

# Comment déméthyle une cytosine ? Enlève-t-on un peu, beaucoup, encore plus, ou pas du tout ?

Chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN, modification majeure des génomes eucaryotes, est assurée par une CpG ADN méthyltransférase. Cette enzyme transfère un groupe méthyl de la S-Adénosyl méthionine vers les cytosines suivies d'une guanosine. La méthylation de l'ADN est généralement synonyme d'inactivité des gènes [1] : elle peut interférer avec la liaison entre les protéines activateurs et leur séquence d'ADN cible, permettre le recrutement de protéines réprimant la transcription (MeCP), ou encore favoriser, à la suite de ce recrutement, la formation de structures chromatinienne répressives. La méthylation de l'ADN est associée à de multiples processus biologiques, dont l'inactivation du chromosome X, l'empreinte parentale (*m/s* 1994, n°2, p. 216), le contrôle de l'expression génique au cours du développement, la limitation de l'expression et de la toxicité des séquences répétées [1]. L'hypométhylation globale du génome observée dans les tumeurs et l'hyperméthylation localisée de certains locus, particulièrement ceux qui correspondent à la localisation des gènes suppresseurs de tumeurs (*m/s* 1995, n°9, p. 1346) [2] suggèrent son implication en oncogénèse. Le dérèglement de la méthylation de l'ADN pourrait même jouer un rôle initiateur de la tumorigénèse, par l'instabilité génique qu'elle provoque [1]. Toutefois, si la méthylation d'une séquence contribue à l'absence d'expression de ce gène, elle ne peut l'expliquer à elle seule, ce qui avive les débats sur l'importance de son rôle. Il est en effet difficile d'établir une corrélation rigoureuse entre méthylation et activité génique, et de prouver que la première est la cause et non la conséquence de la seconde.

L'invalidation du gène codant pour l'ADN méthyltransférase 1 (Dnmt1) apporte un début de clarification.

Cette enzyme contrôle la plupart des réactions de méthylation du génome, particulièrement celles qui interviennent au cours de la réplication de l'ADN. En effet, les CpG sont méthylés sur les deux brins d'ADN, mais les cytosines introduites au cours de la réplication de l'ADN ne sont pas modifiées, ce qui conduit à une hémiméthylation de l'ADN (*figure 1A*). Dnmt1 est associée au complexe de réplication et agirait préférentiellement sur les cytosines du brin d'ADN néoformé, restaurant ainsi le profil de méthylation initial.

On connaît mal les enzymes impliquées dans les changements d'état de méthylation de certains gènes. Il peut s'agir de méthylation *de novo*, ou de déméthylation. La méthylation *de novo* pourrait être le fait, soit de Dnmt1, qui agirait alors sur des sites non méthylés,

soit d'autres enzymes [1]. Aucune enzyme responsable de cette réaction n'était jusqu'à présent clairement définie. Le clonage, par le groupe de Moshe Szyf d'un ADNc codant pour une protéine capable de déclencher la déméthylation représente donc une avancée décisive [3]. Cette protéine déméthyle l'ADN de la manière la plus simple qui soit, en enlevant le groupe méthyl de la base (*figure 1B*). Cela implique la rupture de la liaison entre le carbone 5 de la cytosine et celui du groupe méthyl. Or la survenue d'une telle rupture apparaissait très improbable dans des conditions physiologiques, parce que défavorable du point de vue thermodynamique.

L'effort s'était donc porté sur l'identification d'autres moyens de déméthyle l'ADN. Une possibilité, ou déméthylation « passive », qui semble

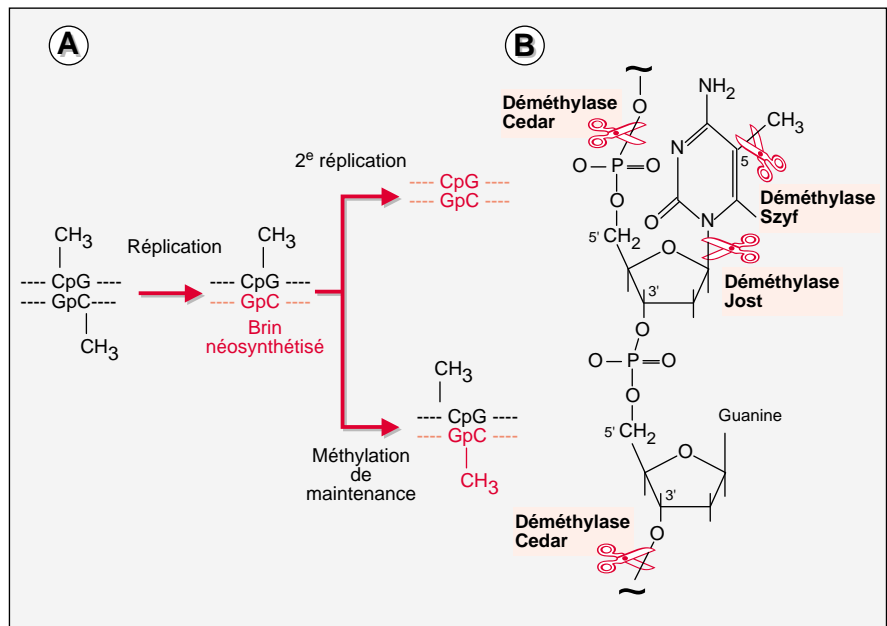


Figure 1. Les différentes manières de déméthyle l'ADN. A. Déméthylation passive. B. Déméthylation active.

effectivement avoir lieu dans quelques cas, consisterait simplement à ne pas ajouter de groupements méthyl au brin d'ADN après répllication en bloquant l'action de la méthylase de maintenance (*figure 1A*). Dans cette hypothèse, après deux cycles de répllication, la moitié des molécules d'ADN filles serait méthylée totalement. La déméthylation peut aussi survenir en dehors de la répllication. Le groupe de Jean-Pierre Jost a ainsi partiellement purifié une méthyl CpG glycosidase qui catalyse la rupture de la liaison N-glycosidique entre la 5-méthylcytosine et le désoxyribose [4] (*figure 1B*). Le sucre  $\alpha$ -basique serait ensuite éliminé et la molécule d'ADN reconstituée par l'action successive d'une endonucléase apurique/aprimidique, d'une désoxyribosephosphate diestérase puis d'une ADN polymérase et d'une ADN ligase comme dans certaines voies de réparation des dommages et erreurs de répllication de l'ADN [5]. La méthyl CpG glycosidase n'a pas encore été clonée et son rôle physiologique reste à démontrer. Le groupe d'Howard Cedar a, quant à lui, identifié une activité de déméthylation qui semble éliminer et remplacer un plus grand fragment d'ADN, puisque l'ensemble du dinucléotide CpG serait remplacé en une seule étape, en l'absence de nucléotides triphosphates, et donc sans qu'intervienne une ADN polymérase [6]. L'enzymologie de ce processus reste peu claire, et une partie des données corroborant les spéculations les plus audacieuses (un ribozyme aurait catalysé la réaction) étaient dues à des artéfacts [7]. Les autres données ont toutefois résisté jusque-là à la contradiction et cette voie de déméthylation reste envisageable, mais elle doit aussi être identifiée avec certitude. L'activité déméthylase décrite par le groupe de Moshe Szyf [3] se distingue de toutes les activités précédemment décrites car la déméthylation ne s'accompagne d'aucune modification du squelette de la molécule d'ADN. Par déduction, la cytosine méthylée ayant laissé la place à une cytosine non méthylée, la seule possibilité est que la liaison entre le carbone 5 et le groupe méthyl ait effectivement été rompue. Le groupe de M. Szyf suggère qu'une

réaction s'est produite entre la liaison carbone-carbone et de l'eau, résultant en la production d'une cytosine méthylée et de méthanol. L'eau étant en concentration beaucoup plus importante que la cytosine méthylée, il est concevable que la réaction soit favorable du point de vue thermodynamique. Malheureusement, les preuves expérimentales de cette hypothèse ne sont pas publiées.

Comment les auteurs ont-ils pu déboucher une activité aussi inattendue ? Leur idée de départ était fort simple et élégante : si une protéine déclenche la déméthylation d'un CpG méthylé, elle doit au préalable être capable de le reconnaître, et ce par l'intermédiaire d'un domaine d'interaction avec ce motif. De tels domaines d'interaction ont été identifiés dans les deux protéines impliquées dans la répression de la transcription par les CpG méthylés, les MeCP (*m/s 1997, n° 10, p. 1210*), et le groupe d'Adrian Bird a identifié plusieurs autres familles de protéines portant ces domaines [8]. L'ADNc isolé par le groupe de M. Szyf correspond à un membre de ces familles [3] sans que l'on sache si cet ADNc code pour la déméthylase. En effet, bien que le produit de l'ADNc ait été obtenu *in vitro* et purifié sur colonne d'affinité grâce à la présence d'une étiquette fusionnée à la protéine, on ne peut exclure que l'activité déméthylase soit associée à un contaminant provenant des systèmes d'expression utilisés. Cette possibilité ne peut être sous-estimée sachant que le produit de l'ADNc porte un domaine d'interaction protéine-protéine et fait partie d'un complexe de haut poids moléculaire [3]. Ainsi, la grande diversité des mécanismes de déméthylation n'est pas sans rappeler celle des mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN [9]. Dans les deux cas, les bases modifiées pourraient être soit enlevées, soit corrigées. La correction intervient directement sur l'ADN, soit après excision ponctuelle de la base, soit après excision d'un domaine plus étendu intéressant plusieurs nucléotides voisins [5]. La situation est probablement très complexe à étudier si on inclut la déméthylation passive parmi ces mécanismes actifs et que l'on tient compte de l'association de plusieurs mécanismes de déméthylation (par exemple, une voie

passive et une voie active permettant de déméthyliser complètement un CpG après un cycle de répllication), et/ou de plusieurs enzymes de méthylation. Toutefois, cette diversité permettrait la flexibilité nécessaire à une régulation fine de ces processus et ces possibilités sont probablement utilisées dans des contextes différents. Le clonage des protéines effectrices ouvre la voie à une meilleure compréhension du phénomène, mais il reste encore un long chemin à parcourir avant de pouvoir envisager une approche génétique de ces activités, permettant de clarifier leur importance physiologique relative, leur rôle dans la régulation transcriptionnelle ainsi que leur contribution à la tumorigénèse.

#### Remerciements

Nous remercions V. Colot et F. Pâques pour leur relecture du texte.

**Thierry Grange**  
**Hélène Thomassin**

*Institut Jacques-Monod, Cnrs, Universités Paris VI-VII, Tour 43, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France.*

1. Colot V, Rossignol JL. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays* 1999; 21: 402-11.
2. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-96.
3. Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397: 579-83.
4. Jost JP, Siegmund M, Sun L, Leung R. Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 1995; 270: 9734-9.
5. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA repair and mutagenesis*. Washington, DC: ASM Press, 1995.
6. Weiss A, Keshet I, Razin A, Cedar H. DNA demethylation *in vitro*: involvement of RNA. *Cell* 1996; 86: 709-18.
7. Swisher JF, Rand E, Cedar H, Marie Pyle A. Analysis of putative RNase sensitivity and protease insensitivity of demethylation activity in extracts from rat myoblasts. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5573-80.
8. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6538-47.
9. Alaoui-Jamali M, Sankar Mitra S. Les mécanismes de réparation de l'ADN: des cibles potentielles en pharmacologie du cancer. *Med Sci* 1996; 12: 766-73.