fonctionnement des cellules cancéreuses fait souvent intervenir des reprogrammations épigénétiques. Le risque de cancer lié à la méthylation pourrait être le prix à payer pour l'utilisation de la méthylation dans le développement embryonnaire ?



S&P Laboratories

Venelle de Sart, 8 - 1300 Wavre - Belgique

Tel : +32 (0)10 245772 - Fax : +32 (0)10 246676

E-mail : info@labosp.com

Web : www.labosp.com

Personne ne remet en cause le fait que ce sont des mutations au niveau du génome qui expliquent l'apparition de nouveaux génotypes ou phénotypes.

Le cancer reste une maladie de l'ADN. De nombreuses observations font remarquer que la plupart de ces changements ne résultent pas de mutations accidentelles aléatoires (Monod : le hasard et la nécessité) mais de modifications du mode d'expression et de réorganisation du génome au cours de processus qui n'ont rien d'aléatoire.

Ils ont été sélectionnés depuis l'origine parce qu'ils aidaient l'individu à mieux valoriser ses ressources génétiques et biochimiques, ce sont des mutations immédiatement adaptatives, qui permettent de faire face à des contraintes nouvelles, généralement transmises aux descendants.

L'homme doit s'adapter aux changements, sinon il sera éliminé.

On trouve des adaptations :

- culturelles qui concernent son mode de vie et sont transmises par imitation
- des modifications du génome, transmissibles aux descendants par les lois de l'hérédité (Mendel) qui sont génétiques avec changement de la séquence des nucléotides et/ou épigénétiques par déstabilisation du génome, sans changement de séquence.

Les nouvelles techniques de génie génétique montrent que des facteurs extérieurs résultant de l'interaction de l'individu avec son environnement, peuvent modifier l'expression des gènes ou des parties non codantes de l'ADN, soit de modifier les génomes eux-mêmes en y introduisant des éléments codants empruntés à des organismes extérieurs.

Vos réactions, vos avis à cafaitdebat@labosp.com