

Génétique et épigénétique

Un code au-dessus du code !

Nicolas P.F. Barthes, Benoît Y. Michel, Janah Shaya, Nadine Martinet et Alain Burger

Résumé

La méthylation de l'ADN est une des marques épigénétiques majeures qui intervient dans la régulation de processus physiologiques importants comme l'empreinte génomique parentale et l'expression tissu-spécifique des gènes. Par ailleurs, la méthylation de l'ADN a été reconnue comme un élément pathologique majeur conduisant au cancer. Les marques épigénétiques s'accumulent pour le meilleur mais aussi pour le pire, au cours du temps et en fonction de l'environnement des organismes concernés. Pour le chimiste, l'épigénétique c'est évidemment la thérapeutique avec des petites molécules, mais c'est aussi bien plus. En effet, des outils chimiques sont indispensables pour décrypter les mécanismes de la mise en place fidèle de la méthylation de l'ADN de la cellule mère à ses cellules filles ; cet article en décrit quelques-uns. La transmission à la première génération des épimutations révolutionne notre conception de l'hérédité. En effet, tout n'est pas inné, beaucoup est acquis. Le mode de vie, la nutrition, le microbiote et l'environnement peuvent tous modifier l'épigénétique et créer des épimutations génératrices de pathologies. C'est à ce titre qu'enfin s'ouvre le champ de la prévention des maladies comme le syndrome métabolique et le cancer, en changeant la nutrition et en jouant sur les facteurs environnementaux : pesticides, tabac... L'actualité des perturbateurs endocriniens contenus dans les plastiques nous le rappelle douloureusement.

Mots-clés

Épigénétique, méthylation de l'ADN, interactions ADN/protéine, cancer, DNMT1, UHRF1.

Abstract

Genetics and epigenetics: a code above the code!

DNA methylation is one of the major epigenetic marks involved in the regulation of important physiological processes such as parental genomic imprinting and tissue-specific gene expression. In addition, DNA methylation has been recognized as a major pathological reason leading to cancer. Epigenetic marks are accumulated for better but also for worse over time and on the basis of the environmental factors for the concerned organisms. For the chemist, epigenetics is obviously therapy using small molecules but it is also much more. Indeed, chemical tools are required to decipher the mechanisms of faithful DNA methylation establishment from the mother cell to its daughter ones; this article describes herein some of them. Transmission to the first generation of epimutations revolutionizes our conception of heredity. Indeed, all is not innate, a lot is acquired. Lifestyle, nutrition, microbiota, environment can all of them alter epigenetics and spur epimutations generating pathologies. Changing nutrition and playing on the environmental factors (pesticides, tobacco...) open up new prospects to prevent diseases such as metabolic syndrome and cancer. Recent events involving endocrine disruptors contained in plastics painfully remind us.

Keywords

Epigenetics, DNA methylation, nucleic acid/protein interactions, cancer, DNMT1, UHRF1.

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, est indispensable à toutes les formes de vie. L'enchaînement successif de ses bases constitue le code génétique qui est transcrit grâce à la machinerie transcriptionnelle. Mais les interactions de l'ADN avec d'autres entités biologiques et l'état moléculaire de ses bases en modifient aussi la transcription. Au-dessus du code génétique, il existe en effet un supra code : « le code épigénétique ». En modifiant la transcription du code génétique, il « édite » le génome. Le code épigénétique se met en place tout au long de la vie et sa transmission à la première génération de la descendance est avérée, perturbant les notions d'hérédité classique. La réversibilité des marques épigénétiques laisse aussi la place à l'intervention thérapeutique. La fidélité de leur mise en place est la garantie de la longévité en bonne santé.

Les marques épigénétiques sont éditrices du génome

Le terme « épigénétique » a été utilisé la première fois en 1942 par Conrad Hal Waddington [1]. Il est créé à partir

des termes grecques « épi » (ἐπί) et « génétique » (γενετικός), avec comme signification « au-dessus du gène ». L'épigénétique englobe l'ensemble des variations des caractères phénotypiques non encodées dans l'ADN (génotype). Elle est cependant transmissible à la descendance (première génération) [2].

Contrairement aux mutations génotypiques, ces épimodifications sont réversibles et fondent le développement des médicaments épigénétiques. L'ADN lui-même ainsi que les protéines sur lesquelles il s'enroule, les histones, sont épimodifiables. La modification chimique des bases de l'ADN comme la méthylation de la cytosine, mais aussi le compactage/décompactage des histones épimodifiées (par acétylation, méthylation, phosphorylation...) régulent l'accessibilité à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle, et par conséquent son éventuelle transcription/expression (figure 1). Enfin, les ARN non codants, sont parfois inclus dans l'*armement* épigénétique parce qu'ils régulent aussi la transcription des gènes ; certains possèdent même des cytosines méthylables.

L'ensemble des acteurs épigénétiques agissent en synergie afin d'atteindre un but commun : l'édition du génome,

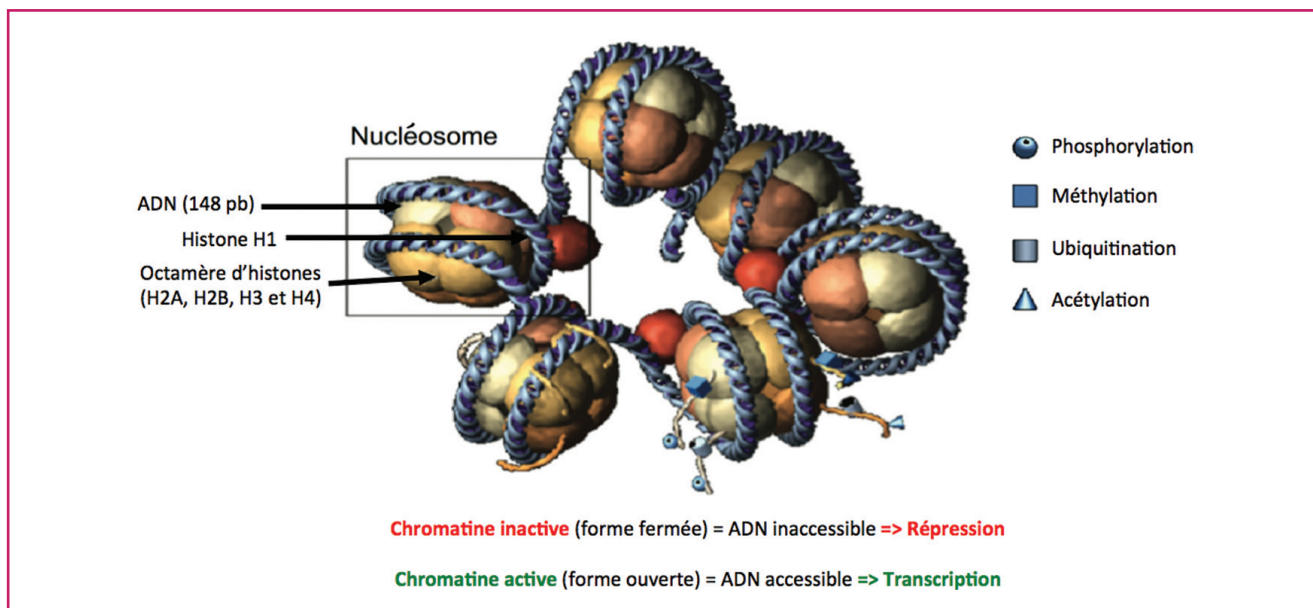


Figure 1 - Marques épigénétiques (adapté de [3]).

c'est-à-dire l'expression et/ou la répression des gènes. Les épimodifications du génome sont physiologiques pendant le développement de l'embryon (empreinte génique). Sous l'influence des facteurs environnementaux auxquels un individu est soumis (nourriture, exposition au soleil, tabagisme, pollution...), elles peuvent conduire à des dérégulations pathologiques : transformation cellulaire maligne, maladie d'Alzheimer, maladie d'Huntington, syndrome métabolique, entre autres.

La méthylation de l'ADN est une marque multifonctionnelle jouant un rôle direct sur l'expression des gènes et un rôle indirect sur la structuration de la chromatine adjacente, mais aussi sur l'expression des miARN encodés dans le génome. Elle semble donc être la « clé de voûte » de cette machinerie transcriptionnelle complexe.

Méthylation de l'ADN

La méthylation de la cytosine (C) est la principale modification épigénétique touchant directement l'ADN. L'ajout d'un motif méthyle (CH₃) en position 5 du noyau pyrimidique (5mC) ne modifie en rien la séquence d'ADN (figure 2). Chez l'homme, les 5mC représentent 1 % du génome pour

environ 21 % de C non modifiées (ou Cp, avec C : cytosine et p : phosphate) [4].

La synthèse de la 5mC est catalysée par les « DNA méthyltransférases » (DNMT), présentes au moins au nombre de 5 (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L) ; DNMT3L, bien qu'incluse dans la famille des DNMT, n'a pas d'activité catalytique. Elles abritent une poche pour leur cofacteur, la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) [5]. SAM possède un groupe méthyle hautement réactif et les méthylases, comme les DNMT, l'utilisent pour méthyler leurs substrats en donnant ensuite de la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH), recyclable en SAM.

Chez les mammifères, la 5mC, représentant 1 % de l'ensemble de leur génome (figure 3), se retrouve quasi exclusivement au niveau des dinucléotides CpG et plus rarement au niveau de trinucléotides CpXpG ou CpXpX (X = A, T ou C). Cependant, dans certaines régions appelées îlots CpG (iCpG), ces dinucléotides CpG sont majoritaires (> 55 % de la séquence) et constituent des régions promotrices de gènes une fois sur deux. Le reste des dinucléotides CpG se répartissent moitié/moitié dans les régions intragéniques et intergéniques. Les iCpG sont généralement déméthylés, sauf dans les cellules cancéreuses (figure 3) [6-7].

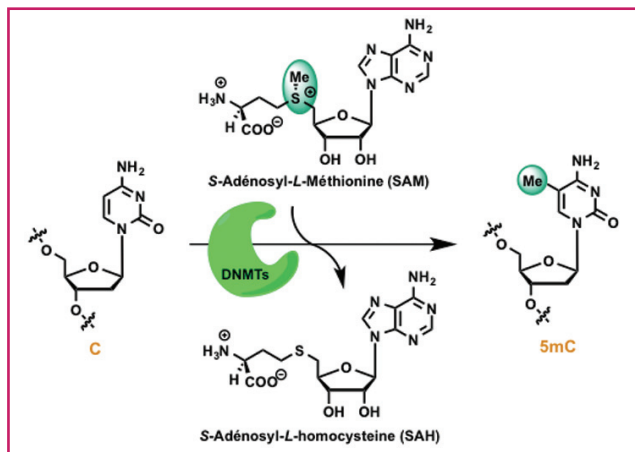


Figure 2 - Méthylation de la cytosine C de l'ADN.

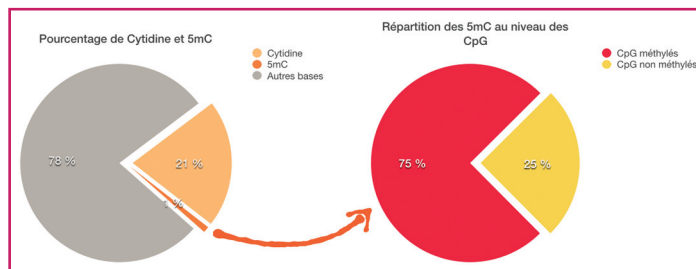


Figure 3 - Répartition des 5mC dans le génome.

Les états actifs et réprimés des gènes sont corrélés au taux de méthylation de leurs régions promotrices [8]. La méthylation *in vitro* du promoteur du gène de la β-globuline, par l'intermédiaire d'une méthylase, empêche sa transcription. D'ailleurs, le traitement par des agents déméthylants de l'ADN est actuellement promu [5, 7a].

La présence des groupes méthyles sur les iCpG des promoteurs géniques se traduit par une répression transcriptionnelle et deux mécanismes peuvent être mis en cause :

- Les méthyles induisent un gène stérique qui empêche la liaison avec les polymérase ; ne pouvant pas être lu, le gène n'est pas transcrit et est alors réprimé [7c].
- Les iCpG méthylés peuvent être reconnus par au moins trois familles de protéines capables de recruter des enzymes de modification des histones pour finaliser un remodelage de la chromatine. La méthylation de l'ADN s'accompagne le plus souvent d'un compactage répressif de la chromatine (figure 1) [8].

Notons que chez les bactéries, une autre méthylation a été identifiée : la 6-méthyl-2'-désoxyadénosine (6mA) (figure 4). Elle régule la réplication et la transcription bactérienne et facilite la réparation des mésappariements de l'ADN. Elle est aussi présente chez les eucaryotes (plantes et champignons) où elle joue un rôle épigénétique. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, elle est présente dans près de 14 000 gènes, soit 84 % du génome. On la retrouve essentiellement au niveau de dinucléotides ApT, avec une surreprésentation au niveau des promoteurs géniques (contrairement à la 5mC). Elle participerait au positionnement de l'ADN au niveau du nucléosome et interviendrait également sur l'expression génique. Sa présence est avérée dans les ARNm des vertébrés [9] et sa quantification au sein de l'ADN reste encore difficile à déterminer ; par exemple, il a été détecté moins de 10^3 adénines modifiées dans un génome entier murin (3×10^9 pb) [9a].

Notons que chez les bactéries, une autre méthylation a été identifiée : la 6-méthyl-2'-désoxyadénosine (6mA) (figure 4). Elle régule la réplication et la transcription bactérienne et facilite la réparation des mésappariements de l'ADN. Elle est aussi présente chez les eucaryotes (plantes et champignons) où elle joue un rôle épigénétique. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, elle est présente dans près de 14 000 gènes, soit 84 % du génome. On la retrouve essentiellement au niveau de dinucléotides ApT, avec une surreprésentation au niveau des promoteurs géniques (contrairement à la 5mC). Elle participerait au positionnement de l'ADN au niveau du nucléosome et interviendrait également sur l'expression génique. Sa présence est avérée dans les ARNm des vertébrés [9] et sa quantification au sein de l'ADN reste encore difficile à déterminer ; par exemple, il a été détecté moins de 10^3 adénines modifiées dans un génome entier murin (3×10^9 pb) [9a].

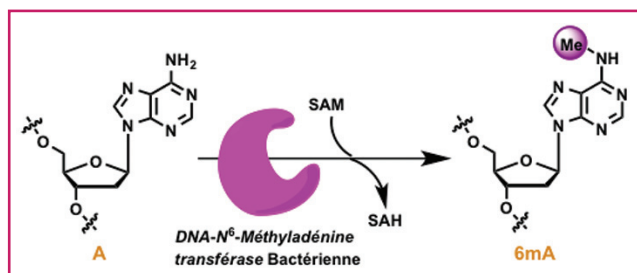


Figure 4 - Méthylation de l'adénosine bactérienne.

Déméthylation de l'ADN

Cette déméthylation, bien qu'incomprise, est observée de la maturation à la fusion des gamètes et lors du développement de l'embryon avec des phases successives de déméthylation puis reméthylation (voir figure 7 p. 23). Alors que la méthylation de l'ADN est étroitement liée à sa réplication, sa déméthylation ne semble pas dépendre du cycle cellulaire. Si l'hyperméthylation d'un promoteur génique entraîne sa répression, sa déméthylation a plutôt tendance à l'activer.

La 5mC peut être déméthylée via deux processus bien distincts. Un premier mécanisme passif intervient après la réplication de l'ADN et serait la conséquence d'une activité plus faible de DNMT1. Cette dernière permet de reproduire le profil initial de méthylation de l'ADN après réplication. Une activité plus faible de l'enzyme peut en effet entraîner une déméthylation passive et progressive de l'ADN au cours des mitoses successives (figure 5) [7b, 10].

Le second mécanisme, actif, ressemble à un processus de « nettoyage », permettant de réparer les erreurs de méthylation acquises au cours de la division cellulaire [11]. Plusieurs mécanismes ont été proposés. TET (« ten-eleven translocation ») oxyderait séquentiellement la 5mC en 5caC

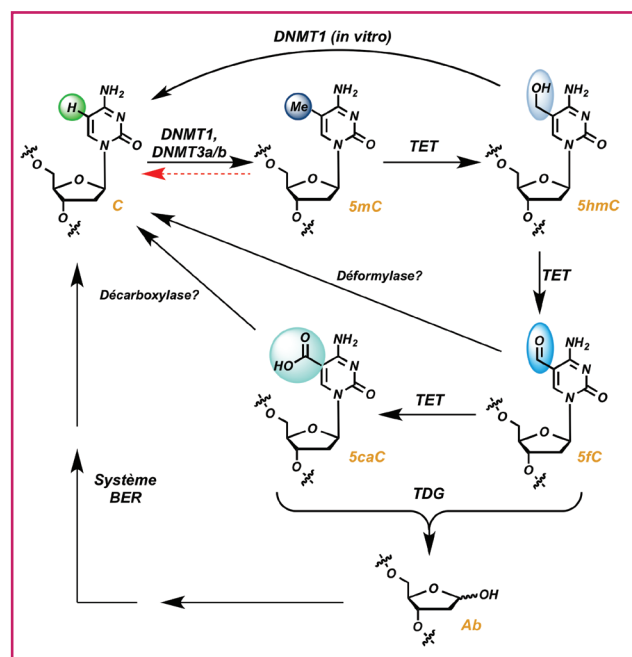


Figure 5 - Déméthylation active et passive (flèche rouge) de la 5mC.

(« 5-carboxylic acid C »), en passant par les intermédiaires successifs : hydroxyméthyle (5hmC) puis formyle (5fC) [5, 9b, 12]. Les mécanismes actifs permettant le retour à la C restent hypothétiques à ce jour et nécessitent d'être confirmés ou infirmés (figure 5) :

- Une première hypothèse mise sur une réparation de l'ADN par excision de base (BER, « base excision repair ») impliquant une série itérative d'enzymes. Elle débiterait par l'excision des bases 5fC et/ou 5caC par la TDG (« thymine DNA glycosylase ») pour former un site abasique sur l'ADN en cours de « nettoyage » qui sera réparé ultérieurement [7b, 13].
- Une seconde hypothèse évoque l'action d'une décarboxylase, non identifiée, qui viendrait décarboxyler 5caC, pour redonner directement la C de départ. L'existence d'une déformylase, qui agirait sur 5fC, a également été évoquée [5, 7b].
- Enfin, *in vitro*, DNMT1 est capable de convertir directement 5hmC en C [10].

L'étude de ces différents intermédiaires de déméthylation de l'ADN est actuellement en plein essor [14]. Notons également que parmi tous ces analogues de C, la 5hmC peut, elle aussi, être considérée comme une marque épigénétique à part entière. Dans un chromosome X inactif, on constate une déplétion en 5hmC, alors qu'elle s'accumulera à nouveau quand X est réactivé. C'est en faisant varier le rapport 5hmC/5mC dans un promoteur génique qu'est régulée l'expression des gènes concernés. La 5hmC semble intervenir lors du développement embryonnaire [4, 9b].

Enfin, en ce qui concerne la 6mA, les premières études démontrent l'existence d'enzymes permettant de la déméthyliser activement : DMAD chez les drosophiles, NMAD-1 chez *Caenorhabditis elegans*, et il semblerait qu'une enzyme similaire soit également présente chez l'homme, METTL4 [9a]. Cependant, aucun mécanisme de déméthylation passive de la 6mA n'a encore été observé.

Dans un second temps, la discussion se focalisera sur le rôle biologique de la méthylation de l'ADN au niveau de la cytosine, ainsi que sur les effets que l'environnement peut avoir sur elle et sur son mécanisme de mise en place, à l'échelle moléculaire.

Développement et méthylation de l'ADN

Comme mentionné précédemment, la méthylation/déméthylation de l'ADN joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire dont certains aspects seront développés ci-après. Mais la spéciation tissulaire, qui fait qu'à partir de l'œuf se développent les différents organes, nécessite la mise en place d'une méthylation de l'ADN précise qui commence à se clarifier grâce aux techniques de séquençage de cellule unique.

Division cellulaire

Au cours de la mitose cellulaire, la réplication de l'ADN permet de dupliquer l'information génétique afin de donner deux duplex d'ADN identiques, qui sont ensuite répartis entre les deux cellules filles (figure 6). La cellule mère présente un profil de méthylation symétrique du fait de la méthylation de ses deux brins. Cependant au cours de la réplication, les nucléotides utilisés pour produire les brins complémentaires des brins parents sont « naturels » car n'ayant subi aucune modification chimique. Une fois la réplication achevée, les cellules filles ne présentent qu'un seul brin d'ADN méthylé, provenant de la cellule mère (figure 6a) ; l'autre brin, nouvellement synthétisé, ne l'est pas : on parle d'ADN hémiméthylé. Pour redonner un ADN symétrique, identique à celui de la cellule mère, DNMT1 vient méthyler le brin néoformé, en se basant sur le modèle des 5mC présentes sur le brin parent. Les cellules filles vont donc ainsi posséder un ADN diméthylé symétrique, fidèlement reproduit (figure 6b) [4, 11]. Cette étape est indispensable au bon fonctionnement de nos cellules.

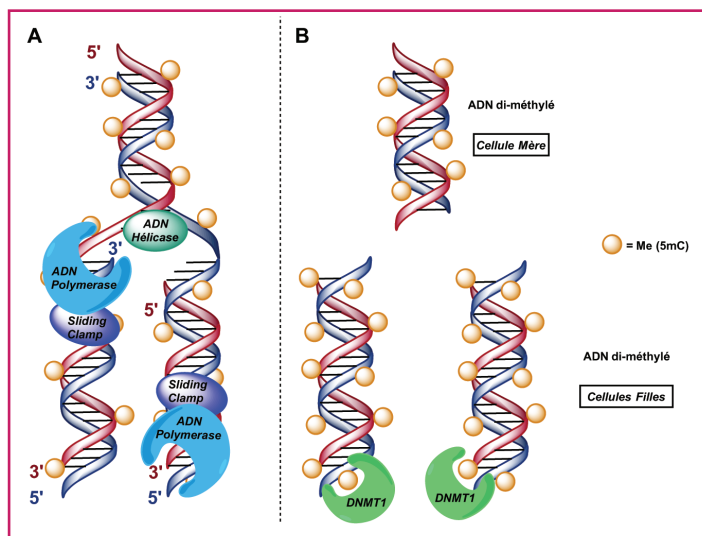


Figure 6 - Représentation simplifiée de (A) la réplication de l'ADN et (B) la conservation du patron de méthylation de l'ADN au cours de la mitose.

Empreinte génomique parentale

Outre la mitose, un autre processus de division cellulaire a lieu lors de la production de gamètes : la méiose. Les gamètes sont les cellules reproductrices (spermatozoïdes et ovules), à l'origine du transfert d'information génétique des parents vers la descendance. Elles ne présentent que la moitié du génome de chaque parent, soit 23 chromosomes. La fusion d'un ovule et d'un spermatozoïde donne lieu à une cellule-œuf qui présente à nouveau un matériel génétique

complet (46 chromosomes), indispensable au développement du nouvel être.

La fusion entre un génome mâle et un génome femelle est nécessaire car ils sont complémentaires l'un de l'autre. Cependant, ils présentent des différences de méthylation de l'ADN, « l'empreinte génique parentale » permettant « l'expression mono-allélique » des gènes. Un même gène peut être « éteint » (mC) chez le père et « allumé » (C) chez la mère. Cela implique donc que le gène transmis par le père ne sera pas exprimé chez l'enfant. Des empreintes parentales anormales conduisent à des maladies : syndromes d'Angelman et de Beckwith-Wiedemann [15-17].

Les cellules germinales primaires, obtenues après méiose, subissent d'abord une étape d'effacement de la méthylation des 5mC. Puis une nouvelle empreinte propre au sexe du futur embryon, mais toujours liée à l'empreinte parentale, est créée sans que l'on sache comment (figure 7) [15, 17].

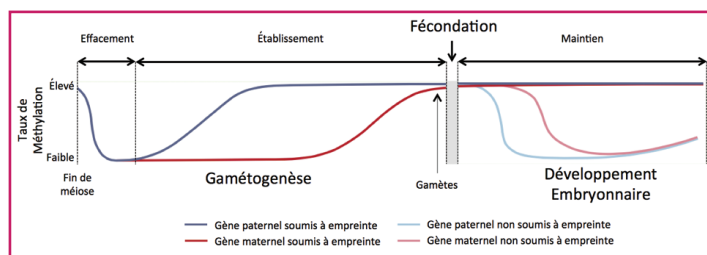


Figure 7 - Évolution du taux de méthylation de l'ADN parental, des gamètes à l'embryon (adapté de [15]).

Influence de l'environnement sur le développement

L'épigénome est en constante évolution de la gestation à la vieillesse [18]. L'environnement où vit une mère influence l'épigénétique de son embryon. La famine subie par une future mère entraîne la naissance d'enfants sujets au diabète de type 2 plus tard [19]. Une déméthylation délétère du promoteur de l'« insulin-like growth factor 1 » accompagne ce développement. Les perturbateurs endocriniens modifiant la maturation sexuelle et la méthylation de l'ADN sont d'autres exemples [2, 20].

Les souris *Agouti* présentées en figure 8A sont des modèles qui permettent de visualiser aisément les modifications de l'épigénome transmises aux souriceaux suite aux intoxications subies par leur mère. Le gène *Agouti* sauvage code pour la production d'eumélanine noire (*Agouti* biméthylé) ou de phéomélanine jaune (*Agouti* non méthylé). Une grande variation de couleur du pelage peut ainsi être obtenue, de la méthylation mono-allélique à la méthylation des quatre allèles. Chez ces animaux modèles, Jirtle et coll. ont étudié l'influence sur l'épigénome fœtal de la consommation par la mère d'un œstrogène xénobiotique, le bisphénol A (BPA) [21]. Ils ont observé que la prise de BPA quinze jours avant la période d'accouplement, ainsi que tout au long de la gestation et de la lactation, augmentait le nombre de nouveau-nés présentant une robe jaune. Les mères ingérant du BPA présentaient un taux de méthylation de l'ADN moins important que les souris contrôles. L'exposition à ce perturbateur endocrinien bien connu induit donc une hypométhylation de l'ADN et cette modification se répercute sur la coloration de la robe de leur progéniture [18].

D'autres études ont également été réalisées sur ces souris *Agouti*. La figure 8B présente deux souris génétiquement



Figure 8 - Influence de l'environnement chez les souris (A et B – adapté de [18]) et les abeilles (C et D).

identiques et de même âge. Pendant la grossesse, leurs mères ont été nourries avec du BPA, mais la mère de la souris jaune (gauche) a suivi le régime alimentaire standard des souris alors que celle de la souris brune (droite) a reçu, en plus du régime standard, des compléments alimentaires donneurs de méthyle (vitamine B12, choline, acide folique et bêtaïne). Le traitement au BPA a pour effet de déméthyliser le gène *Agouti*, donnant ainsi une couleur jaune à la robe. La consommation des agents donneurs de groupe méthyle permet d'atténuer, voire d'annuler, les effets du BPA ingéré par la mère. En effet, la consommation de ces composés a pour conséquence d'augmenter la quantité de SAM disponible pour la méthylation de l'ADN (ou de diminuer celle de l'inhibiteur SAH). Ceci a eu pour effet d'augmenter le taux de méthylation de l'ADN chez les embryons en développement [22].

Un autre exemple en lien avec la nutrition concerne les abeilles. Sur la *figure 8C* sont représentés une ouvrière, une reine et un faux bourdon (mâle). En fonction de sa nourriture, une même larve peut devenir soit une ouvrière, soit une reine. En effet, si la larve est nourrie avec du miel, elle devient une ouvrière. En revanche, si elle est nourrie avec de la gelée royale, c'est une reine qui se développe (*figure 8D*). La consommation de gelée royale induit ici une inhibition de la méthylase DNMT3 [23].

Mais la nourriture n'est pas le seul facteur pouvant influencer le développement des individus ; citons par exemple la température : chez tous les crocodiliens et certaines tortues et lézards, la température au cours du mi-trimestre d'embryogenèse détermine le sexe de l'individu [24].

Concernant le changement de sexe, en fonction de la présence et du comportement de ses congénères, un poisson peut se transformer en un individu du sexe opposé [24].

D'autres facteurs environnementaux vont modifier l'épigénome comme l'exposition à des virus, au tabac, à l'alcool, à la pollution, à la prise d'antibiotiques... [18, 20]. Chez les jumeaux monozygotes humains, le profil de méthylation est identique à la naissance. Cependant, au fur et à mesure qu'ils vieillissent, il évolue. Ceci est en réalité lié à l'accumulation de différentes marques épigénétiques, en lien avec les nombreux facteurs environnementaux auxquels chacun d'entre eux a été exposé [25-26]. Ainsi, deux jumeaux ayant un génome identique ne sont jamais exactement semblables [27].

Les plantes aussi peuvent subir les effets de l'environnement comme en attestent les *figures 9A* et *B*. L'illustration montre une fleur (*Linaria vulgaris*) normale (*9B*) et son analogue pélorique⁽¹⁾ (*9A*). Ces *Linaria* péloriques résultent d'une épimutation héréditaire, causée par une vaste méthylation du

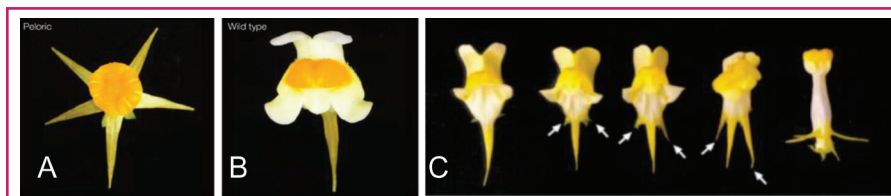


Figure 9 - Effet de l'environnement sur des *Linaria vulgaris* : (A) une fleur pélorique, (B) une fleur normale et (C) évolution graduelle de l'épimutation [28a]. Reproduit avec l'aimable autorisation du Pr. Coen.

gène *Lcyc*, qui devient alors silencieux, entraînant une modification du phénotype floral. La *figure 9C* montre l'évolution (de gauche à droite) entre l'espèce sauvage (gauche) et l'épimutant (droite) en passant par divers individus semi-péloriques [28].

Ainsi, l'influence de l'environnement sur la méthylation joue un rôle majeur lors du développement, mais également pendant l'évolution du génome, et par conséquent sur le phénotype des individus. De plus, ce nouveau paradigme pourrait expliquer la plasticité du génome pour une meilleure adaptation à l'environnement (évolution) et met en lumière la relation étroite entre style de vie et apparition de diverses pathologies [29]. Par exemple, on compte énormément sur l'épigénétique pour une adaptation des végétaux aux changements climatiques puisque de nombreux circuits régulateurs du cycle circadien et de la thermomorphogénèse sont régulés épigénétiquement [30].

Transmissions de la méthylation de l'ADN et couple DNMT1/UHRF1 (SRA)

DNMT1

DNMT1 est omniprésente dans notre organisme : fortement exprimée dans les tissus fœtaux, le cœur, les reins, le placenta, et moins exprimée dans la rate, les poumons, le cerveau, l'intestin grêle, le côlon, le foie et les muscles squelettiques. Quatre isoformes peuvent être observées : DNMT1a (la plus abondante) et DNMT1b sont naturellement présentes dans notre organisme ; DNMT1o et DNMTp ne sont exprimées que dans les ovocytes et lors de la spermatogénèse [7b, 26].

DNMT1 est impliquée dans le maintien du patron de méthylation de l'ADN. En effet, elle est très peu abondante lorsque les cellules sont en quiescence (G0) et n'est induite que lors de l'entrée en phase S (réplication de l'ADN). Plus particulièrement, son domaine RFTD (« replication focus targeting domain ») permet son recrutement au niveau de la fourche de réplication de l'ADN [7b, 26, 31-32]. Elle présente une affinité sélective pour l'ADN hémiméthylé. Son activité

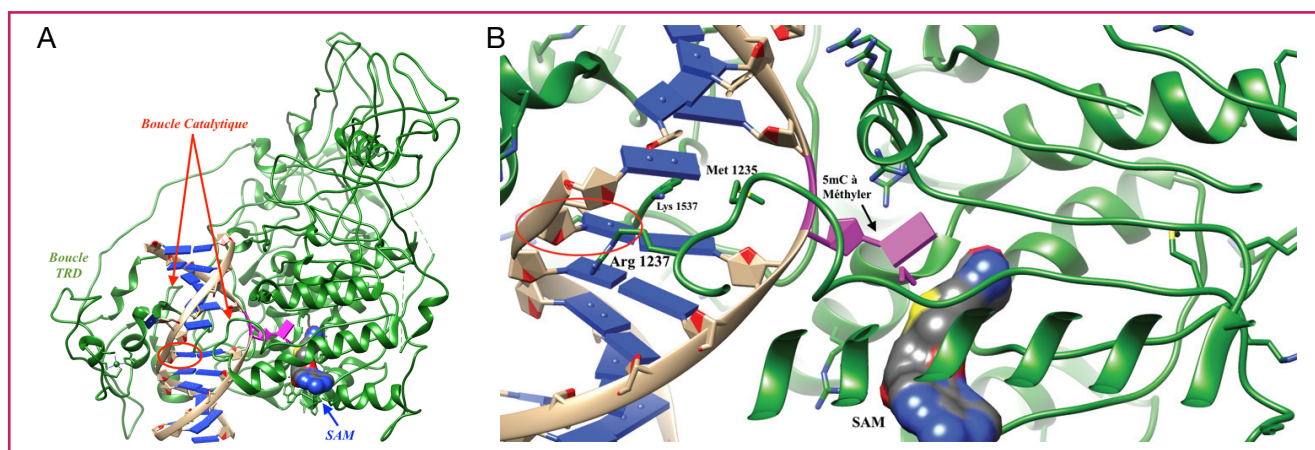


Figure 10 - (A) Structure cristallographique du complexe DNMT1 (murine)/ADN hémiméthylé (PDB : 4DA4 ; vert : DNMT1 ; bleu marine : bases nucléiques ; beige : ponts phosphodiesters ; magenta : C à méthyler ; cercle rouge : 5mC du brin parent ; gris : SAM) et (B) zoom sur le site de stabilisation de l'ouverture du duplex d'ADN [33] (structure produite sur Chimera®).

« méthyltransférase » est en effet 30 à 40 fois plus importante pour les duplex d'ADN hémiméthylés que pour ceux qui sont non méthylés [7b]. DNMT1 reconnaît la 5mC du brin parent (cercle rouge, *figure 10A*) en positionnant son groupe méthyle à l'intérieur d'une poche hydrophobe se trouvant sur la boucle TRD (« target recognition domain »). Le duplex hémiméthylé est maintenu en place grâce à cette boucle TRD et à la boucle catalytique (*figure 10A*) se positionnant respectivement au niveau des grands et petits sillons de l'ADN.

Cette méthylase murine est la seule ayant été cocrystallisée avec un duplex d'ADN hémiméthylé. On constate que la C à méthyler (*figures 10A* et *B*) est basculée hors du duplex d'ADN pour se positionner parfaitement dans la poche catalytique de la DNMT1, au plus près de SAM. Afin de stabiliser la position laissée vacante par le basculement de la base, deux acides aminés (Met1235 et Lys1537) viennent occlure l'ouverture du duplex d'ADN [33]. Ce mécanisme semble être identique chez toutes les enzymes homologues à DNMT1 puisqu'il est également observé dans le cas des méthyltransférases (M.Mpel) de champignons microscopiques (*Mycoplasma penetrans*) [34].

Le mécanisme couramment admis de formation de la 5mC (*figure 11*) commence par une addition de Michael du thiol de Cys1229 sur la position 6 de la C. Cette réaction est favorisée grâce à une catalyse acide de l'azote N3 par Glu1269 [33a]. Ensuite, l'énamine ainsi formée va se

condenser sur le SAM afin de transférer le groupement méthyle en C5 de la nucléobase tout en libérant SAH. Cette étape bénéficie d'une catalyse basique, au travers de la déprotonation du N3 par le résidu glutamate. Enfin, la β -élimination de la cystéine restaure l'aromaticité de la nucléobase et permet la dissociation de la 5mC du site actif de l'enzyme [5, 26].

Une fois la méthylation achevée, 5mC reprend sa place au sein du duplex d'ADN et DNMT1 « relâche son étreinte ».

UHRF1/SRA

Le maintien du profil de méthylation assuré par DNMT1 se fait avec une très haute fidélité. Cependant, sa préférence pour l'ADN hémiméthylé ne suffit pas à expliquer cette fidélité. Elle repose en fait sur l'interaction de DNMT1 avec une autre protéine : UHRF1 (« ubiquitin-like, containing PHD and ring finger domains 1 »). Cette protéine au poids moléculaire apparent de 90 kDa possède cinq domaines bien distincts, dont SRA (« set and ring associated » – 210 résidus) capable de reconnaître la 5mC du brin parent (*figure 12*) [35]. Plus particulièrement, il la fait basculer de sa position intra-duplex vers son site de reconnaissance, un tonneau β , ainsi que l'ont montré différentes structures cristallographiques [33]. Un tel basculement permet probablement un ancrage spécifique de UHRF1 sur l'ADN en limitant le glissement linéaire le long du duplex.

Le rôle qu'elle joue sur la conservation du profil de méthylation ne fait aucun doute. En effet, dans le cas où les cellules sont dépourvues en UHRF1, ce maintien est compromis. Elle semble avoir la capacité d'interagir avec DNMT1 – ainsi qu'avec les deux DNMT3a et b – afin de les guider sur la C à méthyler [26, 35-36].

L'interaction avec l'ADN est renforcée par la présence de deux boucles qui, comme dans le cas de DNMT1, viennent maintenir le duplex en place : le « NKR finger » et le « thumb » (*figure 12*) [35]. Elles interagissent respectivement avec le grand et le petit sillon de l'ADN et les acides aminés du doigt NKR viennent stabiliser, grâce à des liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals, la position laissée vacante par le « basculement » de la 5mC (*figure 12B*) [35].

Ainsi, UHRF1 permettrait de recruter DNMT1 et d'augmenter la fidélité de reproduction du patron de méthylation de l'ADN. Sur la base des résultats des différentes études

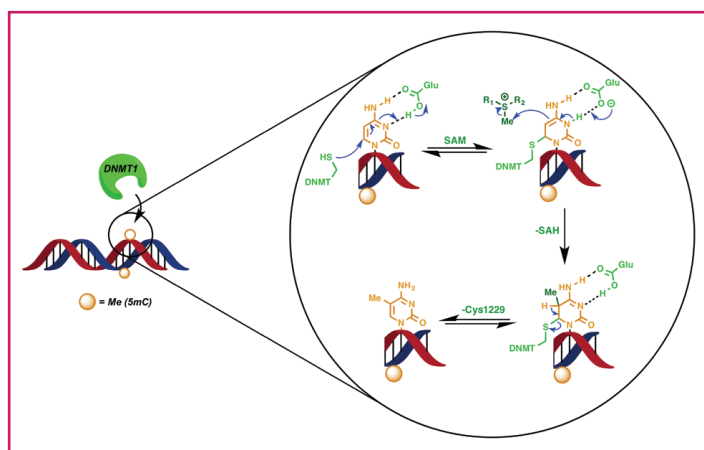


Figure 11 - Mécanisme de méthylation impliquant DNMT1 et SAM.

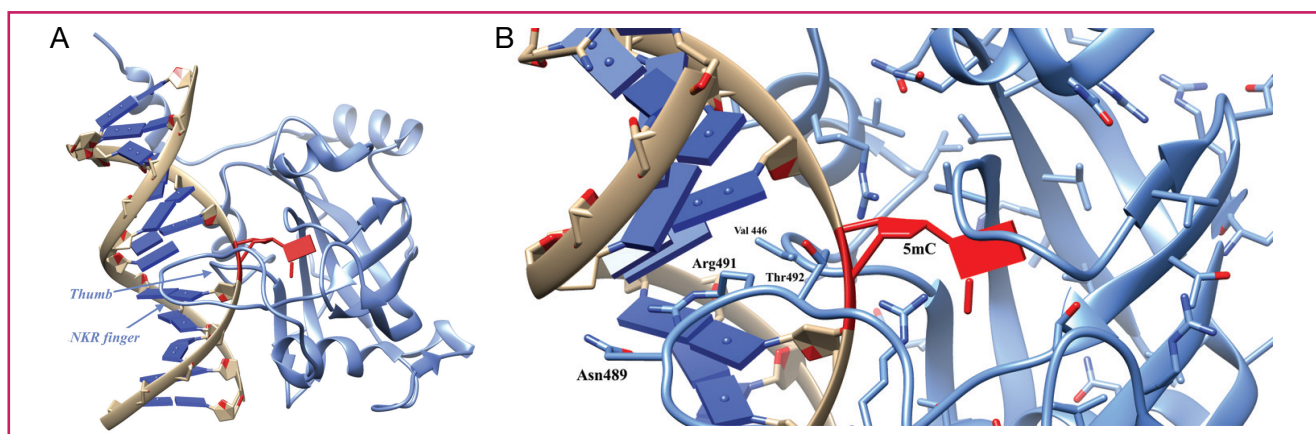


Figure 12 - (A) Structure cristallographique du complexe SRA/ADN hémiméthylé (PDB : 3CLZ ; bleu marine : bases nucléiques ; beige : ponts phosphodiester ; bleu ciel : domaine SRA ; rouge : 5mC) et (B) zoom sur le site de stabilisation de l'ouverture du duplex d'ADN [35a] (structure produite sur Chimera®).

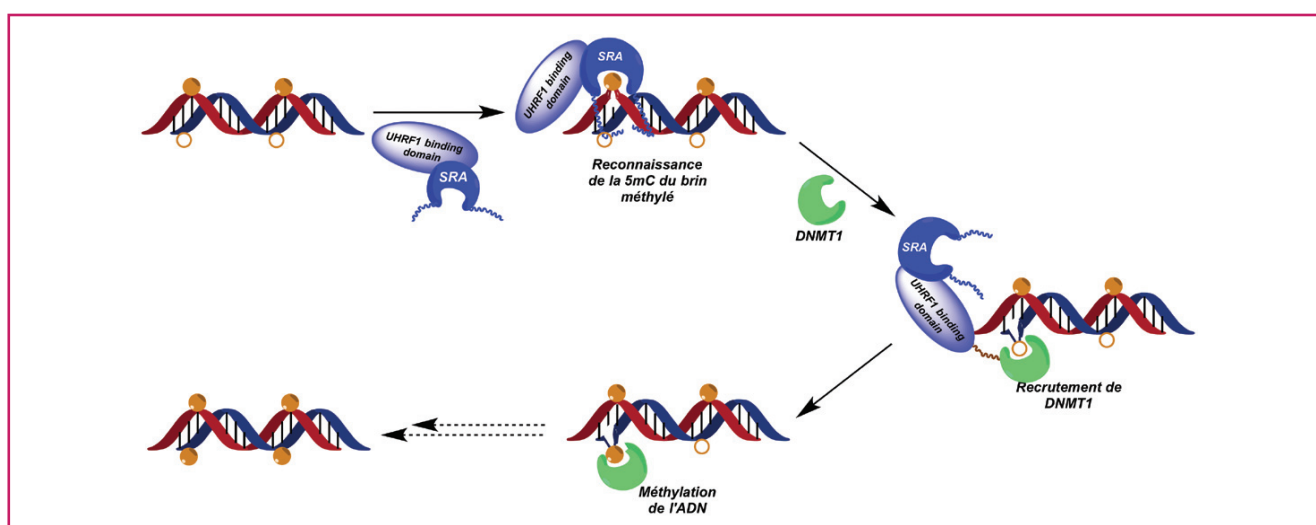


Figure 13 - Mécanisme concerté supposé entre UHRF1 et DNMT1 (adapté de [35b]).

statiques réalisées, un mécanisme en quatre étapes a été proposé pour expliquer le rôle de UHRF1 (figure 13) [35b]. Par le biais de son domaine SRA, UHRF1 se lierait dans un premier temps à l'ADN, puis reconnaîtrait la 5mC du brin parent et la ferait basculer dans sa poche spécialisée. Dans une seconde étape, le complexe UHRF1/ADN permettrait de recruter DNMT1, grâce à l'interaction d'un second site, conduisant à la formation d'un complexe ternaire transitoire. Puis l'approche de la méthylase déstabiliserait ce complexe ternaire, entraînant le départ de UHRF1 pour faciliter l'accès de DNMT1. Sa liaison à l'ADN conduirait alors à la reconnaissance et au basculement de la C à méthyler dans le site actif de l'enzyme. Dans une dernière étape, une fois la méthylation réalisée, DNMT1 se dissocierait de l'ADN, avec repositionnement de la 5mC « fraîchement méthylée » à l'intérieur du duplex. Cependant, la façon dont UHRF1 et DNMT1 communiquent entre elles pour conduire à la méthylation de l'ADN et leurs rôles précis dans ces différentes étapes, à l'échelle moléculaire, restent encore à élucider.

Notons au passage que ce mécanisme semble plus complexe encore, puisqu'il implique d'autres partenaires tels que le « sliding clamp » PCNA (« proliferating cell nuclear antigen ») permettant d'augmenter encore plus la processivité du couple UHRF1/DNMT1 [37].

Le chimiste et le physicien interviennent plus particulièrement à ce moment là pour tenter de visualiser dynamiquement ces étapes et ainsi de faire le lien entre les différentes structures cristallographiques. Des études de la première étape de ce mécanisme sont actuellement en cours au sein de notre groupe, afin de préciser le mécanisme de reconnaissance du domaine SRA de UHRF1 pour sa cible ADN hémiméthylé. Plus particulièrement, des oligonucléotides marqués avec notre rapporteur fluorescent ratiométrique, précédemment décrit dans la littérature [38], nous ont permis de suivre l'approche du domaine SRA de UHRF1 et de déterminer la cinétique de basculement de la 5mC dans sa poche de reconnaissance⁽²⁾.

Notes et références

- (1) Une plante pélorique ne présente plus de fleurs zygomorphes (symétrie bilatérale : figure 9B), mais des fleurs actinomorphes (symétrie radiale : figure 9A).
- (2) Publication soumise.
- [1] Waddington C.H., Canalization of development and the inheritance of acquired characters, *Nature*, **1942**, 150, p. 563.
- [2] Christodoulou M.S. *et al.*, Can we use the epigenetic bioactivity of caloric restriction and phytochemicals to promote healthy ageing?, *Med. Chem. Commun.*, **2014**, 5(12), p. 1804.
- [3] Bertrand P., Martinet N., Interpreting clinical assays for histone deacetylase inhibitors, *CMR*, **2011**, 3, p. 117.

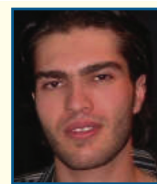
- [4] a) Sun W., Guan M., Li X., 5-Hydroxymethylcytosine-mediated DNA demethylation in stem cells and development, *Stem Cells Dev.*, **2014**, *23*(9), p. 923 ; b) Jeltsch A., Jurkowska R.Z., New concepts in DNA methylation, *Trends Biochem. Sci.*, **2014**, *39*(7), p. 310.
- [5] Choi J., Majima T., Conformational changes of non-B DNA, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*(12), p. 5893.
- [6] a) Weber M. *et al.*, Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells, *Nat. Genet.*, **2005**, *37*(8), p. 853 ; b) Auclair G., Weber M., Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals, *Biochimie*, **2012**, *94*(11), p. 2202.
- [7] a) Yisraeli J., Frank D., Razin A., Cedar H., Effect of in vitro DNA methylation on beta-globin gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*(13), p. 4638 ; b) Cartron P.-F., Pacaud R., Salbert G., Méthylation/déméthylation de l'ADN et expression du génome, *RFL*, **2015**, *473*, p. 37 ; c) Michel B.Y., Cuendet M., Barthes N.P.F., Burger A., Bertrand P., Martinet N., Détection des modifications de la méthylation de l'ADN et de la chromatine, *RFL*, **2015**, *473*, p. 55.
- [8] a) Laird P.W., Jaenisch R., DNA methylation and cancer, *Hum. Mol. Genet.*, **2003**, *3*, p. 1487 ; b) Deltour S., Chopin V., Leprince D., Modifications épigénétiques et cancer, *Médecine Sciences*, **2005**, *21*(4), p. 405 ; c) Rottach A., Leonhardt H., Spada F., DNA methylation-mediated epigenetic control, *J. Cell. Biochem.*, **2009**, *108*(1), p. 43.
- [9] a) Ratel D. *et al.*, Undetectable levels of N6-methyl adenine in mouse DNA: cloning and analysis of PRED28, a gene coding for a putative mammalian DNA adenine methyltransferase, *FEBS Lett.*, **2006**, *580*(13), p. 3179 ; b) López C.M.R., Lloyd A.J., Leonard K., Wilkinson M.J., Differential effect of three base modifications on DNA thermostability revealed by high resolution melting, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*(17), p. 7336 ; c) Huang W. *et al.*, Determination of DNA adenine methylation in genomes of mammals and plants by liquid chromatography/mass spectrometry, *RSC Adv.*, **2015**, *5*(79), p. 64046 ; d) Greer E.L. *et al.*, DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*, *Cell*, **2015**, *161*(4), p. 868 ; e) Summerer D., N⁶-Methyladenine: a potential epigenetic mark in eukaryotic genomes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*(37), p. 10714.
- [10] Chentsova A., Kapourani E., Giannis A., Synthesis of novel derivatives of 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine as tools for epigenetics, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, *10*(1), p. 7.
- [11] Jones P.A., Liang G., Rethinking how DNA methylation patterns are maintained, *Nat. Rev. Genet.*, **2009**, *10*(11), p. 805.
- [12] Williams K., Christensen J., Helin K., DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands?, *EMBO Rep.*, **2012**, *13*(1), p. 28.
- [13] Maiti A. *et al.*, Divergent mechanisms for enzymatic excision of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine from DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*(42), p. 15813.
- [14] a) Dai Q. *et al.*, Weakened N3 hydrogen bonding by 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reduces their base-pairing stability, *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*(2), p. 470 ; b) Duprey J.-L.H.A. *et al.*, Single site discrimination of cytosine, 5-methylcytosine, and 5-hydroxymethylcytosine in target DNA using anthracene-tagged fluorescent probes, *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*(3), p. 717 ; c) Booth M.J., Raiber E.-A., Balasubramanian S., Chemical methods for decoding cytosine modifications in DNA, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*(6), p. 2240 ; d) Szulik M.W. *et al.*, Differential stabilities and sequence-dependent base pair opening dynamics of Watson-Crick base pairs with 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, or 5-carboxylcytosine, *Biochemistry*, **2015**, *54*(5), p. 1294 ; e) Spruijt C.G. *et al.*, Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives, *Cell*, **2013**, *152*(5), p. 1146.
- [15] Gabory A., Dandolo L., Épigénétique et développement : l'empreinte parentale, *Médecine Sciences*, **2005**, *21*(4), p. 390.
- [16] Daxinger L., Whitelaw E., Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals, *Nat. Rev. Genet.*, **2012**, *13*(3), p. 153.
- [17] Reik W., Walter J., Genomic imprinting: parental influence on the genome, *Nat. Rev. Genet.*, **2001**, *2*(1), p. 21.
- [18] Dolinoy D.C., Huang D., Jirtle R.L., Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2007**, *104*(32), p. 13056.
- [19] Almouzni G. *et al.*, Relationship between genome and epigenome: challenges and requirements for future research, *BMC Genomics*, **2014**, *15*(1), p. 487.
- [20] Le Dantec C., Chevaillier A., Renaudineau Y., Épigénétique et médecine prédictive, *RFL*, **2015**, *473*, p. 71.
- [21] Takeshita A. *et al.*, Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription, *Eur. J. Endocrinol.*, **2001**, *145*(4), p. 513.
- [22] a) Wolff G.L., Kodell R.L., Moore S.R., Cooney C.A., Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in *Avy/a* mice, *FASEB J.*, **1998**, *12*(11), p. 949 ; b) Laget S., Defossez P.A., Le double jeu de l'épigénétique, *Médecine Sciences*, **2008**, *24*, p. 724.
- [23] Kucharski R., Maleszka J., Foret S., Maleszka R., Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation, *Science*, **2008**, *319*(5871), p. 1827.
- [24] Crews D., Sex determination: where environment and genetics meet, *Evol. Dev.*, **2003**, *5*(1), p. 50.
- [25] Fraga M.F. *et al.*, Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, *102*(30), p. 10604.
- [26] Martinet N., Michel B.Y., Bertrand P., Benhida R., Small molecules DNA methyltransferases inhibitors, *Med. Chem. Commun.*, **2012**, *3*(3), p. 263.
- [27] Monneret C., L'épigénétique: enjeux scientifiques, éthiques et sociétaux, *L'Act. Chim.*, **2016**, *407*, p. 6.
- [28] a) Cubas P., Vincent C., Coen E., An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry, *Nature*, **1999**, *401*(6749), p. 157 ; b) Cronk Q.C., Plant evolution and development in a post-genomic context, *Nat. Rev. Genet.*, **2001**, *2*(8), p. 607.
- [29] Kronholm I., Collins S., Epigenetic mutations can both help and hinder adaptive evolution, *Mol. Ecol.*, **2015**, *188*(47), p. 13564.
- [30] Quint M. *et al.*, Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis, *Nat. Plants.*, **2016**, *6*(2), p. 15190.
- [31] Howell C.Y. *et al.*, Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the DNMT1 gene, *Cell*, **2001**, *104*(6), p. 829.
- [32] Robert M.F. *et al.*, DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells, *Nat. Genet.*, **2003**, *33*(1), p. 61.
- [33] a) Song J., Teplova M., Ishibe-Murakami S., Patel D.J., Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation, *Science*, **2012**, *335*(6069), p. 709 ; b) Song J., Rechkoblit O., Bestor T.H., Patel D.J., Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation, *Science*, **2011**, *331*(6020), p. 1036.
- [34] Wojciechowski M., Czapińska H., Bochtler M., CpG underrepresentation and the bacterial CpG-specific DNA methyltransferase M.Mpel, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2013**, *110*(1), p. 105.
- [35] a) Avvakumov G.V. *et al.*, Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1, *Nature*, **2008**, *455*(7214), p. 822 ; b) Bronner C. *et al.*, The UHRF family: oncogenes that are druggable targets for cancer therapy in the near future?, *Pharmacol. Ther.*, **2007**, *115*(3), p. 419.
- [36] a) Bostick M. *et al.*, UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells, *Science*, **2007**, *317*(5845), p. 1760 ; b) Arita K. *et al.*, Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism, *Nature*, **2008**, *455*(7214), p. 818 ; c) Hashimoto H. *et al.*, The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix, *Nature*, **2008**, *455*(7214), p. 826.
- [37] Iida T. *et al.*, PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA, *Genes Cells*, **2002**, *7*(10), p. 997.
- [38] a) Dziuba D., Postupalenko V.Y., Spadafora M., Klymchenko A.S., Guérineau V., Mély Y., Benhida R., Burger A., A universal nucleoside with strong two-band switchable fluorescence and sensitivity to the environment for investigating DNA interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*(24), p. 10209 ; b) Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Barthes N.P.F., Michel B.Y., Burger A., Fedorova O.S., New environment-sensitive multichannel DNA fluorescent label for investigation of the protein-DNA interactions, *PLoS ONE*, **2014**, *9*(6), e100007.



N.P.F. Barthes



B.Y. Michel



J. Shaya



N. Martinet

Nicolas P.F. Barthes est attaché temporaire d'enseignement et de recherche (ATER) à l'Université de Nice Sophia Antipolis. Il travaille sur le développement d'outils épigénétiques dans le groupe « Sondes fluorescentes »*.

Benoît Y. Michel est maître de conférences à l'Université Nice Sophia Antipolis dans l'équipe « Molécules bioactives » et co-encadre le groupe « Sondes fluorescentes »*.

Janah Shaya est doctorant à l'Université Nice Sophia Antipolis dans l'équipe « Molécules bioactives » et développe de nouveaux marqueurs fluorescents de l'ADN dans le groupe « Sondes fluorescentes »*.

Nadine Martinet est directrice de recherche Inserm. Experte sur l'épigénétique pour l'Union européenne et pour l'Office parlementaire des sciences et des techniques (OPST), elle a été vice-présidente du COST « Épigénétique » et membre fondateur du COST « Cancer Stem Cell Resistance »*.

Alain Burger (auteur correspondant) est professeur à l'Université Nice Sophia Antipolis dans l'équipe « Molécules bioactives » et anime le groupe « Sondes fluorescentes »*.

* Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Université de Nice Sophia Antipolis, CNRS, Parc Valrose, F-06108 Nice Cedex 2.
Courriels : nicolas.barthes@me.com ; benoit.michel@unice.fr ; janah.shaya@unice.fr ; nadine.martinet@inserm.fr ; alain.burger@unice.fr