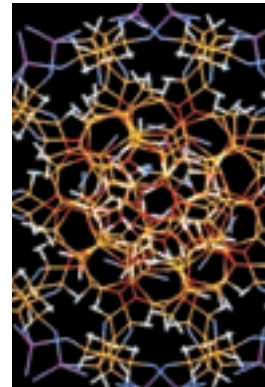


> Le terme « méthylation de l'ADN » désigne l'ajout, par des méthyl-transférases, de groupements méthyl sur des cytosines précédant un résidu Guanine (îlots CpG), et chez l'homme, cette marque épigénétique est classiquement associée à la répression transcriptionnelle. Mais la connaissance de la distribution générale de la méthylation dans le génome et la cartographie de ses promoteurs cibles, préalable indispensable à une meilleure compréhension de son rôle fonctionnel, restait mal connue. La mise au point de techniques d'analyse à large échelle des zones méthylées, notamment la mise au point d'une méthode d'immunoprécipitation des zones méthylées ensuite caractérisées par *microarray*, a confirmé la localisation sélective dans des zones circonscrites du génome, zones codantes, intergéniques et éléments répétés, reflétant probablement le rôle dans la protection de l'intégrité du génome, et son association sélective et permanente aux promoteurs de certains gènes clés (et non pas à l'ensemble des promoteurs inactifs) pour pérenniser une identité cellulaire donnée. Ces analyses ont aussi apporté des données nouvelles sur les altérations des profils de méthylation au cours de la tumorigenèse : déméthylation de certains promoteurs clés, dont des gènes suppresseurs de tumeurs, hypométhylations étendues, pouvant être à l'origine d'une déstabilisation des phénotypes cellulaires, caractéristique des cancers. À l'inverse, la méthylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs peut aussi contribuer à l'émergence tumorale. L'enjeu est maintenant de comprendre les mécanismes de ces anomalies de méthylation associées aux tumeurs, survenue aléatoire, réponse à une pression de l'environnement, ou conséquence directe d'un remaniement oncogénique. <

## Profils de méthylation de l'ADN dans les cellules normales et cancéreuses

Michaël Weber



Institut de Génétique Moléculaire,  
CNRS UMR 5535,  
1919, route de Mende,  
34293 Montpellier Cedex 5,  
France.  
[michael.weber@igmm.cnrs.fr](mailto:michael.weber@igmm.cnrs.fr)

### La méthylation de l'ADN entre dans l'ère « omics »

Le séquençage des génomes a apporté de nombreuses informations sur les processus qui régissent le développement et les pathologies. Cependant, il existe des mécanismes de régulation supplémentaires (dits épigénétiques) qui se surimposent à la séquence d'ADN et participent au développement normal et à la tumorigenèse [1]. Parmi ces marques épigénétiques, la méthylation de l'ADN est la seule qui affecte directement la molécule d'ADN. Chez les mammifères, cette modification touche les cytosines dans le contexte de dinucléotides CpG. Ces CpG ne sont pas répartis de manière égale dans le génome, mais sont enrichis dans les « îlots CpG » que l'on retrouve dans 60 % des promoteurs chez l'homme et la souris. La méthylation de l'ADN est une marque répressive, c'est-à-dire que la méthylation d'un îlot CpG est généralement incompatible avec l'activité transcriptionnelle. Elle a été impliquée dans des phénomènes tels que l'empreinte génomique parentale [2] (→), l'inactivation du chromosome X et la répression des éléments répétés du génome [3]. L'absence des enzymes de la famille des DNA méthyl-transférases (DNMT1, DNMT3a et DNMT3b) induit une mort précoce des embryons chez la souris, ce qui démontre que la méthylation de l'ADN est essentielle

(→) Voir l'article de A. Heinkel et R. Feil, page 747 de ce numéro

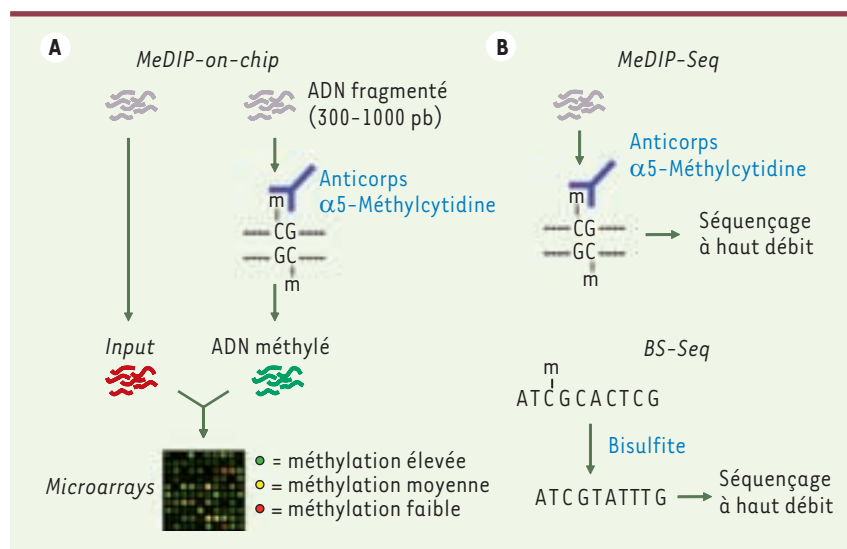
pour le développement chez les mammifères. Cependant son rôle dans la régulation du génome est encore mal compris et a fait l'objet de nombreux débats [4].

Ce manque de connaissances reflète en partie des limitations techniques pour identifier « en aveugle » les cibles de la méthylation. La méthode d'analyse classique est celle du séquençage après traitement au bisulfite, mais celle-ci est difficilement applicable à l'échelle du génome. C'est pourquoi de nombreux groupes ont tenté de développer de nouvelles méthodes d'analyse à grande échelle. Parmi ces méthodes, nous avons développé MeDIP (*methylated DNA immunoprecipitation*) dont le principe est que l'ADN est fragmenté par sonication puis immunoprécipité avec un anticorps qui reconnaît la 5-méthylcytidine [5]. Cette fraction méthylée peut ensuite être hybridée sur n'importe quel type de *microarray* (Figure 1A). D'autres méthodes existent qui isolent l'ADN méthylé avec des protéines MBD (*methyl-CpG binding domain*) ou des enzymes de restriction sensibles à la méthylation. À l'avenir, l'utilisation des technologies de séquençage à haut débit est également très prometteuse (Figure 1B). En particulier l'application du séquençage à haut débit après traitement au bisulfite permettrait d'identifier des profils de méthylation avec une résolution jusqu'au nucléotide. Cette approche a récemment été validée chez *Arabidopsis* [6] et devrait rapidement être adaptée aux génomes complexes de mammifères.

### Profils de méthylation de l'ADN dans les cellules normales

L'avènement de ces nouvelles technologies à grande échelle a permis d'élucider la distribution de la méthylation de l'ADN dans le génome humain. En accord avec les premières études effectuées sur certains locus, il a été montré que la majorité de la méthylation se trouve dans les régions codantes (exons, introns), intergéniques et les éléments répétés [5, 7]. La méthylation de l'ADN y joue un rôle de protection de l'intégrité du génome en inhibant l'activation d'éléments mobiles et en maintenant la stabilité du génome. Cependant, le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation des promoteurs, dont 60 % contiennent des îlots CpG, est encore obscur. Pour apporter des éléments

**Figure 1. Méthodes d'analyse de la méthylation de l'ADN à grande échelle.** (A) MeDIP (*methylated DNA immunoprecipitation*). L'ADN méthylé est immunoprécipité avec un anticorps anti-5-méthylcytidine, puis la fraction méthylée et l'ADN total sont marqués de différentes couleurs et le niveau de méthylation est mesuré par le rapport entre les signaux vert et rouge. (B) Futures applications des nouvelles technologies de séquençage à haut débit. Le séquençage de produits de MeDIP (MeDIP-Seq) permettra de rapidement générer des profils de méthylation sur tout le génome. De même le séquençage après traitement de l'ADN au bisulfite (qui convertit les C en T sauf si les C sont méthylés) (BS-Seq) permettrait de générer des profils de méthylation à la résolution du nucléotide.

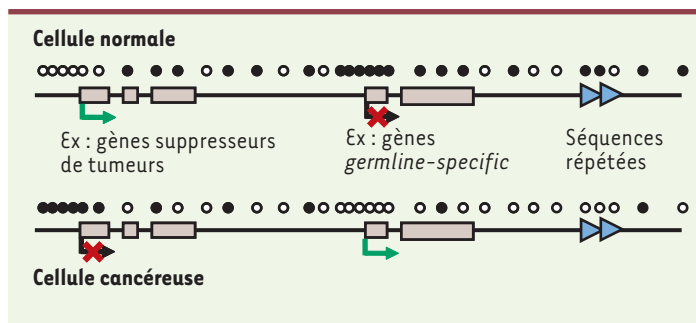


de réponse, nous avons utilisé MeDIP sur des fibroblastes humains primaires en combinaison avec des *microarrays* d'oligonucléotides à haute densité qui couvrent tous les promoteurs (plus de 24 000) du génome humain [8]. Nous avons comparé la méthylation avec l'activité des promoteurs, mesurée par la présence de l'ARN polymérase 2 sur les mêmes *microarrays*. Cette étude montre que la méthylation de l'ADN n'est pas un mécanisme de répression par défaut car la majorité des promoteurs restent non méthylés même lorsqu'ils sont inactifs. Seuls 5 % des îlots CpG sont méthylés dans les fibroblastes mais pas dans les cellules germinales, ce qui montre que la méthylation de l'ADN contribue à la régulation d'un nombre restreint de gènes au cours du développement. Parmi les îlots CpG méthylés dans les cellules somatiques, un grand nombre contrôle des gènes spécifiques des cellules germinales, ce qui suggère qu'une des fonctions de la méthylation de l'ADN est de réprimer le programme germinale (en particulier méiotique) dans les cellules somatiques (Figure 2). Ces résultats sont compatibles avec le modèle selon lequel la méthylation permet de réprimer certains gènes clés de manière permanente pour stabiliser les identités cellulaires.

### Perturbations des profils de méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses

À l'inverse des mutations génétiques, les marques épigénétiques sont réversibles et dynamiques, ce qui peut conduire à des dérégulations associées à certaines pathologies [9] (→). (→) Voir l'article de S. Laget et P.A. Defossez, page 725 de ce numéro

**Figure 2. Perturbations des profils de méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses.** La méthylation d'îlots CpG régulant des gènes suppresseurs de tumeurs est fréquente dans tous les types de cancer. À l'inverse, certains gènes (comme les gènes spécifiques des cellules germinales) peuvent être déméthylés et activés dans les cellules cancéreuses. Enfin, la déméthylation de certaines régions intergéniques et d'éléments répétés contribue à l'instabilité génomique et à la progression tumorale. Les boules représentent des CpG méthylés (noir) ou non méthylés (blanc).



Pour la tumorigenèse, il est maintenant établi que des perturbations des profils de méthylation de l'ADN jouent un rôle au moins aussi important que l'accumulation de mutations génétiques [10]. L'importance de la méthylation est illustrée par le fait que la surexpression, ou l'absence, des enzymes DNMT module l'apparition de tumeurs dans des modèles de cancer *in vivo* chez la souris [11]. Il y a d'une part des changements de méthylation localisés au niveau de certains promoteurs, en particulier l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par méthylation des îlots CpG, que l'on retrouve dans tous les types de cancers (Figure 2). À l'inverse, la déméthylation de certains promoteurs clés peut contribuer à déstabiliser les phénotypes cellulaires. Nos travaux suggèrent que cela pourrait être le cas notamment pour les gènes spécifiques des cellules germinales qui sont méthylés dans les cellules somatiques [8], et fréquemment réexprimés dans les cancers (ils constituent la famille des gènes *cancer-testis specific*) [12, 13] (→) (Figure 2).

(→) Voir l'article de S. Rousseaux et al., page 735 de ce numéro

Par ailleurs, les cellules cancéreuses présentent des changements de méthylation à plus grande échelle. En comparant les profils de méthylation dans des lignées de cancer du côlon et des cellules non transformées, nous avons identifié des régions de plusieurs mégabases hypométhylées dans les cellules cancéreuses [5]. De telles régions hypométhylées ont aussi été récemment observées dans les cellules de cancer du sein [14]. En plus de ces régions, les éléments répétés du génome sont également fréquemment hypométhylés dans les cellules cancéreuses [15]. Les conséquences de ces hypométhylations à grande échelle sont encore mal connues, mais il est probable qu'elles affectent la stabilité du génome et favorisent les recombinaisons.

### Quels mécanismes perturbent la méthylation de l'ADN ?

Une des enjeux majeurs est d'identifier les mécanismes qui induisent ces perturbations des profils de méthy-

lation associées à la tumorigenèse. Les scientifiques du domaine débattent notamment pour savoir si ces perturbations sont acquises par sélection d'événements aléatoires ou si elles sont dirigées par des oncogènes. Une étude récente favorise plutôt la seconde hypothèse. Cette étude suggère que l'oncogène *Ras* induit directement la méthylation de gènes cibles *via* le recrutement de plusieurs effecteurs épigénétiques [16]. Une autre piste de recherche très prometteuse est la possible influence de l'environnement sur les profils de méthylation. Par exemple, une étude récente montre qu'une exposition à de faibles doses de polluants (bisphénol A) au cours du développement peut induire des anomalies épigénétiques liées à une augmentation de la fréquence de certains cancers chez la souris [17].

### Conclusion

Nous sommes encore loin de comprendre comment les perturbations de l'épigénome participent à la tumorigenèse, et plusieurs questions importantes sont sans réponse. Combien de gènes sont méthylés anormalement dans les cellules cancéreuses ? Les perturbations épigénétiques sont-elles différentes selon le type de tumeur ? Quels sont les mécanismes qui perturbent l'épigénome ? Dans l'avenir, l'utilisation des nouvelles techniques d'analyse à grande échelle appliquées à des modèles de cancer permettra d'apporter de nouveaux éléments de réponse. ♦

### SUMMARY

#### Profiles of DNA methylation in normal and cancer cells

In eukaryotes, the epigenetic mark DNA methylation is found exclusively at cytosine residues in the CpG islands of genes, transposons and intergenic DNA. Among functional roles, DNA methylation is essential for mammalian embryonic development, and is classically thought to function by stably silencing promoter activity. However, until recently, understanding of the distribution of cytosine methylation in the whole genome - and hence, identification of its targets - was very limited. High-throughput methodologies, including methylated DNA immunoprecipitation, have recently revealed genome-wide mapping of DNA methylation, and provided new and unexpected data. Clearly DNA methylation is selectively associated with some key promoters - and is not a prerequisite for promoter inactivation, since strong CpG island promoters are mostly unmethylated, even when inactive. Most germline-specific genes are methylated and permanently silenced in somatic cells, suggesting a role of this mark

in maintaining somatic cellular identity. These large scale studies will also help understanding the deregulation of DNA methylation associated with cancer, among which unmethylation of germinal cells genes, and recent observation of large hypomethylated regions in tumoral specimens. The next challenge will be to understand if these methylation changes occur randomly, or more likely are specified by oncogenes or linked to environmental pressure. ♦

## RÉFÉRENCES

1. Morange M. Quelle place pour l'épigénétique ? *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 367-9.
2. Henckel A, Robert Feil R. Asymétrie des génomes parentaux : implications en pathologie. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 747-52.
3. Gabory A, Dandolo L. Épigénétique et développement : l'empreinte parentale. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 390-5.
4. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002 ; 16 : 6-21.
5. Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 853-62.
6. Cokus SJ, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 2008 ; 452 : 215-9.
7. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 2006 ; 38 : 1378-85.
8. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007 ; 39 : 457-66.
9. Laget S, Defossez PA. Le double jeu de l'épigénétique : cible et acteur du cancer. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 725-30.
10. Deltour S, Chopin V, Leprince D. Modifications épigénétiques et cancer. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 405-11.
11. Linhart HG, Lin H, Yamada Y, et al. Dnmt3b promotes tumorigenesis *in vivo* by gene-specific *de novo* methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 3110-22.
12. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 615-25.
13. Rousseaux S, Reynoird N, Gaucher J, Khochbin S. L'intrusion des régulateurs de l'épigénome mâle dans les cellules somatiques cancéreuses. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 735-41.
14. Shann YJ, Cheng C, Chiao CH, et al. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. *Genome Res* 2008 ; 18 : 791-801.
15. Rauch TA, Zhong X, Wu X, et al. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 252-7.
16. Gazin C, Wajapeyee N, Gobeil S, et al. An elaborate pathway required for Ras-mediated epigenetic silencing. *Nature* 2007 ; 449 : 1073-7.
17. Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 5624-32.

## TIRÉS À PART

M. Weber



**Laboratoires ALLERGAN**

Conférence de presse  
Vendredi 29 août 2008 - 17h45 - 19h00

« **PROGRESS Progression : une approche innovante de la progression du Glaucome en 2008** »

Club Med World  
Salon Phuket 39,  
cour Saint Emilion - 75012 Paris Bercy Village

Avec la participation des  
Professeur J.Ph. Nordmann (Paris)  
Professeur J.P. Renard (Paris)  
Docteur E. Sellem (Lyon)

Le nouveau programme de formation sur le glaucome PROGRESS PROGRESSION s'inscrit dans la même ligne que les programmes PROGRESS que propose Allergan

depuis 4 ans maintenant avec :

- PROGRESS 3D – Papille Optique
- PROGRESS CV – Champ Visuel
- PROGRESS 3G - Gonioscopie
- PROGRESS P3 – Synthèse des 3 modules avec des cas cliniques

Ce nouveau programme PROGRESS PROGRESSION propose une revue de détail sur une nouvelle manière d'évaluer la progression du glaucome sur des champs visuels.

