



HAL
open science

Étude pré-clinique d'une série d'acides 4-hydroxybenzoïques comme inhibiteurs de désacétylases d'histones

Carole Seidel

► **To cite this version:**

Carole Seidel. Étude pré-clinique d'une série d'acides 4-hydroxybenzoïques comme inhibiteurs de désacétylases d'histones. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0131 . tel-01750969

HAL Id: tel-01750969

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750969>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention: « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Carole SEIDEL

**Etude pré-clinique d'une série d'acides 4-hydroxybenzoïques
comme inhibiteurs de désacétylases d'histones**

Soutenue publiquement le 30 septembre 2014

Membres du jury

Rapporteurs:

M Slimane AIT-SI-ALI

Directeur de recherche, Université de Paris
Diderot, Paris

M Robert KISS

Professeur, Université Libre de Bruxelles,
Bruxelles

Examineurs:

M Mario DICATO

Professeur, Fondation de recherche « Cancer et
Sang », Luxembourg

M Antonello MAI

Professeur, Université La Sapienza, Rome

M Mohamed OUZZINE

Directeur de recherche, Université de Lorraine,
Nancy

M Wim VANDEN BERGHE

Directeur de recherche, Université de Anvers,
Wilrijk

M Michael SCHNEKENBURGER

Docteur, LBMCC, Luxembourg
Directeur de thèse

M Marc DIEDERICH

Professeur, LBMCC, Luxembourg
Directeur de thèse

**Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC)
Fondation de recherche « Cancer et Sang », Hôpital Kirchberg, Luxembourg**

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés

au « *Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer* »

à l'*Hôpital Kirchberg, Luxembourg*

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier:

du « *Télévie Luxembourg* » (*bourse de formation-recherche Télévie*)

de la *Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »,*

de l'*Association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »,*

de l'*Action Lions « Vaincre le Cancer »*

et

de l'*Association « Een Häerz fir kriibskrank Kanner*

(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) »

Remerciements

Dans ces quelques lignes je tenais à remercier toutes les personnes ayant participé, de près ou de loin, à ce travail et à son aboutissement.

Je remercie chaleureusement le Professeur Marc Diederich et le Docteur Michael Schnekenburger pour avoir co-encadré ma thèse.

Merci Marc de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire, pour les moyens mis à ma disposition pour en assurer la réussite ainsi que pour le suivi régulier de son avancé.

Merci Michael de m'avoir appris à développer un sujet de recherche, les techniques indispensables à sa réalisation et pour toutes ces discussions tant enrichissantes que quotidiennes qui m'ont permis d'avancer. Je te remercie pour tes encouragements et tes conseils mais surtout pour m'avoir appris à voler de mes propres ailes.

Merci au Professeur Mario Dicato, président de la Fondation Recherche Cancer et Sang, pour m'avoir permis de réaliser ce travail ainsi que de me faire l'honneur de participer au jury de soutenance.

Je tenais à remercier le Docteur Slimane Ait-Si-Ali et le Professeur Robert Kiss d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi que le Professeur Antonello Mai de participer à mon jury de thèse.

Merci aux Docteurs Mohamed Ouzzine et Wim Vanden Berghe de m'avoir suivie au travers des comités de thèse, d'avoir pris le temps de discuter et de m'avoir aiguillée dans l'avancée de mes recherches.

Je remercie le Télévie pour le financement ma thèse, sans quoi elle n'aurait pu aboutir.

Une longue réflexion à la manière d'écrire ces mots et pourtant une réponse si évidente, car que valent de longs textes, des pages entières noircies, dépourvues de points et de verbes, contenant tout au plus quelques rimes avec une absence presque indécente de vers, face à la simplicité d'un mot à seulement deux syllabes traduit dans toutes les langues et tous les langages, si courant qu'on en oublierait presque le sens originel, mais qui, écrit, avec tout le poids et la force des sentiments, impacterait probablement plus les personnes concernées, ces mêmes personnes impliquées tout au long de ce travail dans mon intégration dans le laboratoire, pour leur soutien quotidien, ou pas, en agrémentant de nombreuses conversations autour d'un traitement cellulaire, durant ces longues soirées à attendre la mort imminente des cellules ou pendant ces cafés aussi nombreux que les Western Blots, ces personnes avec qui les conversations ne pouvaient qu'être constructives mais aussi celles avec qui elles l'étaient moins, celles qui m'ont encouragées notamment au cours de ces fameux jeudredis, celles qui ont cru en moi, aussi loin soient elles, celles qui m'ont aidée à rester debout et m'ont donné du courage, ces personnes sans qui rien n'aurait été fait, rien n'aurait commencé et rien n'aurait abouti, toi qui, par ta seule présence, ne m'a jamais laissé baisser les bras, et qui a pu me supporter si longtemps tapi dans l'ombre de mes humeurs, celles qui m'ont motivées par la seule force de leur sourire, ces personnes proches et ces nouvelles rencontres, et c'est non sans espoirs que celles-ci, ayant à leur manière, participé à ce travail de près ou de loin, comprendront le poids de la signification de ce petit mot prononcé en un souffle: Merci.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Liste des illustrations	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des annexes	9
I. Introduction	10
I.1. Les modifications post-traductionnelles des protéines.....	10
I.2. Les histones et la régulation de la structure chromatinienne.....	14
I.3. L'acétylation des protéines	20
I.3.1. Les acétyl-transférases des histones	20
I.3.2. Les classes de désacétylases d'histones	24
I.3.3. Les mécanismes catalytiques de désacétylation	26
I.3.4. Les cibles cellulaires des désacétylases d'histones.....	29
I.3.5. L'isoenzyme HDAC6.....	33
I.4. Rôle des désacétylases d'histones au cours de la cancérogenèse	38
I.4.1. Epigénétique et cancer.....	38
I.4.2. Les inhibiteurs des désacétylases d'histones pour la thérapie anti-cancéreuse.....	42
I.4.2.1. La dérégulation cellulaire dans le cancer.....	42
I.4.2.2. Les inhibiteurs des désacétylases d'histones.....	46
I.4.2.3. Les acides 4-hydroxybenzoïques.....	57
II. Objectifs de l'étude	59
III. Matériel et méthodes.....	61
III.1. Lignées et culture cellulaire.....	61
III.2. Traitement des cellules	63
III.3. Test de viabilité et de prolifération cellulaire	63
III.4. Evaluation de l'apoptose par microscopie.....	63
III.5. Evaluation de la différenciation érythroïde par le test à la benzidine.....	64
III.6. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux	64
III.7. Analyse des phases mitotiques.....	64
III.8. Mesure de l'activité enzymatique désacétylase	65
III.9. Extractions protéiques.....	67
III.9.1. Extraction des protéines totales	67
III.9.2. Extraction acide des protéines	67
III.9.3. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires.....	67
III.9.4. Isolation des fractions solubles et insolubles.....	68
III.9.5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	68
III.10. Western Blot	68
III.11. Marquage intracellulaire	71
III.12. Analyse de l'expression génique	71
III.12.1. Extraction des ARN	71
III.12.2. Transcription inverse	72

III.12.3.	Amplification par PCR en temps réel	72
III.12.4.	Immunoprécipitation de la chromatine	72
III.13.	Analyses statistiques	76
IV.	Résultats.....	77
IV.1.	Inhibition <i>in vitro</i> de l'activité désacétylase d'isoenzymes de HDAC par les acides 4-hydroxybenzoïques	77
IV.2.	Etude <i>in cellulo</i> des acides 4-hydroxybenzoïques qui inhibent plusieurs HDAC	78
IV.2.1.	Effet des composés 13b, 13c et 6e sur l'acétylation de cibles protéiques des HDAC	78
IV.2.2.	Les composés 13b, 13c et 6e diminuent la prolifération cellulaires des K-562	81
IV.2.3.	Les acides 4-hydroxybenzoïques modulent le cycle cellulaire des cellules K-562	82
IV.2.4.	Effet cytotoxique des composés 13b, 13c et 6e.....	89
IV.2.4.1.	Les acides 4-hydroxybenzoïques induisent la mort cellulaire des cellules K-562	89
IV.2.4.2.	Caractérisation du type de mort cellulaire induit par les acides 4-hydroxybenzoïques	89
IV.2.5.	Les composés 13b, 13c et 6e diminuent la prolifération et la viabilité de différentes lignées cellulaires.....	96
IV.3.	Effet des composés inhibiteurs spécifiques de HDAC6	104
IV.3.1.	Effet des composés 13a et 7b sur la viabilité et la prolifération.....	104
IV.3.2.	Etude de la localisation cellulaire de HDAC6 dans différents modèles cancéreux	107
IV.3.3.	Les composés 13a et 7b induisent l'acétylation de la tubuline- α	109
IV.3.4.	Effet du composé 13a sur l'architecture des microtubules	114
IV.3.5.	Effet du composé 13a sur la progression du cycle cellulaire.....	117
IV.3.6.	Effet du composé 13a sur la mort cellulaire	117
IV.3.7.	Effet du composé 13a sur la fonction chaperonne de HSP90 α	123
IV.3.8.	Le composé 7b module l'architecture des microtubules.....	125
IV.3.9.	Le composé 7b affecte la prolifération et la viabilité des cellules K-562	128
IV.3.10.	Effet du composé 7b sur les protéines clientes de HSP90 α	131
V.	Discussion	132
V.1.	L'épigénétique ciblée pour la thérapie anti-cancéreuse	132
V.2.	Les inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC	134
V.2.1.	Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation des protéines	134
V.2.2.	Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la prolifération des cellules cancéreuses	135
V.2.3.	Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la viabilité des cellules cancéreuses	137
V.2.4.	Influence de la structure chimique sur le potentiel d'inhibition des HDAC	139

V.3. Les inhibiteurs spécifiques de HDAC6.....	140
V.3.1. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses	141
V.3.2. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire	141
V.3.3. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la mort cellulaire.....	142
V.3.4. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur le dynamisme des microtubules.....	143
V.3.5. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la fonction chaperonne de HSP90 α	144
V.3.6. Influence de la structure chimique dans la sélectivité des molécules pour l'inhibition spécifique de HDAC6.....	144
VI. Conclusions - Perspectives	145
VI.1. Perspectives avec les inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC.....	145
VI.2. Perspectives avec les inhibiteurs spécifiques de HDAC6	146
VII. Bibliographie	150
VIII. Annexes.....	167

Liste des abréviations

ACTR	<i>activator of thyroid and RA receptor</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNase	désoxyribonucléase
ADNc	ADN complémentaire
AIB1	<i>amplified in breast 1</i>
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
APAF1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ARD1	<i>arrest-defective-1 protein</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNase	ribonucléase
ARNm	ARN messenger
ASB	albumine de sérum bovin
ATAT1	<i>alpha tubulin acetyltransferase 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF-2	<i>activating transcription factor 2</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia-mutated</i>
ATP	adénosine triphosphate
BAD	<i>BCL-2-associated death promoter</i>
BAK	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcr-Abl	<i>breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIK	<i>BCL-2-interacting killer</i>
BIM	<i>BCL-2-like protein 11</i>
BMF	<i>BCL-2-modifying factor</i>
CAD	<i>caspase activated DNase</i>
CAK	<i>Cdk-activating kinase</i>
CARM1	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CBNPC	carcinome bronchique non à petites cellules
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CDC	<i>cell division cycle</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKN	<i>CDK inhibitor</i>
CDY	<i>chromodomain protein, Y-linked</i>
CDYL	<i>CDY like</i>
CENP-A	<i>centromere protein A</i>

CFIm	<i>cleavage factor Im</i>
ChIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i> - immunoprécipitation de la chromatine
Cip/Kip	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CoA	coenzyme A
Co-REST	<i>co-repressor of REST</i>
CR	<i>C3b/C4b receptor</i>
CREB	<i>c-AMP response element-binding protein</i>
CRM	<i>chromosome region maintenance</i>
CT	<i>cycle threshold</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DMSO	diméthylsulfoxyde
DNA-PK _{CS}	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i> - ADN méthyltransférase
DRO	dérivés réactifs de l'oxygène
DTT	dithiothréitol
EDTA	<i>ethylenediamine tetra acetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	récepteur de EGF
Elp3	<i>elongator complex protein 3</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCO	<i>establishment of cohesion N-acetyltransferase</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FcR	<i>Fc receptor</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	facteur de transcription
FOXO	<i>forkhead box</i>
Gcn5	<i>general control non-derepressible</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GNAT	<i>Gcn5 related N-acetyltransferase</i>
GRIP1	<i>glutamate receptor-interacting protein 1</i>
HAT	<i>histone acetyltransferase</i> - acétyl-transférase des histones
HBO1	<i>human acetylase binding to ORC1</i>
HDAC	<i>histone deacetylase</i> - désacétylase d'histones
HDACi	inhibiteur de HDAC
HDM	déméthylase d'histones
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
HMT	méthyl-transférase des histones
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>

HP1	<i>heterochromatin protein 1</i> - protéine d'hétérochromatine 1
HSF	<i>heat shock transcription factor</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
HUB	<i>HDAC6-, USP3- and Brap2-related zinc finger motif</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
iCAD	<i>inhibitor of CAD</i>
IGF-I	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP4	<i>insulin-like growth factor-binding protein 4</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IκB	<i>inhibitor of kappa B</i>
Ink4	<i>inhibitor kinase 4</i>
IP	iodure de propidium
LCoR	<i>ligand-dependent nuclear receptor corepressor</i>
LCT	lymphomes cutanés à cellules T
LLA	leucémie lymphoblastique aiguë
LLC-B	leucémie lymphoïde chronique B
LMA	leucémie myéloïde aiguë
LMC	leucémie myéloïde chronique
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBD	<i>methyl binding domain protein</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> - métalloprotéinase matricielle
MOZ	<i>monocytic leukemia zinc finger protein</i>
MORF	<i>MOZ-related factors</i>
M-PER [®]	<i>mammalian protein extracton reagent</i>
MRN	<i>MRE11-Rad50-Nbs1</i>
MTOC	<i>microtubule organizing center</i> - centre d'organisation des microtubules
MYST	<i>MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60</i>
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NAT10	N-acétyl-transférase 10
NES	<i>nuclear export signal</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
miR	micro-ARN
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NuRD	<i>nucleosome remodelling and deacetylating</i>
Oligo-dT	oligo-désoxythimidine
PAP	poly-(A)-polymérase
PARP	poly-ADP ribose polymérase

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCAF	<i>p300/CBP-associated factor</i>
pCIP	<i>p300/CBP co-integrator-associated protein</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGC-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKA	<i>protéine kinase A</i>
PLZF-RAR	<i>promyelocytic leukaemia zinc finger-RAR-α</i>
PML-RAR	<i>promyelocytic leukaemia-RAR-α</i>
Pol II	<i>ARN polymérase II</i>
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
pRB	<i>protéine du rétinoblastome</i>
Prx	<i>peroxirédoxine</i>
PSA	<i>prostate-specific antigen</i>
PTB	<i>phosphotyrosine-binding</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>
RA	<i>récepteur aux androgènes</i>
RAC	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAR	<i>récepteur de l'acide rétinoïque</i>
RE	<i>récepteur aux œstrogènes</i>
REST	<i>RE1-silencing transcription factor</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RUNX	<i>Runt-related transcription factor</i>
SAHA	<i>suberoylanilide hydroxamic acid - acide suberoylanilide hydroxamique</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
Sin3	<i>switch intensive 3</i>
SIR2	<i>silent information regulator 2</i>
SIRT	<i>sirtuine</i>
SMAD7	<i>mothers against decapentaplegic homolog 7</i>
SMRT/N-CoR	<i>silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid-hormone receptor/nuclear hormone receptor co-repressor</i>
SR	<i>serine/arginine rich</i>
SRC	<i>steroid receptor cofactor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SWI/SNF	<i>switch/sucrose non-fermentable</i>

TAFII250	<i>TBP-associated factor 250 kDa</i>
TAT	<i>tubulin acétyl-transferase</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TFIIIC	<i>transcription factor IIIC 220 kDa subunit</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIF-2	<i>transcriptional mediator/intermediary factor 2</i>
TIP60	<i>type 1 interacting protein</i>
tpm	tours par minute
TRAM-1	<i>translocation associated membrane protein 1</i>
TSA	trichostatine A
UPS	<i>ubiquitin-proteasom-system - système ubiquitine-protéasome</i>
UTR	<i>untranslated region - région non traduite</i>
VCP	<i>valosin-containing protein</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von-Hippel-Lindau

Liste des illustrations

Figure 1: Le compactage de l'information génétique.....	15
Figure 2: Les modifications post-traductionnelles des histones.....	16
Figure 3: La réaction d'acétylation / désacétylation des lysines.....	20
Figure 4: Les mécanismes de désacétylation des lysines catalysée par les HDAC.....	28
Figure 5: L'acétylome.....	30
Figure 6: Rôle du statut d'acétylation de la cortactine et de la tubuline- α	32
Figure 7: Structure protéique des isoformes humaines de HDAC6.....	33
Figure 8: Rôles cellulaires de HDAC6.....	36
Figure 9: Le cycle cellulaire.....	43
Figure 10: L'apoptose.....	45
Figure 11: Effet des inhibiteurs de HDAC sur les cellules cancéreuses.....	48
Figure 12: Structures d'inhibiteurs de HDAC.....	52
Figure 13: Structures chimiques d'acides 4-hydroxybenzoïques.....	58
Figure 14: Principe de la mesure de l'activité HDAC <i>in vitro</i>	66
Figure 15: Effet d'acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation de l'histone H4 et de la tubuline- α	79
Figure 16: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation de la tubuline- α ainsi que des histones H3 et H4.....	80
Figure 17: Effet des composés 13b, 13c et 6e sur la prolifération cellulaire.....	81
Figure 18: Effet des composés 13b, 13c et 6e sur la différenciation érythroïde des cellules K-562.....	82
Figure 19: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur le cycle cellulaire des K-562.....	83
Figure 20: Effet des composés 13b, 13c et 6e sur l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.....	87
Figure 21: Etude des cellules en mitose.....	88
Figure 22: Effet du traitement avec les composés 13b, 13c et 6e sur la viabilité des cellules K-562.....	89
Figure 23: Le traitement des cellules K-562 avec les acides 4-hydroxybenzoïques induit l'apoptose.....	90
Figure 24: L'apoptose induite par les acides 4-hydroxybenzoïques dépend des caspases 9, 7, 3 et 8 et de PARP.....	93
Figure 25: Le traitement des cellules K-562 par les acides 4-hydroxybenzoïques induit la protéine pro-apoptotique BIM.....	94
Figure 26: Les composés 13b, 13c et 6e n'affectent pas la viabilité et le statut d'acétylation dans les PBMC de donneurs sains.....	95
Figure 27: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la prolifération et la viabilité de différentes lignées cellulaires.....	102
Figure 28: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur les cellules MCF-7.....	103
Figure 29: Les composés 13a et 7b diminuent la prolifération et la viabilité de différentes lignées cancéreuses.....	105

Figure 30: Effet des composés 13a et 7b sur la viabilité de cellules saines et non cancéreuses.	106
Figure 31: Etude du niveau d'expression basal des protéines HDAC6, tubuline- α acétylée et totale ainsi que de la localisation cellulaire de HDAC6 dans différentes lignées cancéreuses.	109
Figure 32: Les composés 13a et 7b induisent l'acétylation de la tubuline- α	113
Figure 33: Le composé 13a modifie l'architecture des microtubules.	116
Figure 34: Effet du composé 13a sur le cycle cellulaire.	117
Figure 35: Le composé 13a induit la mort cellulaire.	118
Figure 36: Le composé 13a affecte la viabilité des cellules PC-3, LNCaP et K-562.	119
Figure 37: Le composé 13a induit la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules K-562.	121
Figure 38: Le traitement avec le composé 13a induit l'activation de BAX.	123
Figure 39: Le composé 13a diminue le taux protéique de Bcr-Abl et du RA.	124
Figure 40: Le composé 7b induit une hyperpolymérisation de la tubuline- α dans les cellules PC-3 et LNCaP.	126
Figure 41: Le composé 7b induit une augmentation de la tubuline- α polymérisée.	127
Figure 42: Effet du composé 7b sur le cycle cellulaire de la lignée K-562.	128
Figure 43: Le composé 7b induit la mort des cellules K-562.	129
Figure 44: Le composé 7b induit la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules K-562.	130
Figure 45: Effet du composé 7b sur les protéines clientes de HSP90 α	131
Figure 46: Mécanismes d'action des acides 4-hydroxybenzoïques dans les cellules cancéreuses.	149

Liste des tableaux

Tableau 1: Exemples de modifications post-traductionnelles des protéines.	11
Tableau 2: Implication des modifications d'histones dans les processus cellulaires. ...	17
Tableau 3: Exemples de protéines acétylées et des enzymes responsables de leur modification.	21
Tableau 4: Présentation des différents isoenzymes de HDAC.	24
Tableau 5: Surexpression des isoenzymes de HDAC dans le cancer.	40
Tableau 6: Liste des principaux inhibiteurs de HDAC.	49
Tableau 7: Caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses utilisées.	62
Tableau 8: Conditions utilisées pour la détection de l'activité enzymatique des isoenzymes des HDAC <i>in vitro</i>	66
Tableau 9: Conditions d'utilisation des anticorps pour les Western Blots.	69
Tableau 10: Conditions d'utilisation des anticorps pour le marquage intracellulaire. .	71
Tableau 11: Séquences des oligo-nucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR en temps réel.	74
Tableau 12: Solutions pour l'immunoprécipitation de la chromatine.	75
Tableau 13: Conditions d'utilisation des anticorps pour l'immunoprécipitation de la chromatine.	76
Tableau 14: Séquences des oligo-nucléotides utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.	76
Tableau 15: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'activité d'isoenzymes de HDAC.	78

Liste des annexes

Annexe A1: Liste des inhibiteurs de HDAC.....	167
Annexe A2: Molécules issues du criblage <i>in vitro</i> ayant une activité inhibitrice de l'activité HDAC totale	183
Annexe A3: Molécules issues du criblage <i>in vitro</i> ne possédant pas d'activité d'inhibition des HDAC.....	184
Annexe A4: Communications - Publications.....	187

I. Introduction

I.1. Les modifications post-traductionnelles des protéines

Les modifications post-traductionnelles des protéines sont des modifications chimiques covalentes qui sont ajoutées sur des acides aminés particuliers pendant et/ou après leur synthèse. Ces modifications régulent la fonction, la localisation cellulaire, l'interaction avec d'autres protéines ou la demi-vie des protéines ciblées. De nombreuses modifications post-traductionnelles ont été caractérisées dont les mieux décrites sont la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, l'hydroxylation et la glycosylation. Les rôles cellulaires de ces modifications sont présentés dans le Tableau 1 (Mann *et al.*, 2003).

La phosphorylation des protéines est réalisée par des kinases spécifiques qui catalysent l'ajout d'un groupement phosphate provenant de l'ATP sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine, et les phosphatases catalysent la réaction inverse. La phosphorylation touche environ 30% du protéome et induit une modification de la charge des protéines qui peut conduire à un changement conformationnel, une modification de l'interaction avec d'autres protéines ou leur ligand, un changement de leur localisation cellulaire et une activation ou une inhibition de leur activité enzymatique. Par exemple, une augmentation du taux d'AMPC en réponse à la stimulation d'un récepteur active la protéine kinase A (PKA) cytoplasmique dont le domaine catalytique va se relocaliser dans le noyau. Dans le noyau, la PKA peut alors phosphoryler CREB (c-AMP response element-binding protein) qui, ainsi activé, peut jouer son rôle de régulateur de la transcription de gènes en réponse à l'AMPC. Le récepteur à activité tyrosine kinase, activé par la fixation de son ligand, va s'auto-phosphoryler sur plusieurs résidus tyrosine. En fonction du résidu tyrosine, la phosphorylation va augmenter l'activité kinase du récepteur où elle servira de site de recrutement d'autres protéines. En effet, des protéines possédant des domaines SH2 (Src homology) ou PTB (phosphotyrosine-binding) reconnaîtront les résidus phosphotyrosine et seront recrutées par le récepteur. Certaines de ses protéines seront à leur tour phosphorylées par le récepteur créant ainsi de nouveaux sites d'ancrage pour des partenaires supplémentaires (Roach, 1991; Posada *et al.*, 1992).

Tableau 1: Exemples de modifications post-traductionnelles des protéines.

Les acides aminés sont désignés par leur code mono-lettre: A: alanine, D: acide aspartique, E: acide glutamique, K: lysine, H: histidine, M: méthionine, P: proline, R: arginine, S: sérine, T: thréonine, Y: tyrosine, W: tryptophane. Adapté de (Mann *et al.*, 2003).

Modification	Acides aminés	Rôles	Références
Acétylation	K	Stabilité des protéines Interactions protéine-ADN, protéine-protéine Localisation cellulaire Régulation de l'activité Métabolisme Expression des gènes, remodelage de la chromatine Réparation de l'ADN Maturation des ARN Organisation du cytosquelette	(Spange <i>et al.</i> , 2009)
Glycosylation	R, S, T, Y, W	Excrétion des protéines Reconnaissance cellule-cellule Voies de signalisation Régulation de la structure des protéines Réponse immunitaire	(Moremen <i>et al.</i> , 2012)
Hydroxylation	K, P	Stabilité du collagène Stabilité des protéines	(Ke <i>et al.</i> , 2006; Gorres <i>et al.</i> , 2010)
Méthylation	A, D, E, H, K, M, R	Interactions protéine-protéine Communication intercellulaire Localisation cellulaire Transduction du signal Expression des gènes Réparation de l'ADN	(Passos <i>et al.</i> , 2006)
Phosphorylation	S, T, Y	Régulation de l'activité enzymatique Modulation des interactions moléculaires Voies de signalisation Métabolisme Réplication et transcription de l'ADN Epissage et traduction des ARN Division cellulaire Apoptose Organisation du cytosquelette Activation des récepteurs membranaires et des canaux	(Hunter, 2000)
Ubiquitination	K	Signalisation Dégradation protéique Endocytose-internalisation des récepteurs membranaires Trafic intracellulaire des protéines Remodelage de la chromatine	(Marino-Ramirez <i>et al.</i> , 2005; Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2007)

Le statut de phosphorylation des protéines régule aussi la localisation cellulaire de nombreuses protéines telles que NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), STAT (signal transducer and activator of transcription), β -caténine, SMAD (mothers against decapentaplegic homolog) ou Notch. Le facteur NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I κ B (inhibitor of kappa B) qui masque le signal de localisation nucléaire (nuclear localization signal, NLS) de NF- κ B, l'empêchant ainsi d'être transporté dans le noyau. La phosphorylation de I κ B est un signal pour sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi NF- κ B qui peut se localiser dans le noyau et activer la transcription des gènes cibles. Les kinases CDK (cyclin dependent kinase) sont des protéines-clé de la régulation du cycle cellulaire. Leur activité est régulée par leur interaction avec les cyclines mais aussi par phosphorylation. La phosphorylation de la thréonine 160 de la CDK2 par la CAK (Cdk-activating kinase), par exemple, augmente son activité alors que la phosphorylation des thréonines 14 et 15 de cette même CDK inhibe son activité. La kinase Wee a été caractérisée comme une enzyme inhibant l'activité de la CDK ciblée. Par ailleurs, les phosphatases telles que celles de la famille CDC25 (cell division cycle 25 homolog) peuvent contrebalancer ce contrôle (Hunter, 2000; Lodish *et al.*, 2003).

La méthylation des protéines est impliquée notamment dans la communication intercellulaire, les interactions protéine-protéine, la localisation cellulaire, la transduction du signal, la régulation de l'expression des gènes ou la réparation de l'ADN. Par exemple, la méthylation de p300 par CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1) ou des histones H3 et H4 par cette même enzyme induit la transcription des gènes, la méthylation de la protéine hnRNPQ (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) est importante pour sa localisation cellulaire et son rôle dans la maturation des ARN. Les méthyl-transférases catalysent la réaction de transfert d'un groupement méthyle de la *S*-adénosyl-L-méthionine à la protéine cible (Passos *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2011).

L'ubiquitine est un polypeptide de 76 résidus dont 7 résidus lysines permettent aux ubiquitines de se conjuguer entre-elles pour former des chaînes. Selon les lysines mises en jeu dans ces interactions, la chaîne de polyubiquitine sera différente et aura une fonction différente. La formation d'une chaîne polyubiquitine par la lysine 63 est impliquée dans la signalisation cellulaire alors que la polyubiquitination d'une

protéine par la lysine 48 constitue un marqueur pour sa dégradation protéasomale. La dégradation par le protéasome permet de réguler la durée de vie des protéines mais également d'éliminer de la cellule les protéines mal repliées dont l'accumulation est toxique. L'ubiquitination des protéines peut également réguler des mécanismes comme l'endocytose, l'internalisation des récepteurs membranaires, le trafic des protéines et le remodelage de la chromatine (Hicke *et al.*, 2005; Mukhopadhyay *et al.*, 2007).

L'hydroxylation des prolines et des lysines est catalysée par des prolyl- ou lysyl-hydroxylases. L'hydroxylation de prolines du collagène joue un rôle important dans sa stabilisation à la température physiologique (Gorres *et al.*, 2010). Le facteur induit par l'hypoxie HIF (hypoxia inducible factor)-1 α est également soumis à une régulation par hydroxylation de deux prolines et une asparagine. Dans des conditions de normoxie, ces acides aminés sont hydroxylés permettant ainsi la reconnaissance par la protéine VHL (von Hippel-Lindau) ce qui conduit à la dégradation de HIF-1 α . En hypoxie, les hydrolases sont moins actives, HIF-1 α n'est plus dégradé et migre dans le noyau pour activer l'expression des gènes impliqués dans de nombreuses fonctions telles que l'angiogenèse, le métabolisme du glucose, l'apoptose ou la prolifération cellulaire [*e.g.* vascular endothelial growth factor (VEGF), lactate déshydrogénase, Nip3-like protein X, transforming growth factor (TGF)- α , (Ke *et al.*, 2006; Semenza, 2007)].

La glycosylation est réalisée sur les résidus asparagine, sérine et thréonine. Il existe différents types et mécanismes de glycosylation qui jouent notamment un rôle dans la régulation de la structure des protéines, la transduction du signal, les interactions cellule-cellule ainsi que la réponse immunitaire (Moremen *et al.*, 2012).

Comme la phosphorylation, l'acétylation joue un rôle majeur dans la régulation de nombreux processus cellulaires. L'acétylation touche les résidus lysine, et sera décrite plus en détails dans les parties suivantes (I.2., I.3.).

Tous les processus cellulaires sont régulés par les modifications post-traductionnelles des protéines grâce à leur diversité et au grand nombre de protéines modifiées. Ainsi, une perturbation de ces modifications peut avoir un impact important sur l'homéostasie cellulaire et tissulaire pouvant participer de ce fait au développement et à l'agressivité tumorale (Kolch *et al.*, 2010).

I.2. Les histones et la régulation de la structure chromatinienne

Les histones sont des protéines subissant de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces protéines sont associées à l'ADN permettant la condensation de l'information génétique en une structure organisée: la chromatine. L'unité fondamentale de la chromatine est appelée nucléosome. Le nucléosome est formé d'un complexe de huit histones (deux hétéro-tétramères de H2A, H2B, H3 et H4 ; « core histones ») et de 146 paires de bases d'ADN enroulées autour de ce cœur protéique. Chaque nucléosome est séparé de 10 à 60 paires de bases d'ADN. Cet assemblage est le premier état de compaction de l'ADN. Cette structure, d'un diamètre de 10 nm, est aussi appelée structure en « collier de perles ». Afin de maintenir l'ADN enroulé, deux histones H1 (linker histone) se lient à l'ADN au niveau du nucléosome. La liaison de l'histone H1 entre deux nucléosomes permet d'augmenter la compaction en une fibre de 30 nm. Enfin, une compaction supplémentaire, grâce à la participation des complexes protéiques et des mécanismes supplémentaires encore mal caractérisés, aboutit à l'hétérochromatine qui correspond à un état inactif, ou à l'euchromatine, moins dense, qui est associée aux gènes activement transcrits (Figure 1).

La compaction chromatinienne est un mécanisme dynamique régulé principalement par les modifications post-traductionnelles de l'extrémité N-terminale des histones, la méthylation de l'ADN et les complexes protéiques qui interagissent avec ces modifications (par exemple les complexes Polycomb ou les complexes de remodelage de la chromatine). Les modifications d'histones et la méthylation de l'ADN font partie des mécanismes épigénétiques de la régulation de l'expression des gènes ; c'est-à-dire la modification de l'expression génique, héritable, sans altération de la séquence nucléotidique. Les mécanismes épigénétiques contrôlent, entre autres, la condensation de la chromatine et, de ce fait, limitent ou autorisent l'accessibilité de l'ADN à différents facteurs. Ainsi, plusieurs mécanismes tels que la transcription, l'épissage des pré-ARN messagers, la réparation et la réplication de l'ADN sont régulés (Lodish *et al.*, 2003).

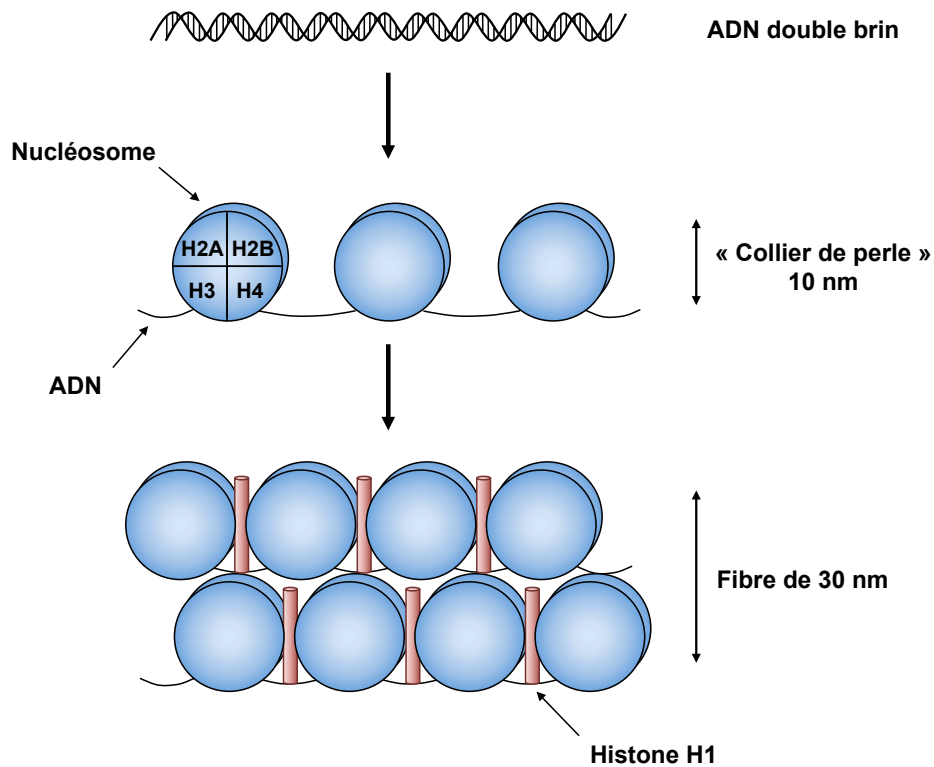


Figure 1: Le compactage de l'information génétique.

La double hélice d'ADN est enroulée autour d'hétéro-octamères d'histones (H2A, H2B, H3 et H4), formant ainsi les nucléosomes et aboutissant à une structure dite en « collier de perles ». Une étape de compaction supplémentaire forme la fibre de 30 nm grâce à l'intervention de l'histone H1 [Adapté de (Lodish *et al.*, 2003)].

L'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones agit de manière séquentielle ou en combinaison pour former le code des histones, qui peut être lu par d'autres protéines pour réguler la condensation de la chromatine et l'expression génique. Depuis la première fois que cette hypothèse a été émise, de grands efforts ont été portés sur le déchiffrement et la compréhension de ce code et sur les événements qu'il contrôle. Les histones subissent un nombre important de modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination, l'ADP-ribosylation, la citrullination, la phosphorylation, la méthylation et l'acétylation (Figure 2). Parmi ces modifications, la méthylation et l'acétylation sont les modifications les mieux décrites à ce jour (Minucci *et al.*, 2006; Choudhary *et al.*, 2009). Ces modifications sont essentiellement localisées sur la région N-terminale des histones, appelée « histone tail », bien qu'un nombre important d'acides aminés situés dans le domaine central des histones subissent également des modifications.

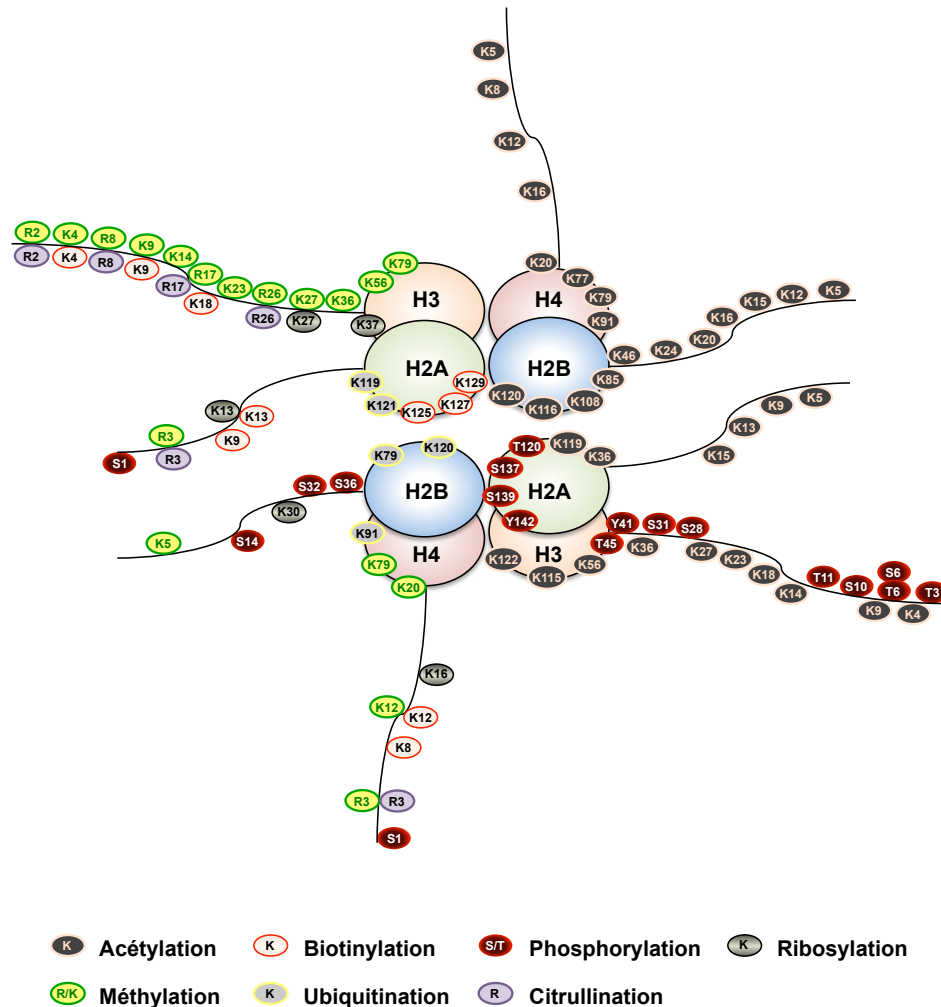


Figure 2: Les modifications post-traductionnelles des histones.

Des lysines (K), sérines (S), thréonines (T) et arginines (R) en différentes positions sur les histones sont les cibles de modifications post-traductionnelles. La position de chaque acide aminé ciblé est indiquée par les nombres. L'association de ces différentes modifications forme le code des histones qui participe au recrutement de facteurs modulant la structure et donc l'état transcriptionnel de la chromatine.

L'hyperacétylation des histones est généralement associée à une chromatine moins condensée (euchromatine) et par conséquent à une activation de la transcription (acétylation de H4K8, H4K16, H3K14...). Cependant, l'acétylation des histones est aussi impliquée dans la déposition des histones au cours de la réplication, le recrutement des histones au niveau de nouveaux nucléosomes (acétylation de H3K9 ou H4K12), ou la réparation de l'ADN ainsi que la perturbation de la formation de la fibre de 30 nm (acétylation de H4K16, H3K14, H3K18). La combinaison de l'acétylation de lysines avec d'autres modifications post-traductionnelles, telles que la méthylation ou la phosphorylation, est associée à des fonctions biologiques particulières (Tableau 2).

Tableau 2: Implication des modifications d'histones dans les processus cellulaires.

Les histones sont désignées par leur abréviation H2A, H2B, H3 et H4 et les acides aminés par leur code mono-lettre (K: lysine, R: arginine, S: sérine, T: thréonine). Adapté de (Mann *et al.*, 2003).

Processus cellulaires	Modifications			
	Acétylation	Méthylation	Phosphorylation	Ubiquitination
Activation de la transcription	H2AK5 H2BK5, K12, K15, K20 H3K4, K9, K14, K18, K23, K27 H4K5, K8, K12, K16	H3K4, R17 H4R3	H3S10	
Apoptose			H2BS14	
Déposition des histones	H3K9 H4K5, K12			
Elongation de la transcription		H3K4, K36, K79		
Empreinte parentale		H3K9		
Inactivation du chromosome X		H3K27		
Mitose			H2AS1 H3T3, S10, T11, S28 H4S1	
Réparation de l'ADN	H3K14, K18, K23 H4K5, K8, K12, K16	H3K36	H2AS1	
Réplication de l'ADN	H3K18			
Silence télomérique	H4K12, K16	H3K4		
Silence transcriptionnel		H3K9, K27 H4K20		
Spermatogenèse				H2BK120

Par exemple, la combinaison de H4K8 et H3K14 acétylées avec H3S10 phosphorylée est associée à l'activation transcriptionnelle. Certaines modifications vont promouvoir ou inhiber les modifications sur d'autres sites de la même histone. La méthylation de la lysine H3K9 inhibe l'acétylation de H3K14, H3K18 et H3K23 alors que la méthylation de H3K4, ou la méthylation de H4R3 stimule l'acétylation de H4K8 et H4K12. De plus, les lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées et les arginines peuvent être mono- ou di-méthylées induisant des effets différents. La di-méthylation de H3K4 peut être associée à des régions actives et inactives alors que sa tri-méthylation est toujours associée à des régions de transcription active (Fischle *et al.*, 2003). La tri-méthylation de H3K9 est corrélée à la répression transcriptionnelle alors que sa mono- et di-méthylation est associée à l'euchromatine (Fischle *et al.*, 2003). Enfin, certaines modifications sont mutuellement exclusives, c'est le cas notamment de la méthylation de H4K20 et de l'acétylation de H4K16 (Nishioka *et al.*, 2002).

La modification des histones est également régulée par la modification d'autres histones présentes dans le même nucléosome, c'est l'effet en *cis*, ou dans un nucléosome voisin, c'est l'effet en *trans*. En effet, l'H3K4 méthylée entraîne l'acétylation des histones H3 et H4 dans le même nucléosome. Par contre, si H3K9 est méthylée, l'acétylation des histones H3 et H4 de ce nucléosome sera inhibée. Afin de répandre l'état d'hétérochromatine le long du chromosome, l'apposition de la méthylation de H3K9 par des méthyl-transférases des histones (HMT), comme SUV39H, dites "writer", est lue par des complexes ("reader") tels que les protéines d'hétérochromatine 1 (HP1), contenant un chromodomaine pour la reconnaissance de H3K9 méthylée et un domaine méthylase pour l'apposition de la marque sur le nucléosome voisin (Wang *et al.*, 2001; Fischle *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007a; Al-Sady *et al.*, 2013).

La structure et les fonctions de la chromatine sont aussi régulées par la présence de variants d'histones. C'est le cas notamment du variant H3.3 qui remplace l'histone H3 canonique au cours de la transcription induisant ainsi la propagation de l'état actif de la chromatine (Chow *et al.*, 2005). Le variant H2A.Z est associé aux éléments isolateurs (insulating elements) qui démarquent les domaines chromosomiques régulant de cette manière la propagation des marques d'hétérochromatine (Meneghini *et al.*, 2003). Le variant macro-H2A joue un rôle dans l'inactivation du chromosome X. Le variant CENP-A (centromere protein A) de

l'histone H3, spécifique des centromères, est essentiel pour l'assemblage des kinétochores pendant la mitose (Jansen *et al.*, 2007).

Par ailleurs, l'histone H3 est la seule à posséder une cystéine C110 impliquée dans la formation d'un pont disulfure entre deux histones H3 au sein du nucléosome. La formation de ce pont rigidifie la conformation du nucléosome, le maintenant ainsi dans une forme fermée associée à la répression transcriptionnelle. La forme réduite permet une conformation du nucléosome plus relâchée associée à des régions de transcription active (Prior *et al.*, 1983; Peterson *et al.*, 2004).

Contrairement au code génétique pour lequel il est établi que chaque combinaison de paires de bases est associée à un signal spécifique indépendamment de sa localisation sur le génome, le code des histones est moins rigide. En effet, une modification particulière peut être interprétée différemment par les facteurs cellulaires et par conséquent associée à une conséquence biologique différente suivant sa localisation génomique ou le contexte cellulaire (Peterson *et al.*, 2004).

Le code des histones est lu par de nombreux facteurs cellulaires tels que des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ou des protéines Polycomb, qui peuvent reconnaître la modification d'un site spécifique. La régulation locale, par exemple sur un promoteur particulier, de la structure de la chromatine et par conséquent de l'expression génique s'effectue par le recrutement des enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones ainsi que des complexes impliqués dans la structure de la chromatine. Par exemple, des facteurs de transcription peuvent recruter des HMT ou des acétyl-transférases des histones (HAT) sur des sites spécifiques afin d'induire respectivement la méthylation ou l'acétylation des histones. La régulation de la structure chromatinienne peut s'effectuer sur certains domaines du génome, comme les centromères, où la condensation de l'ADN est confinée grâce à la présence d'éléments isolateurs qui préviennent la diffusion des marques répressives au-delà du domaine. Enfin, l'exemple le mieux décrit d'une régulation globale de la structure de la chromatine est celui du chromosome X. Le recouvrement du chromosome X par le long ARN non codant Xist ainsi que la méthylation de H3K9 permettent la condensation de la chromatine. Cet état inactif est maintenu par d'autres marques répressives telles que l'hypoacétylation des histones et l'incorporation du variant macro-H2A (Fischle *et al.*, 2003).

I.3. L'acétylation des protéines

L'acétylation de l'azote ϵ des résidus lysines tant des protéines nucléaires (dont les histones) que des protéines cytoplasmiques est catalysée par les HAT. Leur désacétylation est catalysée par les désacétylases d'histones (HDAC, Figure 3).

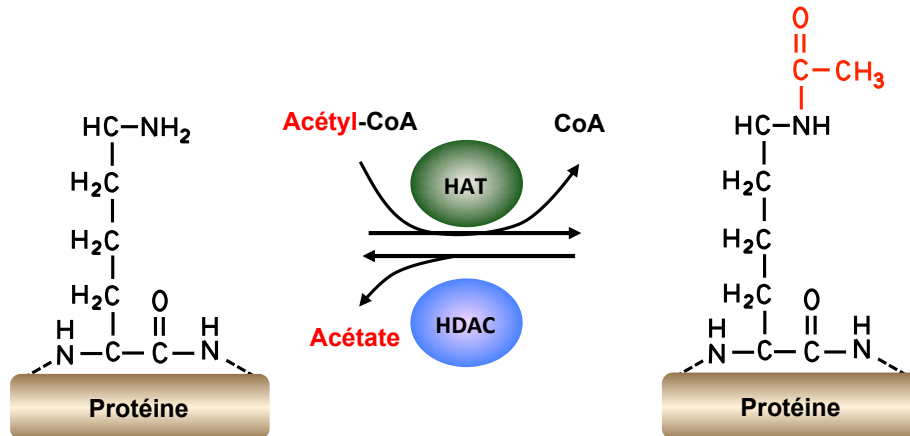


Figure 3: La réaction d'acétylation / désacétylation des lysines.

La réaction d'acétylation est catalysée par les acétyl-transférases des histones (HAT), utilisant l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) comme donneur de groupement acétyle, au niveau de l'azote ϵ des lysines. La réaction inverse est catalysée par les désacétylases d'histones (HDAC).

I.3.1. Les acétyl-transférases des histones

Chez les mammifères, les HAT sont classées en deux groupes selon leur localisation cellulaire: le groupe de type A est principalement nucléaire alors que le groupe de type B est essentiellement cytoplasmique. Une classification selon la similarité de séquence est compromise par le peu de similarité entre ces enzymes. Néanmoins, certaines enzymes ont été regroupées, selon leur similarité de séquence et leur fonction, dans les familles GNAT [Gcn5 related *N*-acetyltransferases), p300/CBP (CREB binding protein), MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60), TAFII250 [TBP (TATA box binding protein)-associated factor 250 kDa] et SRC (steroid receptor cofactor, (Marmorstein *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2001)]. Certains substrats des HAT sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3: Exemples de protéines acétylées et des enzymes responsables de leur modification.

Fonctions cellulaires	Substrats	Enzymes (références)	
		HDAC	HAT
Facteurs de transcription	β -caténine	HDAC6 (Li <i>et al.</i> , 2008b)	PCAF (Ge <i>et al.</i> , 2009)
	E2F-1, -2, -3	HDAC1 (Marzio <i>et al.</i> , 2000)	PCAF, p300/CBP (Martinez-Balbas <i>et al.</i> , 2000)
	HIF-1 α	HDAC1, 7 (Yoo <i>et al.</i> , 2006)	ARD1 (Jeong <i>et al.</i> , 2002)
	p53	HDAC1, 3, SIRT1, 2, 3, 7 (Luo <i>et al.</i> , 2001)	p300/CBP, TIP60, familles PCAF et GCN5 (Liu <i>et al.</i> , 1999; Barlev <i>et al.</i> , 2001; Tang <i>et al.</i> , 2006)
	RA	HDAC1, SIRT1 (Gaughan <i>et al.</i> , 2002)	CBP/p300, TIP60 (Fu <i>et al.</i> , 2000; Gaughan <i>et al.</i> , 2002)
Métabolisme mitochondrial	Complexe I, acétyl-CoA synthétase 2	SIRT3 (Schwer <i>et al.</i> , 2006; Ahn <i>et al.</i> , 2008)	GCN5L1 (Scott <i>et al.</i> , 2012)
	Cytochrome c	SIRT5 (Nakagawa <i>et al.</i> , 2009)	ND
	Glutamate déshydrogénase	SIRT4 (Haigis <i>et al.</i> , 2006)	ND
Migration et division cellulaire	Aurora B	HDAC3 (Fadri-Moskwik <i>et al.</i> , 2012)	ND
	Cortactine	HDAC6, SIRT1 (Zhang <i>et al.</i> , 2009; Kaluza <i>et al.</i> , 2011)	p300 (Zhang <i>et al.</i> , 2009)
	HDAC6	ND	p300 (Han <i>et al.</i> , 2009)
	Tubuline- α	HDAC6, SIRT2 (Hubbert <i>et al.</i> , 2002)	ELP3, ARD1, NAT10, Gen5, MEC17 (Perdiz <i>et al.</i> , 2011)
Réparation de l'ADN	ATM	SIRT1 (Dobbin <i>et al.</i> , 2013)	TIP60 (Sun <i>et al.</i> , 2005)
	Ku70	SIRT1, 3, HDAC6 (Subramanian <i>et al.</i> , 2011)	CBP, PCAF (Cohen <i>et al.</i> , 2004)
Signalisation cellulaire	14-3-3	SIRT2 (Andersen <i>et al.</i> , 2011)	ND
	SMAD7	HDAC1, 2, 3, 5, 6 (Simonsson <i>et al.</i> , 2005)	p300 (Gronroos <i>et al.</i> , 2002)
	TNF- α	SIRT6	ND

(Kelly, 2010)			
Stabilité des protéines	GRP78	HDAC6 (Rao <i>et al.</i> , 2010)	ND
	HSP70	HDAC6, 8 (Rao <i>et al.</i> , 2008)	p300 (Yang <i>et al.</i> , 2013b)
	HSP90	HDAC3, 6 (Bali <i>et al.</i> , 2005)	ND
	TRIM50	HDAC6 (Fusco <i>et al.</i> , 2014)	p300, PCAF (Fusco <i>et al.</i> , 2014)
Structure chromatinienne	DNMT1	HDAC1, SIRT1 (Peng <i>et al.</i> , 2011)	TIP60 (Du <i>et al.</i> , 2010)
	HDAC1	SIRT1 (Dobbin <i>et al.</i> , 2013)	p300 (Qiu <i>et al.</i> , 2006)
	HDAC2	HDAC5 (Eom <i>et al.</i> , 2014)	CBP (Eom <i>et al.</i> , 2014)
	Histones	HDAC1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, SIRT1, 2, 6 (Tong, 2002)	Gen5, PCAF, TIP60, MOZ, MORF, TAF250, CBP/p300, HAT1, ATF-2, TRAM-1 (Peterson <i>et al.</i> , 2004)
	p300	SIRT1, 2 (Black <i>et al.</i> , 2008)	p300 (Black <i>et al.</i> , 2008)
Transcription / maturation des ARN	ARN polymérase I	SIRT7 (Chen <i>et al.</i> , 2013b)	CBP (Chen <i>et al.</i> , 2013b)
	ARN polymérase II	ND	p300 (Schroder <i>et al.</i> , 2013)
	CFIm-25	SIRT1, 2, HDAC1, 3, 10 (Shimazu <i>et al.</i> , 2007)	CBP (Shimazu <i>et al.</i> , 2007)
	PAP	HDAC1, 3, 10, SIRT1, 2 (Shimazu <i>et al.</i> , 2007)	CBP (Shimazu <i>et al.</i> , 2007)
	Protéine SRSF2	HDAC6 (Heyd <i>et al.</i> , 2011)	TIP60 (Heyd <i>et al.</i> , 2011)
Transport nucléo-cytoplasmique	Importine- α	ND	p300, CBP (Bannister <i>et al.</i> , 2000)

ATF-2: activating transcription factor 2, ATM: Ataxia-telangiectasia-mutated, CBP: CREB binding protein, CoA: Co-enzyme A, CFIm: cleavage factor Im, DNMT1: ADN méthyltransférase 1, Elp3: elongator complex protein 3, Gcn5: general control non-derepressible, HAT: acétyl-transférase des histones, HDAC: désacétylase d'histone, HIF: hypoxia-inducible factor, HSP: heat shock protein, NAT10: N-acétyl-transférase 10, ND: non déterminé, PAP: poly(A) polymérase, RA: récepteur aux androgènes, SIRT: Sirtuine, SMAD: mothers against decapentaplegic homolog, SR: serine/arginine-rich, TIP60: type 1 interacting protein, TRAM-1: translocation associated membrane protein 1. Adapté de (Singh *et al.*, 2010).

La famille GNAT contient KAT2A (GCN5, general control non-derepressible), KAT2B (PCAF, p300/CBP-associated factor), KAT1 (HAT1, histone acetyltransferase 1), Elp3 (elongator complex protein 3), ESCO1 et 2 (establishment of cohesion *N*-acetyltransferase), CDYL1, 2A, 2B (chromodomain protein, Y-linked), CDYL et L2 (chromodomain protein Y-like), NAT10 (*N*-acétyl-transférase 10) ainsi que TFIIC (transcription factor IIC). Ces enzymes sont impliquées dans la déposition des histones sur les chaînes d'ADN naissants au cours de la réplication grâce à l'acétylation ainsi que l'import nucléaire des histones nouvellement synthétisées (Burgess *et al.*, 2010). Cette classe d'enzyme est également impliquée dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Yang *et al.*, 2013a). PCAF possède, en plus de son activité acétyl-transférase, une activité E3 ubiquitine-ligase impliquée indirectement dans la stabilité de la protéine p53 (Linares *et al.*, 2007). Les enzymes Elp3 et HAT1 sont impliquées respectivement dans l'élongation de la transcription et la déposition des histones (Hawkes *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2010). NAT10 ou ARD1 stimule la transcription de hTERT (human telomerase reverse transcriptase) ce qui engendre une augmentation de l'activité télomérase. Elle participe aussi à la reformation de l'enveloppe nucléaire à la fin de la mitose et acétyle des protéines non-histoniques telles que la tubuline- α et HIF-1 α (Lv *et al.*, 2003).

La famille p300/CBP contient deux membres, p300 et CBP qui possèdent un bromodomaine. p300 possède également une activité E4 ubiquitine-ligase (Kimura *et al.*, 2005).

Les membres de la famille MYST: Esa1, TIP60 (type 1 interacting protein), TAF250, sont impliqués dans des complexes tels que HBO1 (human acetylase binding to ORC1) et MOZ/MORF [monocytic leukemia zinc finger protein/MOZ-related factors, (Lee *et al.*, 2007)].

La famille SRC comprend les enzymes SRC-1, TRAM-1 (translocation associated membrane protein 1)/ACTR (activator of thyroid and retinoic acid receptor)/AIB1 (amplified in breast 1)/pCIP (p300/CBP co-integrator-associated protein)/RAC3 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate), SRC-3, TIF-2 (transcriptional mediators/intermediary factor 2), GRIP1 (glutamate receptor-interacting protein 1) et ATF-2 (activating transcription factor 2).

D'autres enzymes ne sont pas classifiées dans une famille telle que ATAT1 (alpha tubulin acetyltransferase 1) responsable de l'acétylation de la tubuline- α (Friedmann *et al.*, 2012).

I.3.2. Les classes de désacétylases d'histones

Chez les mammifères, les HDAC sont au nombre de 18 et sont divisées en quatre classes selon leur identité de séquence et leur activité catalytique (Tableau 4). En effet, les classes I, II et IV sont des enzymes possédant au fond de leur poche catalytique un ion zinc indispensable à la réaction de désacétylation, alors que les enzymes de la classe III ne possèdent pas cet ion mais leur activité dépend du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺).

Tableau 4: Présentation des différents isoenzymes de HDAC.

Adapté de (Singh *et al.*, 2010).

Classe	HDAC		Localisation chromosomique
	Membre	Localisation cellulaire	
I	HDAC1	Noyau	1p34
	HDAC2	Noyau	6q21
	HDAC3	Noyau	5q31
	HDAC8	Principalement dans le noyau	Xq13
IIa	HDAC4	Trafic nucléo-cytoplasmique	2q37.3
	HDAC5	Trafic nucléo-cytoplasmique	17q21
	HDAC7	Trafic nucléo-cytoplasmique	12q13.1
	HDAC9	Noyau	7p21.1
IIb	HDAC6	Principalement dans le cytoplasme	Xp11.23
	HDAC10	Noyau et cytoplasme	22q13.31
III	SIRT1	Principalement dans le noyau	10q21.3
	SIRT2	Noyau et cytoplasme	19q13
	SIRT3**	Mitochondrie	11p15.5
	SIRT4*	Mitochondrie	12q
	SIRT5	Mitochondrie	6p23
	SIRT6**	Noyau	19p13.3
	SIRT7	Principalement dans le noyau	17q25
IV	HDAC11	Noyau	3p25.1

*SIRT4 est une ADP-ribosyl-transférase et ne possède pas l'activité de désacétylase. **SIRT3 et 6 possèdent en plus de leur activité de désacétylase, l'activité de ADP-ribosyl-transférase.

La classe I comprend les HDAC1, 2, 3 et 8 qui sont localisées principalement dans le noyau (de Ruijter *et al.*, 2003). HDAC3 forme une exception à cette classe car elle possède, en plus du NLS présent dans toutes les HDAC de cette classe, un signal d'export nucléaire (nuclear export signal, NES) suggérant une possible localisation cytoplasmique. L'activité de ces enzymes est maximale lorsqu'elles sont en complexe avec la chromatine et des protéines modulant leur activité, comme les protéines Sin3

(switch intensive 3), NuRD (nucleosome remodelling and deacetylating) et Co-REST [co-repressor of RE1-silencing transcription factor, (Zhang *et al.*, 1999)].

La classe II est divisée en deux sous-classes: la sous-classe IIa comprenant les HDAC4, 5, 7 et 9, et la sous-classe IIb constituée de HDAC6 et 10. HDAC9 est exclusivement localisée dans le noyau alors que les HDAC4, 5 et 7 possèdent un NLS ainsi qu'un NES. Ces trois dernières sont ainsi localisées tant dans le noyau que dans le cytoplasme. L'activité catalytique de la sous-classe IIa est très faible et n'est quasiment pas détectable *in vitro*. De plus, ces enzymes sont souvent en complexe avec d'autres HDAC, suggérant un rôle différent de celui de désacétylase (Lahm *et al.*, 2007). Par exemple, HDAC4 permet le recrutement du complexe SMRT/N-CoR-HDAC3 (silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid-hormone receptor/nuclear hormone receptor co-repressor) sur des promoteurs spécifiques induisant ainsi leur répression transcriptionnelle (Fischle *et al.*, 2002). HDAC6 est principalement localisée dans le cytoplasme où elle est impliquée dans la désacétylation de la tubuline- α et de la protéine chaperonne HSP90 α (heat shock protein) lui permettant de lier et de stabiliser ses protéines clientes (Bali *et al.*, 2005). Cette HDAC possède deux domaines catalytiques fonctionnels arrangés en tandem et un domaine HUB (HDAC6-, USP3- and Brap2-related zinc finger motif) non présent dans les autres HDAC. Ce domaine est localisé en C-terminal et permet à l'enzyme de lier l'ubiquitine ainsi que les protéines ubiquitinées. HDAC10 possède, comme les HDAC de la sous-classe IIa, un NLS et un NES. Le domaine catalytique est localisé en N-terminal mais un second domaine putatif est présent en C-terminal. De plus, deux domaines putatifs de liaisons de la protéine du rétinoblastome (pRb) sont présents, expliquant l'implication de cette enzyme dans la régulation du cycle cellulaire. HDAC10 interagit avec six des autres HDAC (HDAC1, 2, 3, 4, 5 et 7) évoquant un rôle plutôt de recruteur que de désacétylase (Tong *et al.*, 2002).

La classe IV est uniquement composée de HDAC11 qui est localisée préférentiellement dans le noyau et possède un domaine catalytique en N-terminal. Cette enzyme ressemble structurellement aux HDAC3 et 8 de la classe I mais possède également des similarités avec la classe II. Pour ces raisons, cette nouvelle classe d'enzyme a été créée (Gao *et al.*, 2002).

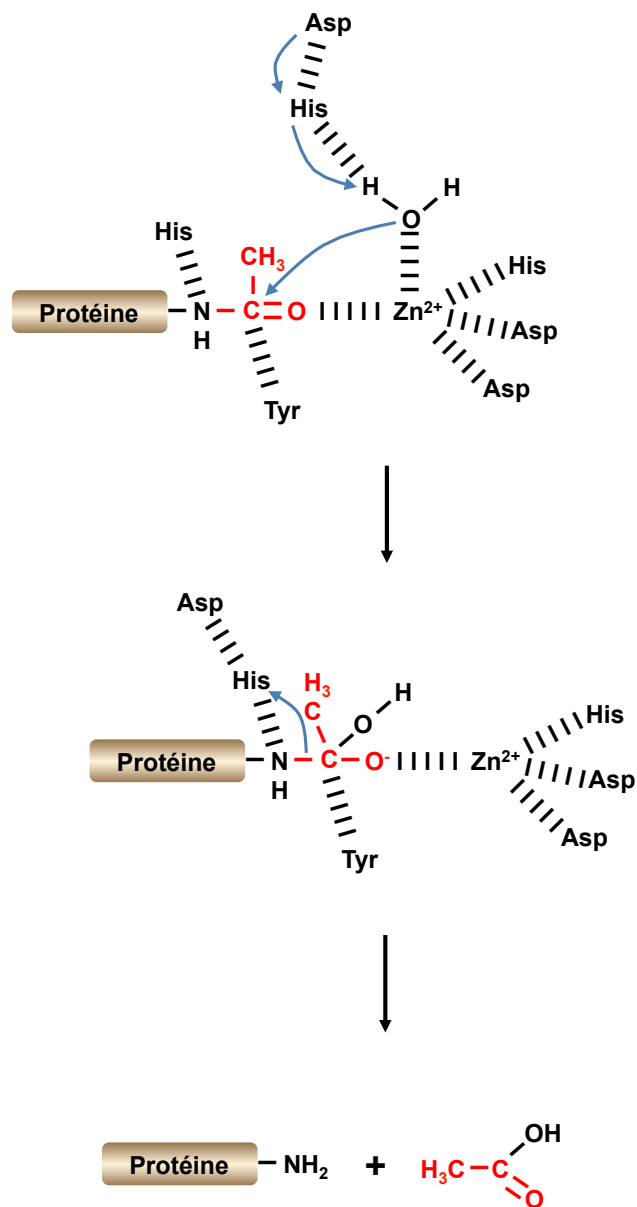
La classe III, aussi appelée sirtuine (SIRT) pour l'analogie à la protéine SIR2 (silent information regulator 2) chez la levure, contient sept membres, SIRT1 à 7. Les SIRT1, 6 et 7 sont localisées dans le noyau où elles sont impliquées dans l'activation

de facteurs de transcription [*e.g.* NF- κ B, p53 et FOXO (forkhead box)], la désacétylation des histones, la réparation de l'ADN et la transcription des ARN ribosomiques. SIRT2 est principalement localisée dans le cytoplasme et participe à la désacétylation de la tubuline- α . Les SIRT3, 4 et 5 sont des protéines mitochondriales. SIRT3 désacétyle l'acétyl-CoA synthétase 2, modulant ainsi son activité, et le complexe I de la chaîne respiratoire, régulant de ce fait, l'homéostasie énergétique. SIRT4 ne possède pas d'activité désacétylase mais une activité ADP-ribosyl-transférase inactivant ainsi la glutamate déshydrogénase ce qui résulte en l'inhibition de la sécrétion d'insuline. Enfin, SIRT5 désacétyle la carbamoyl phosphate synthétase 1 impliquée dans le métabolisme de l'ammoniac (de Ruijter *et al.*, 2003; Argmann *et al.*, 2006; Schwer *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2009).

I.3.3. Les mécanismes catalytiques de désacétylation

Les enzymes des classes I, II et IV possèdent un mécanisme de désacétylation des lysines dépendant d'un ion zinc. Des études de cristallographie ont montrées que la poche catalytique N- ou C-terminale est tubulaire et l'ion se trouve au fond de celle-ci où il est stabilisé par deux résidus aspartates et un résidu histidine (Figure 4A). De plus, l'ion zinc forme des liaisons électrostatiques avec une molécule d'eau catalytique et l'oxygène de la fonction acétyle du substrat. Grâce à un transfert d'électron entre les résidus aspartates et histidine, la molécule d'eau est activée, permettant ainsi l'attaque nucléophile sur le carbone de la fonction acétyle. Cette réaction conduit à un intermédiaire oxyanion tétraédrique stabilisé par un résidu tyrosine du site catalytique. Puis, l'azote du substrat, impliqué dans la liaison avec l'acétate, accepte un proton du relai aspartate-histidine. En conséquence, la liaison carbone-azote est rompue et le substrat désacétylé ainsi que l'acétate sont libérés (Hildmann *et al.*, 2007; Hodawadkar *et al.*, 2007).

A



Légende à la suite de la figure.

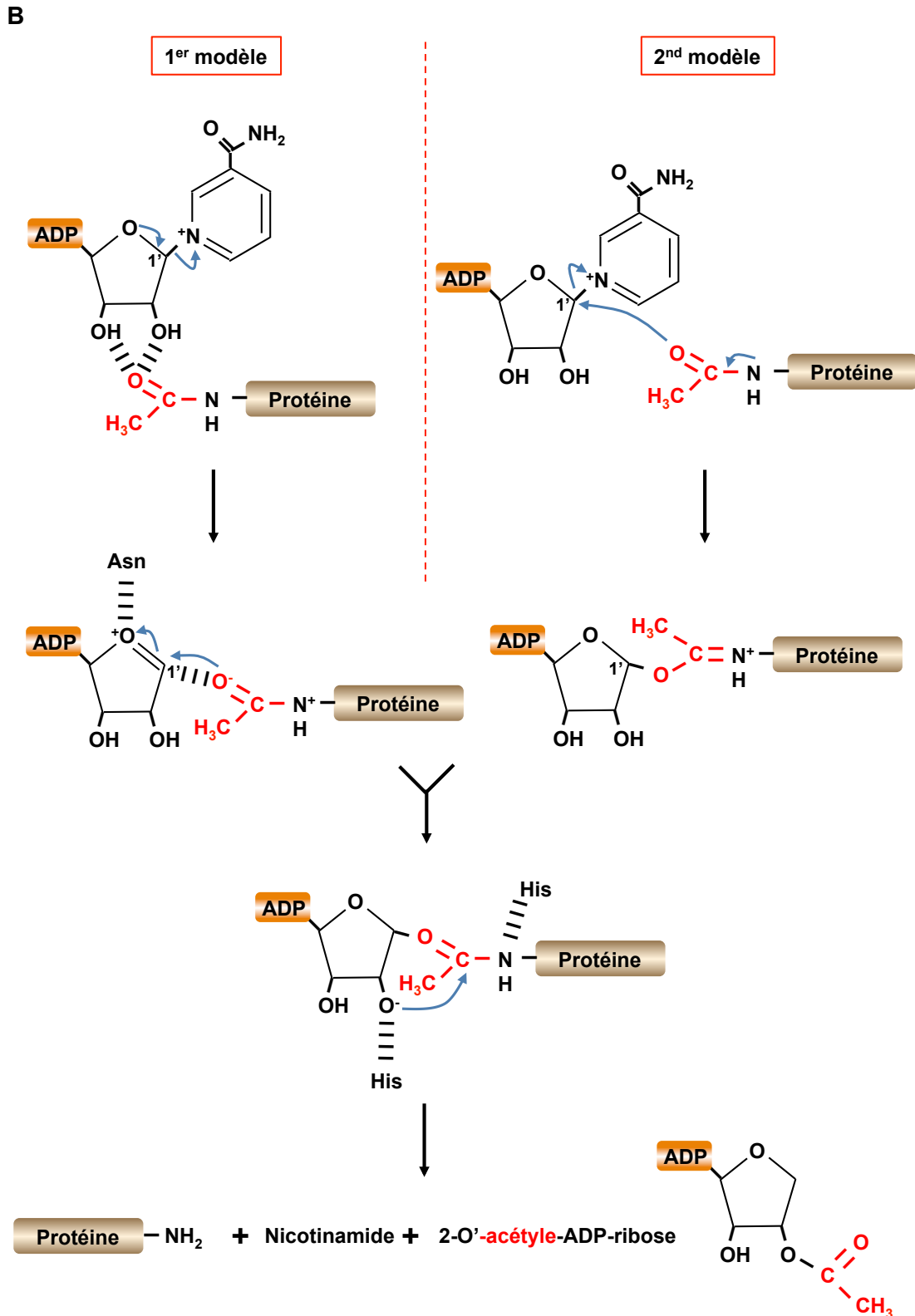


Figure 4: Les mécanismes de désacétylation des lysines catalysée par les HDAC.

(A) Les isoenzymes des classes I, II et IV ont un mécanisme catalytique dépendant d'un ion zinc, (B) alors que le mécanisme des sirtuines, ou classe III, nécessite le cofacteur NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide). Adapté de (Hildmann *et al.*, 2007; Hodawadekar *et al.*, 2007).

Les isoenzymes de la classe III utilisent, quant à eux, un mécanisme dépendant du NAD^+ (Figure 4B). D'après les données cristallographiques, deux mécanismes alternatifs ont été suggérés. Dans le premier modèle, le groupement nicotinamide est hydrolysé, permettant l'attaque nucléophile de l'oxygène du groupement acétate sur le carbone 1' du ribose. Dans le second modèle, l'attaque nucléophile de l'oxygène de l'acétate sur le carbone 1' du ribose du NAD^+ conduit à la libération du nicotinamide. Dans les deux cas, une fois que le groupement acétyle est lié au carbone 1' du ribose, il y a un transfert de proton, facilité par un résidu histidine du site catalytique, qui rend l'oxygène 2' nucléophile. Cet oxygène va alors attaquer le carbone de l'acétate, et de cette réaction résulte un intermédiaire cyclique. L'azote de la lysine du substrat accepte un proton du résidu histidine. Ce transfert conduit à la rupture de la liaison entre l'acétate et la lysine. Les produits de la réaction sont le nicotinamide, la protéine désacétylée et le 2-O'-acétyl-ADP-ribose. Ce dernier sera recyclé suite à l'addition d'un nicotinamide et au retrait du groupement acétyle (Hildmann *et al.*, 2007; Hodawadekar *et al.*, 2007).

I.3.4. Les cibles cellulaires des désacétylases d'histones

Les HDAC sont des enzymes ubiquitaires, initialement identifiées comme étant responsables de la désacétylation des histones, mais elles sont également capables de prendre en charge de nombreuses protéines non-histoniennes comme substrats (de Ruijter *et al.*, 2003). En effet, Choudhary *et al.* ont identifié 1750 protéines pouvant être acétylées *in cellulo* (Choudhary *et al.*, 2009). Le Tableau 3 regroupe quelques exemples de ces protéines ainsi que les enzymes responsables de la régulation de leur statut d'acétylation. Ainsi, un grand nombre de processus cellulaires se trouvent affectés par l'activité de ces enzymes (Figure 5).

L'expression génique est notamment modulée par le statut d'acétylation de facteurs de transcription qui affecte leur localisation cellulaire ou leur activité de transactivation. Par exemple, le transport vers le noyau de NF- κ B, STAT1 et STAT3 est facilité par l'acétylation de certains résidus lysine, et l'activation de la transcription par les facteurs de transcription p53 ou FOXO, est régulée par leur acétylation. L'activité de la pRb, impliquée dans le cycle cellulaire, est modulée par la présence de groupement acétyle.

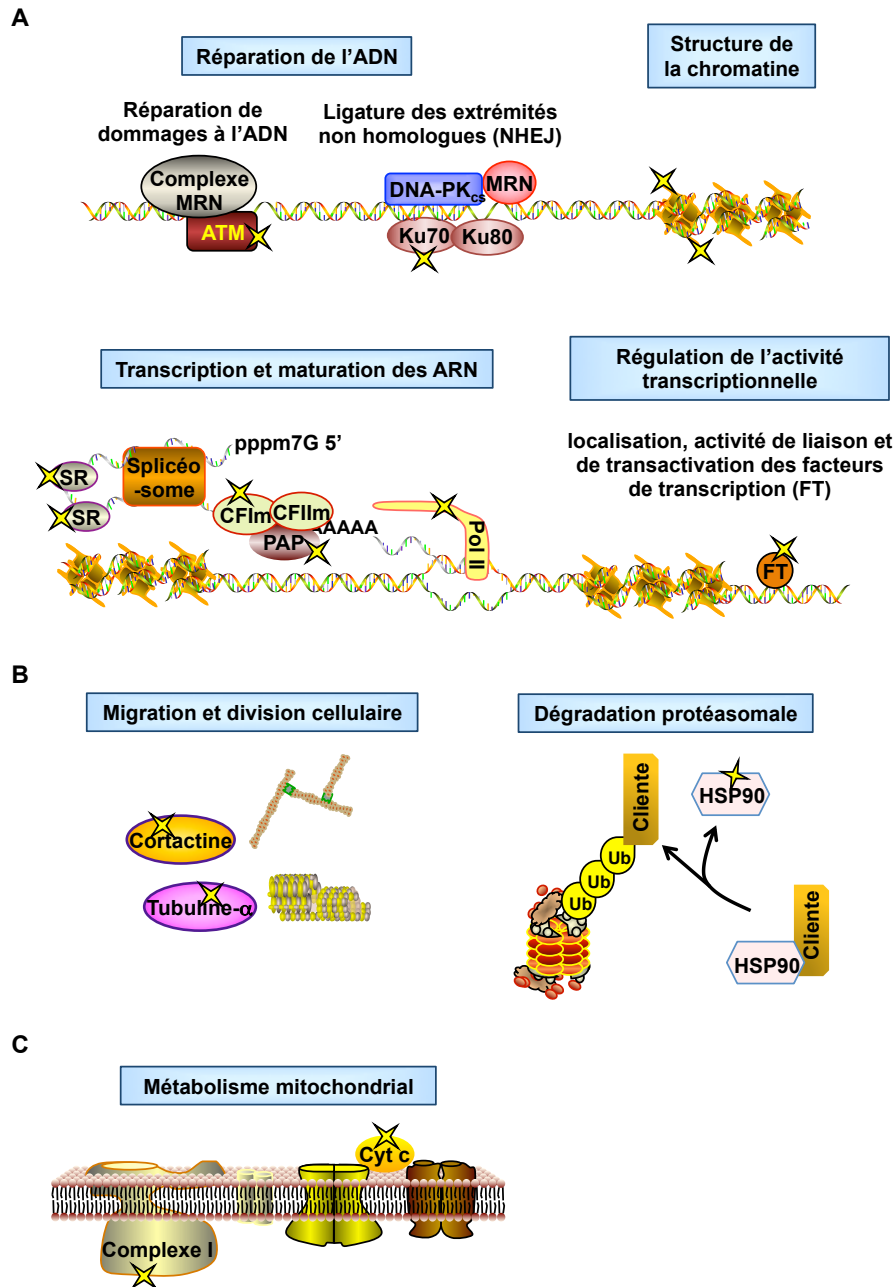


Figure 5: L'acétylome.

L'acétylation touche de nombreux processus cellulaires dans le noyau (A), le cytoplasme (B) et la mitochondrie (C): l'expression génique *via* l'acétylation des facteurs de transcription (FT), des histones et des protéines impliquées dans la transcription et maturation des ARN et dans la réparation de l'ADN ; la mobilité cellulaire avec l'intervention de la tubuline- α et de la cortactine acétylée ; la dégradation protéasomale suite à l'acétylation de la protéine chaperonne HSP90 ; ou encore le métabolisme mitochondrial au travers de l'acétylation de protéines impliquées dans la production d'énergie, d'urée et d'ATP. Les étoiles jaunes indiquent les protéines ciblées par l'acétylation. ATM: ataxia telangiectasia mutated, CFIm: cleavage factor Im, Cyt c: cytochrome c, DNA-PK_{cs}: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, HSP: heat shock protein, MRN: Mre11-Rad50-Nbs1, NHEJ: non-homologous end-joining, PAP: poly-(A)-polymérase, Pol II: ARN polymérase II, SR: serine/arginine-rich proteins.

Le métabolisme mitochondrial est régulé par des SIRT non mitochondriales. Par exemple, SIRT1 désacétyle et module l'activité de PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1) qui est un régulateur important de la biogenèse des mitochondries (Nemoto *et al.*, 2005; Higashida *et al.*, 2013). En effet, PGC-1 α interagit avec des facteurs de transcription et des HAT afin d'induire l'expression de gènes mitochondriaux (Handschin *et al.*, 2006). SIRT2 désacétyle le facteur de transcription FOXO1 qui est alors localisé dans le noyau et active la transcription de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) impliqué dans le métabolisme du glucose (Yu *et al.*, 2009).

De plus, l'acétylation de facteurs participant à la maturation, la stabilité et la traduction des ARNm peut avoir un impact sur leur fonction. Ainsi, l'acétylation des protéines hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein), PAP (poly-(A)-polymérase), CFIm (cleavage factor Im) et de la protéine SRSF2 modifie leurs interactions avec le pré-ARNm. L'épissage alternatif peut être modulé par l'activité HDAC au travers de la dynamique de l'ARN polymérase II. La cinétique de couplage entre la synthèse de l'ARN et l'interaction des facteurs d'épissage est régulée notamment par la processivité de la polymérase, elle-même régulée par les modifications d'histones. Ainsi, l'interaction des facteurs d'épissage avec des séquences activatrices ou inhibitrices sera modifiée ce qui engendre un choix des exons différents (Hnilicova *et al.*, 2011).

La réparation de l'ADN est aussi régulée par l'acétylation de protéines telles que Ku70 impliquée dans la ligature des extrémités non homologues de l'ADN (NHEJ, non-homologous end-joining) et la kinase ATM (ataxia-telangiectasia-mutated) impliquée la signalisation de la réparation des dommages de l'ADN (Chen *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). Le maintien d'un état désacétylé de Ku70 par SIRT1 permet d'augmenter son affinité pour l'ADN conduisant à la réparation de l'ADN et la survie cellulaire. Au contraire, c'est l'acétylation de ATM qui est indispensable à l'activation de son activité kinase.

La stabilité protéique est également modifiée par la présence de groupement acétyle. De cette manière, l'acétylation des protéines p53, p73, SMAD7, c-myc empêche leur ubiquitination et, par conséquent, leur dégradation. Au contraire, l'acétylation de HIF-1 α facilite son interaction avec une E3 ubiquitine-ligase et son adressage au protéasome. De plus, le statut d'acétylation des protéines chaperonnes

comme HSP90 et HSP70 régule leur interaction avec leurs protéines clientes et ainsi la dégradation protéasomale de ces dernières (Rao *et al.*, 2008).

Enfin, la mobilité et l'intégrité cellulaire sont modulées au travers de la dynamique des microtubules et des filaments d'actine dépendante du statut d'acétylation de la tubuline- α et de la cortactine (Figure 6). En effet, la tubuline- α est acétylée sur la lysine 40 par des enzymes portant l'activité α TAT (tubuline acétyl-transférase) telles que ELP3, ARD1, NAT10 ou Gcn5, alors que la cortactine est acétylée par l'acétyl-transférase PCAF. Ces deux protéines sont désacétylées par HDAC6. De plus, SIRT1 désacétyle la cortactine et SIRT2 la tubuline- α . La désacétylation de la tubuline- α conduit à un assemblage dynamique des microtubules permettant une mobilité cellulaire plus importante ainsi que l'adressage des protéines mal repliées vers les aggrésomes pour leur élimination par autophagie (Hubbert *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010a; Ouyang *et al.*, 2012). D'autre part, la cortactine désacétylée interagit avec l'actine-F ce qui mène à une polymérisation plus importante associée à une augmentation de la migration des cellules ainsi qu'une régulation de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes dans les mécanismes d'autophagie (Zhang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010a).

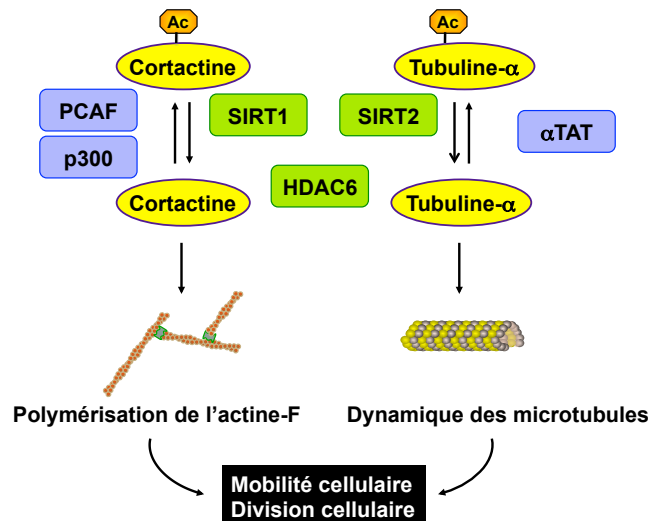


Figure 6: Rôle du statut d'acétylation de la cortactine et de la tubuline- α .

La cortactine est acétylée par PCAF et p300 et la tubuline- α par des enzymes portant une activité α TAT fonctionnelle. Ces deux protéines sont désacétylées par HDAC6, la cortactine est aussi désacétylée par SIRT1 et la tubuline- α par SIRT2. La désacétylation de la cortactine conduit à son association avec l'actine-F et celle de la tubuline- α induit une augmentation de la dynamique des microtubules, permettant ainsi une mobilité et une division cellulaire. Ac: acétyle, ARD1: arrest-defective-1 protein, ELP3: elongator protein 3, Gcn5: general control non-derepressible, NAT10: N-acétyl-transférase 10, PCAF: P300/CBP-associated factor, α TAT: tubuline acétyl-transférase.

I.3.5. L'isoenzyme HDAC6

HDAC6 est la seule isoenzyme de la famille des HDAC à posséder deux sites actifs fonctionnels (Figure 7). Cette enzyme possède du N- au C-terminal un NLS, séquence riche en arginine et lysine, un NES, riche en leucine, deux sites catalytiques 1 et 2, un signal de rétention cytoplasmique appelé ici domaine SE14, séquence répétée de huit tétradécapeptides Ser-Glu consécutifs et un domaine de liaison à l'ubiquitine (BUZ), motif en doigts de zinc.

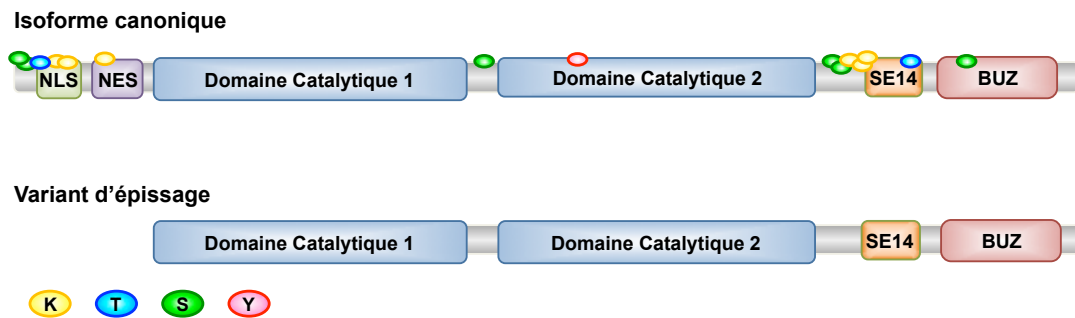


Figure 7: Structure protéique des isoformes humaines de HDAC6.

L'isoforme canonique de HDAC6 possède 1215 acides aminés et peut subir différentes modifications post-traductionnelles sur des lysines (K), thréonines (T), sérines (S) ou tyrosines (Y). Cette isoforme est constituée d'une séquence de localisation nucléaire (NLS), d'une séquence d'export nucléaire (NES), de deux domaines catalytiques, d'une séquence répétée SE14 pour la rétention cytoplasmique et d'un domaine en doigts de zinc pour la liaison à l'ubiquitine (BUZ). Un épissage alternatif de HDAC6 peut aboutir à une forme tronquée en N-terminal.

HDAC6 est régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation de thréonines (T30 et T868), de sérines (S22, S458, S846, S847 et S1062) et de la tyrosine Y570, l'acétylation, l'ubiquitination ou la sumoylation au niveau de lysines [K36, K37, K116, K849, K853 et K854, (Hook *et al.*, 2002; Kirsh *et al.*, 2002; Pugacheva *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012)]. L'expression de HDAC6 est également régulée par un épissage alternatif résultant en une forme tronquée en N-terminal où se situent les séquences NLS et NES. Cette forme tronquée possède la même activité de désacétylation de la tubuline- α que la forme entière mais serait requis pour certaines fonctions, notamment dans l'activation de l'expression des gènes par TGF- β 1 (Zhuang *et al.*, 2010).

Le gène codant HDAC6 est localisé sur le chromosome Xp11.22-23 et couvre 21923 paires de bases. Son promoteur ne contient ni de boîte TATA ni de boîte CCAAT mais un îlot CpG de 1 kb. La transcription de ce gène résulte en un ARNm

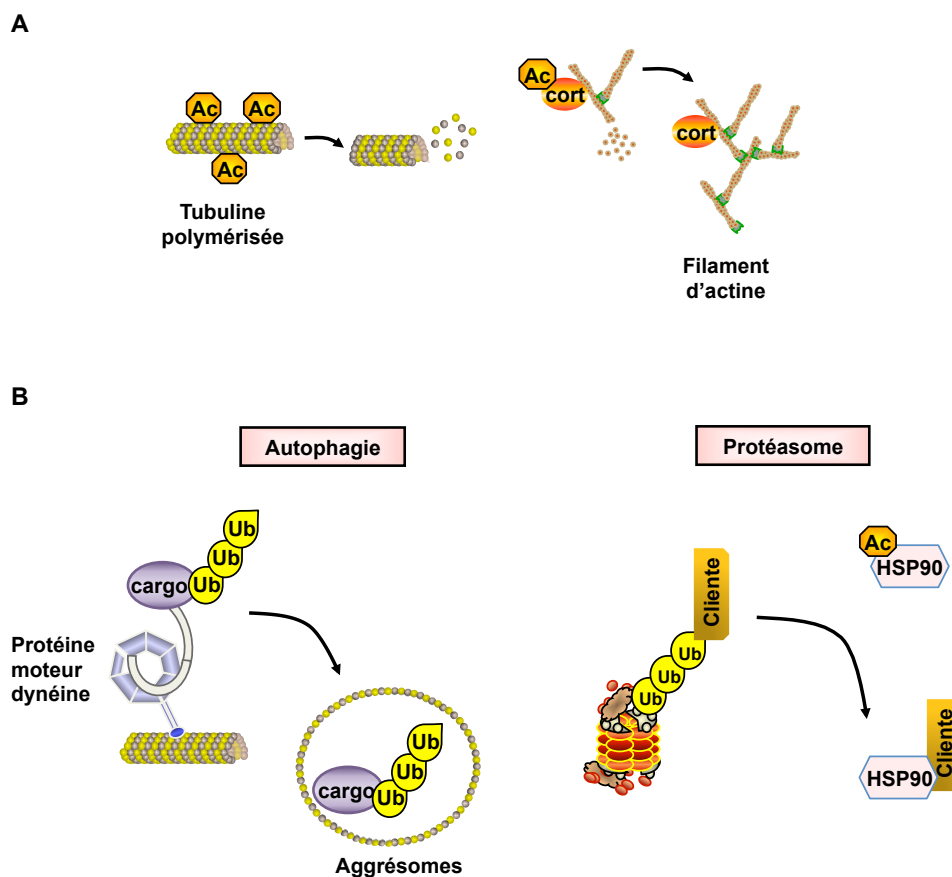
de 3648 paires de bases contenant 28 exons. L'expression de HDAC6 peut dépendre de la méthylation de son promoteur. L'hypométhylation de son promoteur est corrélée à l'expression de la protéine chez des patients atteints de maladies pulmonaires par rapport à des patients contrôles (Voelter-Mahlknecht *et al.*, 2003; Lam *et al.*, 2013).

L'activité de HDAC6 est également régulée par des micro-ARN (miR) tels que les miR-548, miR-22 et miR-433 (Simon *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012; Lwin *et al.*, 2013).

HDAC6 est principalement localisée dans le noyau des cellules non différenciées telles que les cellules souches embryonnaires et les cellules souches neuronales ainsi que dans certaines lignées cancéreuses. Dans le noyau, HDAC6 joue un rôle dans la régulation de TIP60-p400, et se localise dans le cytoplasme au cours de la différenciation (Chen *et al.*, 2013a). La séquence NES participe à la localisation cytoplasmique de HDAC6 de manière dépendante de CRM1 (chromosome region maintenance), un arrêt de la prolifération ou une inhibition de CRM1 entraîne une relocalisation nucléaire d'une fraction de HDAC6 (Verdel *et al.*, 2000). De plus, la rétention cytoplasmique de HDAC6 est permise par le domaine répété SE14 dont le mécanisme n'a pas encore été élucidé (Bertos *et al.*, 2004). Enfin, l'acétylation de HDAC6 par p300 au niveau de son NLS inhibe l'interaction de HDAC6 avec l'importine- α résultant en sa rétention cytoplasmique (Liu *et al.*, 2012).

La présence et la rétention de HDAC6 dans le cytoplasme permettent le maintien de la forme et la polarité des cellules mais aussi le transport intracellulaire, la division, la migration et le mouvement directionnel des cellules ainsi que l'angiogenèse (Figure 8). Tous ces mécanismes sont principalement régis par le cytosquelette et son dynamisme qui est composé de microtubules (polymères de tubuline- α et β), de filaments intermédiaires (constitués de protéines fibrillaires) et de filaments d'actine [ou actine-F, qui sont des polymères d'actine globulaire ou actine-G, (Lodish *et al.*, 2003)]. HDAC6 désacétyle la tubuline- α associée aux microtubules dépolymérisés, mais aussi la cortactine qui est une protéine associée à l'actine-F promouvant ainsi la polymérisation et les branchements de l'actine [Figure 8A, (Aldana-Masangkay *et al.*, 2011)]. De plus, les microtubules sont importants pour l'adressage des protéines mal repliées au centre d'organisation des microtubules (MTOC) pour une dégradation indépendante du protéasome [Figure 8B, (Aldana-Masangkay *et al.*, 2011; Ouyang *et al.*, 2012)]. HDAC6 est impliquée dans ce

mécanisme indépendamment de son activité désacétylase. En effet, suite à une inhibition du protéasome, la cellule doit se protéger d'une accumulation de protéines mal repliées. Pour ce faire, HDAC6 interagit, grâce à son domaine de liaison à l'ubiquitine, avec les protéines polyubiquitinées ainsi que la protéine motrice dynéine (Aldana-Masangkay *et al.*, 2011). Un transport rétrograde de ce complexe sera alors possible jusqu'au MTOC où les aggrésomes sont formés autour des protéines mal repliées. Les aggrésomes fusionnent avec des autophagosomes puis des lysosomes afin de dégrader les protéines grâce notamment à l'activité de désacétylation de la cortactine par HDAC6 (Lee *et al.*, 2010a). De plus, la formation et l'élimination des aggrésomes est régulée par la phosphorylation de la sérine 458 de HDAC6 par la protéine kinase caséine CK2 qui augmente son activité désacétylase (Watabe *et al.*, 2011).



Légende à la suite de la figure.

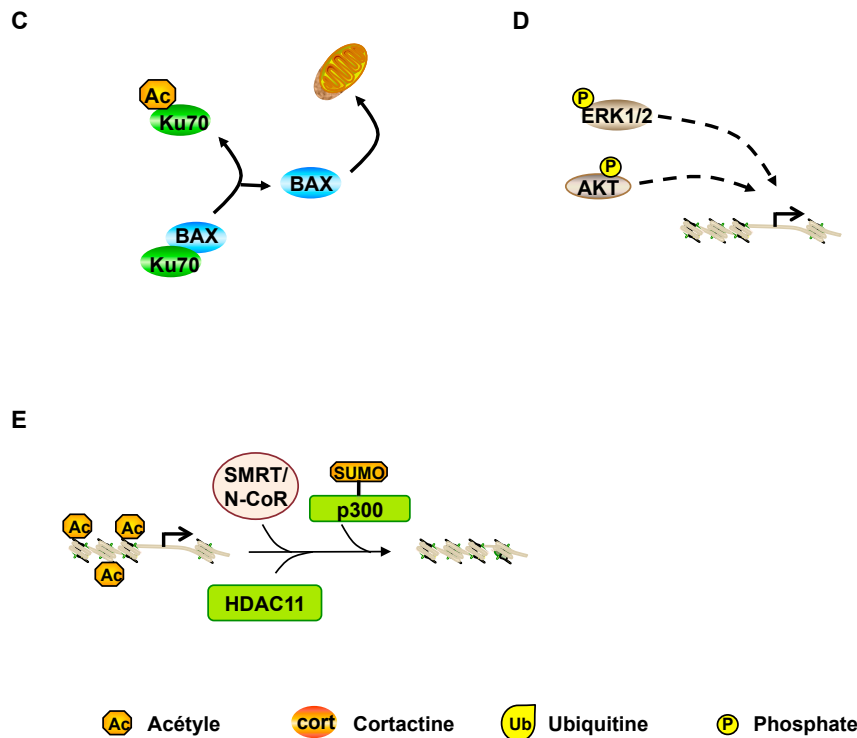


Figure 8: Rôles cellulaires de HDAC6.

(A) HDAC6 intervient dans la division et migration des cellules *via* l'acétylation de la tubuline- α et de la cortactine. (B) Cette enzyme est impliquée dans la dégradation des protéines de façon indépendante du protéasome grâce à la formation d'aggrésomes mais aussi de façon dépendante du protéasome en régulant le statut d'acétylation de la protéine chaperonne HSP90. (C) HDAC6 a aussi une activité anti-apoptotique en désacétylant Ku70, qui séquestre et donc inactive BAX. (D) Enfin, HDAC6 peut également être impliquée dans les voies de signalisation ou (E) participer à la désacétylation des histones en interagissant avec des complexes co-répresseur. ERK: extracellular signal-regulated kinase, MAPK: mitogen-activated protein kinase, N-CoR: nuclear hormone receptor co-repressor, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, SMRT: silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid-hormone receptor.

Par ailleurs, HDAC6 est également impliquée dans la dégradation protéique par le protéasome (Aldana-Masangkay *et al.*, 2011). En effet, elle a pour substrat la protéine chaperonne HSP90 α . Cette protéine prend en charge de nombreuses protéines clientes après désacétylation y compris Bcr-Abl (breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene), les récepteurs aux glucocorticoïdes ou le récepteur aux androgènes (RA). HSP90 α maintient ces protéines dans une conformation favorable à leur activité. L'acétylation de HSP90 α induit une perte de son activité chaperonne et donc une dégradation de ses protéines clientes. La protéine de fusion Bcr-Abl résulte de la translocation chromosomique entre les chromosomes 9 et 22, et caractérise les leucémies myéloïdes chroniques (LMC). Cette protéine acquiert une activité constitutive de tyrosine kinase ayant pour conséquence une

induction de la croissance cellulaire et une résistance à l'apoptose (Cilloni *et al.*, 2012). Le RA est activé suite à la liaison de son ligand, la testostérone ou la dihydrotestostérone, induisant ainsi sa translocation dans le noyau où il joue le rôle de facteur de transcription. Les gènes régulés par le RA sont notamment impliqués dans le maintien d'un phénotype mâle ainsi que dans la survie et la croissance cellulaire. L'expression du RA est marqueur du cancer de la prostate où la thérapie consistant en la déplétion des androgènes est utilisée. Cependant, le développement tumoral est caractérisé par le passage des cellules cancéreuses de la dépendance à l'indépendance aux androgènes (Suzuki *et al.*, 2003).

D'autre part, HSP90 α interagit également avec le facteur de choc thermique 1 (HSF1) dans un complexe comprenant HDAC6 et la chaperonne VCP/p97 (valosin-containing protein/ATPase) et le maintient sous forme inactive (Boyault *et al.*, 2006). Une accumulation de protéines mal repliées provoque une dissociation du complexe induisant la libération de HSF1 qui va activer la transcription des HSP, ainsi que la libération de HDAC6 qui va se lier aux protéines polyubiquitinées. De plus, la capacité de HDAC6 de lier l'ubiquitine est impliquée dans l'élimination des mitochondries endommagées et polyubiquitinées. HDAC6 avec p62 forment alors des mitoaggrésomes qui seront éliminés par mitophagie (Lee *et al.*, 2010b).

De plus, HDAC6 participe à la régulation des vésicules d'endocytose et d'exocytose. Par exemple, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), lié à son ligand, interagit avec HDAC6 et l'inactive par phosphorylation ce qui induit une hyperacétylation des microtubules et engendre une internalisation du récepteur (Deribe *et al.*, 2009). HDAC6 est également impliquée dans la formation et l'internalisation de macropinosomes, dans le remodelage de l'actine ainsi que la formation de plis (ruffles) dans la membrane. Cependant, l'induction de ces processus ainsi que de la mobilité cellulaire nécessite l'activité de HDAC6 mais également de HSP90 α et de Rac1. En effet, suite à la stimulation des cellules par des facteurs de croissance, ces trois protéines co-localisent au niveau des plis de la membrane où leur activité est indispensable (Gao *et al.*, 2007).

HDAC6 participe également à la régulation de l'apoptose. En effet, le statut d'acétylation de la protéine Ku70 dans le cytoplasme est contrôlé par HDAC6 et régit son interaction avec la protéine pro-apoptotique BAX ainsi que la protéine anti-apoptotique FLIP (Figure 8C). Lorsque Ku70 est acétylée, elle n'interagit plus avec BAX qui peut alors activer l'apoptose. Au contraire, la désacétylation de Ku70 par

HDAC6 provoque la séquestration de BAX et par conséquent l'inhibition de l'apoptose par cette voie (Subramanian *et al.*, 2011; Kerr *et al.*, 2012). HDAC6 est aussi impliquée dans les voies de signalisation PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase) et MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase) mais aucun lien direct n'a encore été établi (Lee *et al.*, 2008).

Enfin, les peroxirédoxines 1 et 2 (Prx) sont des substrats de HDAC6. Une inhibition de HDAC6 induit une augmentation de l'acétylation de ces Prx associée à une augmentation de leur activité de réduction pouvant ainsi induire une résistance des cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapie (Parmigiani *et al.*, 2008).

Comme cité ci-dessus, HDAC6 peut être localisée dans le noyau où elle participe à la désacétylation des histones et par conséquent à la répression transcriptionnelle grâce à l'interaction avec différents co-répresseurs tels que RUNX2 (Runt-related transcription factor), LCoR (ligand-dependent nuclear receptor corepressor), p300 sumoylée ou HDAC11 (Gao *et al.*, 2002; Westendorf *et al.*, 2002; Girdwood *et al.*, 2003; Palijan *et al.*, 2009).

I.4. Rôle des désacétylases d'histones au cours de la cancérogenèse

I.4.1. Epigénétique et cancer

Les processus de cancérisation ne sont pas uniquement la conséquence de mutations de la séquence nucléotidique mais mettent en jeu également des mécanismes épigénétiques ainsi que la régulation des modifications post-traductionnelles. En effet, une diminution de l'acétylation des histones des cellules cancéreuses aboutit à une inhibition de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. La diminution de l'acétylation de protéines non-histoniques affecte la régulation des processus de prolifération, de migration et de mort cellulaire. La modification du statut d'acétylation des protéines résulte d'une perturbation de la balance des activités enzymatiques des HAT et HDAC contribuant à la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. La surexpression de plusieurs isoenzymes de HDAC peut mener à une hypoacétylation de la chromatine (Bradbury *et al.*, 2005), c'est le cas notamment des isoenzymes HDAC1 et 3 qui sont surexprimées dans des cancers ovariens ou des HDAC5 et 9 surexprimées dans certains médulloblastomes

[Tableau 5, (Bradbury *et al.*, 2005; Ozdag *et al.*, 2006; Khabele *et al.*, 2007; Clocchiatti *et al.*, 2011)]. D'autre part, des mutations de la séquence codante des HDAC ont été décrites dans différents cancers conduisant à une perte de la fonction de l'isoenzyme mutée ou une modulation de sa localisation cellulaire (Clocchiatti *et al.*, 2011). Enfin, le recrutement aberrant de HDAC par des protéines de fusion telles que PLZF-RAR (promyelocytic leukaemia zinc finger-retinoic acid receptor- α) ou PML (promyelocytic leukaemia)-RAR peut être responsable d'une dérégulation de l'expression de certains gènes. En effet, le récepteur de l'acide rétinoïque est lié à l'ADN en association avec des complexes contenant des HDAC en absence de ligand et inhibe ainsi la transcription des gènes qu'il contrôle. La présence d'acide rétinoïque dissocie ces complexes inhibiteurs au profit de complexes activateurs de la transcription qui contiennent des HAT. Les protéines de fusion PLZFR-RAR et PML-RAR ne permettent plus la dissociation des complexes inhibiteurs par des doses physiologiques d'acide rétinoïque, recrutent d'autres enzymes de modification de la structure de la chromatine et induisent une inhibition plus importante de la transcription. Cette inhibition entraîne un arrêt de la différenciation des cellules hématopoïétiques et leur cancérisation (Minucci *et al.*, 2006; Florean *et al.*, 2011).

La surexpression de HDAC6 dans les cellules cancéreuses peut participer au développement tumoral au travers de la modification du statut d'acétylation des protéines. En effet, la surexpression de HDAC6 est corrélée à un stade plus avancé de la tumeur, à une agressivité accrue des tumeurs et par conséquent à un taux de survie plus faible dans les carcinomes épidermoïdes oraux, les leucémies myéloïdes aiguës (LMA), les cancers de l'ovaire ou les carcinomes hépatocellulaires (Bradbury *et al.*, 2005; Sakuma *et al.*, 2006; Bazzaro *et al.*, 2008; Kanno *et al.*, 2012). Dans le cancer de l'ovaire, Bazzaro *et al.* ont montré que le « stress du système ubiquitine-protéasome » (UPS) est pallié grâce à HDAC6 qui permet la dégradation des protéines par les voies lysosomales, induisant de cette manière une résistance des cellules cancéreuses à la mort (Bazzaro *et al.*, 2008). Une surexpression de HDAC6 dans les cellules de carcinomes hépatocellulaires contribue à accélérer les phénomènes de migration et d'invasion des cellules tumorales (Kanno *et al.*, 2012). De plus, dans les cellules du cancer de l'ovaire et du sein la surexpression de HDAC6 peut être régulée par l'oncogène Ras et cette surexpression mène à la transformation oncogénique (Lee *et al.*, 2008).

Tableau 5: Surexpression des isoenzymes de HDAC dans le cancer.

HDAC		Cancer	Références
Classes	Membres		
I	HDAC1	Prostate, gastrique, colorectal, pancréas, œsophage, carcinome hépatocellulaire, ovarien, sein	(Khabele <i>et al.</i> , 2007; Miremadi <i>et al.</i> , 2007; Witt <i>et al.</i> , 2009; Gabrielli <i>et al.</i> , 2012; Robert <i>et al.</i> , 2012; Ververis <i>et al.</i> , 2012)
	HDAC2	LMA, colorectal, gastrique, dysplasie cervicale, carcinome invasif, prostate, LLA, ovarien, sein	(Bradbury <i>et al.</i> , 2005; Khabele <i>et al.</i> , 2007; Witt <i>et al.</i> , 2009; Florean <i>et al.</i> , 2011; Gabrielli <i>et al.</i> , 2012; Robert <i>et al.</i> , 2012; Ververis <i>et al.</i> , 2012)
	HDAC3	Poumon, prostate, colon, gastrique, colorectal, LLA, ovarien, sein	(Khabele <i>et al.</i> , 2007; Witt <i>et al.</i> , 2009; Florean <i>et al.</i> , 2011; Gabrielli <i>et al.</i> , 2012; Robert <i>et al.</i> , 2012; Ververis <i>et al.</i> , 2012)
	HDAC8	Neuroblastome pédiatrique, LLA, sein	(Witt <i>et al.</i> , 2009; Florean <i>et al.</i> , 2011; Robert <i>et al.</i> , 2012; Ververis <i>et al.</i> , 2012)
IIa	HDAC4	Sein, prostate	(Miremadi <i>et al.</i> , 2007; Witt <i>et al.</i> , 2009; Robert <i>et al.</i> , 2012)
	HDAC5	Colorectal, médulloblastome	(Witt <i>et al.</i> , 2009; Clocchiatti <i>et al.</i> , 2011)
	HDAC7	Colorectal, colon	(Miremadi <i>et al.</i> , 2007; Witt <i>et al.</i> , 2009; Robert <i>et al.</i> , 2012)
	HDAC9	Médulloblastome, astrocytome	(Clocchiatti <i>et al.</i> , 2011; Robert <i>et al.</i> , 2012)
IIb	HDAC6	LLA, LMA, ovarien, épidermoïde oral, sein	(Bradbury <i>et al.</i> , 2005; Witt <i>et al.</i> , 2009; Florean <i>et al.</i> , 2011; Robert <i>et al.</i> , 2012)
	HDAC10	Carcinome hépatocellulaire	(Robert <i>et al.</i> , 2012)
III	SIRT1	Colorectal, sein, prostate, LMA, colon, peau, LLC-B, LLA	(Bradbury <i>et al.</i> , 2005; Miremadi <i>et al.</i> , 2007; Florean <i>et al.</i> , 2011; Robert <i>et al.</i> , 2012)
	SIRT4	Sein	(Robert <i>et al.</i> , 2012)
	SIRT5	Pancréas, sein	(Robert <i>et al.</i> , 2012)
	SIRT6	Colon, sein	(Robert <i>et al.</i> , 2012)
	SIRT7	Sein	(Robert <i>et al.</i> , 2012)
IV	HDAC11	Sein	(Robert <i>et al.</i> , 2012)

LMA: leucémie myéloïde aiguë, LLA: leucémie lymphoblastique aiguë, LLC-B: leucémie lymphoïde chronique B.

En revanche, de manière surprenante, HDAC6 peut également jouer un rôle de suppresseur de tumeurs. C'est le cas notamment dans des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), lymphomes cutanés à cellules T (LCT), carcinomes hépatocellulaires ou carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC). En effet, une forte expression de HDAC6 dans des LLC ou des LCT est corrélée à une survie plus longue sans traitement et un meilleur pronostic vital (Osada *et al.*, 2004; Marquard *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2012; Van Damme *et al.*, 2012). De plus, Jung KH

et al. ont observé une diminution de l'expression de HDAC6 dans des carcinomes hépatocellulaires associé à un faible pronostic. La perte de l'activité HDAC6 diminue les mécanismes d'autophagie et une expression ectopique de cette enzyme rétablit une mort cellulaire *via* l'activation de ces mécanismes (Jung *et al.*, 2012).

Dans les cancers du sein, l'expression de HDAC6 est régulée par les récepteurs des œstrogènes (RE). Une forte expression de HDAC6 dans le cancer du sein est corrélée à un meilleur pronostic et une meilleure réponse aux traitements endocriniens. Par exemple, une surexpression de HDAC6 peut être associée à une plus petite taille des tumeurs, un faible développement cancéreux du point de vue histologique et une meilleure réponse au traitement avec le tamoxifène dans le cas des cancers positifs aux RE augmentant ainsi la survie des patientes (Zhang *et al.*, 2004; Saji *et al.*, 2005). Par ailleurs, une surexpression de HDAC6 dans des cellules positives aux RE mais ne répondant pas à la thérapie endocrinienne est associée à un faible pronostic. De surcroît, l'association de la surexpression de HDAC6 avec une autre cible des RE, le facteur de croissance IGFBP4 (insulin-like growth factor-binding protein 4), diminue davantage le pronostic vital. Les auteurs suggèrent alors d'étudier le taux d'expression des gènes cibles des RE afin de créer des stratifications cliniques chez les patientes atteintes de cancers du sein positifs aux RE (Yoshida *et al.*, 2004).

D'autres études ont montré qu'une surexpression de HDAC6 est corrélée à une augmentation de la mobilité, de la migration et des propriétés invasives des cellules tumorales. L'étude comparative des lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 a montré que HDAC6 joue un rôle important dans l'invasion. En effet, les cellules MDA-MB-231 ont un pouvoir invasif plus important que les cellules MCF-7 et elles expriment plus fortement HDAC6 ainsi que la métalloprotéinase matricielle (MMP)9 (Park *et al.*, 2011).

En conclusion, le taux d'expression de HDAC6 pourrait être utilisé comme un nouveau biomarqueur dans le diagnostic des cancers ainsi que dans le pronostic du stade de développement tumoral. Suivant le type cellulaire atteint, une médecine personnalisée permettrait d'utiliser des traitements plus appropriés à la pathologie spécifique de l'individu.

I.4.2. Les inhibiteurs des désacétylases d'histones pour la thérapie anti-cancéreuse

I.4.2.1. La dérégulation cellulaire dans le cancer

La progression du cycle cellulaire est permise par la phosphorylation des cibles des complexes cycline-CDK dont l'activité est régulée par phosphorylation/déphosphorylation (Lodish *et al.*, 2003). D'autre part, l'inhibition de la progression du cycle cellulaire est également régulée par des protéines inhibitrices des CDK (CDKi) appartenant aux familles Cip/Kip (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) et Ink4 (inhibitor kinase 4) telles que p21 ou p27, qui inhibent les complexes cycline-CDK en se liant à ces derniers ou encore par une protéolyse cyclique des cyclines (Figure 9). De plus, des points de contrôle de l'intégrité cellulaire existent à différentes phases du cycle. De cette manière, la compétence de la cellule à entrer dans le cycle ainsi que l'intégrité de son ADN sont des points décisifs pour l'entrée en phase G1. Ainsi, au cours de la phase G1, les complexes cycline D1-CDK4/6 et cycline E-CDK2 permettent l'hyperphosphorylation de pRb, libérant les facteurs de transcription de la famille E2F. Ces derniers peuvent alors induire la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle. La phase S est la phase de synthèse de l'ADN, sa poursuite est permise par le complexe cycline A-CDK2. Un point de contrôle en début de phase G2 permet de vérifier la bonne réplication et compaction de l'ADN, la progression est alors permise par le complexe cycline A-CDK1. Enfin, si les conditions environnantes sont favorables, les cellules entrent en phase M, qui est la phase de mitose, grâce au complexe cycline B-CDK1. La phase de mitose est constituée de quatre sous-phases: la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Au cours de la prophase, la chromatine se condense pour former les chromosomes et les centrosomes migrent aux pôles opposés de la cellule. Puis la membrane nucléaire disparaît, le fuseau mitotique se localise dans la région nucléaire et les kinétochores capturent les chromosomes et les stabilisent au centre. Les chromosomes sont alors alignés sur le plan équatorial et la cellule entre en métaphase. L'anaphase est caractérisée par la séparation des centromères des chromatides sœurs grâce au raccourcissement des fibres du fuseau et à la séparation des pôles. Enfin, au cours de la télophase, le fuseau est dissocié et les chromosomes se décondensent suivit de la reconstitution de l'enveloppe nucléaire. Cette phase se termine par le phénomène de cytokinèse qui consiste en une séparation identique du

cytoplasme et la constriction de la membrane cytoplasmique pour aboutir à deux cellules filles identiques (Lodish *et al.*, 2003).

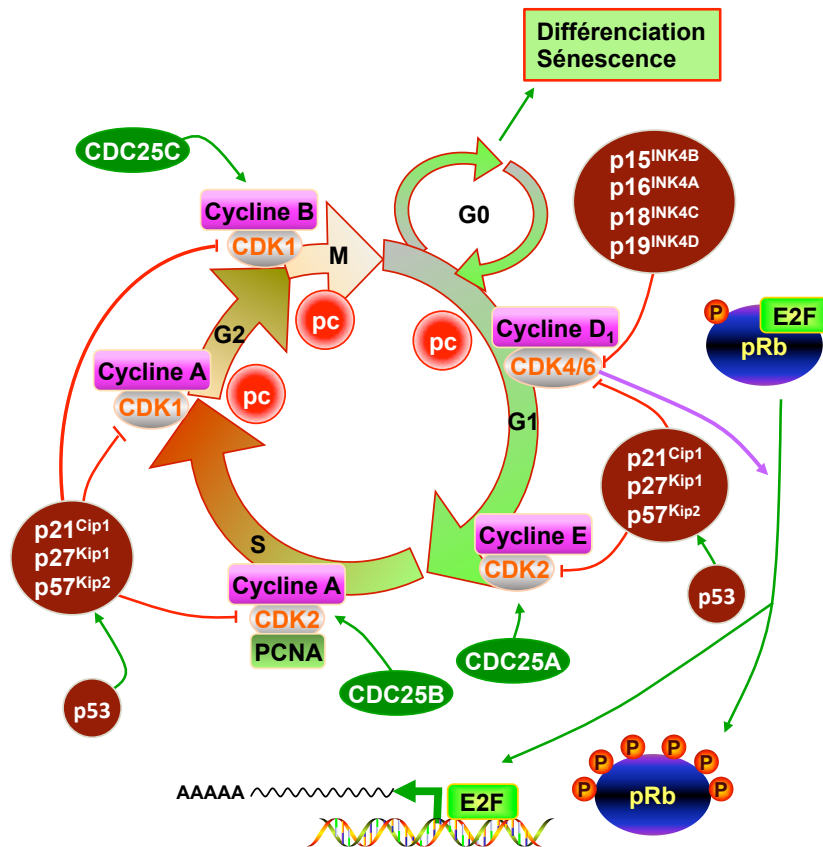


Figure 9: Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est l'ensemble des phases successives pendant lesquelles la cellule grossit, duplique son matériel génétique et se divise pour donner deux cellules filles. La progression à travers les différentes phases du cycle est contrôlée par différentes cyclines-CDK dont l'activité est régulée par les inhibiteurs des familles Cip/Kip et Ink4 qui les inhibent (flèches rouges) ou les activent (flèches vertes). La pRb séquestre des membres de la famille E2F jusqu'à la fin de la phase G1, les empêchant ainsi d'activer la transcription des gènes impliqués dans la progression du cycle. La pRb est hyperphosphorylée par les CDK4/6 et 2 (flèche violette). Différents points de contrôles sont indispensables pendant le cycle cellulaire afin d'éviter une prolifération anarchique de la cellule. CDK: cycline-dépendent kinase, CIP: CDK interacting protein, INK4: inhibitor kinase 4, KIP: Kinase inhibitory protein, pc: points de contrôles, pRb: protéine du rétinoblastome.

Dans le cas où la cellule détecte une anomalie à un des points de contrôle, l'apoptose ou la mort cellulaire programmée est déclenchée (Figure 10). Deux voies apoptotiques sont possibles, la voie intrinsèque induite, entre autre, par des dommages à l'ADN, et la voie extrinsèque *via* l'activation des récepteurs de la mort par un ligand extracellulaire (Taylor *et al.*, 2008).

L'activation de la voie intrinsèque est induite par la libération du cytochrome c des mitochondries vers le cytoplasme grâce, entre autre, à la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe. Les pores sont formés suite à l'hétérodimérisation des protéines BAX (BCL-2-associated X protein) et BAK (BCL-2 homologous antagonist/killer) et à l'inhibition de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (B-cell lymphoma 2). La libération du cytochrome c dans le cytoplasme va engendrer l'activation de l'apoptosome composé du cytochrome c, de la procaspase 9 et de APAF1 (apoptotic peptidase activating factor 1). L'apoptosome permet l'activation de la caspase initiateur 9, responsable du clivage des caspases effectrices 3, 6 et 7. La caspase initiateur 2 est activée quand à elle par des dommages à l'ADN. Enfin, la dégradation de la protéine inhibitrice iCAD (inhibitor of caspase activated DNase) par les caspases permet l'activation et la translocation nucléaire de la nucléase CAD qui va induire la fragmentation de l'ADN. La voie extrinsèque peut activer les caspases effectrices indépendamment de la libération du cytochrome c suite à l'activation des caspases initiateur 8 et 10 par les récepteurs de la mort et à la formation du complexe DISC (death inducing signaling complex). Cependant, la voie extrinsèque peut aussi activer la voie intrinsèque, notamment par clivage de la protéine pro-apoptotique BID (BH3 interacting domain death agonist) par la caspase 8 (Taylor *et al.*, 2008). La forme tronquée t-BID est requise pour la multimérisation de BAK et BAX.

Parmi les protéines intervenant dans la régulation des mécanismes d'apoptose, deux grandes familles ont été caractérisées. La première est la famille BCL-2 qui est divisées en trois classes: les protéines anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-x_L, BCL-w, MCL-1, DIVA...), les protéines pro-apoptotiques dites multi-domaines (BAX, BAK, BOK...) et les protéines pro-apoptotiques dites BH3-only (BID, BAD, BIK, BIM, NOXA, PUMA...). La seconde famille est celle des IAP (inhibitor of apoptosis) contenant des protéines telles que XIAP, cIAP ou la survivine (Taylor *et al.*, 2008).

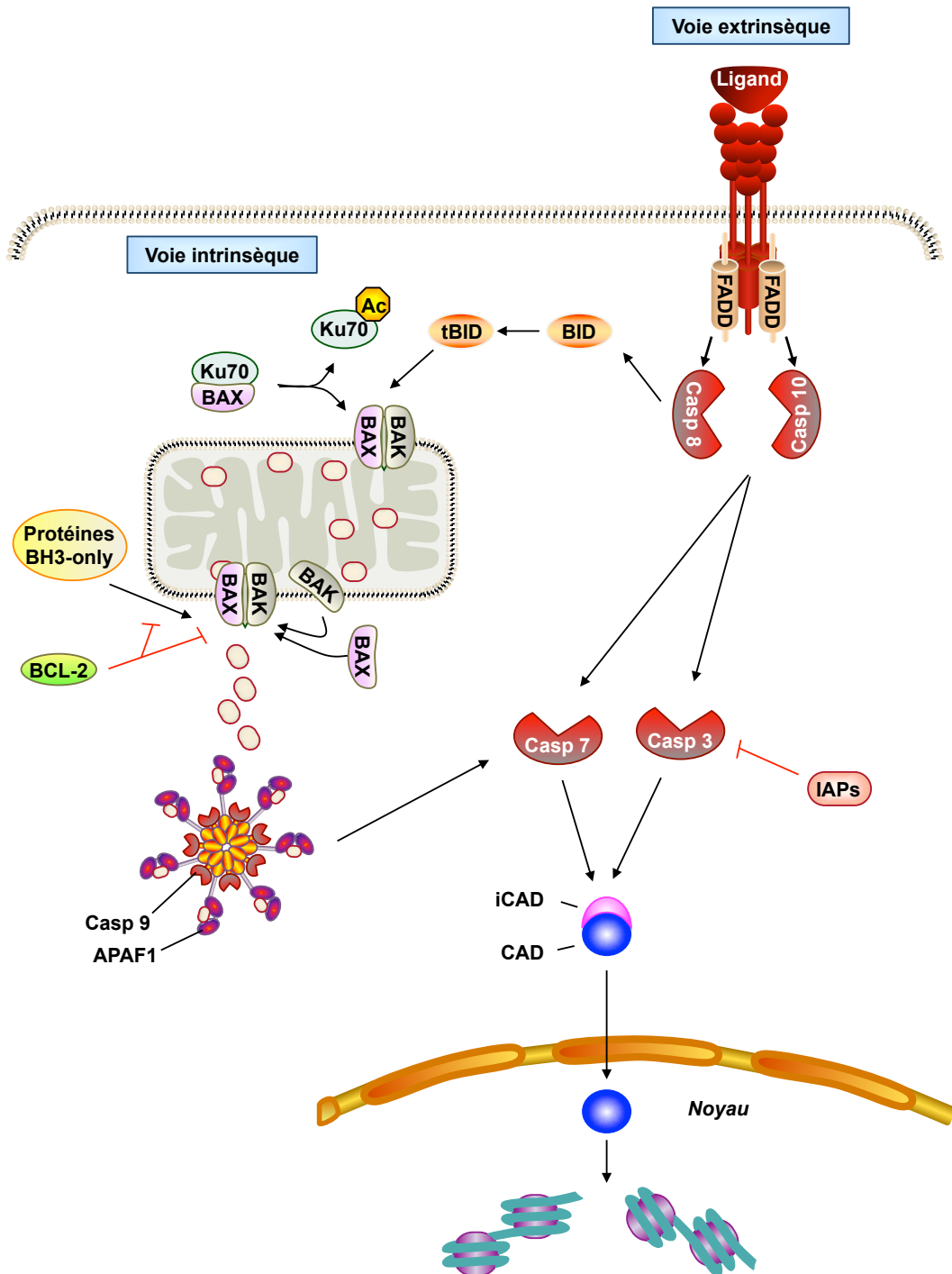


Figure 10: L'apoptose.

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est déclenchée par une activation des récepteurs de la mort (voie extrinsèque) ou par un signal intracellulaire comme des dommages à l'ADN suite à l'action d'agents anti-cancéreux ou des UV (voie intrinsèque). L'activation des caspases et la formation de pores dans la membrane mitochondriale (par les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK) induisent une libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Il y a, ensuite, une activation en cascade des caspases qui aboutit au clivage de nombreux substrats, dont la poly-ADP ribose polymérase (PARP). La fragmentation de l'ADN est réalisée suite à l'activation et la translocation nucléaire de la nucléase CAD [Adapté de (Taylor *et al.*, 2008)]. APAF1: Apoptotic protease activating factor 1, iCAD: inhibitor of caspase activated DNase, casp: caspase, FADD: Fas-associated protein with death domain.

Les cellules cancéreuses présentent des perturbations du cycle cellulaire. En effet, une activation d'oncogènes, comme Ras, ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, comme p53, peuvent modifier l'expression de gènes empêchant l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de séquences ADN endommagées. Les points de contrôle ne sont plus activés provoquant une instabilité génomique. Les cellules cancéreuses prolifèrent à l'infini et acquièrent des propriétés de résistance à l'apoptose. Les HDAC interviennent directement ou indirectement dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose en modifiant le statut d'acétylation de protéines impliquées dans ces mécanismes. L'acétylation de facteurs de transcription est contrôlée par les HDAC, ainsi p53 peut activer la transcription de p21 ou NF- κ B peut réguler l'expression de protéines anti- et pro-apoptotiques (Minucci *et al.*, 2006). L'activation des protéines impliquées dans les mécanismes de modulation du cycle cellulaire et de l'apoptose peut également être régulée par l'activité HDAC. Par exemple, l'activation de la protéine pro-apoptotique BAX dépend de son interaction avec Ku70 dont l'acétylation permet la libération de BAX qui peut alors se multimériser au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Subramanian *et al.*, 2011).

I.4.2.2. Les inhibiteurs des désacétylases d'histones

Contrairement aux modifications génétiques, les modifications épigénétiques sont potentiellement réversibles. Les enzymes impliquées dans ces modifications représentent donc des cibles de choix dans le cadre de la thérapie anti-cancéreuse. En particulier, un intérêt considérable s'est porté sur le développement d'inhibiteurs des HDAC (HDACi), au regard de leur implication dans la modulation de l'expression génique ainsi que dans la régulation de l'activité et des fonctions de nombreuses protéines non-histoniennes.

Dans les cellules saines, les promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs ne sont généralement pas méthylés et présentent un enrichissement des marques actives d'histones comme l'acétylation et la méthylation (H3K4, H3K79, H3R17), qui sont, respectivement, activement maintenues par les HAT et HMT. Les marques d'histones répressives (H3K9 et H3K27) sont maintenues non-méthylées par des HDM (déméthylases d'histones) spécifiques. Ces marques chromatiniennes favorisent le recrutement des complexes co-activateurs comme les complexes de remodelage de la

chromatine (SWI/SNF, switch/sucrose non-fermentable), les facteurs de transcription et l'ARN polymérase II, qui peut ainsi activer la transcription (Figure 11). Dans les cellules cancéreuses, certains gènes suppresseurs de tumeurs sont activement maintenus silencieux du à une hyperméthylation de leur promoteur établie et maintenue par les ADN méthyltransférases (DNMT). Cette hyperméthylation permet le recrutement des MBD (methyl binding domain protein) qui lient les CpG méthylés et favorisent le recrutement des complexes répresseurs (mSin3A ou SMRT/N-CoR) contenant des HDAC conduisant à l'hypoacétylation des histones. De plus, les méthylations dites "actives" (H3K4, H3K79) des histones sont éliminées par des HDM spécifiques et remplacées par des méthylations dites "répressives" (H3K9, H3K27, H3R2) par des HMT spécifiques. Ces modifications favorisent la condensation de la chromatine et bloquent le recrutement des facteurs de transcription et du complexe de l'ARN polymérase II.

Certains HDACi peuvent conduire à la réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs silencieux dans les tumeurs (Figure 11). De plus, par modulation de l'expression génique ainsi que de l'activité de protéines non-histoniques, l'inhibition de l'activité HDAC module la dégradation des protéines, induit la différenciation et l'apoptose, et inhibe l'expression de la télomérase et la progression du cycle cellulaire (Figure 11). De nombreuses structures chimiques ont déjà été identifiées en tant que HDACi. Ces molécules sont groupées selon leur structure chimique dans les cinq classes suivantes: les acides gras à chaîne courte, les benzamides, les depsipeptides, les hydroxamates et les peptides cycliques. Néanmoins, de nombreuses nouvelles molécules ont été identifiées récemment et possèdent des structures chimiques différentes de celles des classes précédemment citées. Les HDACi les mieux caractérisés sont présentés dans le Tableau 6 et la Figure 12, et une liste plus complète est exposée dans l'Annexe A1 (Khan *et al.*, 2008).

Les HDACi sont utilisés en thérapie anti-cancéreuse pour leurs propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques mais également pour leur capacité à induire la différenciation des cellules cancéreuses. Certains inhibiteurs possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires participant ainsi à l'effet anti-cancéreux.

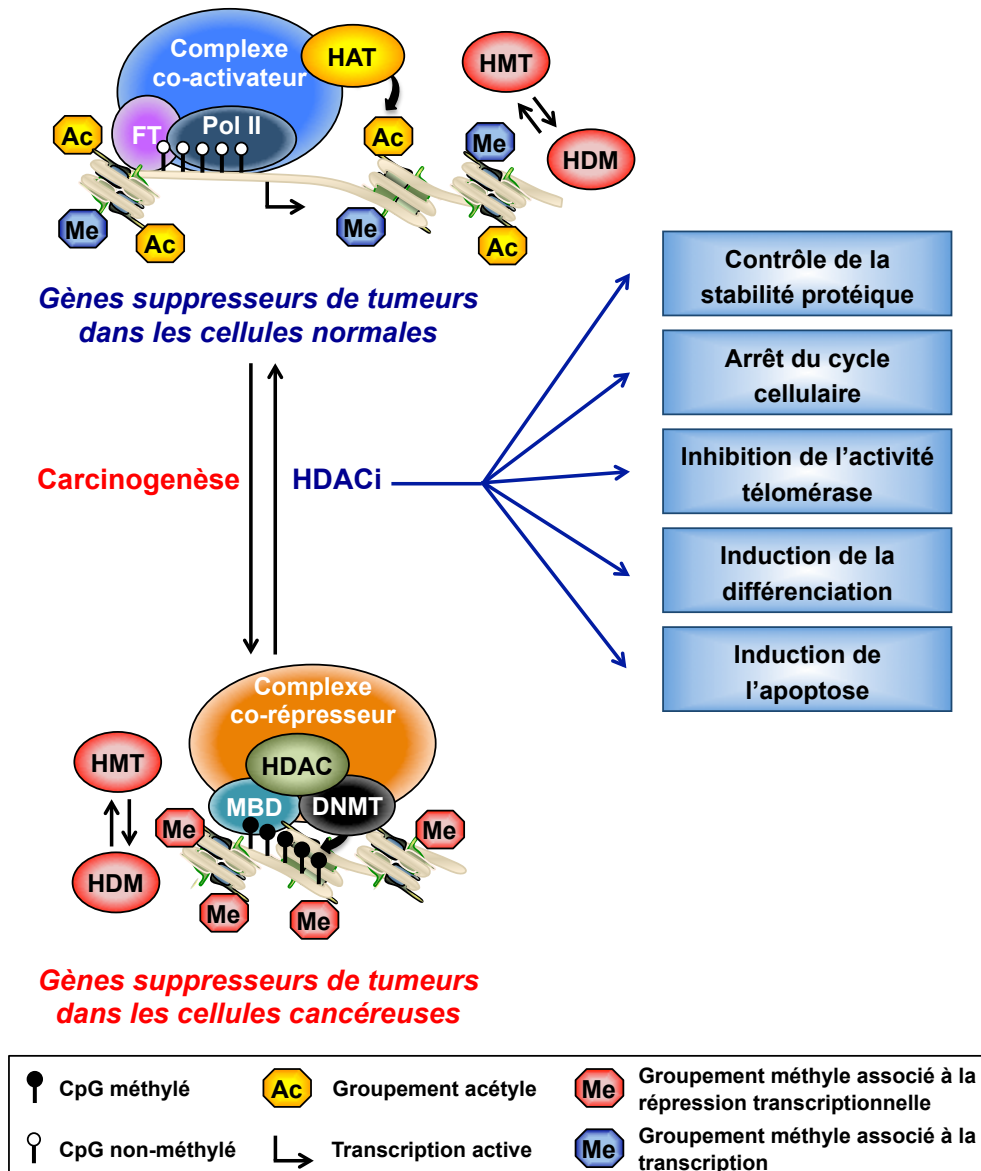


Figure 11: Effet des inhibiteurs de HDAC sur les cellules cancéreuses.

L'inhibition des HDAC permet de rétablir l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, induire la différenciation, l'apoptose, un arrêt de la prolifération, inhiber l'activité télomérase ainsi que moduler la dégradation protéasomale de protéines spécifiques dans les cellules cancéreuses. DNMT: ADN méthyltransférase, FT: facteur de transcription, HAT: acétyltransférase des histones, HDAC: désacétylase d'histone, HDACi: inhibiteur de HDAC, HDM: déméthylase d'histone, HMT: méthyl-transférase des histones, MBD: methyl binding domain protein, Pol II: ARN polymérase II.

Tableau 6: Liste des principaux inhibiteurs de HDAC.

Les noms alternatifs des composés sont indiqués entre parenthèses. <http://clinicaltrials.gov/>, <http://cancer.gov/clinicaltrials>. Un tableau plus complet des inhibiteurs de HDAC est présenté dans l'Annexe A1.

Classe chimique	Inhibiteurs	Origine	Cibles	Phase clinique (maladie)	Références
Acides gras à chaîne courte	Acide valproïque	Synthétique	Classes I et IIa	I (tumeur solide)	(Gurvich <i>et al.</i> , 2004)
	Butyrate de sodium	Fermentation des fibres alimentaires	Classes I et IIa et IV	Non applicable	(Davie, 2003)
Benzamides	MGCD0103 (Mocetinostat)	Synthétique	HDAC1, 2, 3 et 11	II (lymphome, leucémie, tumeur solide)	(Fournel <i>et al.</i> , 2008)
	MS-275 (Entinostat, SNDX-275)	Synthétique	HDAC1, 2, 3 et 11	II (mélanome métastatique)	(Saito <i>et al.</i> , 1999)
	Sirtinol	Synthétique	SIRT1, 2 et 3	Pré-clinique	(Grozinger <i>et al.</i> , 2001)
Depsipeptides	FK228 (Romidepsin, FR901228)	<i>Chromobacterium violaceum</i>	HDAC1, 2, 4 et 6	FDA en 2009 (LCT)	(Furumai <i>et al.</i> , 2002)
	Largazole	<i>Symploca sp.</i>	Classe I	Pré-clinique	(Ying <i>et al.</i> , 2008)
Hydroxamates	Spiruchostatines A à D	<i>Pseudomonas</i>	Classe I	Pré-clinique	(Crabb <i>et al.</i> , 2008)
	ITF2357 (Givinostat)	Synthétique	Classes I et II	II (néoplasmes myéloprolifératifs chroniques, myélome multiple)	(Leoni <i>et al.</i> , 2005)

Classe chimique	Inhibiteurs	Origine	Cibles	Phase clinique (maladie)	Références
Hydroxamates	JNJ-16241199 (R306465)	Synthétique	Classe I	I (cancers solides)	(Arts <i>et al.</i> , 2007)
	JNJ-26481585 (Quisinosat)	Synthétique	Classes I et II	I (cancers solides et lymphomes)	(Tong <i>et al.</i> , 2010)
	LBH-589 (Panobinostat)	Synthétique	Classes I, II et IV	III (LCT, LMC)	(Qian <i>et al.</i> , 2006)
	NVP-LAQ824 (Dacinostat)	Synthétique	Classes I et II	I (tumeurs solides et hématologiques)	(Catley <i>et al.</i> , 2003)
	PXD101 (Belinostat)	Synthétique	Classes I, II et IV	II (mésothéliome pleural malin, myélome multiple, LMA)	(Plumb <i>et al.</i> , 2003)
	Acide suberoylanilide hydroxamique (Vorinostat)	Dérivé synthétique de la trichostatine A	Classes I, II et IV	FDA en 2006 (LCT)	(Richon <i>et al.</i> , 1998)
	Trichostatine A	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Classes I, II et IV	Non applicable	(Woo <i>et al.</i> , 2007)
	Tubacine	Synthétique	HDAC6	Pré-clinique	(Namdar <i>et al.</i> , 2010)
	Tubastatine A	Synthétique	HDAC6 et 8	Pré-clinique	(Butler <i>et al.</i> , 2010)
	Peptides cycliques	Apicidine D	<i>Fusarium spp.</i>	Classes I et II	Pré-clinique
FR235222		<i>Acremonium sp.</i>	Classe I	Pré-clinique	(Petrella <i>et al.</i> , 2008)
Trapoxine A et B		<i>Corollospora</i>	Classe I	Pré-clinique	(Furumai <i>et al.</i> , 2001)
Divers	Allyl mercaptan	<i>Allium sp.</i>	ND	Pré-clinique	(Nian <i>et al.</i> , 2008)
	Diallyl disulfure	Ail	ND	Pré-clinique	(Druesne <i>et al.</i> , 2004)

Classe chimique	Inhibiteurs	Origine	Cibles	Phase (maladie)	Phase clinique	Références	
Divers	Dihydrocoumarine	<i>Melittous officinalis</i>	SIRT1 et 2	Pré-clinique	Pré-clinique	(Olaharski <i>et al.</i> , 2005)	
	Génistéine	Soja	ND	III (cancer prostate)	III (cancer de la prostate)	(Basak <i>et al.</i> , 2008)	
	Indole-3-carbinol	Choux-fleurs et brocolis	Classe I	III	III	(Bhatnagar <i>et al.</i> , 2009)	
	Nicotinamide	Endogène	SIRT1 et 2	Pré-clinique	Pré-clinique	(Tervo <i>et al.</i> , 2004)	
	Psammaplaine A	<i>Aphysinella rhax</i>	Classe I	Pré-clinique	Pré-clinique	(Kim <i>et al.</i> , 2007)	
	Sulforaphane cystéine	Légumes	Classes I et II	Pré-clinique	Pré-clinique	(Myzak <i>et al.</i> , 2004)	
	Suramine	Synthétique	SIRT1, 2 et 5	III (cancer prostate)	III (cancer de la prostate)	(Schuetz <i>et al.</i> , 2007)	

LCT: lymphomes cutanés à cellules T, LMA: leucémie myéloïde aiguë, LMC: leucémie myéloïde chronique, ND: non déterminé.

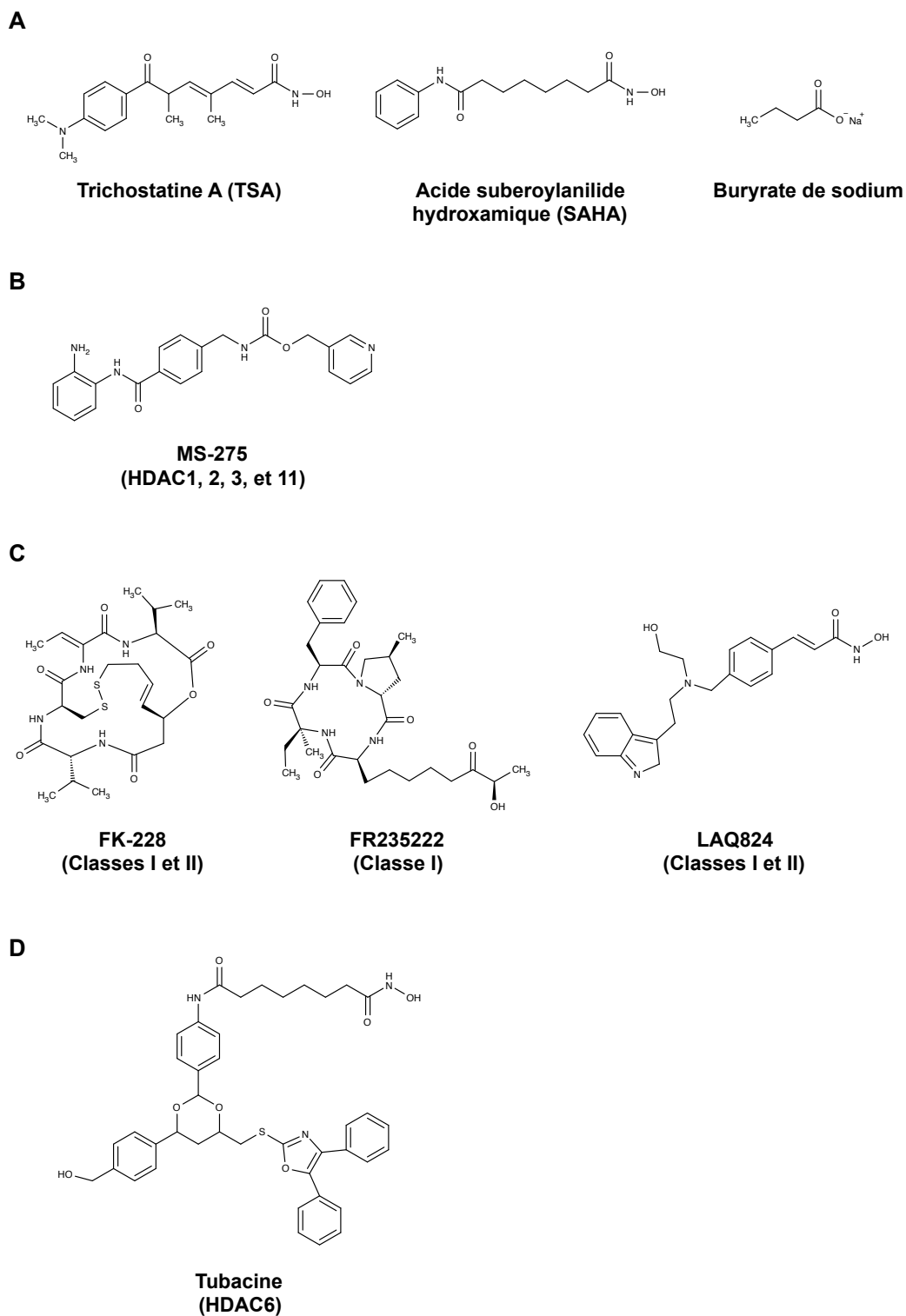


Figure 12: Structures d'inhibiteurs de HDAC.

Les structures chimiques d'inhibiteurs qui ciblent toutes les HDAC (A), d'inhibiteurs affectant plusieurs isoenzymes (B), d'inhibiteurs spécifiques d'une classe (C) ou d'une isoenzyme (D) sont présentées.

La trichostatine A (TSA) est un puissant inhibiteur qui ciblent plusieurs HDAC, de la classe des hydroxamates il provient de l'actinomycète *Streptomyces hygroscopicus* (Figure 12A). Cette molécule possède une activité antiproliférative, induit l'entrée des cellules en apoptose et réduit l'activité de la télomérase (Woo *et al.*, 2007). L'induction de l'apoptose des cellules leucémiques U-937 est associée à une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX, une diminution des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-x_L et un clivage des caspases et de PARP. La TSA inhibe l'activité de la télomérase *via* la diminution de l'expression de hTERT. La TSA induit également l'apoptose de cellules cancéreuses du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) sans affecter la viabilité des cellules non cancéreuses MCF-10A (Sun *et al.*, 2014). L'induction de l'apoptose survient après l'arrêt des cellules en phase G2/M et la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) suite à la réduction de l'activité de la chaîne respiratoire des mitochondries.

L'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA, Vorinostat) est un dérivé synthétique de la TSA (Figure 12A). Différentes études ont montré que le traitement avec le SAHA induit l'acétylation des histones dans divers modèles cellulaires, notamment au niveau du promoteur du gène codant p21 (Gui *et al.*, 2004; Gillenwater *et al.*, 2007). Cette hyperacétylation induit l'expression de p21 associée à un ralentissement de la croissance des cellules cancéreuses (Kumagai *et al.*, 2007). Le traitement des cellules cancéreuses pancréatiques par 5 µM de SAHA induit leur différenciation dès 48 heures de traitement (Kumagai *et al.*, 2007). De plus, le SAHA peut induire l'apoptose des cellules cancéreuses pancréatiques, de cancer du foie (HepG2 et Huh6), de carcinomes de la tête et du cou (HNSCC) ou encore de cellules HeLa à des concentrations comprises entre 2,5 et 10 µM (Shao *et al.*, 2004; Emanuele *et al.*, 2007; Gillenwater *et al.*, 2007; Kumagai *et al.*, 2007). Cependant, le traitement peut induire une mort cellulaire par autophagie dans le cas où les cellules ont une voie apoptotique défectueuse (Shao *et al.*, 2004). De plus, une autre équipe a montré que l'induction de l'apoptose par le SAHA est améliorée lorsque les mécanismes d'autophagie sont inhibés dans des cellules cancéreuses de colon (Carew *et al.*, 2010). Enfin, le traitement d'un cancer du foie par le SAHA en combinaison avec un inhibiteur du protéasome a un effet synergique sur l'induction de l'apoptose de ces cellules (Emanuele *et al.*, 2007). Le SAHA a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 2006 dans le cadre de traitement de LCT (Bradner *et al.*, 2010). En effet, 24% des patients traités avec le SAHA ont une réponse partielle et

58% montrent une amélioration clinique (Duvic *et al.*, 2007). De plus, le SAHA est utilisé en phase clinique III pour le traitement de cancer du poumon et en phase II pour le traitement des LMA, du cancer du sein, du poumon, de l'ovaire et de la thyroïde. Les résultats montrent une réponse partielle ou une stabilisation de la maladie, sauf pour les cancers de la thyroïde où aucune réponse n'a été observée. Cependant, des effets secondaires légers tels que la fatigue ou des nausées mais aussi graves comme un accident vasculaire cérébral, une embolie pulmonaire ou une neutropénie ont été observés suite au traitement (Luu *et al.*, 2008; Traynor *et al.*, 2009; Woyach *et al.*, 2009).

Le butyrate de sodium est un acide gras à chaîne courte produit par la fermentation des fibres alimentaires par une bactérie ananérobie (Figure 12A). Le traitement par ce composé a comme conséquence l'arrêt de croissance des cellules leucémiques et leur entrée en apoptose suite à une induction de la dégradation de la protéine anti-apoptotique BCL-2 *via* l'inhibition des HDAC des classes I, IIa et IV (Davie, 2003). De plus, le butyrate de sodium peut induire l'hyperacétylation des histones H3 et H4 au niveau du site Sp1 du promoteur de p18. Cette augmentation de l'acétylation induit le liaison de Sp1 au site et l'expression de p18, responsable d'un arrêt des cellules en phase G0/G1 et une différenciation des cellules K-562 vers la voie érythroïde (Li *et al.*, 2008a). Cependant, en raison de la faible stabilité de ce composé, son utilisation est limitée aux études *in vitro*.

Le MS-275 (Entionostat) est un benzamide synthétique qui inhibe les isoenzymes HDAC1, 2, 3 et 11 (Figure 12B). Le traitement de cellules leucémiques ou de lymphomes avec de faibles doses de MS-275 induit un arrêt de la prolifération avec une augmentation de l'expression de p21, l'hyperphosphorylation de pRb et la diminution de l'expression de la cycline D1. A faible concentration, le MS-275 induit la différenciation des cellules d'un lymphome histiocytaire U-937 avec l'induction de l'expression du marqueur de différenciation CD11b. Un traitement à plus forte dose induit une mort des cellules par apoptose avec une génération des DRO accompagnée de l'activation des caspases et de la dégradation des protéines PARP, p21, p27, BCL-2 et pRb et la diminution de l'expression de la cycline D1 et des protéines anti-apoptotiques MCL-1 et XIAP (Rosato *et al.*, 2003). Le MS-275 est testé en essais cliniques de phase II seul ou en combinaison pour des patients atteints de cancer du poumon, de leucémie, du sein ou de mélanome. Le MS-275 est bien toléré par les patients avec un mélanome métastatique et induit une stabilisation de la maladie chez

25% des patients. La combinaison de cette molécule avec un inhibiteur d'aromatase, l'exemestane, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein positif au RE induit l'acétylation des protéines et augmente la survie des patientes d'environ 20 mois comparé à l'exemestane seul (Yardley *et al.*, 2013). La poursuite des études cliniques du MS-275 seul ou en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques est alors nécessaire.

Le depsipeptide FK228 (Romidepsin) est une pro-drogue naturelle produite par *Chromobacterium violaceum* (Figure 12C). Cette molécule a un pont disulfure intramoléculaire qui est réduit dans les cellules. La forme réduite du depsipeptide interagirait avec l'ion zinc catalytique des isoenzymes de la classe I préférentiellement (Furumai *et al.*, 2002). *In cellulo*, le FK228 induit l'hyperacétylation de l'histone H3 associée à l'inhibition de la croissance cellulaire, l'induction de l'apoptose et de la différenciation de cellules de sarcomes (Liu *et al.*, 2008). De plus, il inhibe la fonction chaperonne de HSP90 de manière indirecte, contrairement aux inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC tel que le SAHA. HSP70 est impliquée dans l'assemblage des complexes HSP90-protéine cliente. Le FK228 induit l'hyperacétylation de HSP70 dans les cellules leucémique K-562, ce qui entraîne une inhibition de l'activité chaperonne de HSP90 et la dégradation de ses protéines clientes par le protéasome (Wang *et al.*, 2007b). Le FK228 a été approuvé par la FDA en 2009 pour le traitement des LCT (Bradner *et al.*, 2010). En effet, le traitement des patients par le FK228 donne un taux de réponse d'environ 35% entre 11 et 15 mois. De plus, cette molécule induit une toxicité faible et réversible et des effets secondaires légers (Piekarz *et al.*, 2009). Le FK228 est aussi testé en phase clinique II chez des patients atteints de néoplasme métastatique, de cancer de la prostate, du sein, du poumon, de la thyroïde, de la tête et du cou, de myélome multiple et de LMA.

Le peptide cyclique naturel FR235222 induit l'expression de p21 et inhibe la cycline E, responsables de l'accumulation des cellules en phase G1 [Figure 12C, (Petrella *et al.*, 2008)]. La structure cyclique de cette molécule sert de base pour la synthèse de dérivés ayant conservés les liaisons peptidiques (Singh *et al.*, 2008). Aucune étude clinique n'est actuellement en cours avec cette molécule.

L'hydroxamate synthétique LAQ824 (Dacinostat) inhibe les isoenzymes des classes I et II et inhibe la croissance de diverses cellules cancéreuses telles que les cellules cancéreuses de colon (H-1299 et HCT-116), de sein (MDA-435), de prostate (PC-3 et Du-145) et de poumon (A-549, Figure 12C). Cette molécule induit un arrêt

du cycle cellulaire *via* l'induction de gènes inhibiteurs de la progression du cycle comme p21 et p27 ainsi que la dégradation protéasomale de la protéine de fusion Bcr-Abl suite à l'augmentation de l'acétylation de sa chaperonne HSP90 dans des LMC (Nimmanapalli *et al.*, 2003). Dans des cellules de myélome multiple, LAQ824 induit un arrêt de la croissance cellulaire accompagné d'une augmentation de l'expression de p21 (Catley *et al.*, 2003). Une mort par apoptose avec une activation des caspases et un clivage de PARP sont observés dans des cellules résistantes à différents agents chimiothérapeutiques classiques. Ce composé inhibe aussi le protéasome et augmente donc l'accumulation de protéines polyubiquitinées. LAQ824 est testé en phase clinique I chez des patients atteints de cancers solides ou hématologiques. Le traitement induit l'acétylation de l'histone H3 et de HSP90 ainsi qu'une stabilisation de la maladie (de Bono *et al.*, 2008).

La tubacine est un hydroxamate synthétique spécifique de HDAC6 (Figure 12D). L'inhibition catalytique de HDAC6 par cette molécule induit une hyperacétylation de la tubuline- α engendrant une diminution de la vitesse de croissance et de la dynamique des microtubules ainsi qu'un blocage de la mobilité cellulaire (Tran *et al.*, 2007; Zilberman *et al.*, 2009). De plus, HDAC6 désacétyle la protéine Ku70 qui interagit avec la protéine pro-apoptotique BAX et la protéine anti-apoptotique FLIP. Le traitement des cellules par la tubacine induit l'acétylation de Ku70 qui perd son interaction avec ces deux protéines. BAX ainsi libéré induit une mort cellulaire par apoptose et FLIP est polyubiquitinée puis dégradée par le protéasome (Subramanian *et al.*, 2011; Kerr *et al.*, 2012). L'induction de l'apoptose par la tubacine dans des cellules de myélome multiple est médiée par une perte de l'interaction de HDAC6 avec la dynéine provoquant une accumulation des protéines ubiquitinées. Cette voie est potentialisée quand la tubacine est combinée à un inhibiteur du protéasome, le bortezomib (Hideshima *et al.*, 2005). Le co-traitement de la tubacine avec le bortezomib potentialise l'induction de l'apoptose aussi dans des cellules de lymphome de Burkitt positives pour le virus Epstein-Barr (Kawada *et al.*, 2009). La combinaison de la tubacine avec un inhibiteur de HSP90, le 17-AAG, potentialise l'induction de la mort des cellules leucémiques K-562 (Rao *et al.*, 2008). De la même manière, la tubacine potentialise les effets d'inhibiteurs de la topoisomérase II, l'étoposide et la doxorubicine, dans des cellules cancéreuses de prostate LNCaP et de sein MCF-7 (Namdar *et al.*, 2010). Aucune étude clinique n'est actuellement en cours avec cette molécule.

D'un point de vue thérapeutique, il serait intéressant de découvrir des activateurs la classe des sirtuines (classe III). Par exemple, le resveratrol (polyphénol) du raisin, induit SIRT1, responsable de la désacétylation de la survivine, déclenchant ainsi l'apoptose (Wang *et al.*, 2008). Cependant, l'inhibition de SIRT1 et 2 semblerait avoir aussi un effet positif contre le cancer. En effet, la dihydrocoumarine (polyphenol) isolé de *Melilotus officinalis*, inhibe ces enzymes, induit l'acétylation de p53 et l'entrée en apoptose (Olaharski *et al.*, 2005). De plus, la diminution de l'expression de SIRT1 par le salermide induit une augmentation de l'acétylation de p53 associée à l'induction de l'apoptose des cellules de cancer du sein MCF-7 (Dastjerdi *et al.*, 2013). De même, dans des carcinomes hépatocellulaires, l'inhibition de SIRT1 par le cambinol inhibe la prolifération et induit l'expression de marqueurs de différenciation (Portmann *et al.*, 2013). Les inhibiteurs de sirtuines cambinol et EX527 induisent la mort des cellules leucémiques et la combinaison de ces inhibiteurs avec des inhibiteurs des isoenzymes de HDAC des classes I, II et IV potentialise l'effet sur la mort cellulaire avec une activation des caspases 3 et 7 (Cea *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus au cours des essais cliniques montrent que le traitement par des HDACi induit divers effets secondaires tels que des désordres gastro-intestinaux, de la fatigue, une diminution des plaquettes et des globules blancs sanguins mais aussi cardiaque et métabolique (Subramanian *et al.*, 2010). Il semble alors nécessaire de poursuivre la recherche et le développement de nouvelles molécules afin de diminuer la toxicité des molécules vis-à-vis des cellules saines et de réduire les effets secondaires potentiellement engendrés par le traitement.

I.4.2.3. Les acides 4-hydroxybenzoïques

Un criblage *in vitro* nous a permis d'identifier une classe de composés synthétiques, des acides 4-hydroxybenzoïques. La structure chimique de ces molécules dérive des burkinabines (Figure 13).

Les burkinabines ont initialement été isolées à partir de la racine de la plante africaine *Fagara zanthoxyloides* connue pour ses effets sur les maladies sanguines (anémie falciforme, érythrocytes drépanocytaires). Les acides 4-hydroxybenzoïques proviennent du laboratoire du Prof Robert Kiss (Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles (ULB), Belgique). Le composé 7b est une molécule synthétisée suite à l'alkylation de l'acide benzoïque substitué. Le composé 6e a été synthétisé par

benzylation, alkylation et déprotection de l'acide benzoïque substitué. Les acides 4-hydroxybenzoïques 13a, 13b et 13c ont été synthétisés grâce à l'ajout de groupements fluor, chlore ou O-méthyl (Lamoral-Theys *et al.*, 2010).

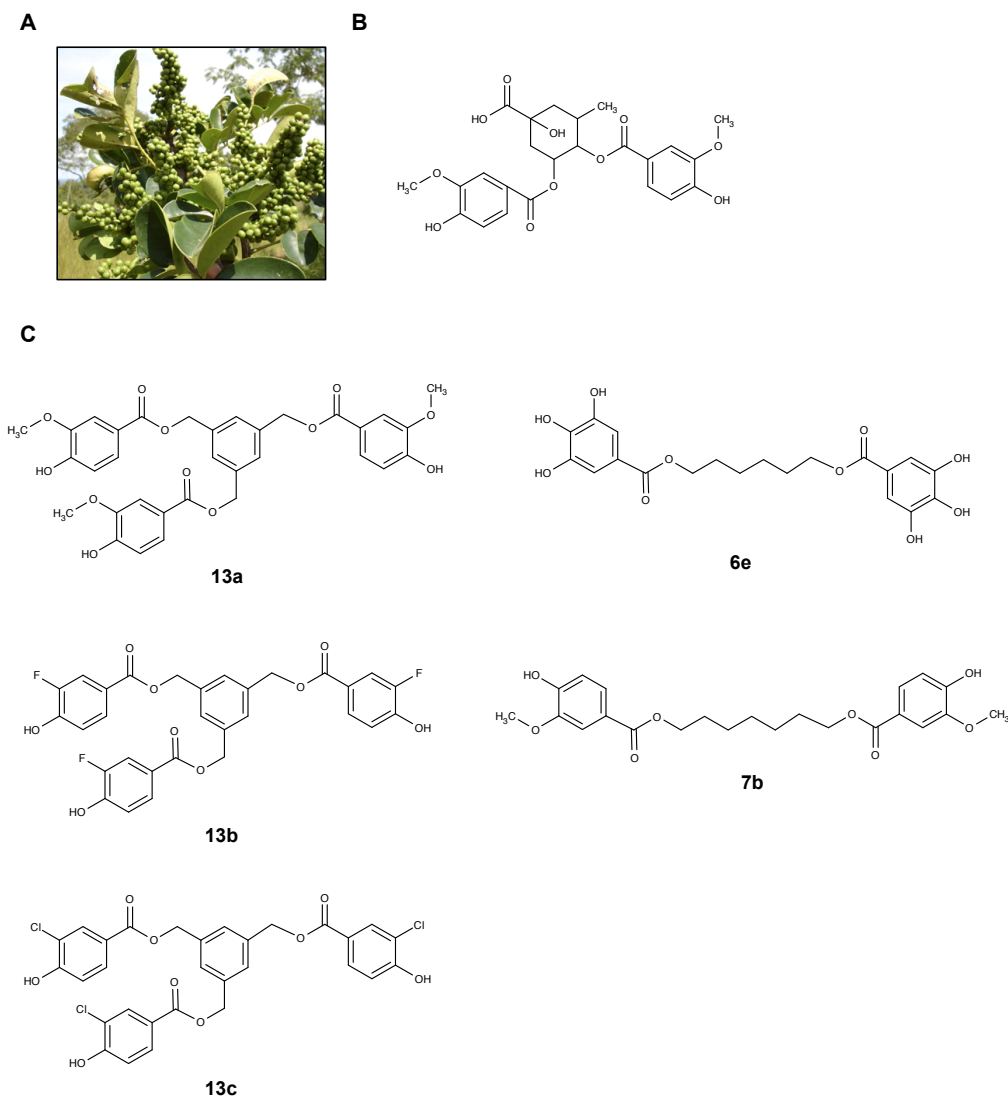


Figure 13: Structures chimiques d'acides 4-hydroxybenzoïques.

(A) La racine de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (<http://www.westafricaplants.senckenberg.de>) a permis l'extraction de burkinabines. (B) Parmi ces burkinabines, l'isomère B a servi de modèle à la synthèse d'acides 4-hydroxybenzoïques. (C) Les structures des acides 4-hydroxybenzoïques utilisés dans cette étude sont présentées.

II. Objectifs de l'étude

La famille des HDAC représente une cible de choix dans le cadre de la thérapie anti-cancéreuse du fait de leur implication dans la cancérogenèse. Par conséquent, de nombreux inhibiteurs de HDAC ont déjà été identifiés et testés pour leurs effets anti-cancéreux (Khan *et al.*, 2008). Cependant, uniquement deux molécules ont été approuvées par la FDA due notamment à une faible réponse des patients au traitement ou l'apparition d'effets secondaires (Subramanian *et al.*, 2010).

L'hypothèse générale de travail est qu'il existe dans la nature de nombreuses molécules ayant comme cible des mécanismes de régulation épigénétique et dont leur structure novatrice peut servir de base pour l'amélioration de leur potentiel anti-cancéreux. Ainsi, l'objectif principal de cette étude consiste en la recherche de nouveaux inhibiteurs de plusieurs HDAC ou spécifiques d'une isoenzyme, telle que HDAC6, possédant un potentiel anti-cancéreux avec une faible toxicité vis-à-vis des cellules saines.

Les données préliminaires d'un criblage *in vitro* ont permis l'identification d'une famille de molécules, les acides 4-hydroxybenzoïques, comme inhibiteurs de HDAC. Afin d'étudier si les acides 4-hydroxybenzoïques sont une famille de composés pouvant être des inhibiteurs de HDAC avec des propriétés anti-cancéreuses intéressantes, nous étudierons les points suivants:

1. Le profil d'inhibition des acides 4-hydroxybenzoïques sera analysé sur l'activité *in vitro* de différentes isoenzymes de HDAC en utilisant un test fluorimétrique. La suite de l'étude sera réalisée sur les molécules identifiées comme inhibiteurs de plusieurs isoenzymes dans une première partie et comme inhibiteurs spécifiques de HDAC6 dans une seconde partie.
2. Les molécules capables d'inhiber l'activité HDAC de plusieurs isoenzymes seront étudiées en premier lieu. La détermination de l'inhibition potentielle de plusieurs HDAC *in cellulo* par ces molécules et leur potentiel anti-cancéreux sera étudié. Afin de répondre à cet objectif, l'inhibition *in cellulo* des HDAC sera étudiée par l'analyse

par Western Blot du statut d'acétylation des protéines cibles des HDAC. L'étude du potentiel anti-cancéreux des molécules sera réalisée au travers de l'analyse de la prolifération et de la viabilité des cellules K-562 par un test d'exclusion du bleu de Trypan. Puis, la progression dans cycle cellulaire des K-562 sera évaluée par cytométrie en flux. De plus, l'expression des facteurs impliqués dans le cycle sera étudiée par PCR en temps réel et Western Blot. L'analyse d'un lien entre l'inhibition des HDAC et la modulation de l'expression de p21, un inhibiteur du cycle cellulaire, sera réalisée à travers l'étude du statut d'acétylation du promoteur de ce gène par ChIP. L'effet cytotoxique des molécules sera étudié plus en détail grâce à la détermination du type de mort cellulaire induit par un marquage au Hoechst et iodure de propidium ainsi qu'au travers de l'analyse par Western Blot du clivage des caspases et de l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques. Enfin la comparaison de l'effet des molécules sur la prolifération et la viabilité d'autres modèles cancéreux avec des modèles sains ou non cancéreux sera étudiée par un test d'exclusion du bleu de Trypan, un marquage au Hoechst et iodure de propidium ainsi que par cytométrie en flux.

3. En second lieu seront étudiées les molécules spécifiques *in vitro* de l'isoenzyme HDAC6. L'étude de l'effet des inhibiteurs spécifiques de HDAC6 sera réalisée dans trois modèles cellulaires cancéreux, les cellules K-562, PC-3 et LNCaP. Ainsi, l'effet des composés sur la viabilité et la prolifération des lignées cancéreuses et non cancéreuses sera analysé par un test d'exclusion du bleu de Trypan. Dans le but d'étudier l'inhibition de HDAC6 *in cellulo*, le statut d'acétylation de la tubuline- α sera évalué par Western Blot. Puis, l'évaluation de la structure du cytosquelette des cellules adhérentes par immunomarquage sera réalisée. L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux et du type de mort cellulaire induit par marquage au Hoechst et iodure de propidium, immunomarquage et Western Blot permettra d'émettre des hypothèses mécanistiques du lien entre l'inhibition de HDAC6 et la mort cellulaire induite. Enfin, l'effet des composés sur une autre protéine cible de HDAC6, la chaperonne HSP90 α , ainsi que sur les effets en aval sera étudiée par Western Blot.

III. Matériel et méthodes

III.1. Lignées et culture cellulaire

La description des lignées cellulaires cancéreuses (American Type Culture Collection, ATCC, USA) utilisées dans cette étude est présentée dans le Tableau 7.

La lignée MCF-10A est une lignée épithéliale non cancéreuse établie à partir de cellules adhérentes de glande mammaire. Ces cellules expriment les antigènes spécifiques du sein et ne présentent pas de signes de différenciation terminale et de sénescence.

Les cellules périphériques mononuclées sanguines (PBMC) ont été isolées grâce à une séparation en fonction de la densité à partir de couche leucocytaire issue de sang total frais provenant de donateurs sains humains avec le consentement et le respect de l'anonymat du patient (Croix Rouge, Luxembourg). Le sang est dilué trois fois dans du PBS 1x (phosphate buffered saline pH7, NaCl 8% ; KCl 0,2% ; Na₂HPO₄, 7H₂O 1,15% ; KH₂PO₄ 0,2%). Le sang dilué est ajouté doucement à 30% Ficoll-PaqueTM Premium (GE Healthcare) avant une centrifugation de 30 min à 400 g afin de créer un gradient de densité. Les leucocytes sont récupérés, lavés, comptés puis ensemencés à 5.10⁶ cellules / mL.

Les cellules en suspension sont centrifugées à 350 g pendant 7 minutes tous les trois jours et ensemencées à 2.10⁵ cellules / mL pour les cellules K-562, JURKAT, RAJI et U-937 et à 4.10⁵ cellules / mL pour les cellules TF-1. Les cellules adhérentes sont détachées de leur support par ajout de trypsine-EDTA (BioWhittaker®, Lonza) et sont ensemencées à 2.10⁴ cellules / cm². Les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide et équilibrée à 5% de CO₂.

Les cellules cancéreuses sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (BioWhittaker®, Lonza) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté (BioWhittaker®, Lonza) et de 1% (v/v) de solution d'antibiotiques (Streptomycine et Pénicilline) et d'antimycotique (BioWhittaker®, Lonza). La lignée TF-1 nécessite également l'ajout de 5 ng/mL de GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor). La lignée MCF-7 est maintenue dans du milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol. La lignée MCF-10A est maintenue dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle/F-12 (BioWhittaker®, Lonza) supplémenté de 5% (v/v)

de sérum de cheval décomplémenté (BioWhittaker®, Lonza), de 100 ng/mL de toxine de choléra (Sigma), de 0,5 mg/mL d'hydrocortisone (Sigma), de 10 mg/mL d'insuline (Sigma) et de 20 ng/mL de facteur de croissance épidermique humain recombinant (Sigma).

Tableau 7: Caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses utilisées.

Cancer	Lignée cellulaire	Organe de prélèvement	Caractéristiques cellulaires
Cancer du sein	MCF-7	Epanchement pleural	- Potentiel métastatique faible - Caractéristiques de cellules différenciées de l'épithélium mammaire - Sensibilité aux œstrogènes
	MDA-MB-231	Epanchement pleural	- Potentiel métastatique élevé - Expression des facteurs EGF et TGF α
Carcinome de la prostate	LNCaP	Métastase du ganglion sus-claviculaire gauche	- Potentiel métastatique faible - Bien différenciées - Expression des PSA et RA
	PC-3	Métastase osseuse	- Potentiel métastatique élevé - Faiblement différenciées
Leucémie	K-562 (LMC)	Moelle osseuse	Translocation entre les chromosomes 9 et 22 aboutissant à la protéine de fusion Bcr-Abl
	JURKAT (LLA)	Sang périphérique	Expression du récepteur à l'antigène des cellules T
	TF-1 (LMA)	Moelle osseuse	Culture dépendante de la cytokine GM-CSF
Lymphome	RAJI (Lymphome de Burkitt)	Maxillaire gauche	- Infection par le virus d'Epstein-Barr - Expression à la surface de FcR, CR1 et CR2
	U-937 (Lymphome histiocytaire)	Effusion pleurale	- Propriétés de phagocytose - Expression du proto-oncogène c-myc
Neuroblastome	SK-N-AS	Métastase de la moelle osseuse	Expression du facteur IGF-I

Bcr-Abl: breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene, CR1 et 2: C3b/C4b receptors, EGF: epidermal growth factor, FcR: Fc receptor, GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IGF-I: insulin-like growth factor, LMA: leucémie myéloïde aiguë, LMC: leucémie myéloïde chronique, LLA: leucémie lymphoblastique aiguë, PSA: prostate-specific antigen, RA: récepteur aux androgènes, TGF α : transforming growth factor α .

III.2. Traitement des cellules

Les solutions stocks de SAHA (Cayman Chemical Compagny), de la tubacine (Sigma) et de l'étoposide (VP16, Sigma) sont préparées dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). Le paclitaxel (Hospira), la vinblastine (Teva[®] Pharma) et le cisplatine (ONCO-TAIN[®], Hospira) sont en solution injectable au patient. L'hémine (Sigma) est préparée dans une solution contenant 2,5% d'éthanol absolu, 5 mM KOH dans du PBS 1x puis filtrée avec des filtres de 0,22 µm. Les cellules sont traitées en phase exponentielle de croissance.

III.3. Test de viabilité et de prolifération cellulaire

Le nombre de cellules viables est déterminé suite à un test d'exclusion au bleu de Trypan (BioWhittaker[®], Lonza). En effet, les cellules vivantes sont capables de rejeter activement le colorant dans le milieu extracellulaire, elles apparaissent alors blanches au microscope. Au contraire, les cellules mortes, ne possédant plus la capacité d'expulsion, apparaissent bleues. Les cellules sont comptées de manière semi-automatique grâce au compteur Cedex XS (Innovatis, Roche) qui fournit la concentration cellulaire ainsi que la viabilité.

III.4. Evaluation de l'apoptose par microscopie

L'étude microscopique des cellules est réalisée après le marquage de un million de cellules au Hoechst 33342 (InvitrogenTM) à 1 µg/mL pendant 15 minutes à 37°C puis dans une solution d'iodure de propidium (IP, Sigma, 1 µg/mL). Le Hoechst 33342 pénètre et colore les noyaux en bleu permettant, ainsi, d'observer la morphologie nucléaire. L'IP se lie aux bases des acides nucléiques mais ne pénètre que dans les cellules qui ont perdu l'intégrité de leur membrane, dénotant d'un état nécrotique ou apoptotique tardif. Ainsi, la numération des cellules apoptotiques, nécrotiques et vivantes peut être réalisée.

III.5. Evaluation de la différenciation érythroïde par le test à la benzidine

La différenciation des cellules K-562 vers la voie érythroïde est associée à une production d'hémoglobine. L'hémoglobine permet la transformation du peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire. Ce dernier oxyde la benzidine qui devient bleue et colore ainsi les cellules différenciées. Le test est réalisé avec de $3 \cdot 10^5$ cellules qui sont centrifugées 7 minutes à 350 g puis lavées avec du PBS 1x. Ensuite, les cellules sont incubées à l'obscurité avec 100 μ L de solution de chlorure de sodium 0,9% et 50 μ L du mélange benzidine (0,2% dans 0,5 M d'acide acétique, Sigma) et peroxyde d'hydrogène (110 volumes, Sigma). Après 20 minutes d'incubation, le mélange est dilué avec 300 μ L de chlorure de sodium 0,9% et les cellules positives à la benzidine sont comptées sur lame de Malassez.

III.6. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Un million de cellules est lavé au PBS 1x puis fixé à l'éthanol 70%. Après une incubation de 20 minutes à l'obscurité dans une solution d'IP (1 μ g/mL) et de ARNase (0,1 μ g/mL, Roche), les échantillons sont analysés par cytométrie en flux grâce à l'appareil FACS Calibur (BD) piloté par le logiciel Cell Quest Pro (BD) qui intègre les paramètres de taille, de granulosité et de fluorescence de chaque cellule. La détection du signal est basée sur la fluorescence de l'IP qui est fonction de la quantité d'ADN.

L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel FlowJo. Les doublets sont éliminés de la population grâce à la fonction de FL2A (correspondant à la fluorescence émise par l'IP en tenant compte de la surface de la cellule). La méthode Dean-Jet-Fox permet de définir les différentes phases du cycle cellulaire et d'obtenir le pourcentage de cellules dans chacune des phases.

III.7. Analyse des phases mitotiques

Les cellules sont colorées grâce au kit Diff-Quik (Medion Diagnostics) qui suit le même principe que la coloration au May-Grünwald-Giemsa. Ce kit permet de mettre en évidence les éléments cellulaires acides tel que l'ADN et basiques comme le cytoplasme. Ainsi, une solution de 100 μ L de PBS 1x contenant $2 \cdot 10^5$ cellules est

projetée sur une lame de verre par cyto centrifugation (Cytofuge[®]2 de STAT Spin) pendant 4 minutes à 700 tpm. Les lames obtenues sont trempées pendant 30 secondes dans des bains successifs contenant les solutions fixative, colorante I et colorante II puis rincées avec de l'eau neutre [1 L d'eau distillée additionné d'une pastille pour ajuster le pH à 6,8 (Buffer tablets, MERCK)]. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre puis les cellules sont analysées par microscopie. Basé sur la morphologie du noyau et la coloration cellulaire, les cellules des différentes phases de la mitose ou en interphase sont comptées.

III.8. Mesure de l'activité enzymatique désacétylase

L'activité de désacétylation des protéines est mesurée grâce à un substrat synthétique possédant des groupements acétyles, un fluorophore et un « quencher ». Une solution de « développeur » permet le clivage du substrat uniquement si il a été désacétylé libérant ainsi le groupement fluorescent et induisant l'émission de fluorescence (Figure 14).

Afin de tester l'effet des composés sur l'activité enzymatique de différentes isoenzymes de HDAC, les protéines recombinantes (Enzo) sont incubées avec un substrat (Enzo) et un tampon spécifique à l'isoenzyme. Le temps d'incubation à 37°C dépend également de l'isoenzyme testée. Les conditions optimisées sont présentées dans le Tableau 8. Après incubation du substrat avec la source enzymatique, la réaction est arrêtée par ajout d'une solution de « développeur » additionnée de SAHA (inhibiteur des HDAC des classes I, II et IV ; 1 μ M) ou de nicotinamide (inhibiteur des HDAC de la classe III ; 1 mM). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, la fluorescence est mesurée grâce à l'appareil Spectra MAX Gemini (Molecular Devices) piloté par le logiciel Soft Max Pro avec une longueur d'onde d'excitation à 360 nm et d'émission à 460 nm. La fluorescence basale émise par le substrat est soustraite de chaque échantillon, un contrôle du solvant, de l'activité HDAC et de l'inhibition de l'activité par le SAHA étant réalisé à chaque essai.

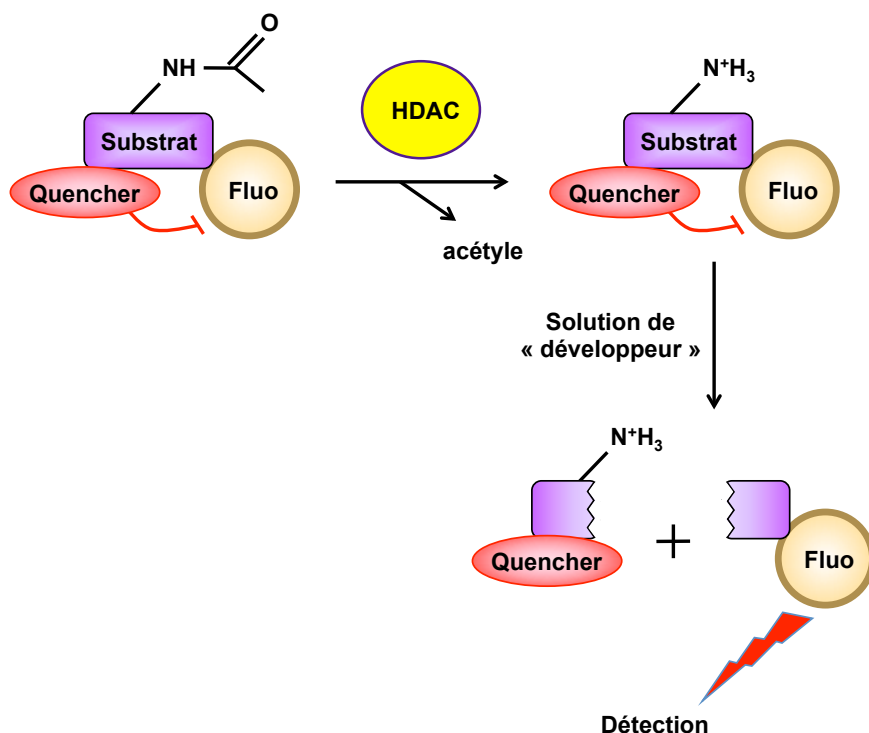


Figure 14: Principe de la mesure de l'activité HDAC *in vitro*.

Le substrat conjugué à un fluorophore (Fluo) est incubé en présence de protéines totales ou de protéines recombinantes purifiées possédant une activité de désacétylase (HDAC). La réaction est ensuite arrêtée par la solution de « développeur » contenant du SAHA. Le « développeur » clive le substrat uniquement s'il est désacétylé, libérant ainsi le fluorophore. La fluorescence émise est alors mesurée.

Tableau 8: Conditions utilisées pour la détection de l'activité enzymatique des isoenzymes des HDAC *in vitro*.

Le tampon d'incubation des isoenzymes HDAC1, 2, 3, 6, 10 et 11 ainsi que les SIRT1, 2 et 3 est composé de Tris-HCl pH8 50 mM ; NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; MgCl₂ 1mM et ASB 1 mg/mL. Le même tampon d'incubation est utilisé pour l'isoenzyme 8 mais additionné de 10% polyéthylène glycol.

Enzyme	Quantité d'enzyme (U/puits)	Substrat (concentration)	Cofacteur (concentration)	Temps d'incubation (min)
HDAC1	0,5	Fluor de lys-SIRT1 (10 µM)	NA	60
HDAC2	0,5	Fluor de lys-SIRT1 (20 µM)	NA	30
HDAC3	0,5	Fluor de lys-SIRT1 (10 µM)	NA	30
HDAC6	0,5	Fluor de lys-SIRT1 (10 µM)	NA	60
HDAC8	1	Fluor de lys-HDAC8 (50 µM)	NA	15
HDAC10	0,5	Fluor de lys-SIRT1 (20 µM)	NA	30
HDAC11	1	Fluor de lys-SIRT1 (10 µM)	NA	30
SIRT1	1	Fluor de lys-SIRT1 (50 µM)	NAD ⁺ (250 µM)	30
SIRT2	5	Fluor de lys-SIRT2 (50 µM)	NAD ⁺ (250 µM)	30
SIRT3	5	Fluor de lys-SIRT2 (25 µM)	NAD ⁺ (1000 µM)	30

NA: non applicable.

III.9. Extractions protéiques

III.9.1. Extraction des protéines totales

Des culots cellulaires de cinq millions de cellules sont suspendus avec une solution de MPER[®] (Thermo), d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche) et de SAHA (10 μ M). Les échantillons sont placés sous agitation douce pendant 10 minutes à température ambiante puis centrifugés 15 minutes à 14000 g à 4°C. Les protéines totales se trouvant dans le surnageant sont dosées par la méthode de Bradford avant d'être conservées à -80°C.

III.9.2. Extraction acide des protéines

Des culots cellulaires de cinq millions de cellules sont lysés après ajout de 1 mL de tampon de lyse (Tris-HCl pH8 10 mM ; KCl 1 mM ; MgCl₂ 1,5 mM ; DTT 1 mM ; inhibiteurs de protéases 1x) sous une agitation douce pendant 30 minutes à 4°C. Les noyaux sont collectés par centrifugation pendant 10 minutes à 10000 g à 4°C puis lysés dans 400 μ L d'acide sulfurique 0,4 N sous agitation douce pendant 30 minutes à 4°C. Après une centrifugation de 10 minutes à 13000 g, les surnageants sont transférés dans des nouveaux tubes auxquels est ajouté, goutte-à-goutte, de l'acide trichloracétique jusqu'à une concentration finale de 25%. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, les protéines sont centrifugées 10 minutes à 13000 g à 4°C. Les culots enrichis en histones sont lavés deux fois avec 500 μ L d'acétone froid puis sont suspendus dans 100 μ L d'eau. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Bradford avant d'être conservées à -80°C.

III.9.3. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires

Des culots cellulaires de cinq millions de cellules sont suspendus dans une solution de lyse des membranes cytoplasmiques (Hepes pH7,9 10 mM ; KCl 10 mM ; EDTA 0,1 mM ; EGTA 0,1 mM ; DTT 1 mM ; inhibiteur de protéases 1x ; SAHA 10 μ M). Les échantillons sont incubés 15 minutes sur la glace, puis 25 μ L d'Igepal[®] 10% sont ajoutés. Après une agitation vigoureuse pendant 10 secondes suivie d'une centrifugation pendant 30 secondes à 13000 g à 4°C, les surnageants contenant la fraction cytoplasmique sont collectés. Les culots sont suspendus dans une solution de lyse des noyaux (Hepes pH7,9 20 mM ; NaCl 400 mM ; EDTA 1 mM ; EGTA

1 mM ; glycérol 20% ; DTT 1 mM ; inhibiteur de protéases 1x ; SAHA 10 μ M). Après une agitation vigoureuse à 4°C pendant 15 minutes, les surnageants contenant la fraction nucléaire sont récupérés après 15 minutes de centrifugation à 4°C à 13000 g. Les protéines de chaque fraction sont dosées par la méthode de Bradford puis conservées à -80°C.

III.9.4. Isolation des fractions solubles et insolubles

Des culots cellulaires de cinq millions de cellules sont incubés pendant 5 minutes sur la glace dans 1 mL d'une solution de lyse (PIPES pH6,9 0,1 M ; glycérol 2 M ; MgCl₂ 5 mM ; EGTA 2 mM ; Triton X-100 0,5% ; inhibiteurs de protéases 1x ; paclitaxel 4 μ M). Après une centrifugation de 45 minutes à 16000 g à 4°C, le surnageant contenant la fraction soluble est récupéré et dosé par la méthode de Bradford. Le culot contenant la fraction insoluble est suspendue dans 100 μ L d'une solution d'urée (Tris-HCl pH6,8 62,5 mM ; l'urée 6 M ; SDS 2% ; glycérol 10% ; bleu de bromophénol 0,00125%) et lysés pendant 2 minutes par 4 cycles de sonication à 4°C dans un bain à ultrasons (Bioruptor®, Diagenode) à la puissance maximale. Les échantillons sont conservés à -80°C.

III.9.5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

A 160 μ L d'une dilution appropriée de chaque échantillon sont additionnés 40 μ L de réactif de Bradford (Biorad). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, l'absorbance est lue à 590 nm grâce à l'appareil SpectraCount™ (Canberra Packard) piloté par le logiciel Plate-reader. L'équation de droite de la gamme standard d'albumine de sérum bovin (ASB, de 1 à 20 μ g / mL) permet de déterminer la concentration protéique des échantillons.

III.10. Western Blot

Les protéines, additionnées de tampon Laemmli (Tris-HCl pH6,8 0,125 M ; glycérol 20% ; SDS 4% ; 2- β -mercapto-éthanol 5% ; bleu de bromophénol 0,005%), sont dénaturées puis chargées sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration 4% (Tris-HCl pH6,8 125 mM ; SDS 0,1% ; ammonium persulfate 0,1% ; TEMED 0,1 % v/v ; acryl/bisacry 37,5:1 4%,) et d'un gel de séparation dont le

pourcentage est ajusté selon la taille de la protéine d'intérêt (Tris-HCl pH8,8 373 mM ; SDS 0,1% ; ammonium persulfate 0,1% ; TEMED 0,1 % v/v ; acryl/bisacry 37,5:1). Après migration, les membranes PVDF (polyvinylidene fluoride) sont activées pendant 10 secondes dans du méthanol et incubées, ainsi que les gels, 10 minutes dans du tampon de transfert. Le transfert est réalisé 1h à 100 Volts constants à froid. Les membranes sont ensuite incubées avec l'agent bloquant, l'anticorps primaire puis secondaire dans les conditions optimisées présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9: Conditions d'utilisation des anticorps pour les Western Blots.

La dénaturation des échantillons est réalisée pendant 5 minutes à 100°C, hormis pour la détection de PARP (poly-ADP ribose polymérase) et de sa forme clivée où la dénaturation est faite à 80°C pendant 5 minutes. La saturation des membranes est réalisée 1 heure à température ambiante dans du PBS-Tween contenant 5% d'agent bloquant. Les anticorps primaires sont incubés toute la nuit à 4°C dans du PBS-Tween contenant 5% d'agent bloquant ; et les anticorps secondaires (Santa Cruz) sont incubés 1 heure à température ambiante dans du PBS-Tween contenant 5% de lait.

Cible Nom	Anticorps primaire			Anticorps secondaire		
	Taille (kDa)	Fournisseur (Référence)	Saturation de la membrane	Agent bloquant, dilution de l'anticorps	Hôte	Dilution de l'anticorps
Actine- β	42	Sigma (A5441)	Lait	Lait, 1/20000	Souris	1/10000
BCL-2	25	Calbiochem (OP60)	Lait	Lait, 1/2000	Souris (BD Pharmingen)	1/5000
BCL-x _L	32	BD Biosciences (610212)	Lait	Lait, 1/1000	Lapin	1/4000
Bcr-Abl	210 et 120	Santa Cruz (sc- 131)	Lait	Lait, 1/250	Lapin	1/2500
BIM	12, 15 et 23	Cell Signalling (2819)	Lait	ASB, 1/1000	Lapin	1/4000
Caspase 3	17/19 et 35	Cell Signalling (9668)	Lait	Lait, 1/1000	Souris	1/4000
Caspase 7	20, 30 et 35	Cell Signalling (9494)	Lait	Lait, 1/1000	Souris	1/2000
Caspase 8	18, 43, 57	Cell Signalling (9746)	Lait	ASB, 1/1000	Souris	1/4000
Caspase 9	10, 35 et 47	Cell Signalling (9502)	Lait	Lait, 1/1000	Lapin	1/10000
Cdk2	34	Santa Cruz (sc- 163)	Lait	Lait, 1/2000	Lapin	1/5000
Cdk2 phosphorylé	34	Santa Cruz (sc- 101656)	ASB	ASB, 1/2000	Lapin	1/5000
Cycline A	55	Cell Signalling (4656S)	Lait	Lait, 1/2000	Souris	1/5000
Cycline B1	58	Upstate (5373)	Lait	Lait,	Souris	1/5000

					1/2000		
Cycline D1	36	Cell Signalling (2926)	Lait	ASB, 1/2000	Souris	1/5000	
Cycline E	48 et 56	Cell Signalling (4129)	Lait	ASB, 1/1000	Souris	1/5000	
GRP78	78	Santa Cruz (sc-13968)	Lait	Lait, 1/1000	Lapin	1/4000	
HDAC6	160	Santa Cruz (sc-11420)	Lait	Lait, 1/2500	Lapin	1/1000	
Histone H4	14	Millipore (05-858)	ASB	Lait, 1/25000	Lapin	1/5000	
Histone H3K9 acétylée	17	Millipore (1692626)	Lait	Lait, 1/20000	Lapin	1/5000	
Histone H3K14 acétylée	17	Millipore (1548623)	Lait	Lait, 1/20000	Lapin	1/10000	
Histone H4 acétylée	14	Upstate (31992)	ASB	Lait, 1/50000	Lapin	1/5000	
Histone H4K8 acétylée	14	Millipore (1676174)	ASB	ASB, 1/10000	Lapin	1/5000	
Histone H4K16 acétylée	14	Millipore (1687546)	Lait	Lait, 1/10000	Lapin	1/5000	
HSP90α	90	Stressgen (SPA-840)	Lait	Lait, 1/10000	Rat	1/5000	
Ku70	70	Abcam (ab92450)	Lait	Lait, 1/5000	Lapin	1/10000	
Lamine B	65	Santa Cruz (sc-6216)	Lait	Lait, 1/1000	Chèvre	1/5000	
Lysine acétylée		Millipore (AB3879)	ASB	ASB, 1/5000	Lapin	1/5000	
MCL-1	40	Cell Signalling (5472)	ASB	ASB, 1/1000	Lapin	1/4000	
p21	21	Santa Cruz (sc-817)	Lait	Lait, 1/1000	Souris	1/4000	
PARP	24, 89 et 116	Cell Signaling (9542)	Lait	Lait, 1/1000	Lapin	1/4000	
PCNA	34	Santa Cruz (sc-9857)	Lait	Lait, 1/30000	Lapin	1/30000	
Récepteur aux androgènes	110	Cell Signaling (3202)	Lait	ASB, 1/1000	Lapin	1/2000	
Tubuline-α	55	Calbiochem (CP06)	Lait	Lait, 1/5000	Souris	1/5000	
Tubuline-α acétylée	55	Santa Cruz (sc-23950)	Lait	Lait, 1/1000	Souris	1/5000	
XIAP	57	BD Biosciences (61763)	Lait	Lait, 1/1000	Souris	1/5000	

L'actine- β et la lamine B ont été utilisées comme contrôles de chargement des gels sauf pour les gels utilisés pour l'analyse des histones et de leur acétylation. Ces derniers ont été colorés avec une solution de bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0,05% p/v ; méthanol 50% ; acide acétique 10%) afin de révéler l'histone H1. La décoloration est réalisée avec un mélange de méthanol (20%) et d'acide acétique (10%) et les gels sont photographiés grâce à l'appareil Molecular Imager[®] Gel Dox[™] XR (BioRad) piloté par le logiciel Quantity One[®]. Le signal de chimio-luminescence est révélé grâce au kit ECL Plus Western Blotting Detection System et l'acquisition est réalisée avec le système ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare).

La quantification des blots est réalisée grâce au logiciel ImageQuant TL en utilisant la méthode de soustraction du bruit de fond Rolling Ball. Les rapports d'intensités entre la protéine d'intérêt et la protéine de référence sont rapportés par rapport au contrôle solvant et sont présentés sous forme d'histogramme sous les blots.

III.11. Marquage intracellulaire

Les cellules en suspension ou adhérentes (5 millions) sont cultivées dans des chambres de culture sur lame (Millicell[®] EZ slide, Millipore), lavées avec du PBS 1x puis fixées pendant 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité avec 2% de paraformaldéhyde-PBS 1x. Les membranes cellulaires sont perméabilisées suite à une incubation de 8 minutes à température ambiante avec 0,1% de Triton X-PBS 1x. Les cellules sont ensuite incubées séquentiellement avec les anticorps primaires et secondaires aux concentrations indiquées dans le Tableau 10 pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, les échantillons sont incubés 10 minutes à température ambiante avec 1 µg/mL de Hoechst 33342 et analysés par microscopie à fluorescence.

Tableau 10: Conditions d'utilisation des anticorps pour le marquage intracellulaire.
Les anticorps secondaires sont dilués au 1/100 et proviennent de Invitrogen[™].

Anticorps primaire	Fournisseur (référence)	Dilution des anticorps primaires	Anticorps secondaire (référence)
BAX 6A7	Santa Cruz (sc-23959)	1/50	Souris (A11031)
HDAC6	Santa Cruz (sc-11420)	1/100	Lapin (A11036)
Tubuline-α	Calbiochem (CP06)	1/100	Souris (A11029)

III.12. Analyse de l'expression génique

III.12.1. Extraction des ARN

L'extraction des ARN est réalisée à partir d'un million de cellules, grâce au kit NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel). Suite à la lyse cellulaire et l'élimination des débris, les acides nucléiques sont retenus sur une colonne de silice. L'ADN est ensuite dégradé par une incubation avec de l'ADNase, et les ARN sont lavés et élués. La concentration des ARN est calculée à partir de l'absorbance des échantillons à 260 nm (NanoDrop) et ces derniers sont conservés à -80°C.

III.12.2. Transcription inverse

Un mélange de un μg d'ARN et de 0,5 μg d'oligo-dT est incubé à 70°C pendant 10 minutes afin de dénaturer l'ARN, suivie d'une incubation de 5 minutes à 4°C. A ce mélange, sont ajoutés, du tampon de transcriptase inverse 1x (Tris-HCl pH8,3 50 mM ; KCl 40 mM ; DTT 10 mM ; MgCl_2 7 mM), 0,5 mM de chaque dNTP, 10 mM DTT, 40 unités d'inhibiteur de ARNase et 50 unités de transcriptase inverse SuperScript II (Invitrogen™). La réaction de transcription inverse est réalisée à 42°C pendant 1h30 puis l'enzyme est inactivée pendant 15 minutes à 70°C. Enfin, les ARN sont digérés par 1,5 unités de ARNase H à 37°C pendant 20 minutes, et les ADNc sont conservés à -20°C.

III.12.3. Amplification par PCR en temps réel

L'amplification de 8 ng d'ADNc est réalisée en présence de Power SYBR® Green PCR Master Mix 1x (Applied Biosystem) additionné de 0,1 μM d'amorces sens et anti-sens spécifiques des gènes d'intérêts (Tableau 11). L'amplification et la détection de la fluorescence des produits de PCR sont réalisées dans un appareil à PCR en temps réel (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems) piloté par le logiciel 7300 System software suivant le programme: 40 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et d'une étape d'hybridation et d'amplification à 60°C pendant 60 secondes. Une courbe de dissociation est réalisée afin de s'assurer que lors de la réaction d'amplification, il n'y a pas eu d'amplification de produits aspécifiques, ni de formation de dimères d'amorces. Les données sont obtenues sous formes de Ct (cycle threshold) qui correspondent au nombre de cycles nécessaire à la détection des produits de PCR. Les résultats sont analysés grâce l'équation suivante: $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct gène cible} - \text{Ct gène rapporteur})}$, le gène rapporteur utilisé dans cette étude étant l'actine- β .

III.12.4. Immunoprécipitation de la chromatine

Dix millions de cellules à une concentration de 5.10^5 cellules / mL sont incubées pendant 8 minutes à température ambiante avec 0,8% de formaldéhyde (MP Biomedical) sous agitation afin de créer des liaisons covalentes entre les molécules d'ADN et protéiques. L'action du formaldéhyde est stoppée par l'ajout de 0,125 M de glycine. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante sous agitation, les

cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1x à 4°C. Les cellules sont lysées avec 1 mL de tampon de lyse cellulaire (Tableau 12) pendant 15 minutes à 4°C sous agitation douce puis centrifugées 5 minutes à 2500 g à 4°C. Les noyaux sont suspendus dans 300 µL de tampon de lyse nucléaire et incubés 10 minutes sur la glace. La chromatine est ensuite fragmentée pendant 4 minutes par 8 cycles de sonication (alternance 30 secondes ON, 30 secondes OFF) à 4°C dans un bain à ultrasons (Bioruptor®) à la puissance maximale. Les débris sont éliminés par centrifugation 10 minutes à 14000 g à 4°C, et la chromatine fragmentée est transférée dans de nouveaux tubes. Afin de diminuer le bruit de fond de l'immunoprécipitation, 35 µL de suspension de protéine A agarose conjuguée (Millipore) sont ajoutées aux échantillons qui sont incubés 30 minutes à 4°C sous agitation douce puis centrifugés 5 minutes à 350 g à 4°C. La chromatine est diluée 10 fois dans du tampon de dilution et un volume correspondant environ à 2 millions de cellules est utilisé par immunoprécipitation. Les anticorps primaires pour l'immunoprécipitation sont ajoutés aux dilutions indiquées dans le Tableau 13 et les échantillons sont incubés toute la nuit à 4°C sous agitation douce.

En parallèle, 10% de la chromatine diluée est conservée à 4°C et servira d'input. Après l'incubation, 25 µL de suspension de protéine A agarose conjuguée sont ajoutés aux échantillons qui sont incubés 2 heures à 4°C sous agitation douce puis centrifugés 3 minutes à 350 g à 4°C. Cette étape permet de précipiter les complexes anticorps-antigènes qui seront lavés successivement par les tampons de lavage 1, 2, 3, le tampon Tris-EDTA (TE) additionné d'inhibiteurs de protéases puis par le tampon TE sans inhibiteurs de protéases. Afin de défaire les interactions entre les anticorps, les billes et les protéines, 60 µL de tampon d'élution sont ajoutés et les échantillons sont vigoureusement agités pendant 10 minutes à température ambiante puis centrifugés 3 minutes à 350 g à 4°C. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes. Pour inverser les liaisons covalentes, le volume des inputs est réajusté à 120 µL et dans tous les échantillons sont ajoutés 200 mM de NaCl et 125 µg/mL d'ARNase qui sont incubés 5 heures au bain-marie à 67°C. Les protéines sont digérées 1 heures à 45°C suite à l'ajout de 10 mM d'EDTA pH8, 40 mM de Tris-HCl pH6,5 et 300 µg/mL de protéinase K. L'ADN est purifié grâce au kit QIAquick PCR purification (QIAGEN) avec un volume d'élution de 85 µL et analysé par PCR en temps réel (voir III.12.3) grâce aux amorces présentées dans le Tableau 14. Les données sont obtenues sous forme de Ct et sont analysées afin d'exprimer les résultats

sous forme d'enrichissement spécifique au promoteur. Cet enrichissement correspond à la fraction totale / input de la protéine d'intérêt auquel la fraction totale / input de l'IgG a été soustraite.

Tableau 11: Séquences des oligo-nucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR en temps réel.

Le nom des gènes cibles, les séquences sens (s) et les séquences anti-sens (as) sont indiqués.

Gène cible	Séquence
<i>Actine-β</i>	s: 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' as: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
<i>BAX</i>	s: 5'-GGGGACGAACTGGACAGTAA-3' as: 5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'
<i>BIM EL</i>	s: 5'-CAACACAAACCCCAAGTCCT-3' as: 5'-TCTTGGGCGATCCATATCTC-3'
<i>BIM LEL</i>	s: 5'-AGATCCCCGCTTTTCATCTT-3' as: 5'-TACCCACTGGAGGATCGAGA-3'
<i>BIM SLEL</i>	s: 5'-AATTACCAAGCAGCCGAAGA-3' as: 5'-CAATGCATTCTCCACACCAG-3'
<i>CDKN1A (p21)</i>	s: 5'-GACTCTCAGGGTCGAAAACG-3' as: 5'-GGATTAGGGCTTCCTCTTGG-3'
<i>CDKN1B (p27)</i>	s: 5'-AATAAGGAAGCGACCTGCAA-3' as: 5'-GGGGAACCGTCTGAAACATT-3'
<i>CDKN1C (p57)</i>	s: 5'-AGAGATCAGCGCCTGAGAAG-3' as: 5'-TGGGCTCTAAATTGGCTCAC-3'
<i>CDKN2C (p18)</i>	s: 5'-TGCACAAAATGGATTTGGAA-3' as: 5'-CGAAACCAGTTCGGTCTTTC-3'
<i>CDKN2D (p19)</i>	s: 5'-CCGTGGGGTTATGTATCAG-3' as: 5'-AAGCCACAACTGTGCTCCT-3'
<i>PCNA</i>	s: 5'-GGCGTGAACCTCACCAGTAT-3' as: 5'-AGGTATCCGCGTTATCTTCG-3'
<i>TP73 (p73)</i>	s: 5'-CCCACCACTTTGAGGTCAC-3' as: 5'-TTCTTCAAGAGCGGGGAGTA-3'

Tableau 12: Solutions pour l'immunoprécipitation de la chromatine.

Toutes les solutions, sauf celle utilisée pour l'élution, contiennent un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free).

Solutions	Composition	Concentrations finales
Lyse cellulaire	PIPES	5 mM
	KCl	85 mM
	Igepal®	0,5%
Lyse nucléaire	Tris-HCl pH8.1	50 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	1%
Dilution	SDS	0,01%
	Triton X-100	1,1%
	EDTA	1,2 mM
	Tris-HCl pH8.1	16,7 mM
	NaCl	167 mM
	Complete EDTA-free	1x
Lavage 1	SDS	0,1%
	Triton X-100	1%
	EDTA	2 mM
	Tris-HCl pH8.1	20 mM
	NaCl	150 mM
	Complete EDTA-free	1x
Lavage 2	SDS	0,1%
	Triton X-100	1%
	EDTA	2 mM
	Tris-HCl pH8.1	20 mM
	NaCl	500 mM
	Complete EDTA-free	1x
Lavage 3	EDTA	1 mM
	Tris-HCl pH8.1	10 mM
	LiCl	250 mM
	Igepal®	1%
	Deoxycholic acid	1%
	Complete EDTA-free	1x
Tris-EDTA (TE)	EDTA	1 mM
	Tris-HCl pH8.1	20 mM
	Complete EDTA-free	1x
Elution	NaHCO ₃	50 mM
	SDS	1%

Tableau 13: Conditions d'utilisation des anticorps pour l'immunoprécipitation de la chromatine.

Cible	Anticorps	
	Fournisseur (Référence)	Dilution
ARN Polymérase II	Upstate (31992)	1/300
Histone H4 acétylée	Upstate (31992)	1/600
IgG souris normal	Santa Cruz (sc-2025)	1/600

Tableau 14: Séquences des oligo-nucléotides utilisés pour les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.

Les séquences sens (s) et les séquences anti-sens (as) sont indiquées.

Promoteur ciblé	Localisation par rapport au site d'initiation de la transcription	Séquence
BIM	-0,2 kb	s: 5'-GGAGGCTAGGGTACACTTCG-3' as: 5'-GGCGTGTTTACCGGAGTAAC-3'
p21	+1 kb	s: 5'-CCGAAGTCAGTTCCTTGTGG-3' as: 5'-CGCTCTCTCACCTCCTCTGA-3'

III.13. Analyses statistiques

Les variations entre les différents échantillons ont été évaluées à l'aide du test de Student pour des échantillons indépendants. Le seuil de significativité utilisé est de $p < 0,05$.

IV. Résultats

L'objectif principal de cette étude est de caractériser le potentiel anti-cancéreux d'acides 4-hydroxybenzoïques et d'analyser l'implication éventuelle de leurs propriétés inhibitrices des HDAC. Nous analyserons d'abord la sélectivité des molécules par rapport aux différentes isoenzymes de HDAC. Ensuite, nous évaluerons les effets moléculaires et cellulaires de ces composés.

IV.1. Inhibition *in vitro* de l'activité désacétylase d'isoenzymes de HDAC par les acides 4-hydroxybenzoïques

Les acides 4-hydroxybenzoïques **3b**, **5b**, **6d**, **6e**, **7b**, **8b**, **9d**, **12a**, **13a**, **13b**, **13c** et **17b** inhibent l'activité HDAC totale. Ces composés ont ensuite été testés afin d'évaluer leur potentiel inhibiteur de l'activité de désacétylation de différentes isoenzymes de HDAC. Les résultats montrent que les composés **3b**, **5b**, **6d**, **8b** et **12a** sont inactifs. L'inhibition observée sur l'activité HDAC totale peut être expliquée par une faible inhibition de plusieurs isoenzymes. Les résultats observés avec les composés **7b** et **13a** montrent une inhibition spécifique de HDAC6 avec des CI_{50} respectives de 20 et 0,2 μ M (Tableau 15). Le composé **6e** inhibe les HDAC1, 2, 8, 6 et 10 avec des CI_{50} respectives de 11, 61, 14, 69 et 100 μ M. Le composé **9d** inhibe les HDAC1 et 11 avec des CI_{50} respectives de 82 et 100 μ M. Le composé **13b** inhibe les HDAC1, 2, 3 et 11 avec une CI_{50} comprise entre 4 et 75 μ M. Le composé **13c** inhibe les HDAC1, 2, 6 et 11 avec des CI_{50} comprises entre 0,6 et 14 μ M. Enfin, le composé **17b** n'inhibe que l'isoenzyme HDAC8 avec une CI_{50} de 77 μ M. L'effet des composés **6e**, **7b**, **9d**, **13a**, **13b**, **13c** and **17b** a aussi été testé *in vitro* sur l'activité HDAC des sirtuines 1, 2 et 3. Les résultats montrent que le composé **13b** inhibe l'activité de ces trois enzymes avec des CI_{50} comprises entre 12 et 96 μ M. Le composé **13c** quant à lui n'inhibe que l'activité de la sirtuine 1 avec une CI_{50} de 29 μ M, alors que les composés **6e**, **7b** et **13a** ne ciblent pas cette classe de HDAC.

Tableau 15: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'activité d'isoenzymes de HDAC.
 CI₅₀: concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique, inactif signifie CI₅₀ > 100 µM.

Classe	HDAC Membre	CI ₅₀ (µM)						
		6e	7b	9d	13a	13b	13c	17b
I	HDAC1	11	Inactif	82	Inactif	5	12	Inactif
	HDAC2	61	Inactif	Inactif	Inactif	40	8	Inactif
	HDAC3	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif	75	Inactif	Inactif
	HDAC8	14	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif	77
IIb	HDAC6	69	0,2	Inactif	20	Inactif	14	Inactif
	HDAC10	100	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif	Inactif
III	SIRT1	Inactif	Inactif	ND	Inactif	12	29	ND
	SIRT2	Inactif	Inactif	ND	Inactif	56	Inactif	ND
	SIRT3	Inactif	Inactif	ND	Inactif	96	Inactif	ND
IV	HDAC11	Inactif	Inactif	100	Inactif	4	0,6	Inactif

ND: non déterminé.

Au regard des résultats obtenus *in vitro*, la suite de l'étude est réalisée sur les composés inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC **13b**, **13c** et **6e** (première partie), et sur les composés spécifiques de HDAC6 **13a** et **7b** (seconde partie).

In vitro, les composés **13b**, **13c** et **6e** sont des inhibiteurs de plusieurs HDAC alors que les composés **13a** et **7b** inhibent spécifiquement l'isoenzyme HDAC6.

IV.2. Etude *in cellulo* des acides 4-hydroxybenzoïques qui inhibent plusieurs HDAC

IV.2.1. Effet des composés **13b**, **13c** et **6e** sur l'acétylation de cibles protéiques des HDAC

Afin de tester si les composés **13b**, **13c** et **6e** sont capables d'inhiber des activités d'HDAC *in cellulo*, le statut d'acétylation de protéines-cibles des HDAC a été étudié. Les isoenzymes des classes I, II et IV ciblent l'acétylation des histones et le substrat principal de HDAC6 est la tubuline- α . Une faible augmentation de l'acétylation de l'histone H4 a été observée après 24 heures de traitement des cellules K-562 avec 100 µM de composé (Figure 15A).

L'examen de l'acétylation de la tubuline- α montre une induction modérée avec les composés (Figure 15B). L'inhibition de l'acétylation des HDAC par le SAHA, utilisé en tant que contrôle positif, induit l'acétylation de l'histone H4 et de la tubuline- α , en accord avec la littérature.

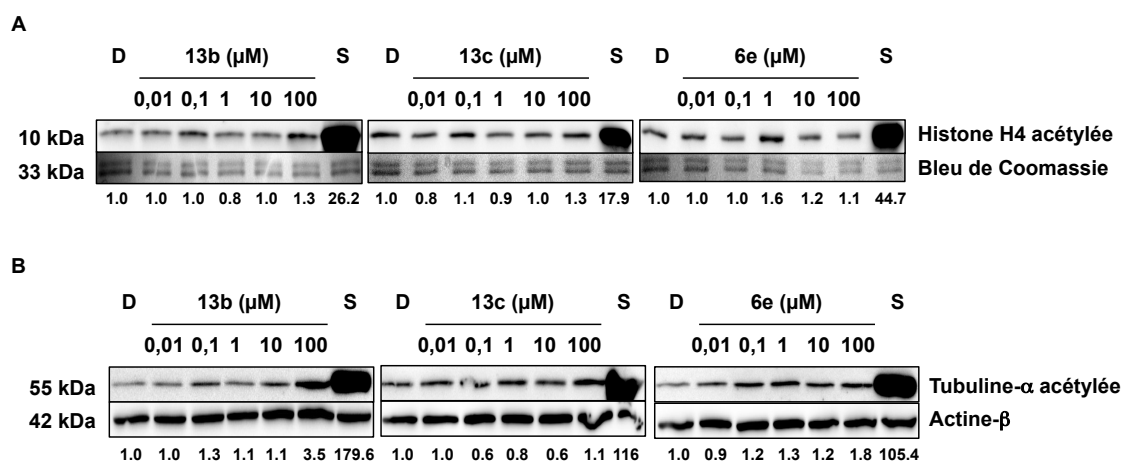


Figure 15: Effet d'acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation de l'histone H4 et de la tubuline- α .

Les cellules K-562 ont été traitées avec une concentration croissante de composés pendant 24 heures et l'acétylation de l'histone H4 (A) et de la tubuline- α (B) a été étudiée par Western Blot. La coloration au bleu de Coomassie et l'actine- β sont utilisées en tant que contrôles de chargement. Le DMSO (D) est utilisé comme contrôle solvant et le SAHA (S, 2 μ M) est utilisé comme inhibiteur de HDAC de référence. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots.

Afin d'étudier l'effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation des cibles des HDAC en fonction du temps, les cellules K-562 ont été traitées avec 50 μ M des composés **13b**, **13c** et **6e**. Les résultats de Western Blots montrent une augmentation du taux d'acétylation de l'histone H4 et de la tubuline- α entre 12 et 24 heures de traitement avec le composé **13c** alors que les composés **13b** et **6e** n'induisent pas l'acétylation de ces protéines aux temps de traitement testés (Figure 16).

De plus, l'effet des composés sur l'acétylation de lysines spécifiques des histones H3 et H4 a été étudié. Le composé **13b** induit l'acétylation de H4K8 d'environ 5 fois, de H3K9 et de H3K14 d'environ 1,5 fois après 6 heures de traitement et de H4K16 de 1,8 fois après 24 heures de traitement (Figure 16). Le composé **13c** n'a pas d'effet sur H4K16 mais induit l'acétylation de H4K8 de 2 à 3,6 fois et H3K9 de 2 fois après 6 à 24 heures de traitement et de H3K14 après 24 heures de 1,7 fois. Le composé **6e** induit uniquement une augmentation de l'acétylation de H3K14 de 1,4 à 1,7 fois entre 12 et 24 heures de traitement.

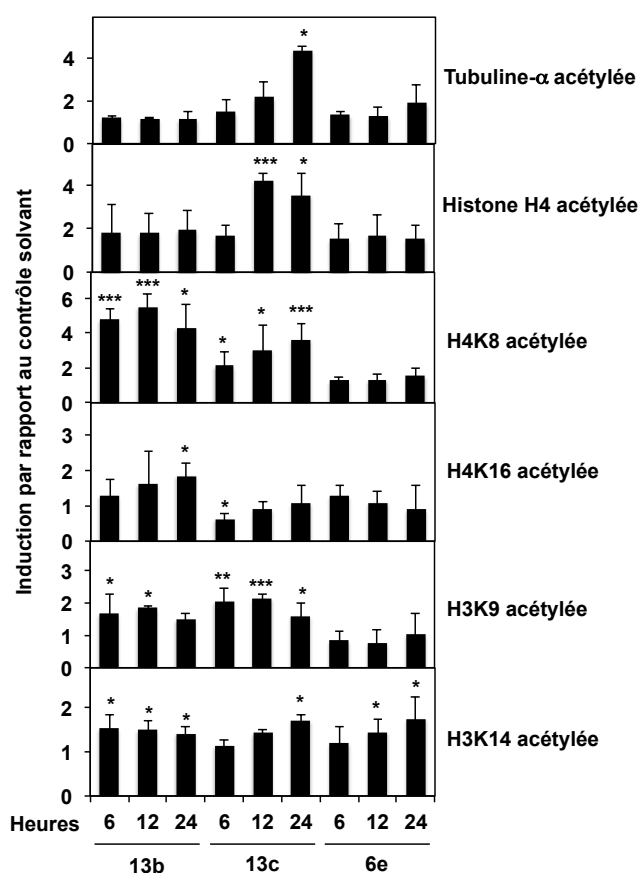
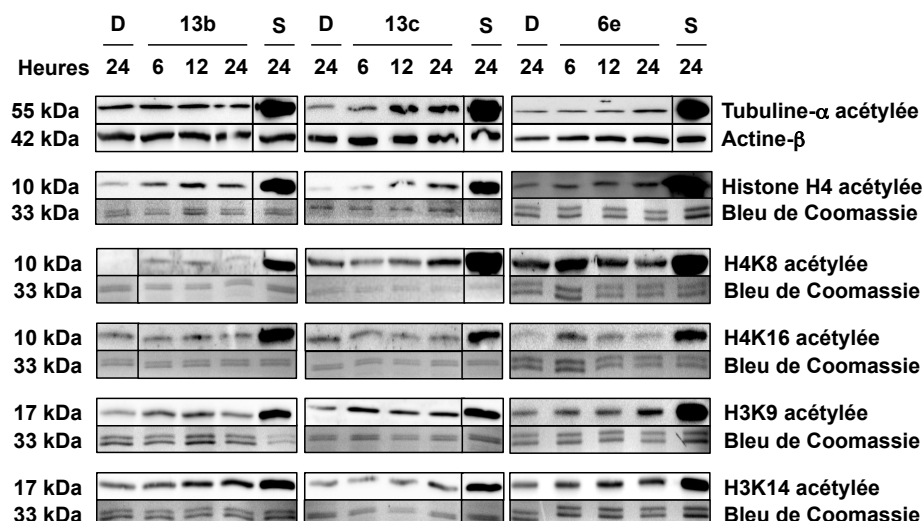


Figure 16: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation de la tubuline- α ainsi que des histones H3 et H4.

Les cellules K-562 ont été traitées avec 50 μ M des acides 4-hydroxybenzoïques ou 2 μ M de SAHA (S) aux temps indiqués. L'acétylation de la tubuline- α , de l'histone H4 ainsi que des lysines 8 et 16 de l'histone H4 (H4K8 et H4K16) et des lysines 9 et 14 de l'histone H3 (H3K9 et H3K14) a été évaluée par Western Blot. La coloration au bleu de Coomassie et l'actine- β sont utilisées comme contrôles de chargement. Le DMSO (D) est utilisé comme contrôle solvant. Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Les composés 13b, 13c et 6e induisent l'hyperacétylation des protéines cibles des HDAC dans les cellules K-562, en adéquation avec l'inhibition de l'activité des isoenzymes *in vitro*.

IV.2.2. Les composés 13b, 13c et 6e diminuent la prolifération cellulaires des K-562

Dans le but d'étudier le potentiel anti-cancéreux des composés 13b, 13c et 6e, la concentration des cellules K-562 a été déterminée à différents temps de traitement (Figure 17). Le traitement des cellules avec 100 μM de chaque composé inhibe la prolifération cellulaire de 55 à 75% dès 24 heures de traitement. Une diminution de la croissance d'environ 50% est observée après traitement avec 10 μM de composés 6e à partir de 48h.

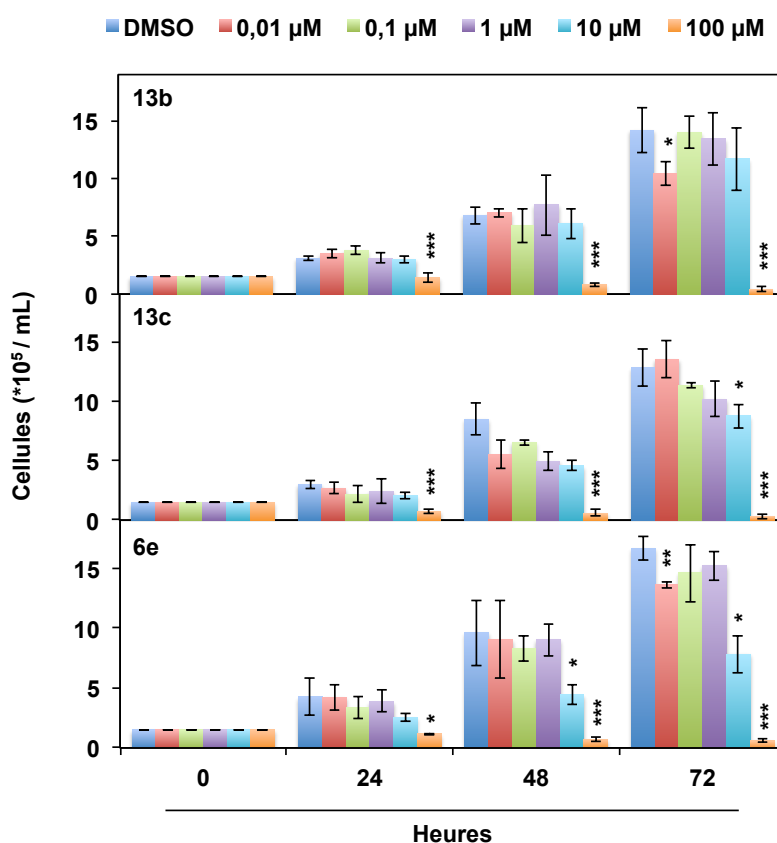


Figure 17: Effet des composés 13b, 13c et 6e sur la prolifération cellulaire.

Les cellules K-562 ont été traitées avec une concentration croissante de composés pendant 24, 48 et 72 heures, puis les cellules négatives au bleu de Trypan ont été comptées. Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes et le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

De nombreuses études ont montré que l'inhibition des HDAC pouvait entraîner la différenciation des cellules cancéreuses (Rosato *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2007). De plus, la différenciation des cellules K-562 peut être principalement induite vers la voie érythroïde par de nombreux composés. Ainsi, nous avons testé si l'inhibition de croissance observée (Figure 17) suite au traitement des cellules K-562 par les différents composés entraîne la différenciation de ces cellules vers la voie érythroïde. Après 72 heures de traitement à 10 μ M, le test à la benzidine révèle une très faible augmentation de l'hémoglobinisation suite au traitement avec les composés **13b** (5%) et **13c** (8%, Figure 18). Le composé **6e** n'a pas d'effet sur cette voie de différenciation. L'hémine, utilisée comme inducteur de la voie érythroïde de référence, induit la différenciation de 60% de la population cellulaire.

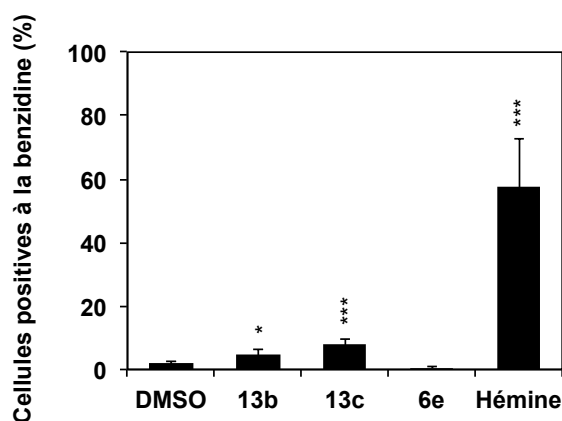


Figure 18: Effet des composés 13b, 13c et 6e sur la différenciation érythroïde des cellules K-562.

Les cellules ont été traitées 72 heures avec 10 μ M d'acides 4-hydroxybenzoïques ou 30 μ M d'hémine, utilisée comme inducteur de référence de la voie érythroïde. La différenciation vers la voie érythroïde a été évaluée par le test à la benzidine. Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes et le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

IV.2.3. Les acides 4-hydroxybenzoïques modulent le cycle cellulaire des cellules K-562

Des inhibiteurs d'HDAC peuvent réguler le cycle cellulaire. Par conséquent, l'observation de l'inhibition de prolifération observée précédemment (IV.2.2.) nous a conduit à étudier l'influence des acides 4-hydroxybenzoïques sur le cycle cellulaire. L'étude des différentes phases du cycle cellulaire a été réalisée par cytométrie en flux après différents temps de traitement avec 50 μ M de composés. Les résultats présentés dans la Figure 19 montrent que le traitement des cellules par 2 μ M de SAHA pendant

24 et 48 heures induit, comme reporté dans la littérature, une accumulation des cellules dans la phase G0/G1 d'environ 30% de la population cellulaire. Le traitement des cellules K-562 par le composé **13b** induit un arrêt des cellules en phase G0/G1 à 48 heures de traitement (10%). Le composé **13c** entraîne une diminution de la population cellulaire dans les phases G0/G1 et G2/M et une augmentation de 15% dans la phase S à 48 heures de traitement. Enfin, le traitement des cellules K-562 par 50 μ M du composé **6e** induit une accumulation des cellules dès 6 heures de traitement en phase G0/G1 jusqu'à 24 heures (10 à 25%) puis en phase S après 48 heures (15%).

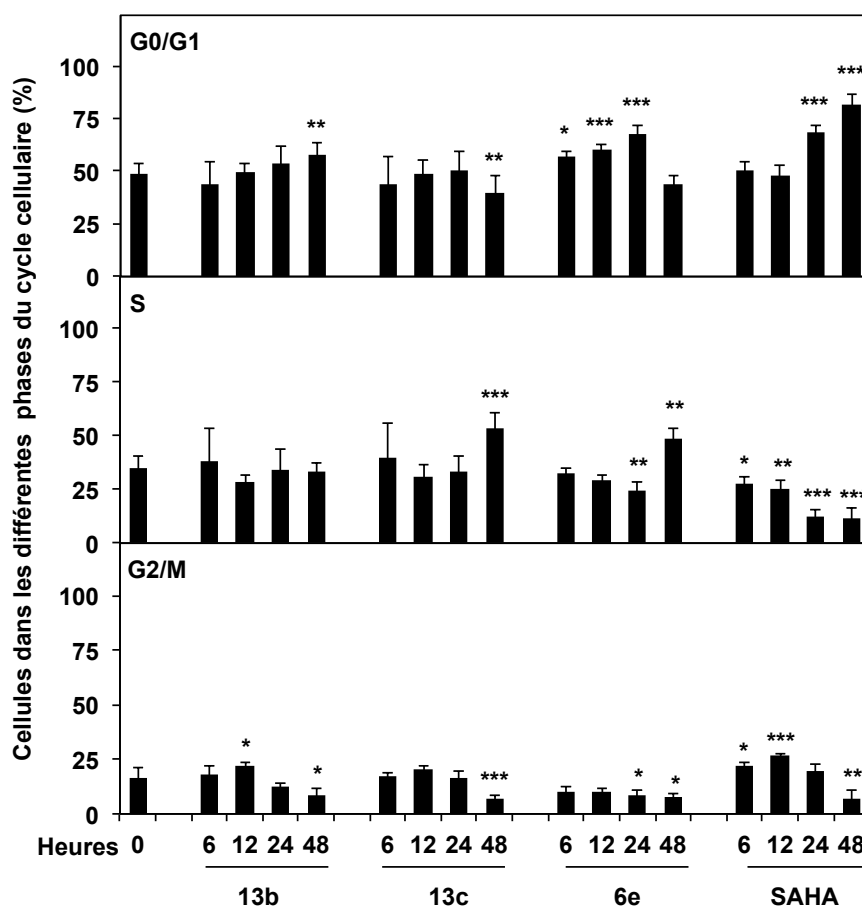


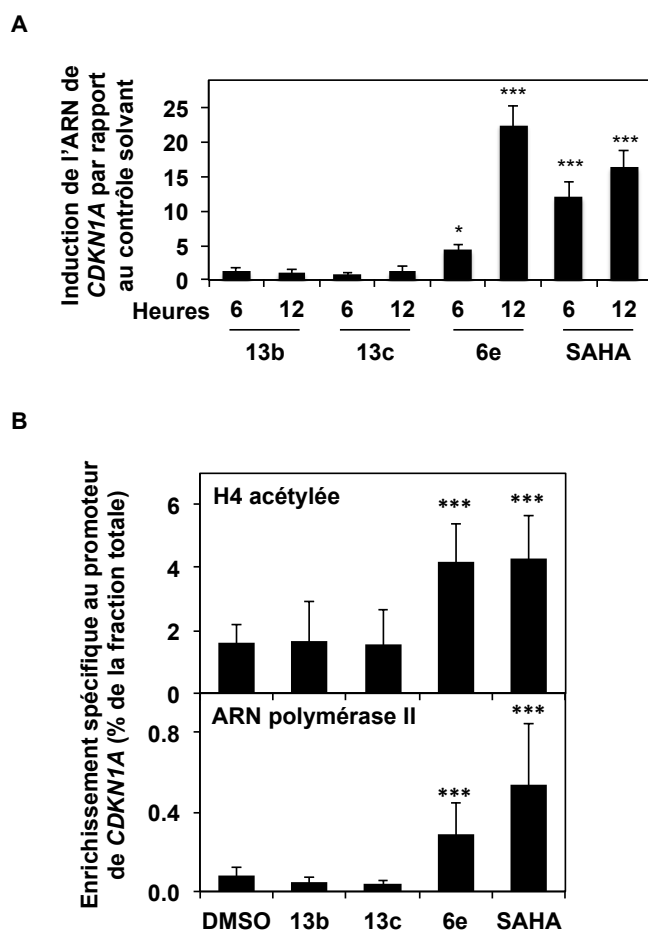
Figure 19: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur le cycle cellulaire des K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec 50 μ M des composés indiqués pendant 6, 12, 24 et 48 heures, et la distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire est obtenue après marquage à l'iodure de propidium et analyse par cytométrie de flux. Le SAHA (2 μ M) est utilisé comme inhibiteur de HDAC de référence. Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes et le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle 0, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

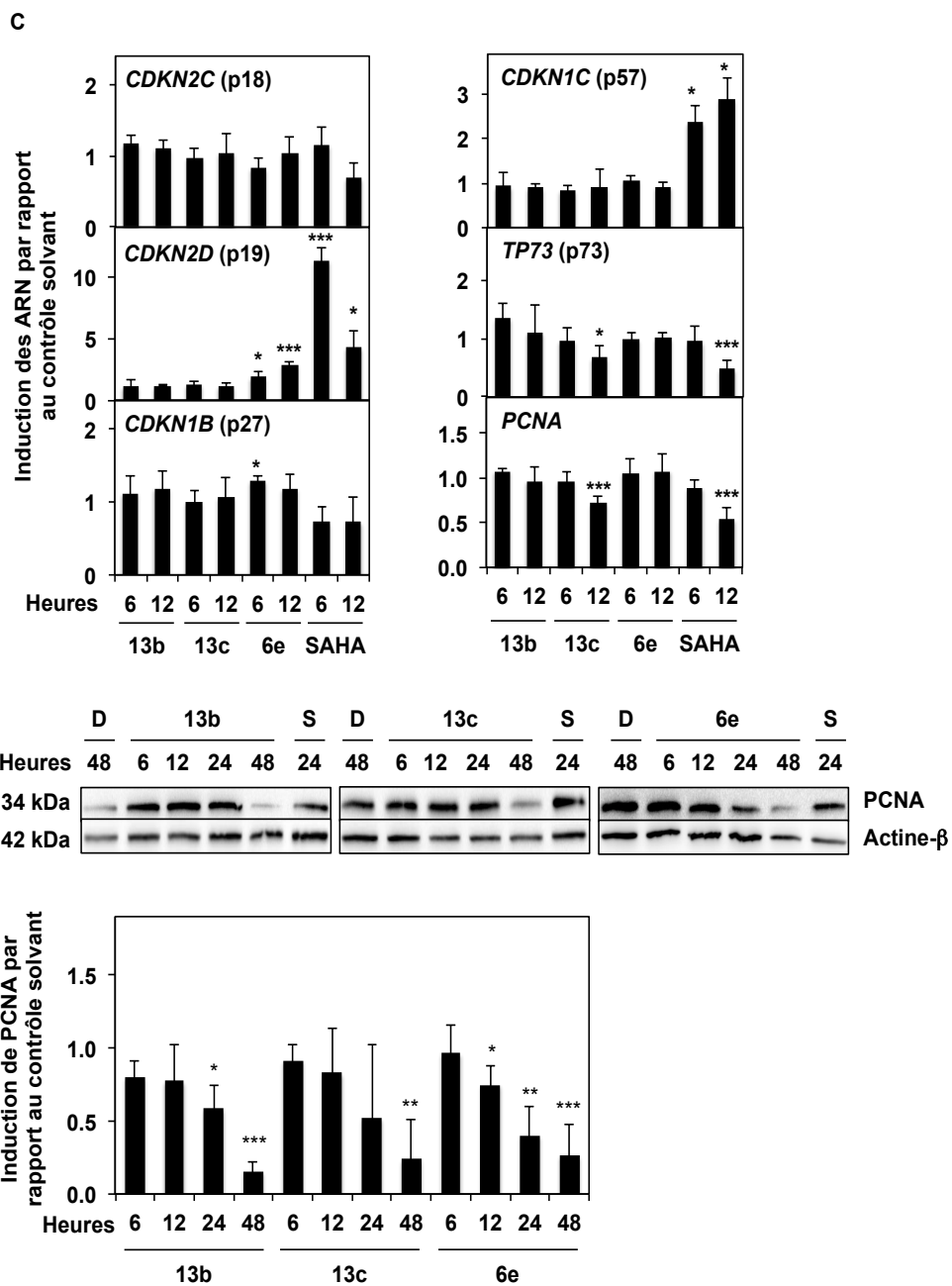
L'expression du gène *CDKN1A*, qui code la protéine p21 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, peut être induite par des inhibiteurs d'HDAC (Druesne *et al.*, 2004; Nian *et al.*, 2008). Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation du cycle cellulaire par les acides 4-hydroxybenzoïques, l'expression du gène *CDKN1A* a été étudiée par PCR en temps réel (Figure 20A). Ces expériences révèlent que le composé **6e** induit fortement l'expression du gène *CDKN1A* (22% après 12 heures) alors que les composés **13b** et **13c** n'ont pas d'effet sur l'expression de ce gène. Le traitement avec le SAHA augmente de 16% l'ARNm de p21, comme reporté dans la littérature.

Dans le but d'analyser si cette induction est due à une régulation transcriptionnelle du gène *CDKN1A*, l'analyse des marques actives de la transcription a été réalisée au niveau du site d'initiation de la transcription du promoteur de ce gène. L'étude de l'enrichissement de l'histone H4 acétylée et de l'ARN polymérase II par ChIP révèle une augmentation de ces marques suite au traitement avec le composé **6e** et le SAHA, en accord avec le niveau d'expression de l'ARNm de *CDKN1A*. Les composés **13b** et **13c** n'ont pas d'effet sur l'enrichissement du promoteur de *CDKN1A* en marques actives (Figure 20B).

Afin d'approfondir l'analyse de l'effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la prolifération cellulaire, l'expression d'autres protéines régulatrices du cycle cellulaire a été analysée (Figure 20C). Le composé **13b** n'affecte pas l'expression des gènes *CDKN2C* (p18), *CDKN2D* (p19), *CDKN1C* (p57), *TP73* (p73) et *PCNA*. Le composé **13c** diminue l'expression des gènes *TP73* (p73) et *PCNA* alors que le composé **6e** induit l'expression des gènes *CDKN2D* (p19) et *CDKN1B* (p27). Le SAHA induit l'expression des gènes *CDKN2D* (p19) et *CDKN1C* (p57) et diminue celle des gènes *CDKN2C* (p18), *TP73* (p73) et *PCNA*. L'analyse par Western Blot de PCNA montre que les trois molécules induisent une diminution de cette protéine entre 12 et 48 heures de traitement. L'étude du taux d'expression des cyclines impliquées dans la progression du cycle cellulaire par Western Blot montre que seuls les composés **13b** et **6e** induisent une diminution de la cycline B1 après 24 heures traitement (Figure 20D). Les trois molécules diminuent les cyclines A et E avec le temps de traitement. Une diminution drastique de la cycline D est observée dès 6 heures de traitement avec les composés **13c** et **6e**. Le traitement des cellules par le SAHA augmente le taux de cycline D1 alors qu'il diminue celui des cyclines A et B1 et n'affecte pas le taux de cycline E.



Légende à la suite de la figure.



Légende à la suite de la figure.

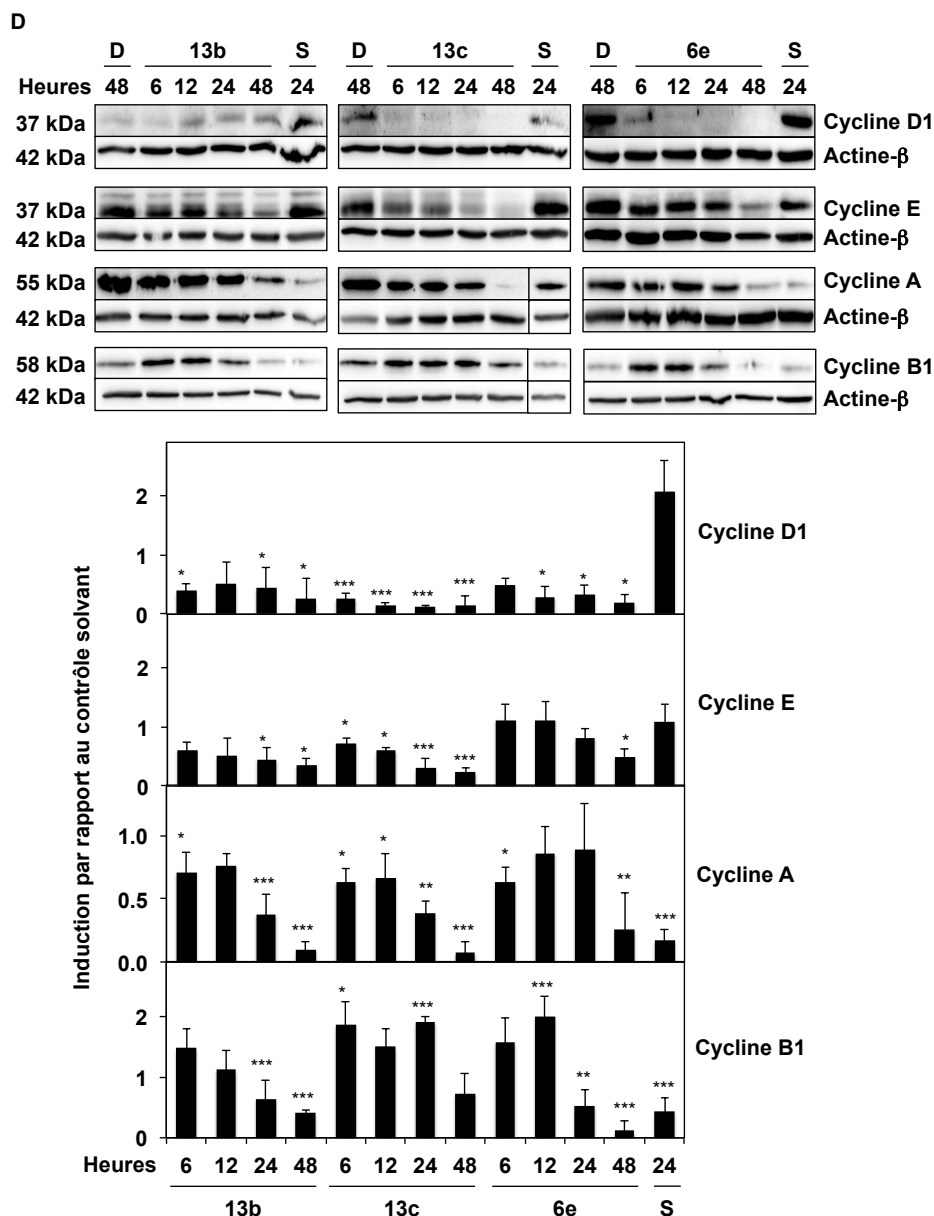


Figure 20: Effet des composés 13b, 13c et 6e sur l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.

Les cellules K-562 ont été traitées avec 50 μM des différents composés ou 2 μM de SAHA utilisé comme composé de référence. (A) L'expression du gène *CDKN1A* codant la protéine p21 a été étudiée par PCR en temps réel après 6 et 12 heures de traitement. (B) Après 8 heures de traitement, l'enrichissement de la région autour du site d'initiation de la transcription du promoteur du gène codant p21 en histone H4 acétylée et polymérase II a été étudié par ChIP. (C) L'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire a été étudiée par PCR en temps réel après 6 et 12 heures de traitement, panneau supérieur, et par Western Blot après 6 à 48 heures de traitement, panneau inférieur. (D) L'expression des cyclines régulatrices du cycle cellulaire a été étudiée par Western Blot, après 6 à 48 heures. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Les histogrammes correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO (D) avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Suite à l'observation de la modulation du cycle cellulaire par les acides 4-hydroxybenzoïques, une étude des cellules dans les différentes phases de la mitose a été réalisée (Figure 21). La numération des cellules en mitose, toutes phases comprises, montre que le composé **13b** induit une diminution du nombre de cellules en mitose en fonction du temps de traitement pour atteindre près de 40% de la population, alors que les composés **13c** et **6e** diminuent, respectivement, 45 et 65% de cellules en mitose dès 6 heures de traitement.

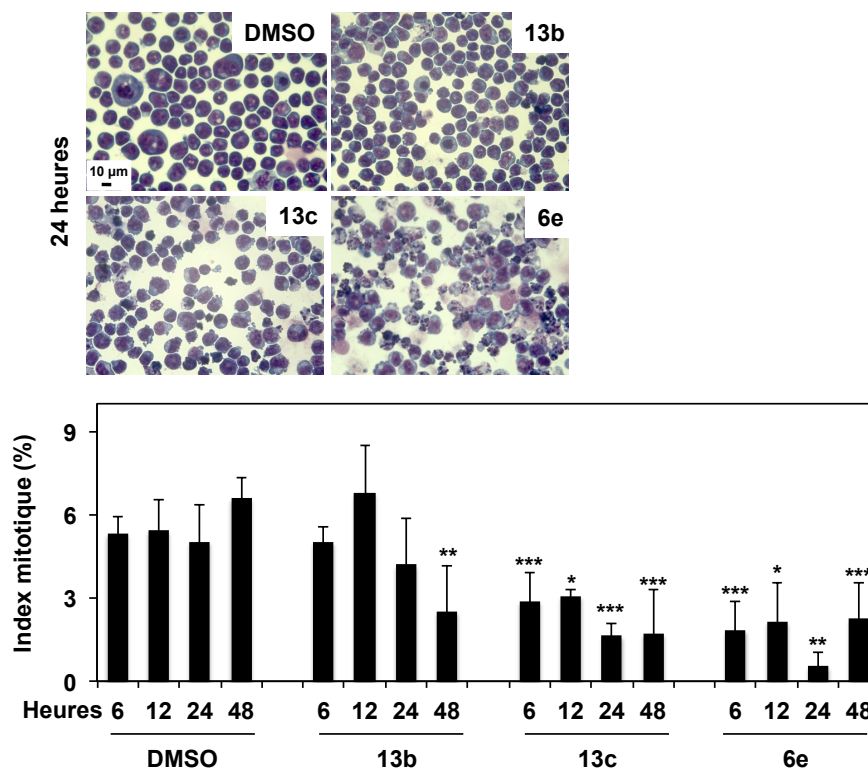


Figure 21: Etude des cellules en mitose.

Les cellules dans les différentes phases de la mitose ont été étudiées suite au traitement des cellules K-562 par 50 μM de composés aux temps indiqués. Les photographies ont été prises 24 heures après traitement et sont représentatives de trois expériences indépendantes (panneau supérieur). La quantification des cellules en mitose a été réalisée et la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes est représentée sur l'histogramme (panneau inférieur). Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle DMSO du temps correspondant, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Les acides 4-hydroxybenzoïques induisent un arrêt des cellules dans différentes phases du cycle cellulaire suite à la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la progression du cycle sans affecter les mécanismes de différenciation érythroïde.

IV.2.4. Effet cytotoxique des composés 13b, 13c et 6e

IV.2.4.1. Les acides 4-hydroxybenzoïques induisent la mort cellulaire des cellules K-562

L'effet des composés sur la viabilité cellulaire a également été évalué après une coloration au bleu de Trypan des cellules traitées avec les acides 4-hydroxybenzoïques. Les composés **13b**, **13c** et **6e** induisent une augmentation du pourcentage de cellules positives au bleu de Trypan en fonction du temps de traitement atteignant, respectivement, environ 35, 70 et 50% à 72 heures (Figure 22).

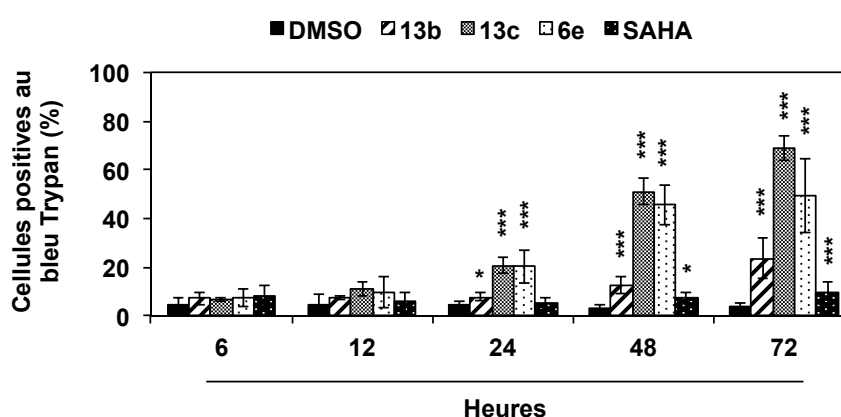


Figure 22: Effet du traitement avec les composés 13b, 13c et 6e sur la viabilité des cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec 50 μ M des acides 4-hydroxybenzoïques aux temps indiqués et les cellules positives au bleu de Trypan ont été comptées afin de déterminer la viabilité. Le SAHA (2 μ M) est utilisé comme inhibiteur de HDAC de référence et le DMSO représente le contrôle solvant des expériences. Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes et le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

IV.2.4.2. Caractérisation du type de mort cellulaire induit par les acides 4-hydroxybenzoïques

La diminution de la viabilité observée (Figure 22) lors du traitement des cellules avec les différents acides 4-hydroxybenzoïques nous a mené à étudier le type de mort cellulaire induit. L'analyse de la morphologie nucléaire montre une faible induction des cellules apoptotiques et nécrotiques avec les contrôles DMSO et SAHA jusqu'à 72 heures, confirmant ainsi les résultats obtenus avec la coloration au bleu de Trypan (Figure 23).

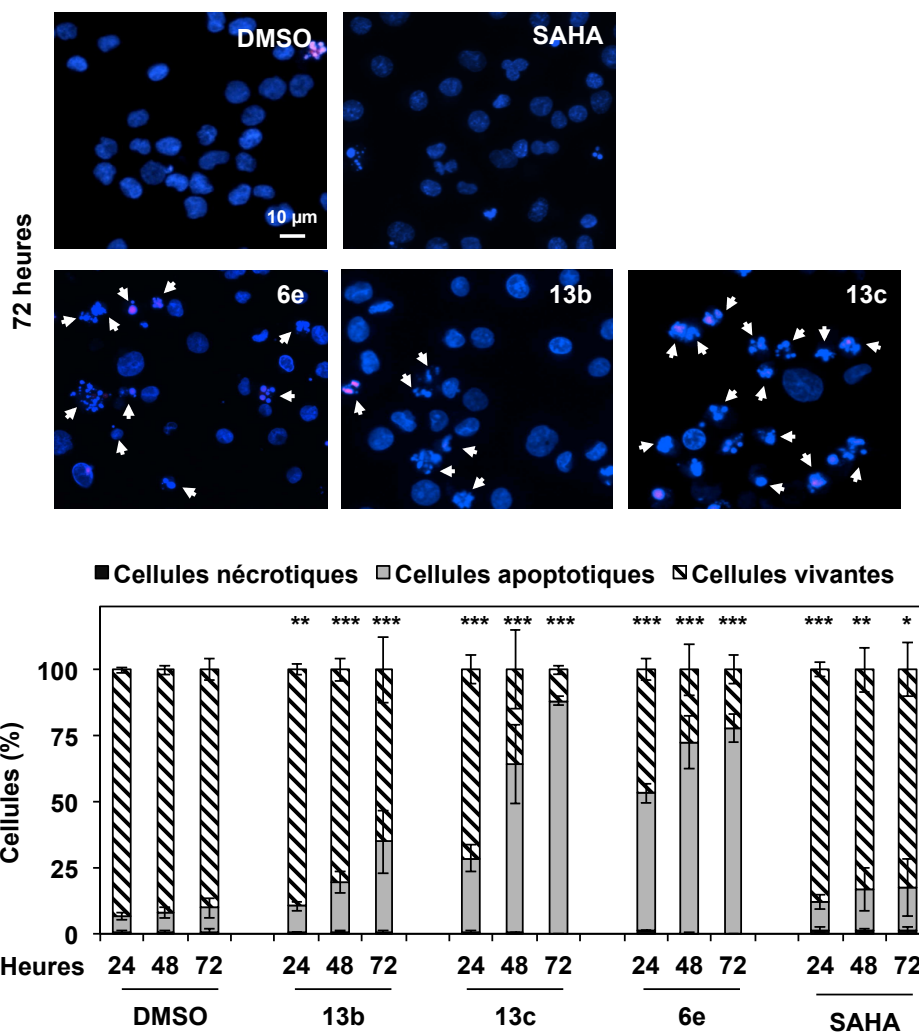


Figure 23: Le traitement des cellules K-562 avec les acides 4-hydroxybenzoïques induit l'apoptose.

L'étude de la morphologie nucléaire des cellules K-562 est réalisée par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium suite au traitement avec 50 μM des acides 4-hydroxybenzoïques aux temps indiqués. Le SAHA (2 μM) est utilisé comme inhibiteur d'HDAC de référence et le DMSO représente le contrôle solvant des expériences. Les photographies résultent d'une superposition d'une photographie des cellules marquées au Hoechst (bleu) et d'une photographie des cellules marquées à l'iodure de propidium (rouge). Les photographies sont prises après 72 heures de traitement et sont représentatives de trois expériences indépendantes (panneau supérieur). La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été réalisée et les résultats présentés sur l'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes (panneau inférieur). Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO du temps correspondant, avec * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005.

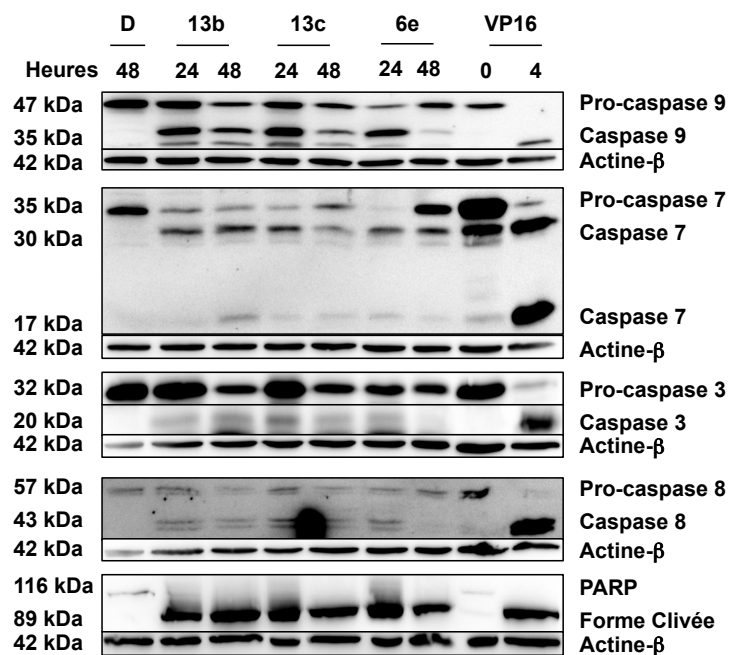
La numération des cellules montre une forte induction de l'apoptose suite au traitement avec les composés **13c** et **6e** dès 24 heures de traitement pour atteindre, respectivement, 88 et 78% de cellules après 72 heures. Le composé **13b** induit l'apoptose de manière plus modérée mais croissante avec le temps de traitement pour atteindre 34% de la population après 72 heures de traitement.

Afin de confirmer l'induction de l'apoptose et de caractériser la voie apoptotique induite suite au traitement des cellules par les différents composés, l'activation des caspases a été étudiée. Ainsi des Western Blots ont été réalisés grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre les caspases 9, 7, 3 et 8 et contre PARP et leurs isoformes clivées. Le traitement avec les acides 4-hydroxybenzoïques induit un clivage des caspases 9, 7, 3 et 8 ainsi que de PARP dès 24 heures de traitement (Figure 24A). L'étoposide est utilisé en tant qu'inducteur d'apoptose et d'activateur des caspases dans les cellules U-937.

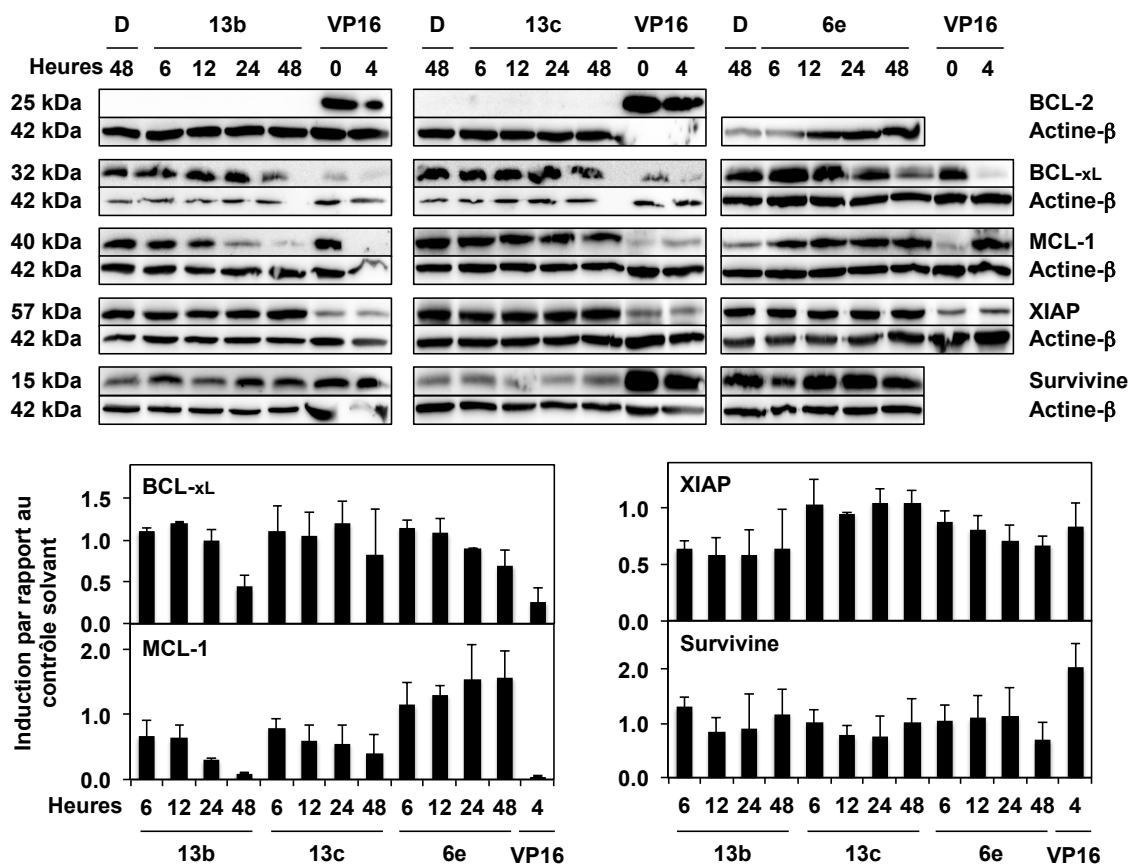
De plus, l'expression des protéines anti-apoptotiques BCL-2, BCL-x_L, MCL-1, XIAP et survivine a été étudiée par Western Blot après 6 à 48 heures de traitement (Figure 24B). Une diminution de l'expression de ces protéines est observée après des temps de traitement longs dénotant de l'absence d'implication de ces protéines dans l'induction de l'apoptose par les acides 4-hydroxybenzoïques. La forme clivée de la protéine pro-apoptotique BID a également été analysée par Western Blot et les résultats montrent que le traitement des cellules par les composés n'induit pas d'activation de cette protéine (Figure 24C).

Par ailleurs, l'effet des composés sur une autre protéine pro-apoptotique, BIM, a été étudié par Western Blot grâce à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant trois isoformes de BIM issus d'un épissage alternatif, appelés EL, L et S. Un temps court de traitement (6 à 12 heures) des cellules K-562 par 50 µM des composés **13b**, **13c** et **6e** induit une augmentation de l'isoforme L suivi par une diminution des trois isoformes après des temps de traitement plus longs (Figure 25A). L'analyse de l'expression des ARNm des isoformes ainsi que des marques actives de la transcription sur le promoteur du gène codant BIM montrent que la modification du taux protéique est indépendante de la modulation transcriptionnelle (Figure 25B et C). L'ensemble de ces résultats montre que les cellules entrent en apoptose après traitement avec les différents composés. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment avec la coloration des cellules au bleu de Trypan (Figure 22) où une augmentation des cellules positives a été observée.

A



B



Légende à la suite de la figure.

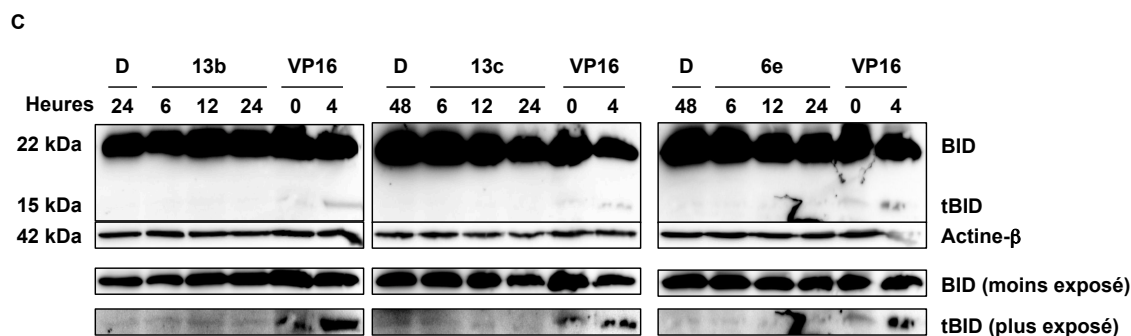
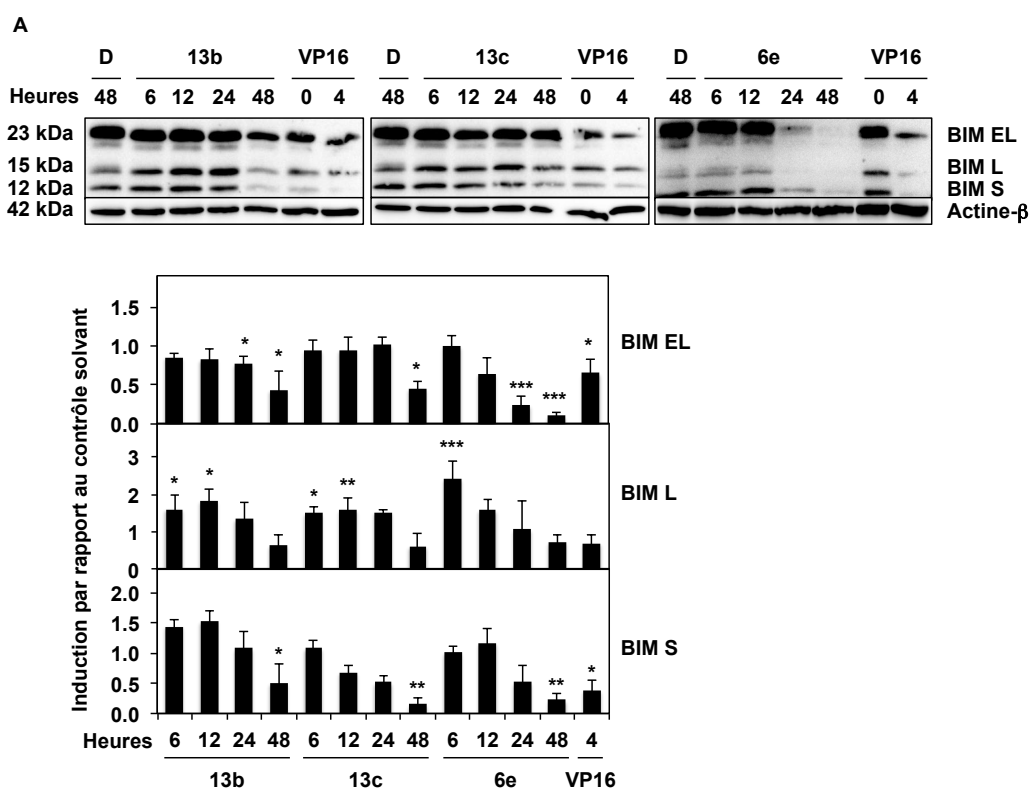


Figure 24: L'apoptose induite par les acides 4-hydroxybenzoïques dépend des caspases 9, 7, 3 et 8 et de PARP.

Les cellules K-562 ont été traitées avec 50 μM des acides 4-hydroxybenzoïques aux temps indiqués. (A) Les formes entières et clivées des caspases 9, 7, 3 et 8 et de PARP (poly-ADP ribose polymérase), (B) les protéines anti-apoptotiques BCL-2, BCL-x_L, MCL-1, XIAP et survivine et (C) le clivage de la protéine pro-apoptotique BID en tBID ont été étudiés par Western Blot. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes pour (A) et deux expériences indépendantes pour (B) et (C). La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Le VP16 (cellules U-937 traitées avec 100 μM d'étoposide) est utilisé comme contrôle d'induction de l'apoptose.



Légende à la suite de la figure.

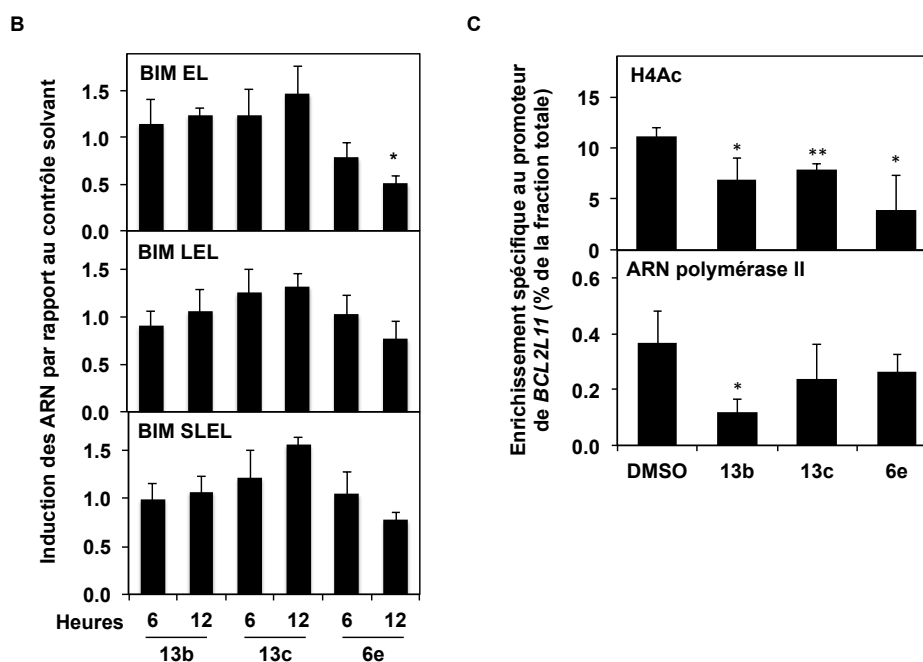


Figure 25: Le traitement des cellules K-562 par les acides 4-hydroxybenzoïques induit la protéine pro-apoptotique BIM.

Les cellules K-562 ont été traitées avec 50 μM des acides 4-hydroxybenzoïques. (A) Le taux protéique de trois isoformes de la protéine pro-apoptotique BIM, appelées BIM EL, BIM L et BIM S, ont été analysées par Western Blot après 6 à 48 heures de traitement. Le VP16 (cellules U-937 traitées avec 100 μM d'étoposide) est utilisé comme contrôle d'induction de l'apoptose. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. (B) La quantité d'ARNm des isoformes de la protéine pro-apoptotique BIM a été analysée par PCR en temps réel après 6 et 12 heures de traitement. Différents couples d'amorces ont permis d'amplifier l'isoforme BIM EL, BIM L et EL, ou les trois isoformes BIM S, L et EL. (C) L'enrichissement en histone H4 acétylée et polymérase II du promoteur de BIM a été étudié par ChIP après 8h de traitement avec 50 μM des acides 4-hydroxybenzoïques. Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Enfin, l'effet des composés **13b**, **13c** et **6e** a été testé sur la viabilité de cellules circulantes (PBMC) de patients sains. Ces expériences révèlent que le traitement avec des concentrations comprises entre 10 et 100 μM affecte peu la viabilité des PBMC (Figure 26A). De plus, l'acétylation de la tubuline- α et de l'histone H4 a été analysée après 8 et 24 heures de traitement (Figure 26B). Les résultats montrent que les composés **13b**, **13c** et **6e** n'ont pas d'effet sur le taux d'acétylation de ces protéines dans les PBMC. Au contraire, le SAHA induit fortement l'acétylation des deux protéines dans ces cellules.

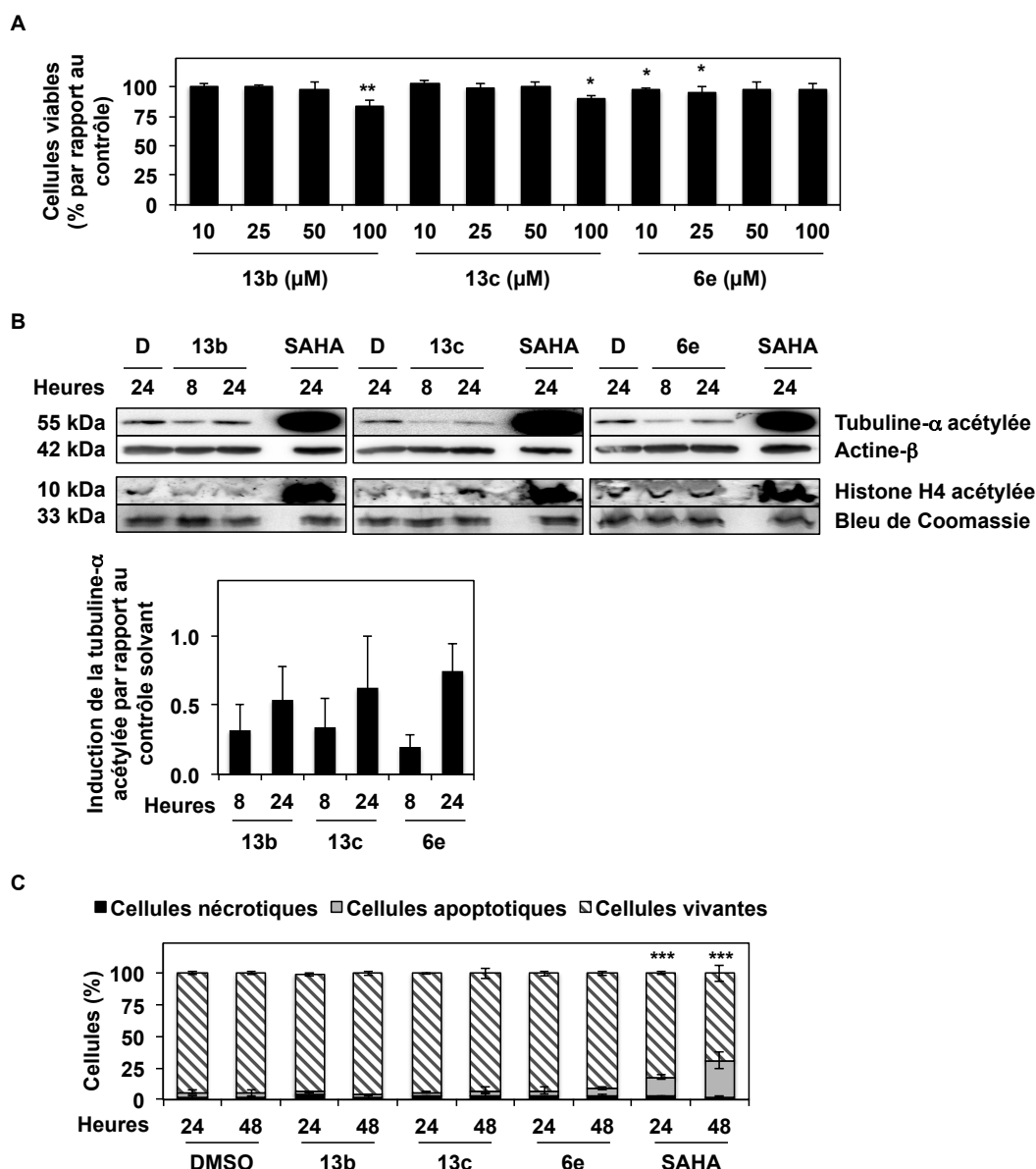


Figure 26: Les composés 13b, 13c et 6e n'affectent pas la viabilité et le statut d'acétylation dans les PBMC de donneurs sains.

Les cellules périphériques mononuclées sanguines (PBMC) ont été isolées puis traitées avec les acides 4-hydroxybenzoïques. (A) Après 24 heures de traitement avec des concentrations croissantes, un test d'exclusion au bleu Trypan a été réalisé. L'histogramme représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes avec le pourcentage de cellules viables rapporté au contrôle solvant DMSO. (B) L'acétylation de la tubuline- α et de l'histone H4 a été étudiée par Western Blot après différents temps de traitement avec 50 μ M de composé. La coloration au bleu de Coomassie et l'actine- β sont utilisées comme contrôles de chargement. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. (C) L'étude de la morphologie nucléaire est réalisée après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium suite au traitement avec les acides 4-hydroxybenzoïques. Le SAHA (2 μ M) est utilisé comme inhibiteur de HDAC de référence. L'histogramme correspond à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

De plus, l'effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la morphologie nucléaire des PBMC confirme l'absence d'induction de la mortalité de ces cellules. De manière intéressante, le SAHA induit une mort par apoptose des PBMC d'environ 15% après 24 heures de traitement et 30% après 48 heures de traitement (Figure 26C).

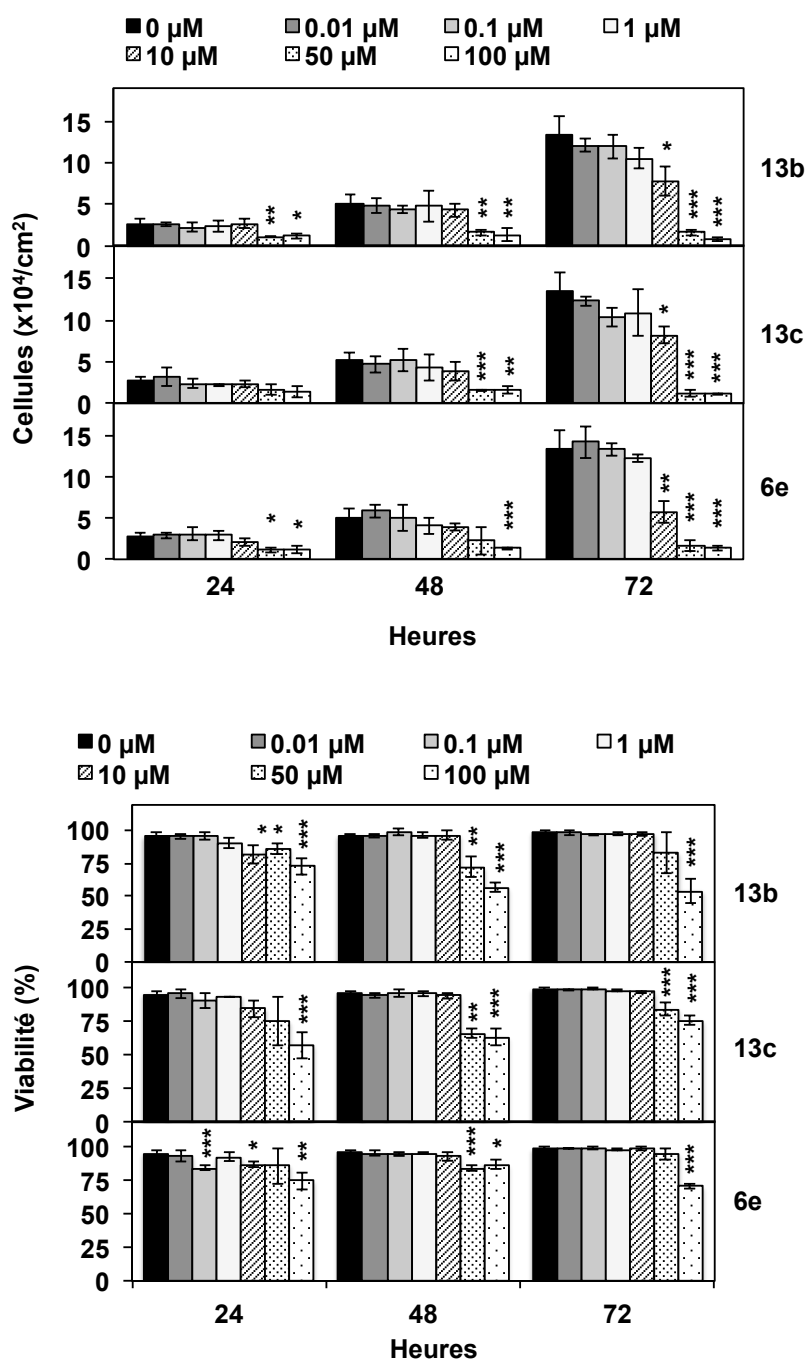
Les composés 13b, 13c et 6e induisent la mort des cellules K-562 par apoptose qui est indépendante des protéines anti-apoptotiques testées. Par contre, les acides 4-hydroxybenzoïques n'affectent pas la viabilité des PBMC.

IV.2.5. Les composés 13b, 13c et 6e diminuent la prolifération et la viabilité de différentes lignées cellulaires

Afin de valider nos résultats, d'autres modèles cellulaires ont été utilisés. Le nombre de cellules totales et la viabilité ont été déterminés après 24 à 72 heures de traitement. Nous avons utilisé une gamme de concentration sur les lignées cancéreuses PC-3, TF-1, RAJI, SK-N-AS et MCF-7 ainsi que sur des cellules non cancéreuses MCF-10A (Figure 27). Les trois composés diminuent la concentration ainsi que la viabilité cellulaire principalement à 50 et 100 μM dans les lignées cancéreuses. Les molécules diminuent la prolifération et la viabilité des cellules non cancéreuses MCF-10A de manière moins importante que les lignées cancéreuses.

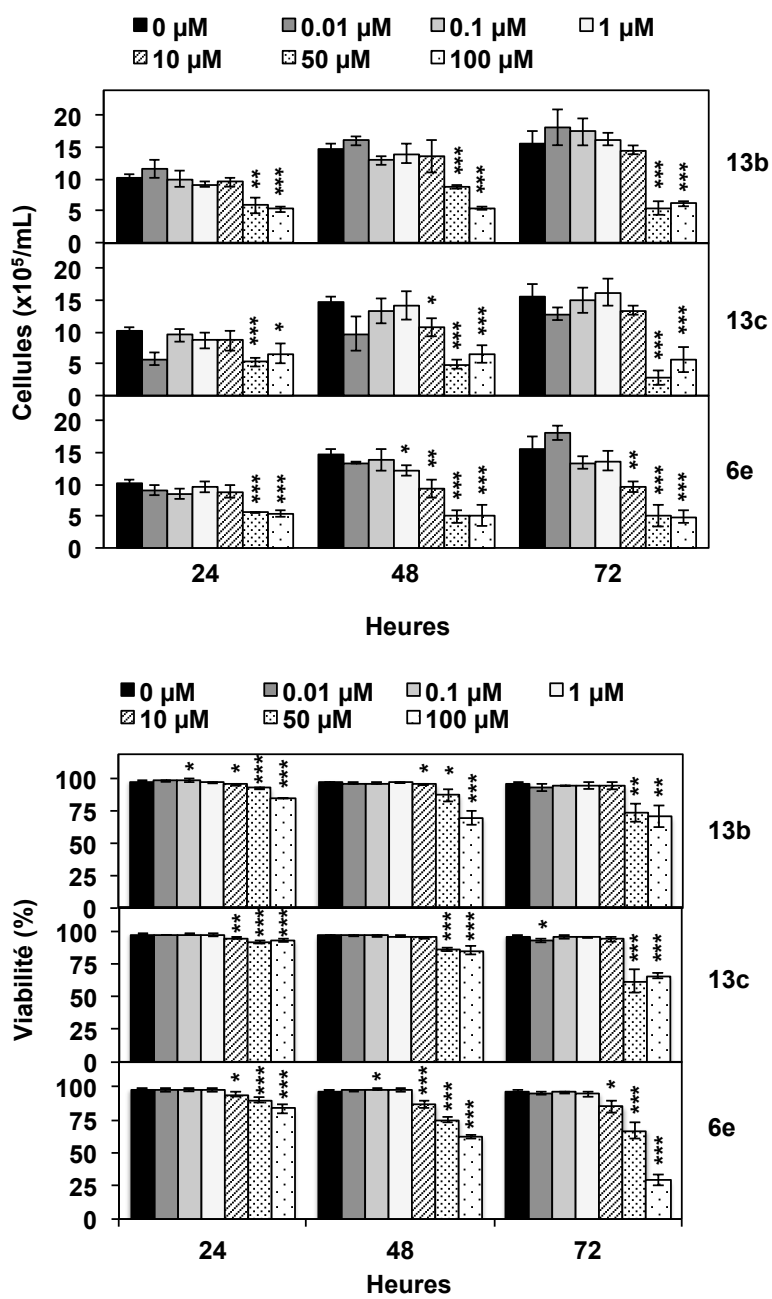
L'étude de l'effet des composés **13b**, **13c** et **6e** a été étendue à la lignée cellulaire MCF-7 (Figure 27). Les composés affectent la viabilité de ces cellules uniquement à 100 μM , mais inhibent la prolifération de ces cellules dès 50 μM . Par conséquent, une analyse du cycle cellulaire a été réalisée. Le traitement des cellules avec 50 μM de composé pendant 6 à 48 heures n'affecte pas la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (Figure 28A). Enfin, le statut d'acétylation de l'histone H4 ainsi que celui de la tubuline- α a été analysé par Western Blot (Figure 28B). Après 8 et 24 heures de traitement des cellules MCF-7 avec 50 μM des composés **13b** et **6e** et après 24 heures de traitement avec le composé **13c**, une augmentation de l'acétylation de la tubuline- α est observée alors que seul le composé **13b** induit l'acétylation de l'histone H4.

A



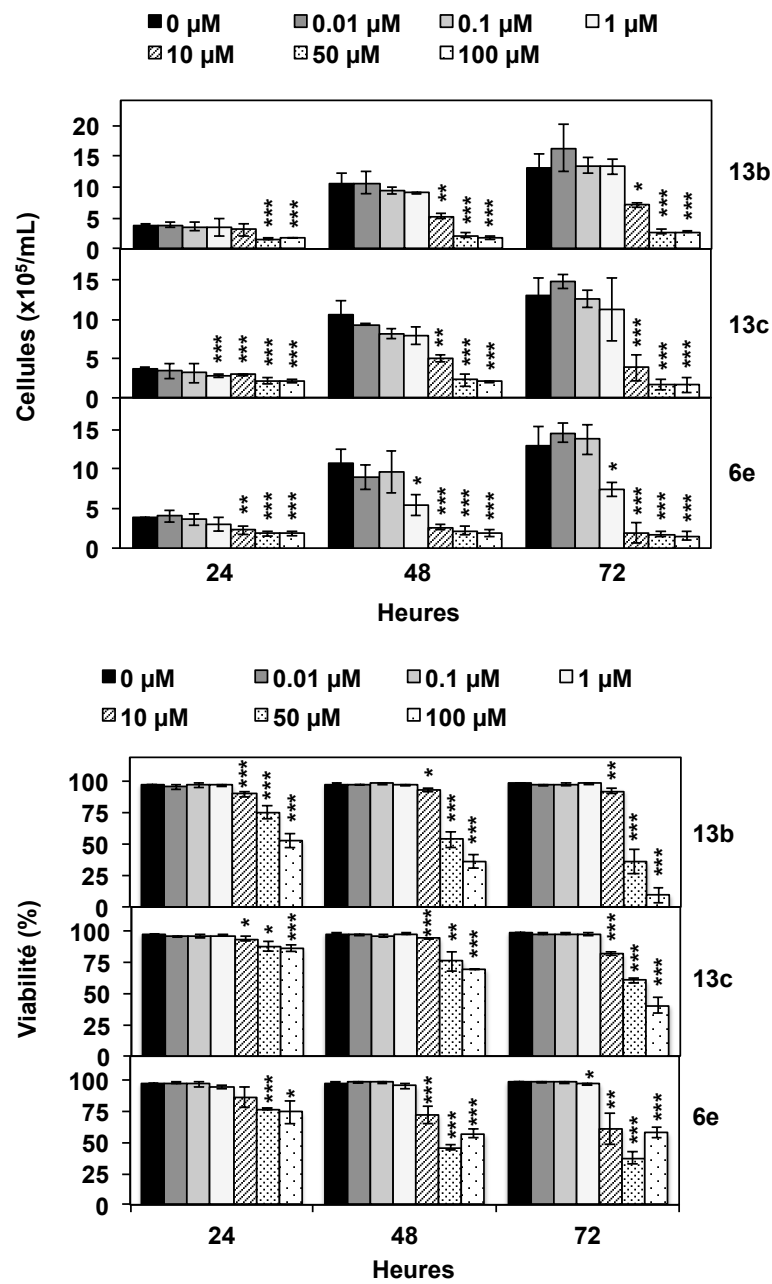
Légende à la suite de la figure.

B



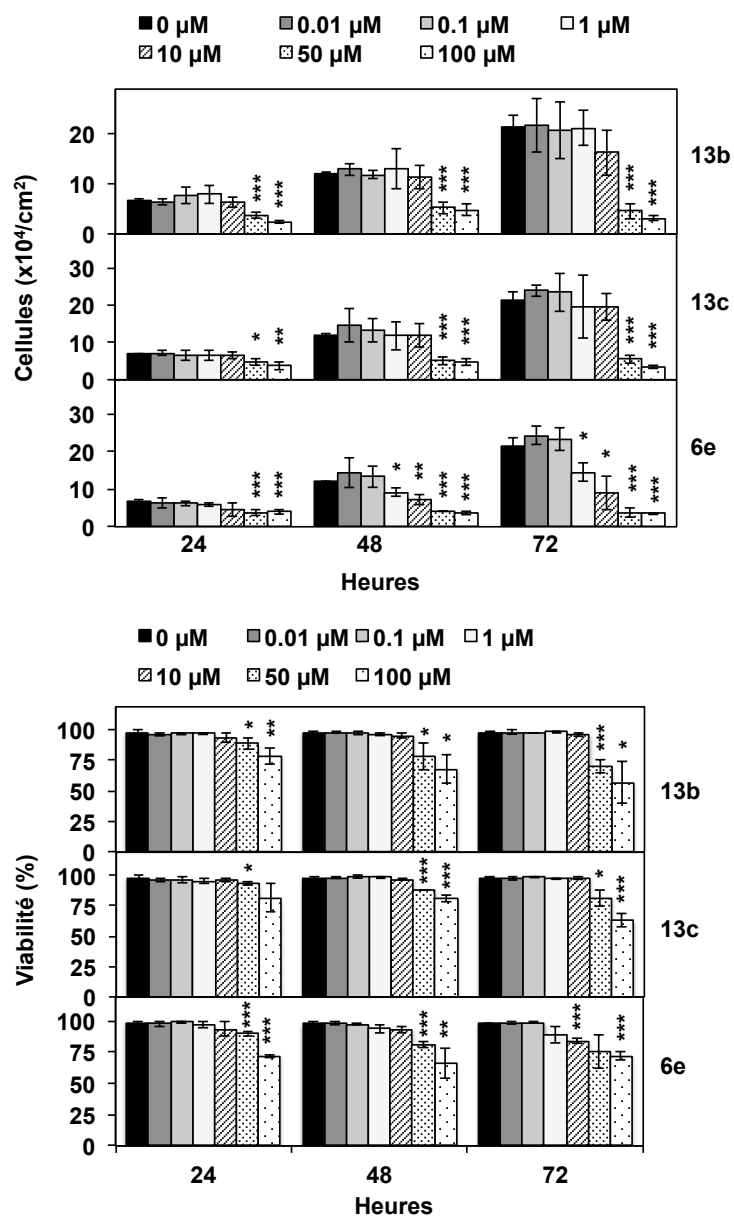
Légende à la suite de la figure.

C



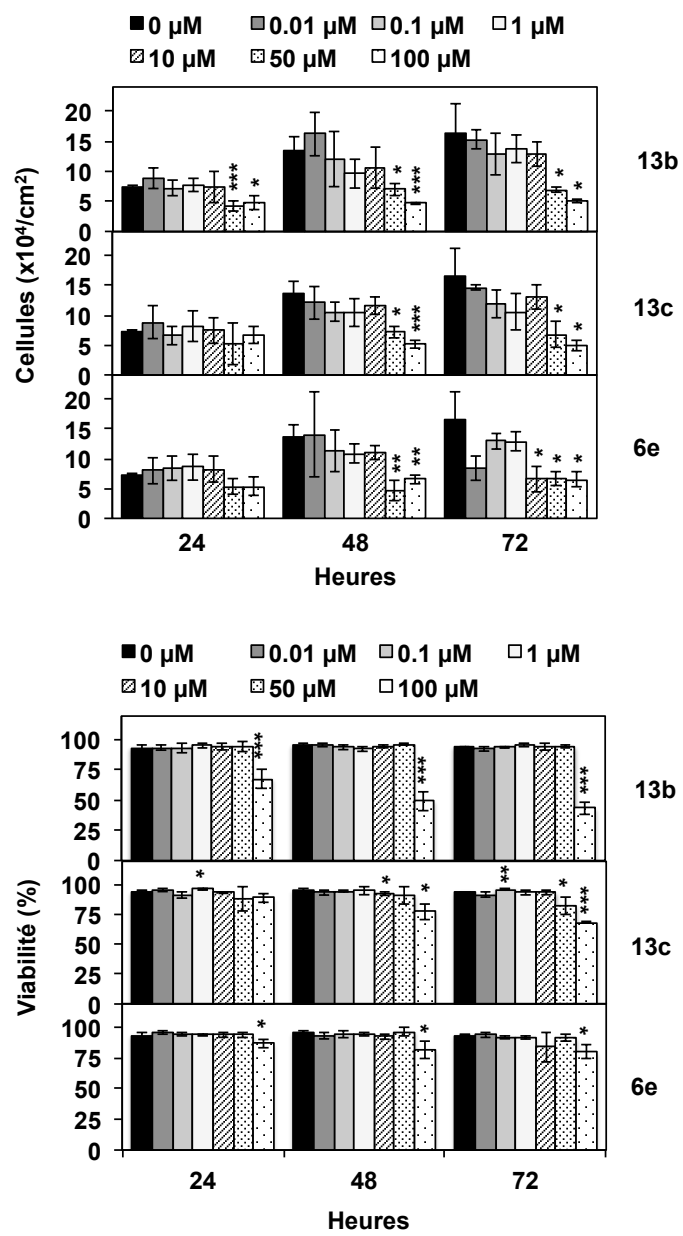
Légende à la suite de la figure.

D



Légende à la suite de la figure.

E



Légende à la suite de la figure.

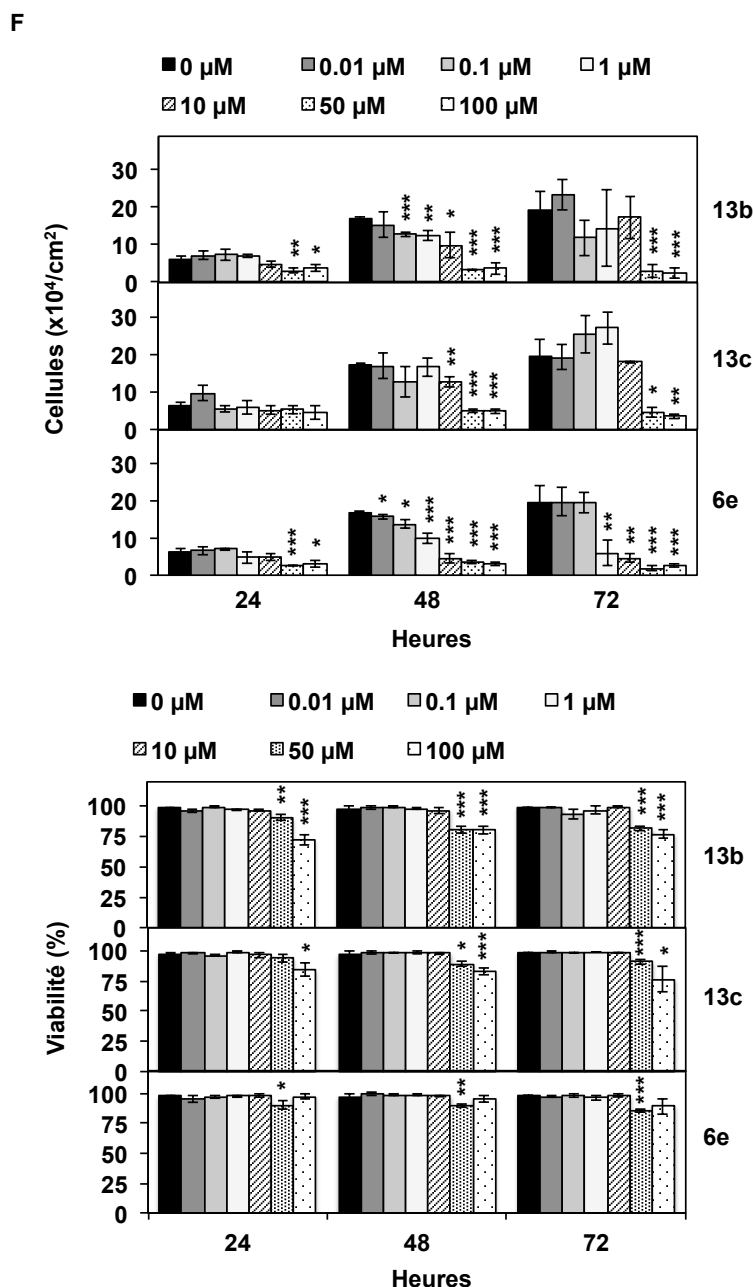


Figure 27: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la prolifération et la viabilité de différentes lignées cellulaires.

Les lignées cancéreuses PC-3 (A), TF-1 (B), RAJI (C), SK-N-AS (D) et MCF-7 (E) ainsi que la lignée non cancéreuses MCF-10A (F) ont été traitées avec une gamme de concentration des acides 4-hydroxybenzoïques indiqués. Après 24, 48 et 72 heures, le nombre de cellules totales ainsi que la viabilité ont été évalués. Les résultats présentés sont la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

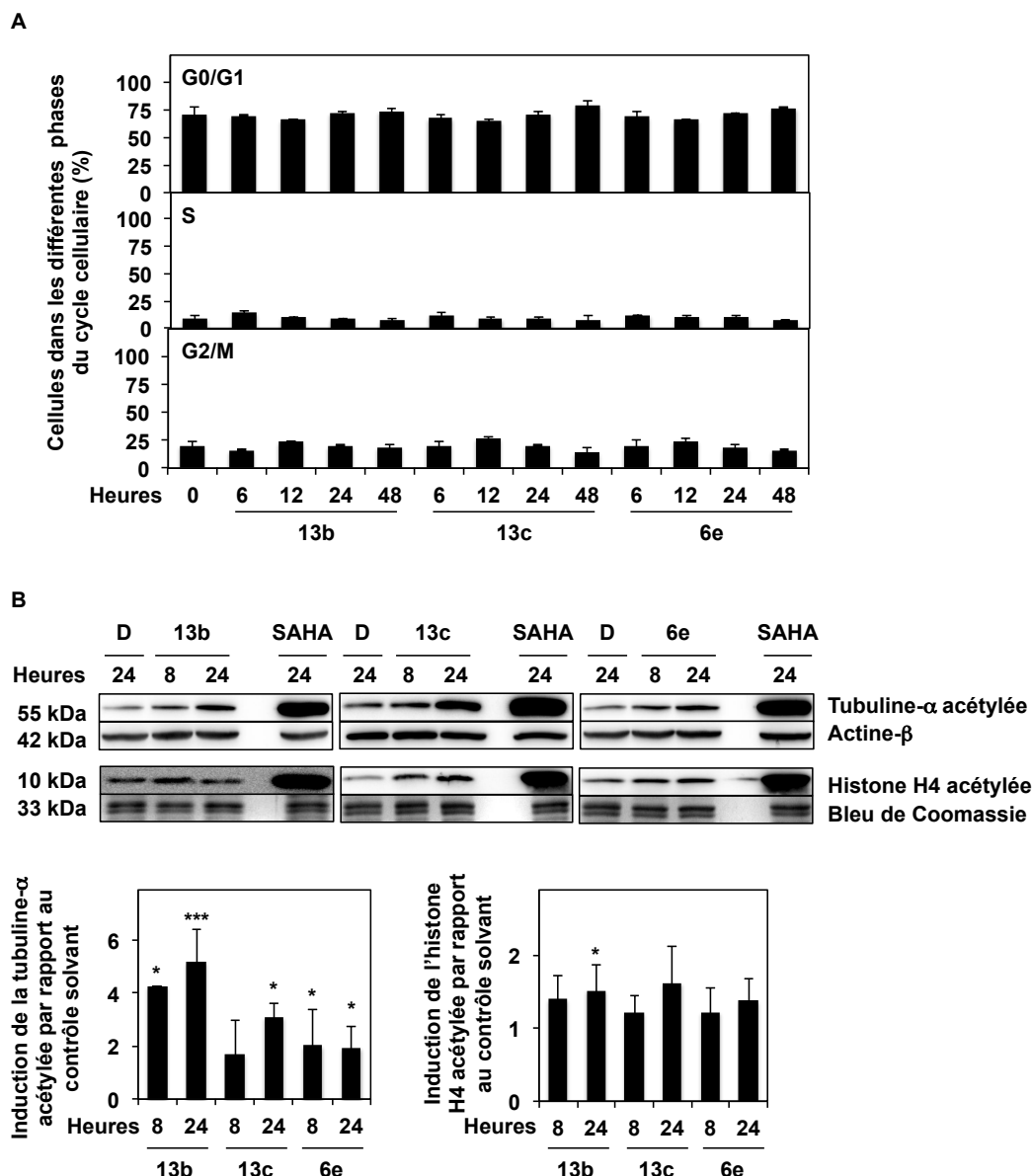


Figure 28: Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur les cellules MCF-7.

Les cellules MCF-7 ont été traitées avec 50 μ M de composé aux temps indiqués. (A) La distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire est analysée par cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium. (B) L'acétylation de l'histone H4 et de la tubuline- α a été analysée par Western Blot. La coloration au bleu de Coomassie et l'actine- β sont utilisées en tant que contrôles de chargement. Le SAHA (2 μ M) est utilisé comme inhibiteur de HDAC de référence. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Les histogrammes présentés sont la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Les composés 13b, 13c et 6e diminuent préférentiellement la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses comparées aux cellules saines et non cancéreuses.

IV.3. Effet des composés inhibiteurs spécifiques de HDAC6

Le criblage *in vitro* avait permis d'identifier les composés **13a** et **7b** comme inhibiteurs spécifiques de HDAC6 avec des CI_{50} respectives de 20 et 0,2 μM .

IV.3.1. Effet des composés **13a** et **7b** sur la viabilité et la prolifération

L'activité *in cellulo* des composés **13a** et **7b** a été testée sur la prolifération et la viabilité de huit modèles de tumeurs solides et non solides: les lignées K-562, RAJI, U-937, JURKAT, PC-3, LNCaP, MDA-MB231 et MCF-7. Après 72 heures de traitement avec une gamme de concentration, le test d'exclusion au bleu de Trypan a permis d'observer une diminution importante de la concentration cellulaire dès 10 μM ainsi qu'une diminution de la viabilité à partir de 25 μM de façon dépendante de la concentration (Figure 29). Afin d'analyser une potentielle cytotoxicité différentielle vis-à-vis de cellules saines et non cancéreuses, les cellules périphériques mononuclées sanguines (PBMC) et les cellules MCF-10A ont été traitées. La Figure 30A montre qu'après 48 heures de traitement, la viabilité des PBMC est faiblement affectée avec 100 μM de **7b**. Le composé **13a** diminue la prolifération des cellules MCF-10A dès 10 μM et la viabilité à partir de 50 μM , alors que le composé **7b** induit une diminution de la prolifération et de la viabilité, respectivement, à partir de 25 et 100 μM (Figure 30B).

Les composés 13a et 7b diminuent la prolifération et la viabilité de différentes lignées cancéreuses mais ont un effet modéré sur la viabilité des cellules saines et non cancéreuses.

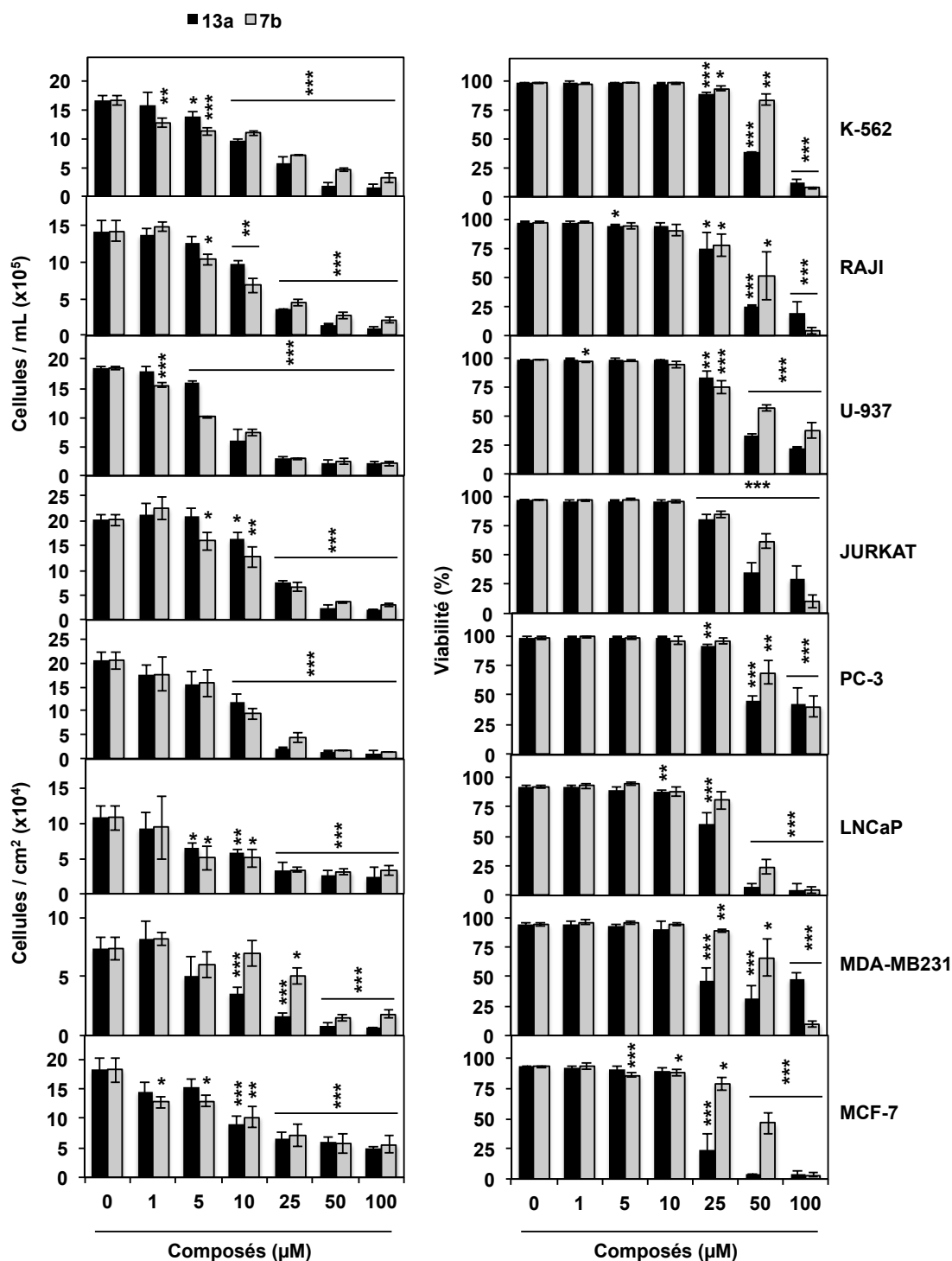


Figure 29: Les composés 13a et 7b diminuent la prolifération et la viabilité de différentes lignées cancéreuses.

Les cellules en suspension K-562, RAJI, U-937 et JURKAT et les cellules adhérentes PC-3, LNCaP, MDA-MB231 et MCF-7 ont été traitées avec les composés **13a** et **7b** aux concentrations indiquées. Après 72 heures de traitement la prolifération (panneau de gauche) et la viabilité (panneau de droite) ont été évaluées. Les histogrammes représentent la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle 0, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

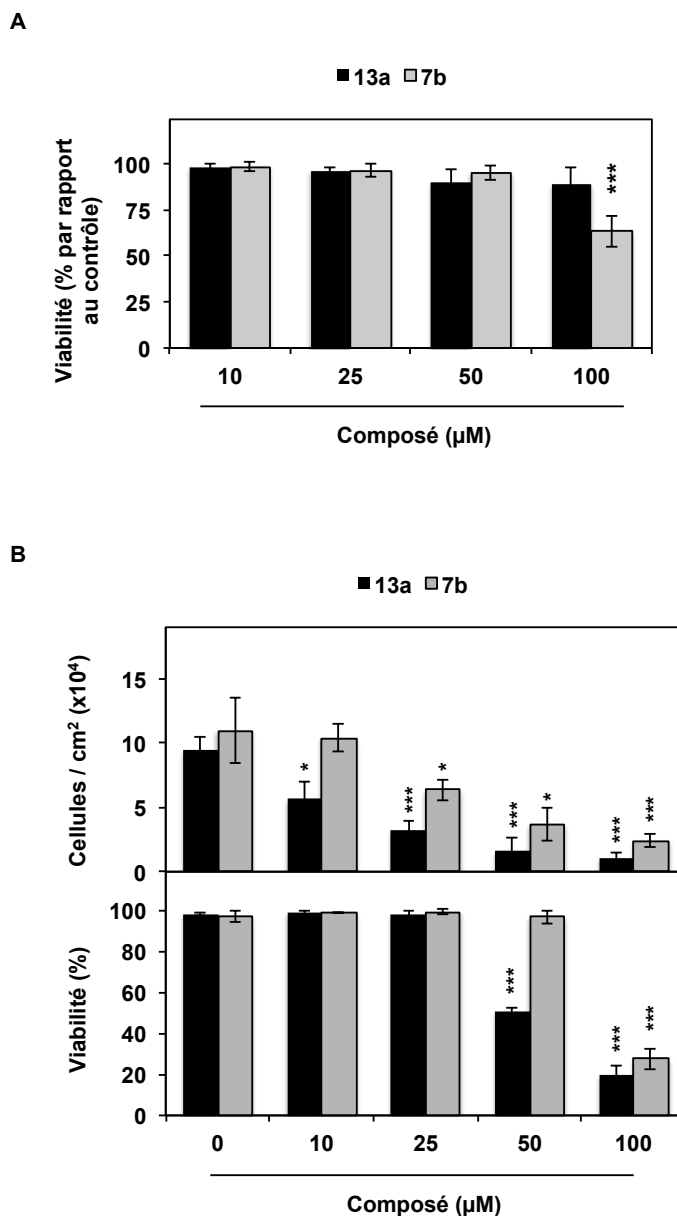


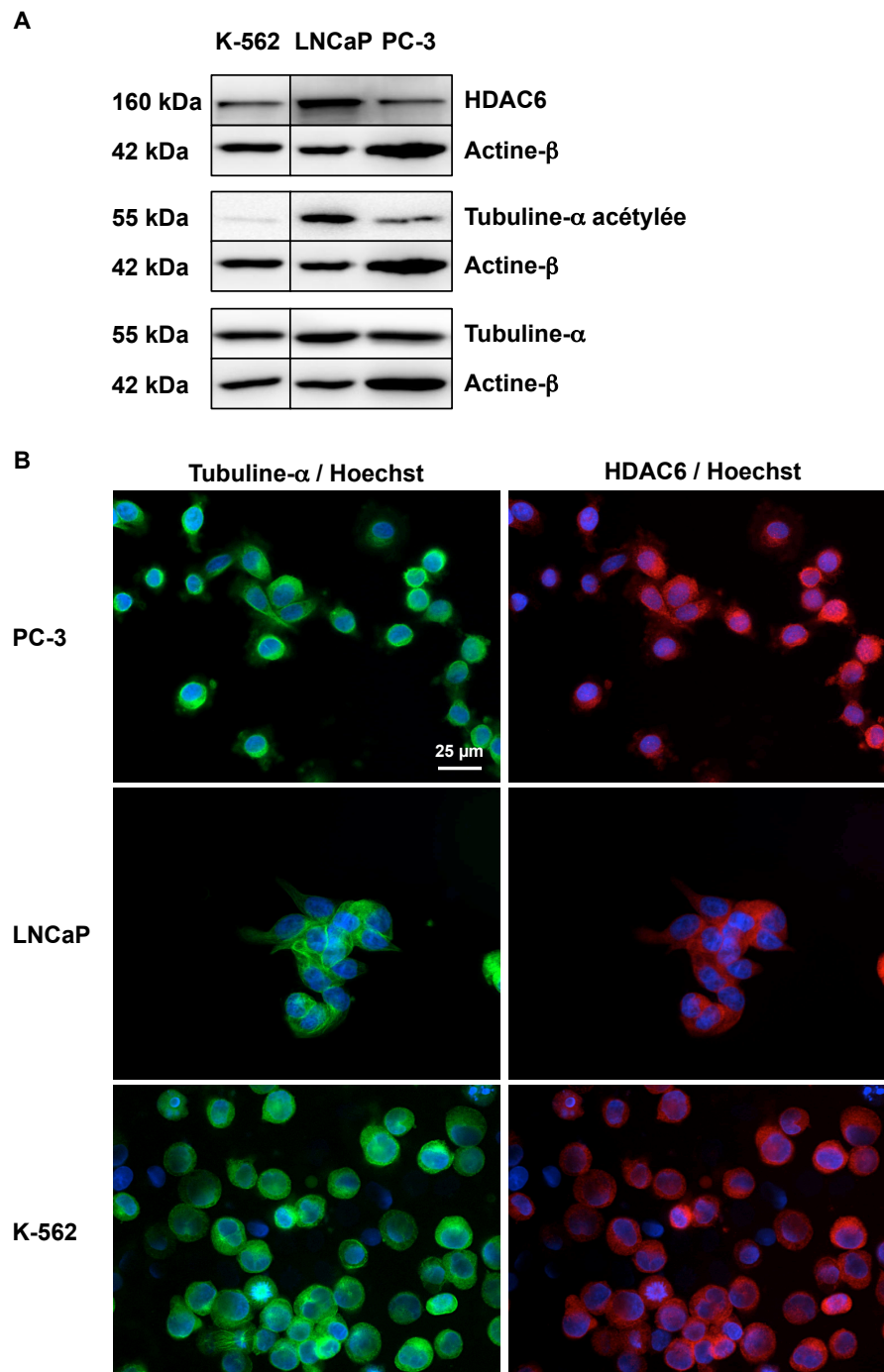
Figure 30: Effet des composés 13a et 7b sur la viabilité de cellules saines et non cancéreuses.

Les PBMC de patients sains (A) et les cellules non cancéreuses MCF-10A (B) ont été traitées pendant 48 heures aux concentrations indiquées. Un test d'exclusion au bleu de Trypan a été réalisé et les histogrammes représentent la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle 0, avec * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

IV.3.2. Etude de la localisation cellulaire de HDAC6 dans différents modèles cancéreux

Après avoir étudié l'effet des composés **13a** et **7b** sur la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses, nous avons choisi les cellules PC-3, LNCaP et K-562. Le niveau basal de HDAC6, de la tubuline- α acétylée et totale ainsi que la localisation cellulaire de HDAC6 ont été caractérisés dans ces modèles. L'analyse par Western Blot montre une expression basale plus importante de HDAC6 dans les cellules LNCaP comparée aux cellules K-562 et PC-3 dont le taux protéique de HDAC6 est comparable (Figure 31A). Le taux basal de tubuline- α totale est comparable dans les trois lignées. Par contre, le niveau basal de tubuline- α acétylée n'est pas corrélé au taux de HDAC6. En effet, un taux supérieur est observé dans les cellules LNCaP comparé aux cellules K-562 et PC-3, alors que ce sont les cellules qui expriment le plus HDAC6. Il est décrit dans la littérature que HDAC6 peut être localisée dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau, ces résultats peuvent alors être expliqués par une localisation cellulaire différente de HDAC6. Afin de vérifier la localisation de HDAC6, une étude par immunomarquage a été réalisée (Figure 31B). Les résultats montrent que HDAC6 est principalement cytoplasmique dans les trois lignées cellulaires. De plus, l'étude par Western Blot de la proportion de HDAC6 dans le noyau et le cytoplasme confirme ceux obtenus par microscopie à fluorescence (Figure 31C).

HDAC6 est principalement localisée dans le cytoplasme des cellules PC-3, LNCaP et K-562.



Légende à la suite de la figure.

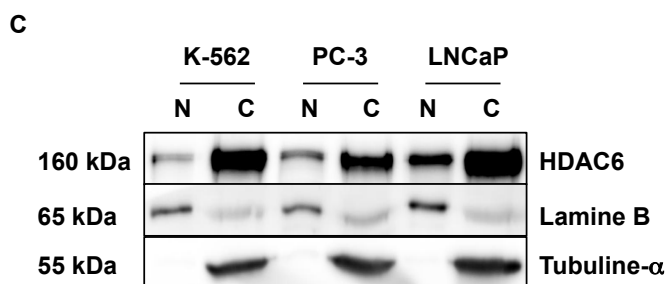


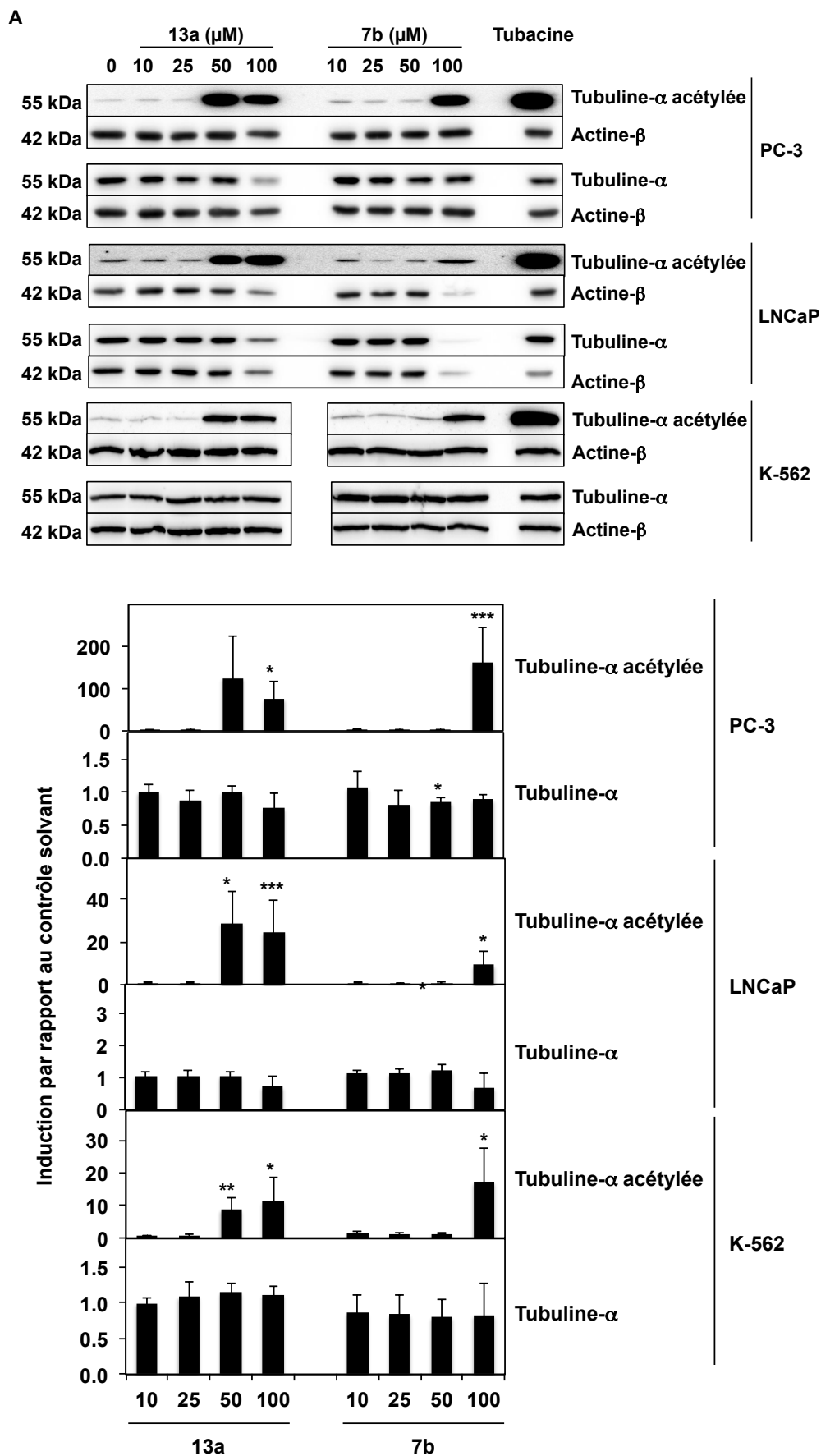
Figure 31: Etude du niveau d'expression basal des protéines HDAC6, tubuline- α acétylée et totale ainsi que de la localisation cellulaire de HDAC6 dans différentes lignées cancéreuses.

(A) Dans les cellules K-562, PC-3 et LNCaP, le taux de HDAC6, tubuline- α acétylée et totale a été étudié par Western Blot. (B) Les cellules ont été marquées par le Hoechst (bleu) et avec des anticorps dirigés contre la tubuline- α (vert) et HDAC6 (rouge). Les photographies sont représentatives de trois expériences indépendantes. (C) La proportion de HDAC6 dans les fractions nucléaires (N) et cytoplasmiques (C) a été analysée sur 5% de chaque fraction. L'actine- β , la lamine B et la tubuline- α sont utilisées en tant que contrôles de chargement. Les blots sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

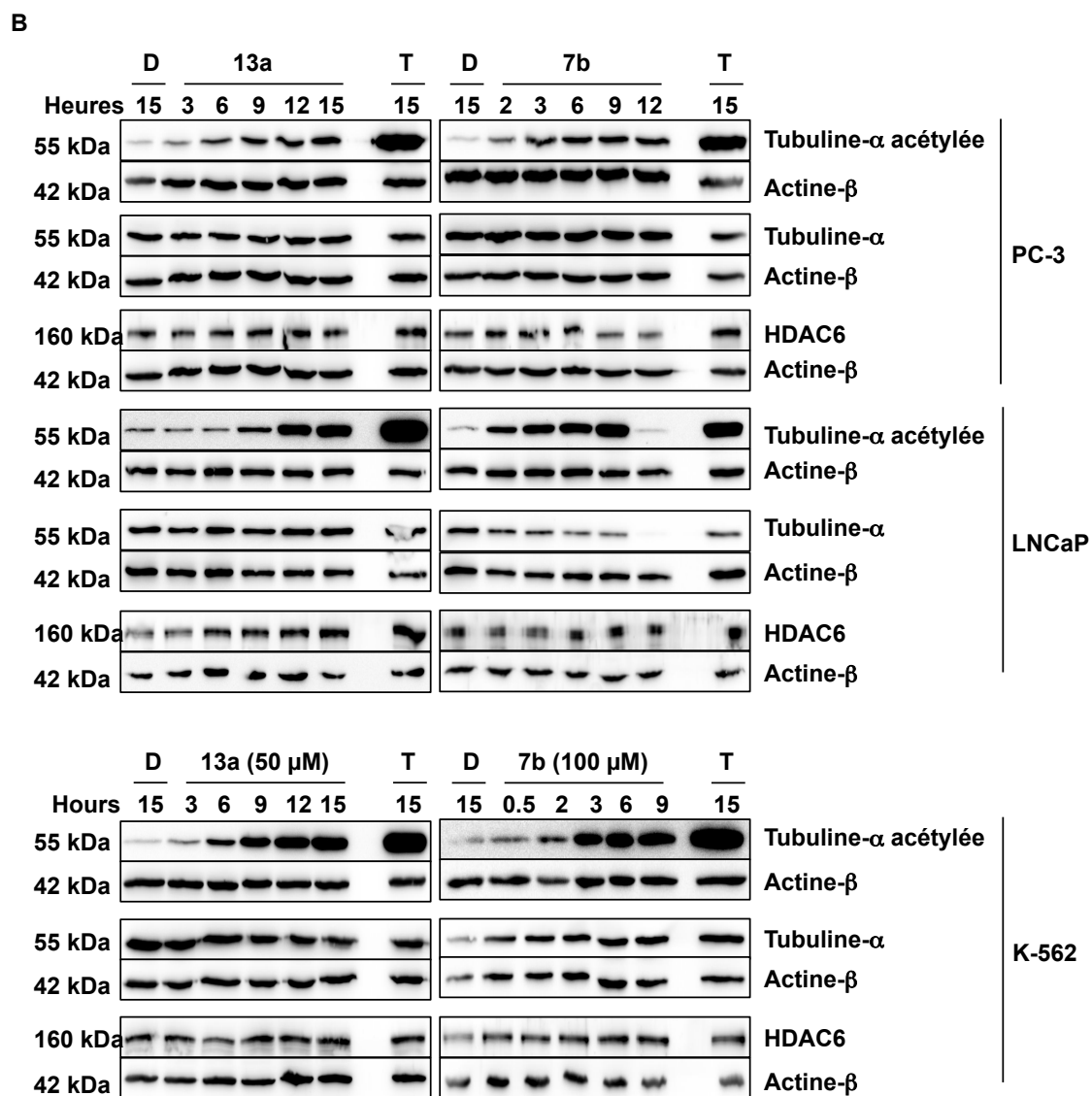
IV.3.3. Les composés **13a** et **7b** induisent l'acétylation de la tubuline- α

L'analyse *in cellulo* de l'inhibition de HDAC6 par les composés **13a** et **7b** a été réalisée par l'étude du statut d'acétylation de la tubuline- α . Les résultats obtenus avec les cellules PC-3, LNCaP et K-562 montrent une forte induction de l'acétylation de la tubuline- α après traitement dès 50 μ M de **13a** et 100 μ M de **7b** sans affecter le taux de tubuline- α totale (Figure 32A). La suite de l'étude est alors réalisée avec les concentrations de 50 μ M de composé **13a** et de 100 μ M de composé **7b**.

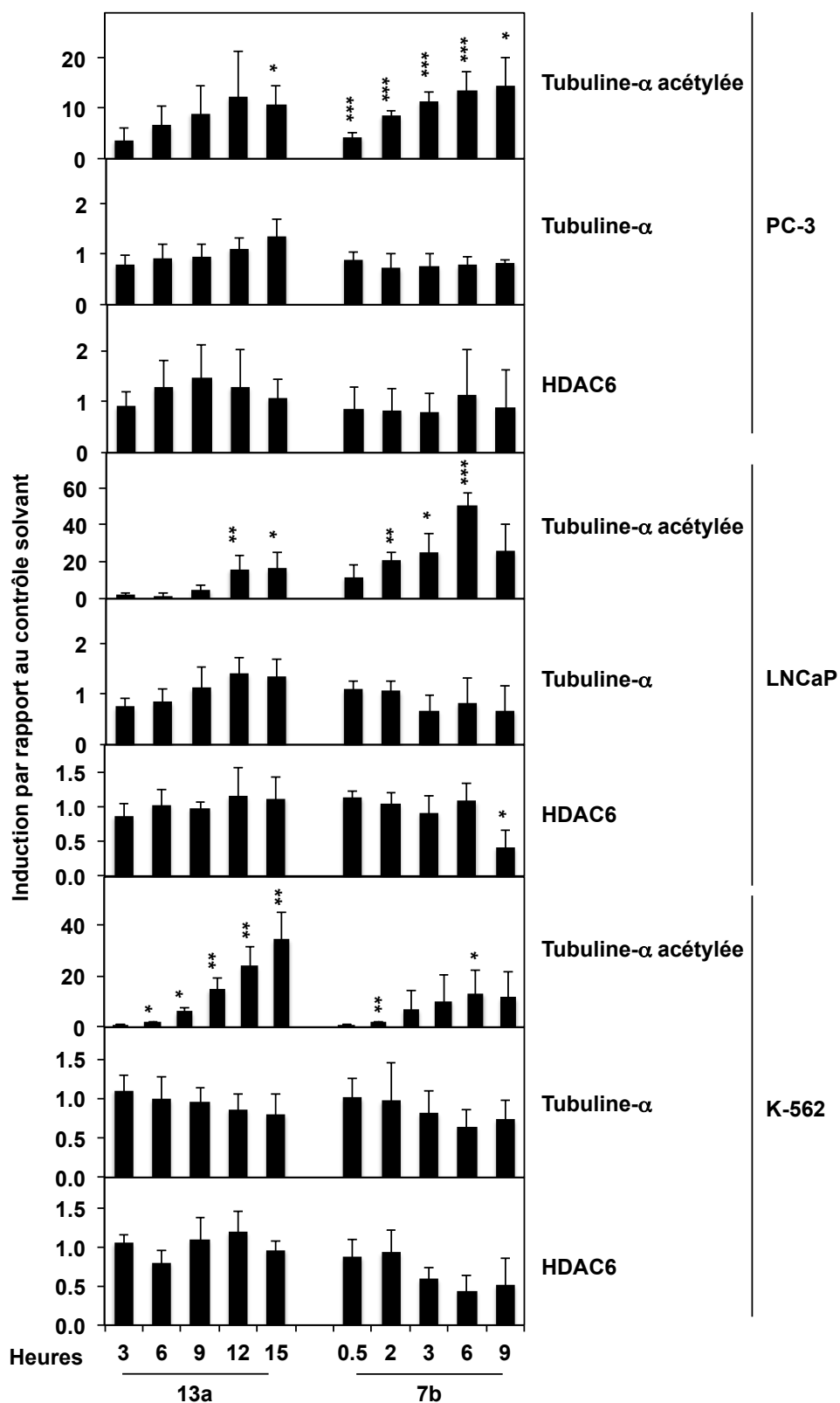
L'acétylation/désacétylation de la tubuline- α est un mécanisme rapide, la cinétique d'induction de l'hyperacétylation de cette protéine a alors été étudiée après traitement des cellules avec les composés **13a** et **7b**. Le composé **13a** induit l'acétylation dès 3 heures de traitement dans les cellules PC-3 et K-562 et dès 9 heures de traitement dans les cellules LNCaP pour atteindre un maximum entre 12 et 15 heures de traitement (Figure 32B, panneau de gauche). Le composé **7b** augmente fortement l'acétylation de la tubuline- α dès 2 heures de traitement dans les cellules adhérentes et dès 30 minutes de traitement dans les cellules K-562 pour atteindre un maximum autour de 9 heures de traitement (Figure 32B, panneau de droite). Les taux de tubuline- α totale ainsi que de HDAC6 ne sont pas affectés par le traitement avec ces deux molécules.



Légende à la suite de la figure.



Légende à la suite de la figure.



Légende à la suite de la figure.

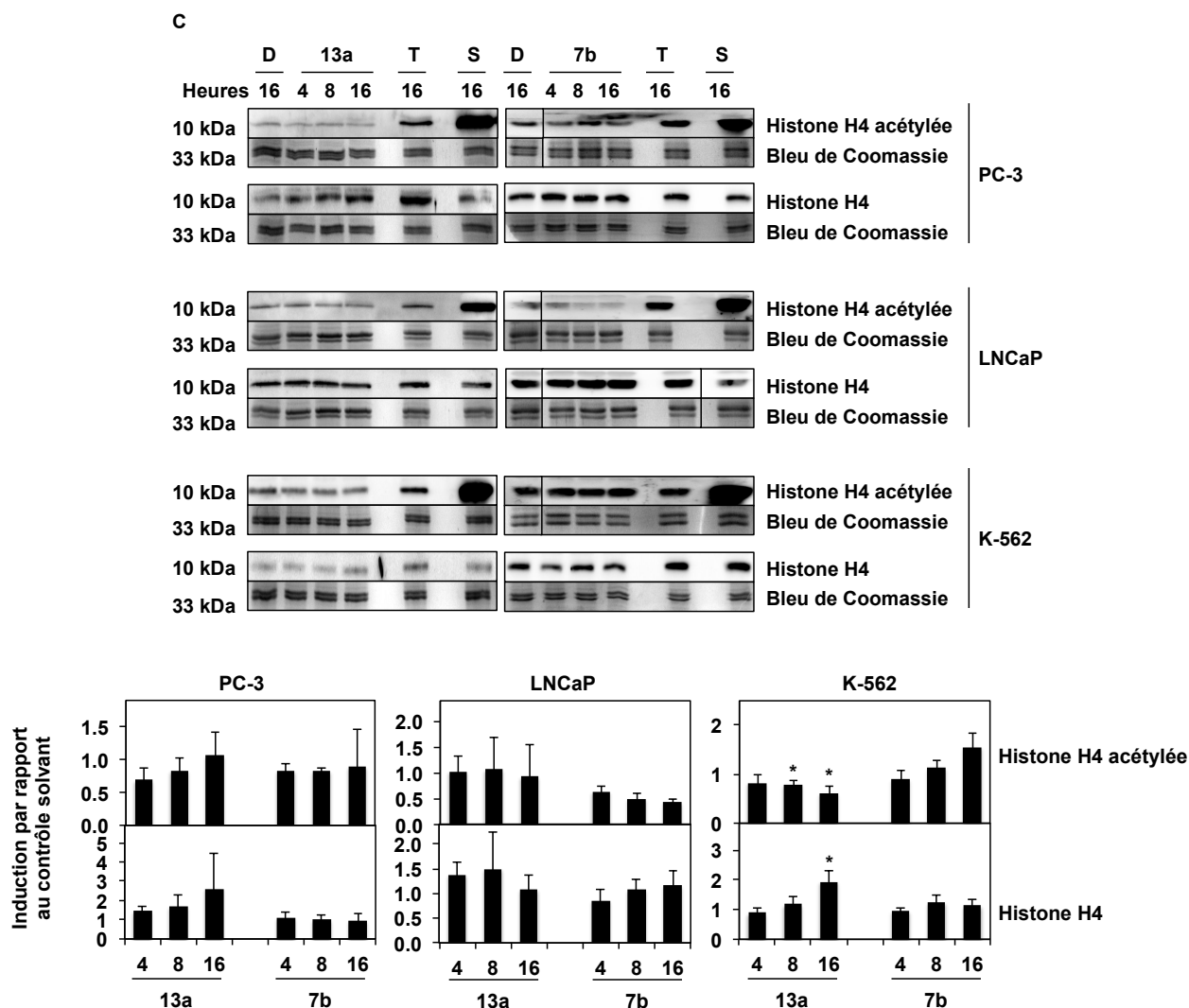


Figure 32: Les composés 13a et 7b induisent l'acétylation de la tubuline- α .

(A) Le taux de tubuline- α acétylée et totale a été analysé par Western Blot après 24 heures de traitement des cellules PC-3, LNCaP et K-562 avec une gamme de concentration des composés **13a** et **7b**. (B) Le taux de tubuline- α acétylée et totale ainsi que de HDAC6 a été étudié après différents temps de traitement avec 50 μ M de composé **13a** et 100 μ M de composé **7b**. (C) Les cellules ont été traitées avec 50 μ M de composé **13a** et 100 μ M de composé **7b** aux temps indiqués et le taux d'acétylation de l'histone H4 ainsi que l'histone H4 totale a été étudiée par Western Blot. Le DMSO (D) est utilisé comme contrôle solvant, la tubacine (T, 2 μ M) est utilisé en tant qu'inhibiteur de HDAC6 de référence et le SAHA (S, 2 μ M) est utilisé comme inhibiteur de HDAC de référence. La coloration au bleu de Coomassie et l'actine- β sont utilisées en tant que contrôles de chargement. Les blots sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

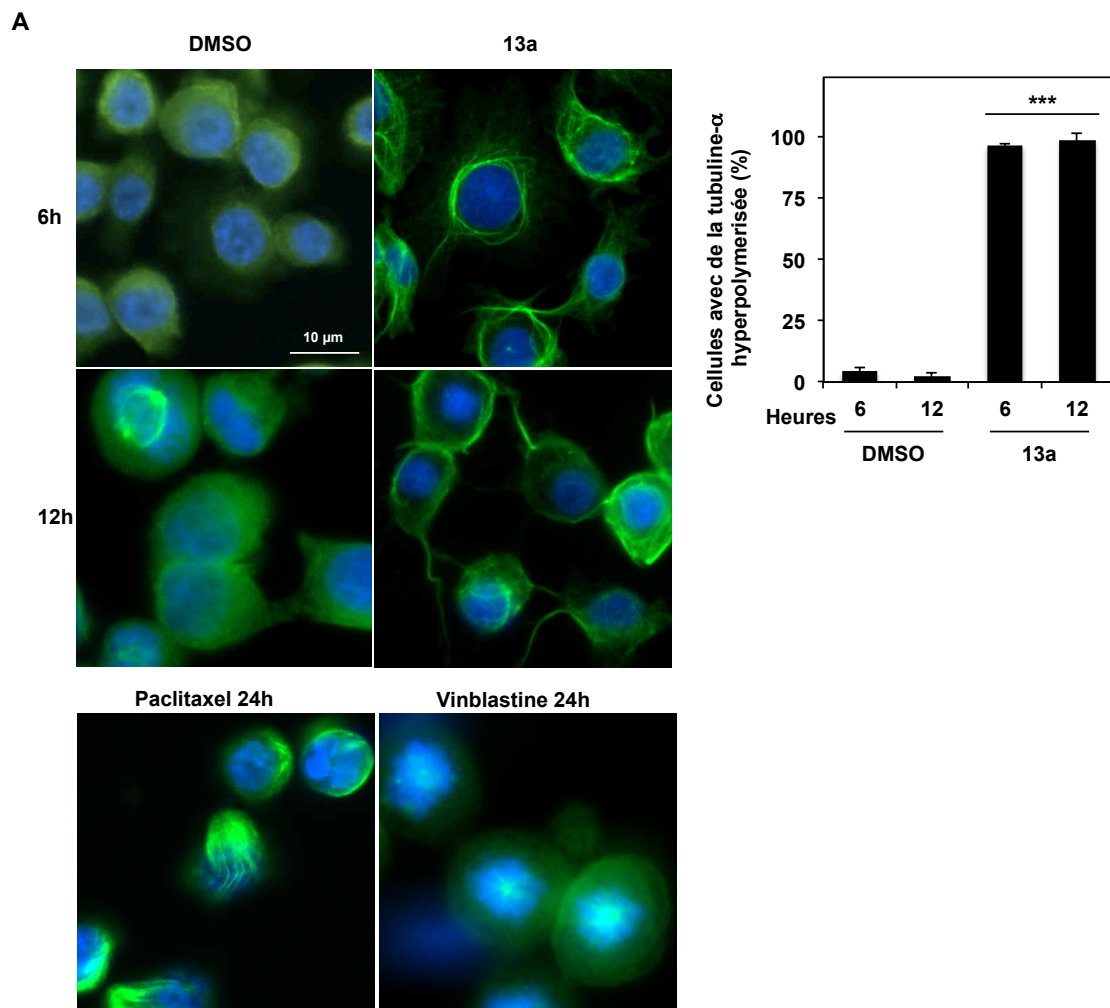
Comme montré précédemment, HDAC6 est principalement localisée dans le cytoplasme dans ces modèles cellulaires, par conséquent, l'analyse de l'effet des composés sur l'acétylation des histones précise l'inhibition spécifique de HDAC6 *in cellulo*. Les résultats montrent que les composés **13a** et **7b** n'ont pas d'effet sur l'acétylation de l'histone H4 dans les trois lignées cellulaires (Figure 32C).

Les composés 13a et 7b inhibent spécifiquement HDAC6 *in vitro* et induisent une forte hyperacétylation de la tubuline- α dans les cellules PC-3, LNCaP et K-562.

IV.3.4. Effet du composé 13a sur l'architecture des microtubules

Le statut d'acétylation de la tubuline- α joue un rôle dans le dynamisme des microtubules, c'est-à-dire sur le taux de tubuline polymérisée et non polymérisée (Matsuyama *et al.*, 2002). Par conséquent, suite à l'observation de l'augmentation de l'acétylation de la tubuline- α après traitement avec le composé 13a (Figure 32), l'architecture des microtubules a été étudiée. Les cellules PC-3 (Figure 33A) et LNCaP (Figure 33B) ont été traitées avec 50 μ M de composé **13a** aux temps de traitement induisant un maximum d'acétylation de la tubuline- α , soient 6 et 12 heures. Grâce au marquage intracellulaire de la tubuline- α , une modification générale de la forme des cellules, les cellules LNCaP sont plus rondes, ainsi qu'un réseau de tubuline- α plus polymérisé sont observés après traitement en comparaison aux cellules contrôles DMSO. Ces changements se rapprochent de ceux observés dans les cellules traitées au paclitaxel, qui est un inhibiteur de la dépolymérisation de la tubuline. La vinblastine, utilisée comme inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, montre un marquage plus diffus dans le cytoplasme que les cellules contrôles. De plus, dans les cellules LNCaP après 6 heures de traitement avec le composé **13a**, environ 50% des cellules possèdent des extensions cytoplasmiques. Ces résultats concordent avec l'inhibition de HDAC6 et l'induction de l'acétylation de la tubuline- α observée (Figure 32) par Western Blot.

Le composé 13a modifie la polymérisation de la tubuline- α dans les cellules PC-3 et LNCaP.



Légende à la suite de la figure.

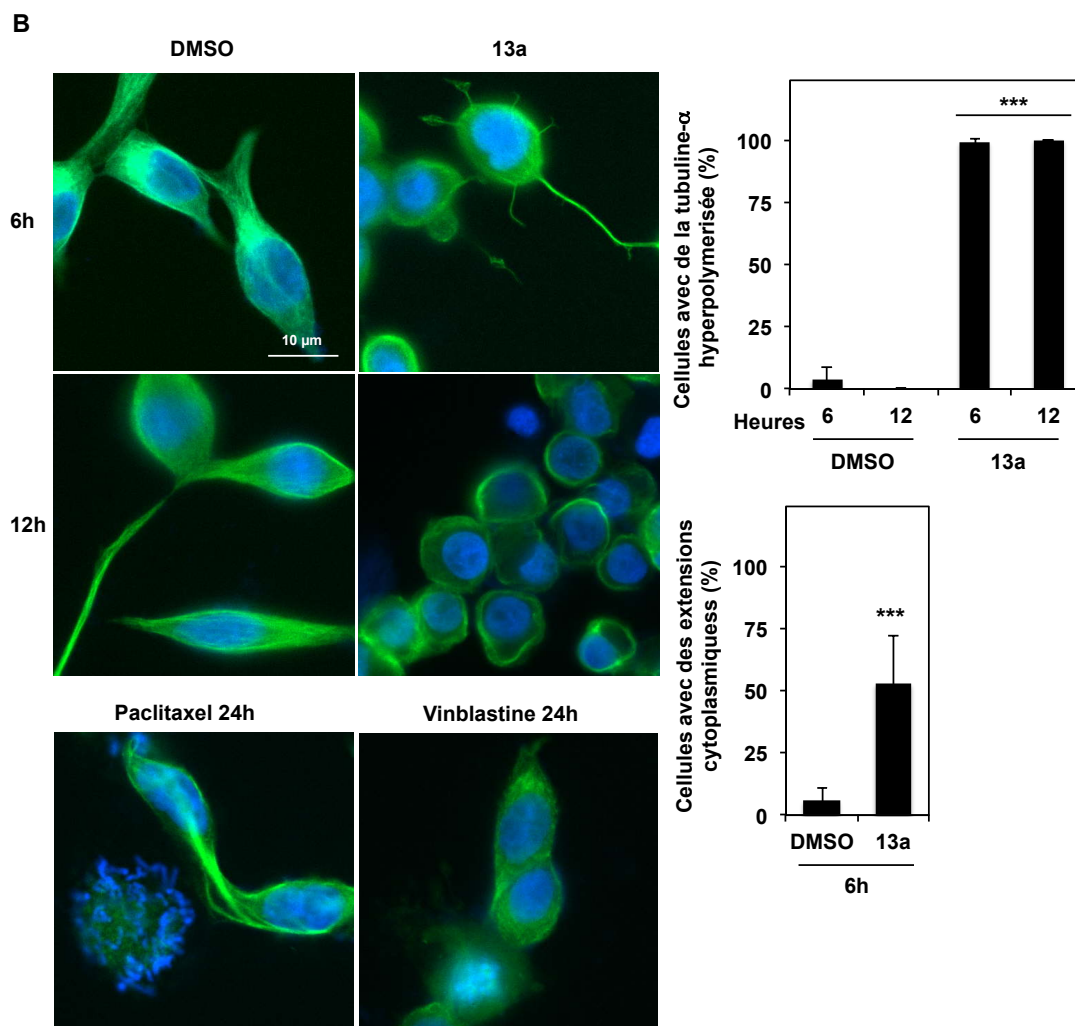


Figure 33: Le composé 13a modifie l'architecture des microtubules.

Les cellules PC-3 (A) et LNCaP (B) ont été traitées aux temps indiqués avec 50 μM de composé **13a**. Le marquage intracellulaire de la tubuline-α par un anticorps spécifique (vert) a permis de mettre en évidence les microtubules. Les noyaux ont été marqués au Hoechst (bleu). Le paclitaxel (10 nM, 24 heures) et la vinblastine (10 nM, 24 heures) ont été utilisés comme contrôles respectifs de l'inhibition de la dépolymérisation et de la polymérisation de la tubuline-α. Les photographies montrent des cellules représentatives des populations considérées et sont représentatives de trois expériences indépendantes. Le pourcentage de cellules avec de la tubuline-α hyperpolymérisée ainsi que le pourcentage de cellules LNCaP avec des extensions cytoplasmiques sont représentés sur les histogrammes qui correspondent à la moyenne ± l'écart type de la quantification de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec *** p < 0,005.

IV.3.5. Effet du composé 13a sur la progression du cycle cellulaire

Les résultats précédents montrent que le composé **13a** induit fortement l'acétylation de la tubuline- α (Figure 32), module l'architecture des microtubules (Figure 33) et diminue la prolifération des cellules (Figure 29). Ainsi, l'effet de cette molécule sur la progression du cycle cellulaire des cellules PC-3, LNCaP et K-562 a été étudié. Le composé **13a** induit une accumulation des cellules PC-3 en phase G2/M dès 12 heures de traitement, alors que la distribution des cellules LNCaP et K-562 dans les différentes phases du cycle n'est pas affectée (Figure 34).

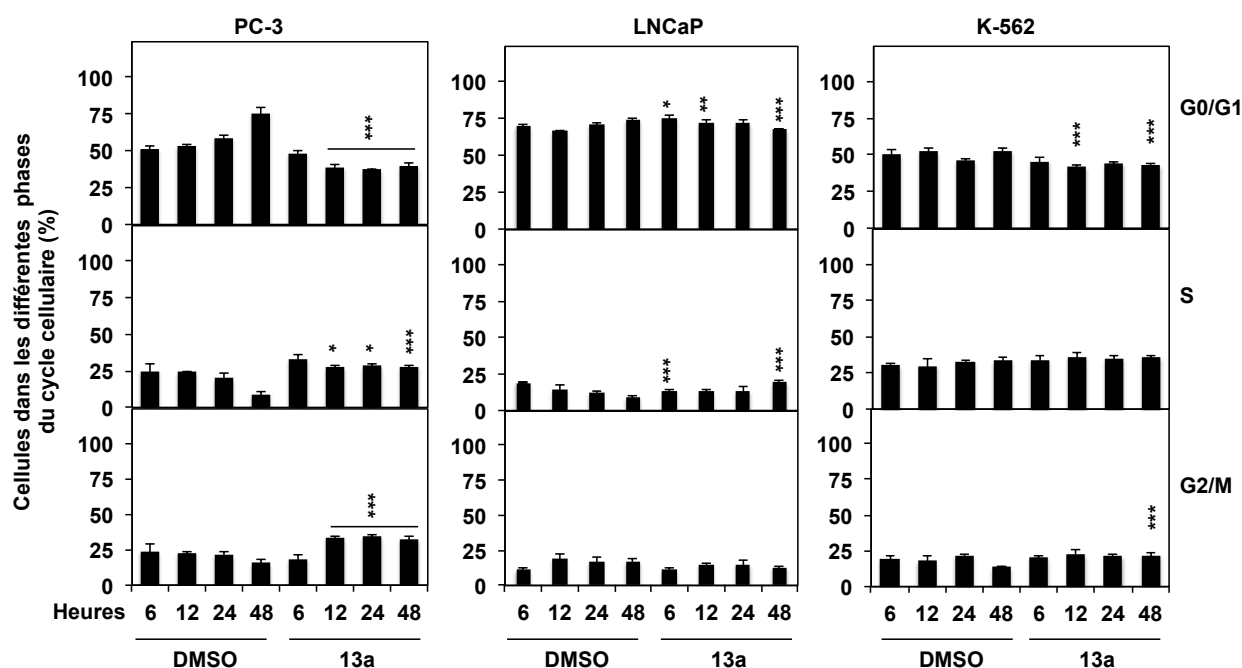


Figure 34: Effet du composé 13a sur le cycle cellulaire.

Les cellules PC-3, LNCaP et K-562 ont été traitées pendant 6 à 48 heures par 50 μ M de composé **13a** et la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

IV.3.6. Effet du composé 13a sur la mort cellulaire

L'évaluation du nombre de cellules positives au bleu de Trypan après traitement avec le composé **13a** révèle une augmentation du taux de cellules mortes en fonction du temps pour atteindre entre 60 et 70% après 72 heures de traitement pour les trois lignées cellulaires (Figure 35A). Ces résultats ont été confirmés dans les cellules K-562 par l'augmentation du nombre de cellules en phase subG1 (Figure 35B).

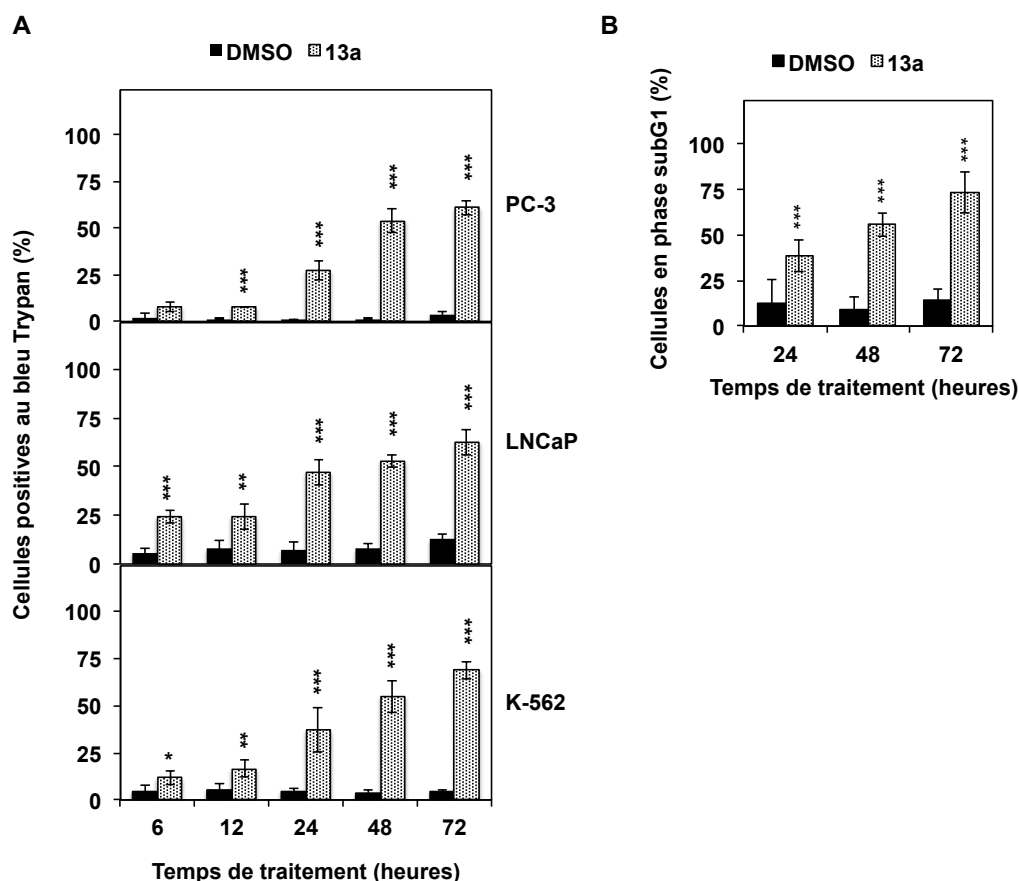


Figure 35: Le composé 13a induit la mort cellulaire.

(A) Les cellules PC-3, LNCaP et K-562 ont été traitées avec 50 μ M de composé **13a** aux temps indiqués et le test d'exclusion au bleu de Trypan a permis de déterminer le nombre de cellules positives. (B) Le pourcentage de cellules K-562 en phase subG1 est quantifié après analyse de la population cellulaire ayant une taille et une émission d'IP faible. Les histogrammes correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Afin de déterminer le type de mort cellulaire induit par le traitement des cellules PC-3, LNCaP et K-562 avec le composé **13a**, une analyse de la morphologie nucléaire a été réalisée après marquage des cellules au Hoechst et à l'iodure de propidium. La Figure 36 montre que le composé **13a** induit l'apoptose des cellules K-562 en fonction du temps de traitement atteignant 85% après 72 heures de traitement. Le composé augmente de manière modérée le nombre de cellules PC-3 positives à l'iodure de propidium et de manière importante le nombre de cellules LNCaP positives à l'iodure de propidium pour atteindre près de 90% après 48 heures de traitement. Comme attendu, le traitement des trois lignées cellulaires par le cisplatine induit une mort par apoptose.

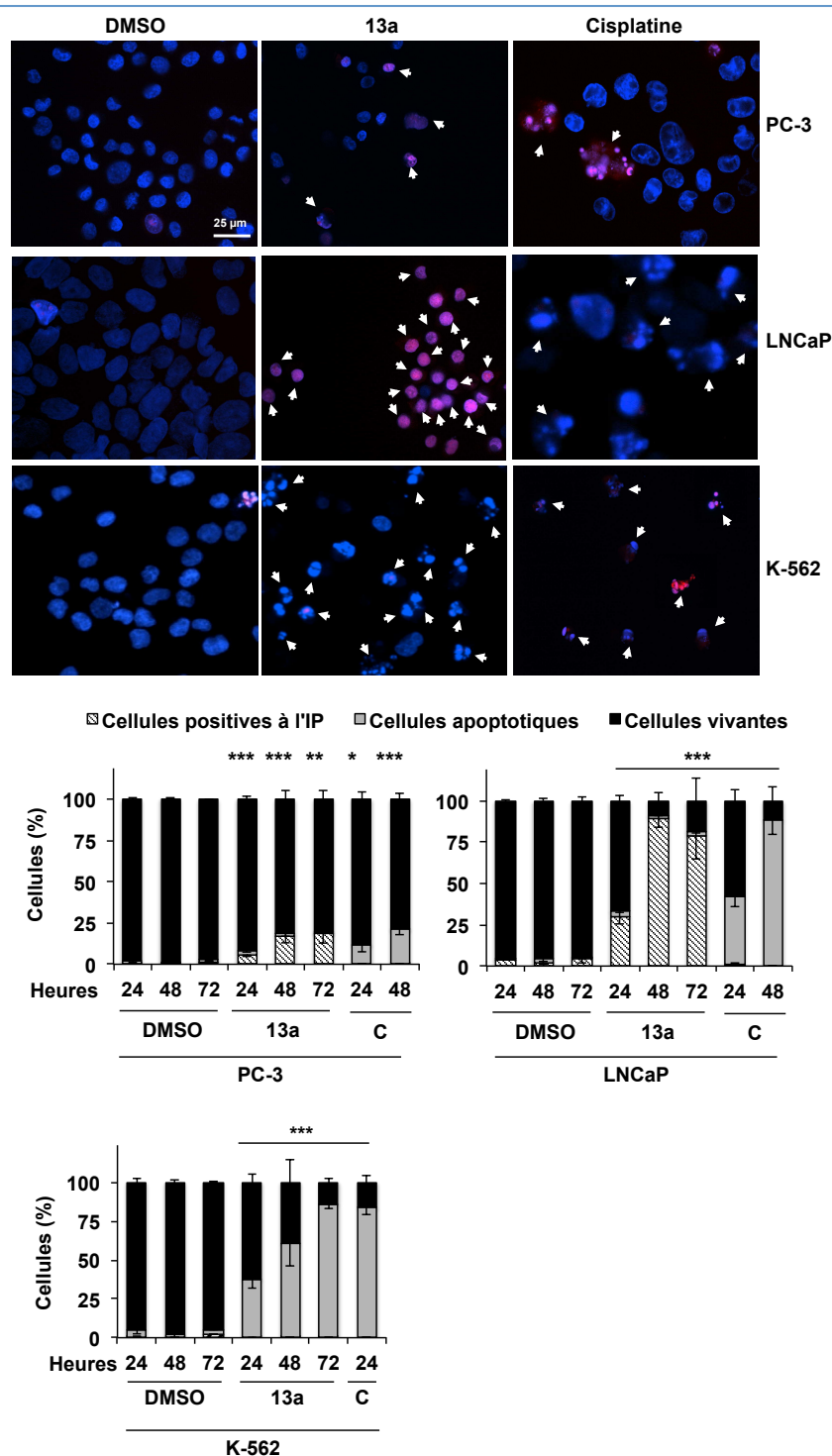


Figure 36: Le composé 13a affecte la viabilité des cellules PC-3, LNCaP et K-562.

Les cellules PC-3, LNCaP et K-562 ont été traitées avec 50 μ M du composé **13a** et la morphologie nucléaire a été analysée après marquage au Hoechst (bleu) et à l'iodure de propidium (IP, rouge). Les photographies, représentatives de trois expériences indépendantes, résultent de la superposition de photographies des cellules marquées au Hoechst et à l'IP. Elles ont été prises après 72 heures de traitement avec le composé **13a** et 24 heures par le cisplatine (50 μ M), utilisé comme inducteur de l'apoptose de référence. Les histogrammes correspondent à la moyenne \pm l'écart type des quantifications des cellules positives à l'IP, apoptotiques et vivantes issues de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

L'apoptose des cellules K-562 est accompagnée d'un clivage de la caspase initiateur 9, des caspases effectrices 3 et 7 ainsi que de l'un des substrats des caspases, PARP, après 24 et 48 heures de traitement avec le composé **13a** (Figure 37). Le traitement avec le composé 13a n'induit pas de clivage de la caspase initiateur 8 indiquant une induction de la voie intrinsèque.

De plus, il est connu que l'activité pro-apoptotique de BAX peut être régulée indirectement par HDAC6. En effet, BAX est séquestré dans le cytoplasme par la protéine Ku70, l'empêchant ainsi d'être localisé à la mitochondrie. Subramanian *et al.* ont montré que le statut d'acétylation de Ku70 est important pour son interaction avec BAX et dépend de l'activité de HDAC6 (Subramanian *et al.*, 2011). Ainsi l'inhibition de HDAC6 induit l'acétylation de Ku70 qui libère BAX et qui peut être activé pour s'associer à la membrane externe de la mitochondrie. Afin d'étudier si cette voie est activée suite au traitement avec le composé **13a** pour induire l'apoptose des cellules K-562, l'activation de BAX a été analysée par microscopie à fluorescence grâce à un anticorps qui reconnaît spécifiquement la forme activée de BAX (BAX 6A7). Le cisplatine et la tubacine induisent l'activation de BAX après, respectivement, 24 et 48 heures de traitement (Figure 38A). Le composé **13a** induit aussi l'activation de BAX dans les cellules K-562 après 24 et 48 heures de traitement. De plus, le composé **13a** n'a pas d'effet sur l'expression de BAX (Figure 38B).

Le composé 13a induit la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules K-562, tout en activant la protéine pro-apoptotique BAX.

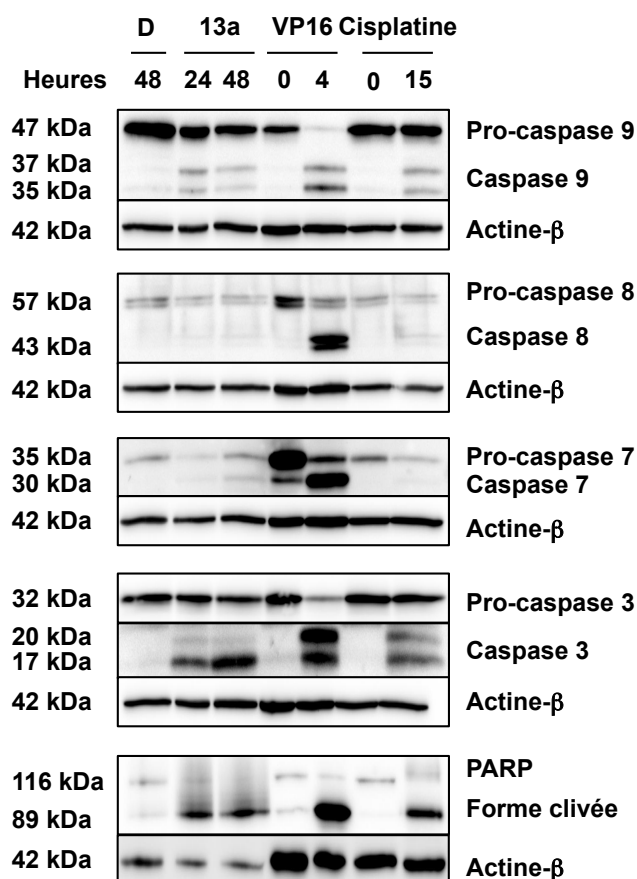
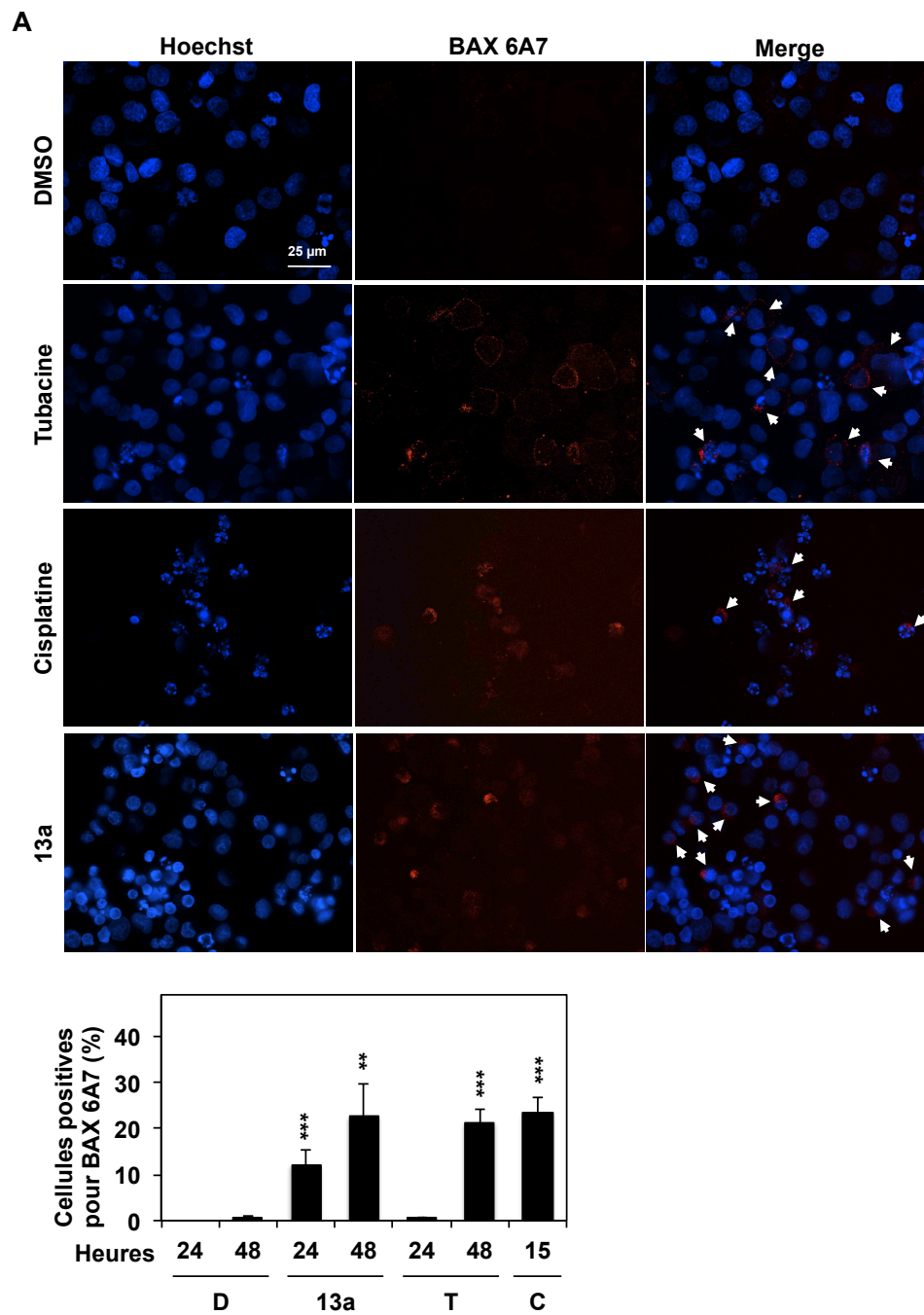


Figure 37: Le composé 13a induit la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées pendant 24 et 48 heures par 50 μM de composé **13a**. L'évaluation du clivage des caspases 9, 8, 7 et 3 ainsi que de leur substrat PARP est réalisée par Western Blot grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre leur forme entière et clivée. L'actine- β est utilisée en tant que contrôle de chargement. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Le cisplatine (C, 50 μM , 24 heures) et le VP16 (cellules U-937 traitées avec 100 μM d'étoposide) sont utilisés comme inducteurs de l'apoptose de référence.



Légende à la suite de la figure.

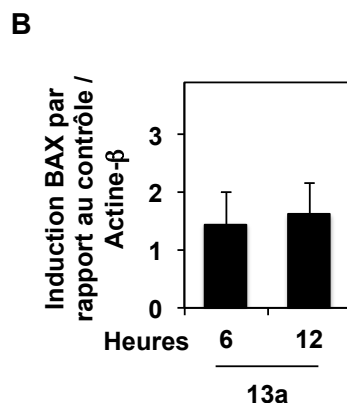


Figure 38: Le traitement avec le composé 13a induit l'activation de BAX.

(A) L'activation de BAX est analysée après traitement des cellules K-562 avec 50 μ M de composé **13a** et immunomarquage des cellules grâce à un anticorps qui reconnaît spécifiquement BAX activé (BAX 6A7, rouge) et au Hoechst (bleu). La tubacine (T, 10 μ M, 48 heures) et le cisplatine (C, 50 μ M, 15 heures) sont utilisés comme inducteurs de l'activation de BAX de référence. Les photographies sont représentatives de trois expériences indépendantes. La quantification des cellules positives pour BAX 6A7 est représentée dans l'histogramme qui correspond à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO (D) des temps correspondants, avec ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. (B) Après 6 et 12 heures de traitement, l'expression de BAX a été analysée par PCR en temps réel.

IV.3.7. Effet du composé 13a sur la fonction chaperonne de HSP90 α

Les cellules K-562 expriment la protéine de fusion Bcr-Abl et les cellules LNCaP expriment le récepteur aux androgènes (RA). Ces deux protéines sont des protéines clientes de HSP90 α . Comme l'activité chaperonne de HSP90 α dépend de son statut d'acétylation qui est régi par HDAC6, l'analyse de l'effet du composé **13a** sur la fonction chaperonne de HSP90 α a été réalisée par l'évaluation du taux protéique de Bcr-Abl et du RA. Après 3 à 15 heures de traitement, le composé **13a** induit une diminution de l'expression des deux protéines aboutissant à moins de 10% de protéine résiduelle après 12 et 15 heures de traitement (Figure 39A). Afin d'analyser si l'inhibition de Bcr-Abl et du RA est une conséquence de la modification de l'expression ou de l'activité de HSP90 α , le taux protéique de cette chaperonne a été évalué au même temps de traitement que précédemment dans les deux lignées cellulaires. Nos résultats montrent que le taux d'expression de HSP90 α n'est pas affecté par ce traitement (Figure 39B).

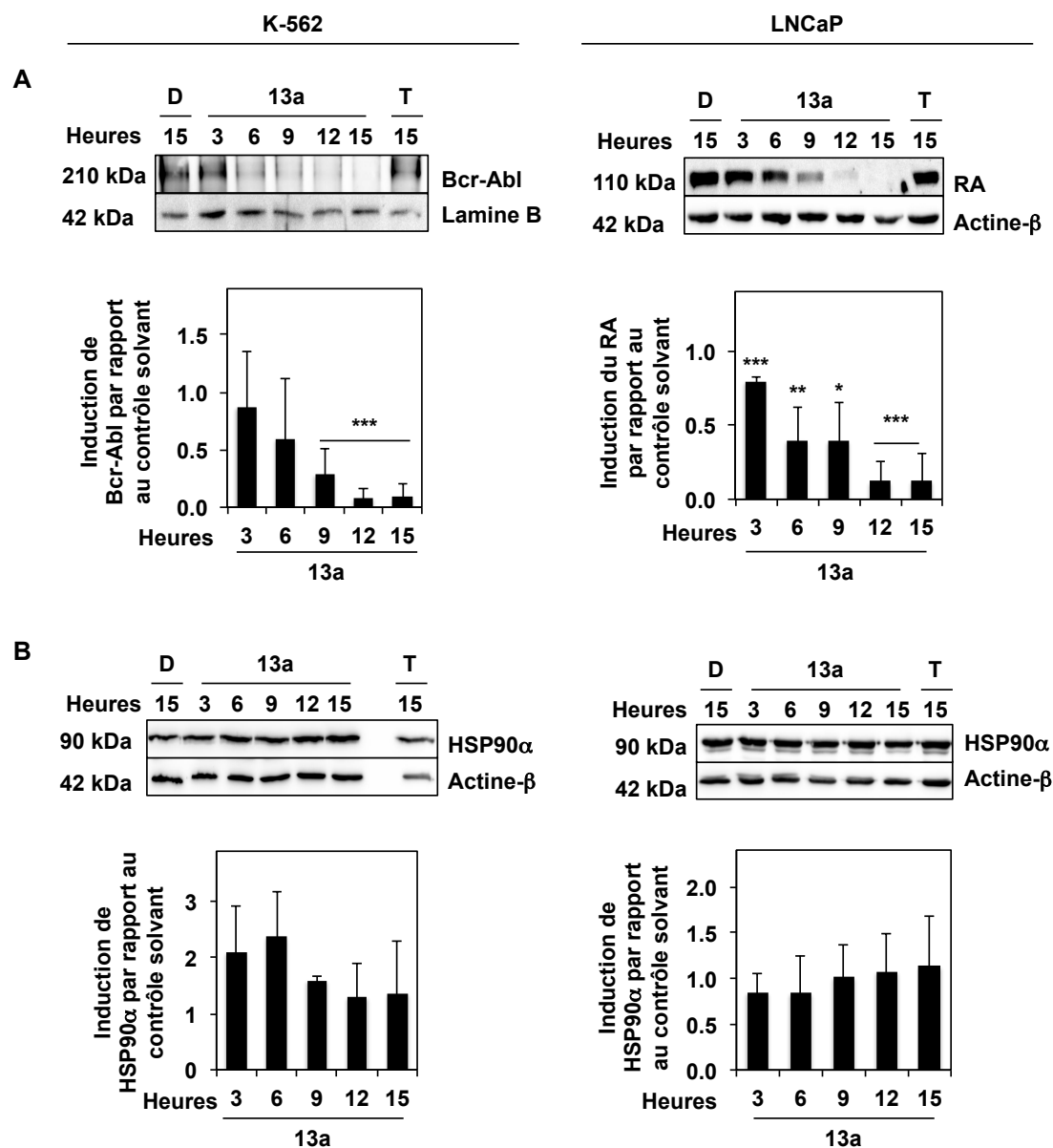


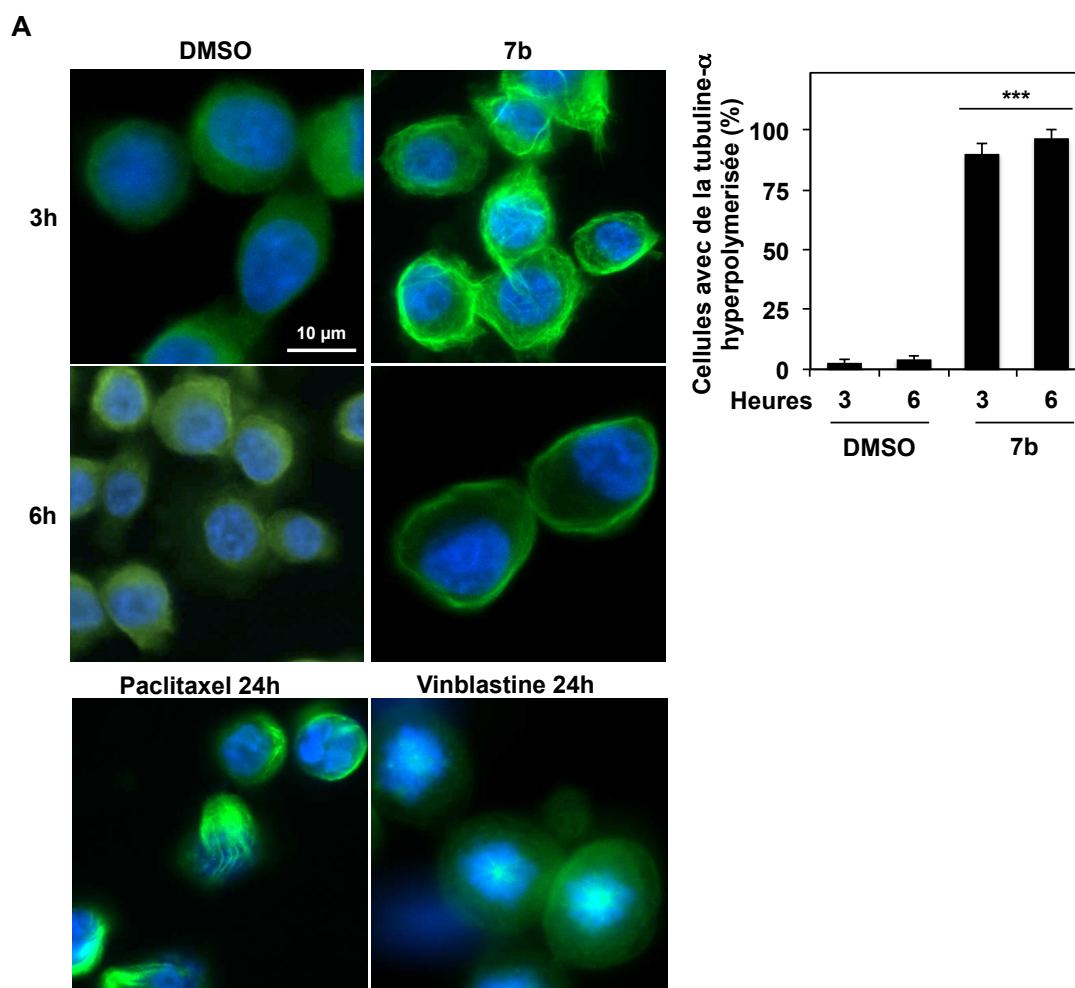
Figure 39: Le composé 13a diminue le taux protéique de Bcr-Abl et du RA.

L'analyse par Western Blot de Bcr-Abl (A, panneau de gauche), du RA (A, panneau de droite) et de HSP90α (B) est réalisée après traitement des cellules K-562 (panneau de gauche) et LNCaP (panneau de droite) avec 50 μM de composé **13a** aux temps indiqués. Le DMSO (D) est le contrôle solvant et la tubacine (T, 2 μM) est utilisée comme inhibiteur de référence de HDAC6. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005.

Le composé 13a affecte la fonction chaperonne de HSP90α dans les cellules K-562 et LNCaP sans, cependant, affecter le taux d'expression de cette protéine chaperonne.

IV.3.8. Le composé **7b** module l'architecture des microtubules

Le composé **7b** induit fortement l'acétylation de la tubuline- α (Figure 32). Par conséquent, l'architecture des microtubules a été analysée par microscopie à immunofluorescence des cellules PC-3 et LNCaP. Nos résultats montrent que le composé **7b** induit une condensation des microtubules dès 3 heures de traitement des cellules PC-3 (Figure 40A). De manière similaire, le composé **7b** induit une hyperpolymérisation de la tubuline- α dans les cellules LNCaP (Figure 40B).



Légende à la suite de la figure.

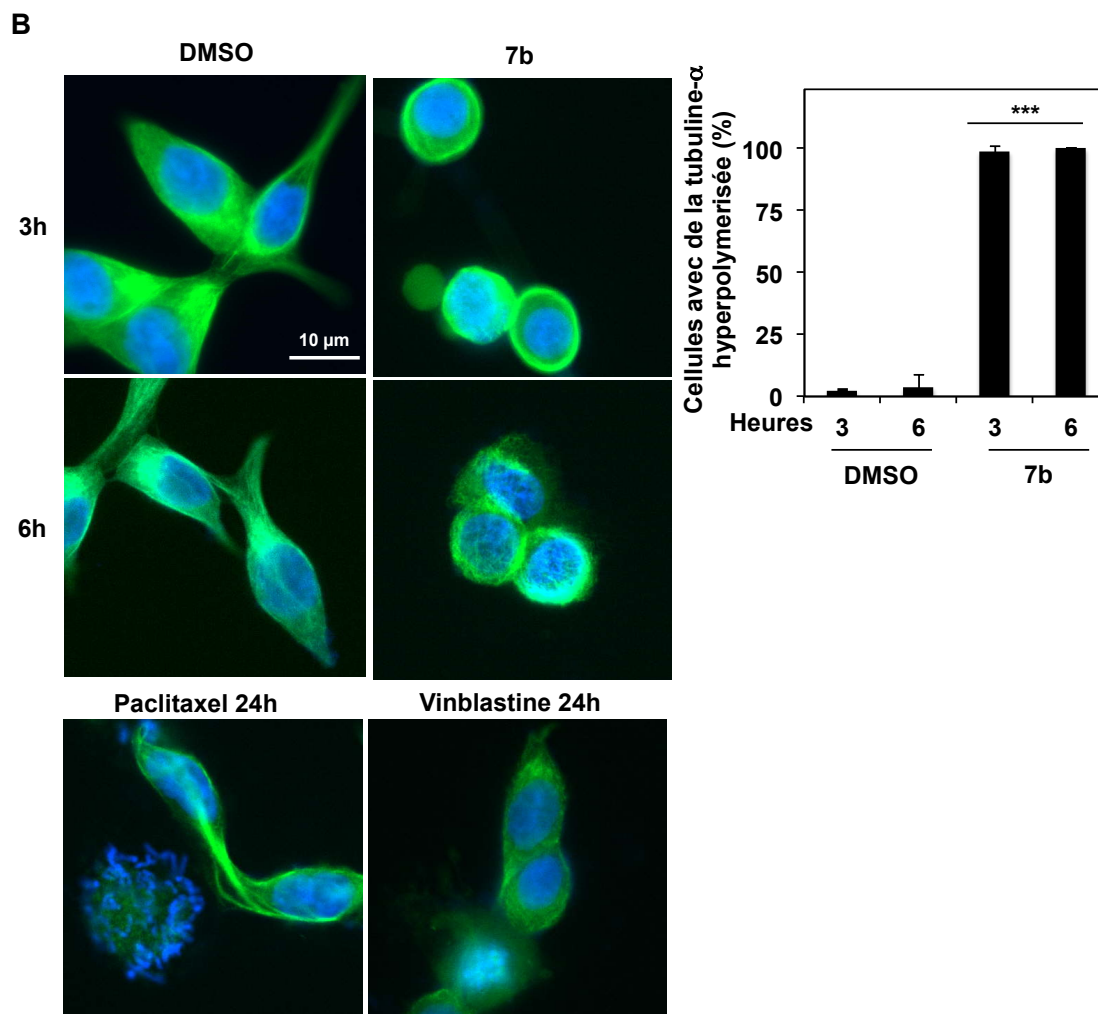


Figure 40: Le composé 7b induit une hyperpolymérisation de la tubuline- α dans les cellules PC-3 et LNCaP.

Les cellules PC-3 (A) et LNCaP (B) ont été traitées aux temps indiqués avec 100 μ M de composé **7b**. L'analyse de la polymérisation de la tubuline est réalisée par microscopie à fluorescence suite au marquage de la tubuline- α (vert) et des noyaux au Hoechst (bleu). Le paclitaxel (10 nM, 24 heures) et la vinblastine (10 nM, 24 heures) ont été utilisés comme contrôles respectifs de l'inhibition de la dépolymérisation et de l'inhibition de la polymérisation de la tubuline- α . Les photographies montrent des cellules représentatives des populations considérées et sont représentatives de trois expériences indépendantes. Le pourcentage de cellules avec de la tubuline- α hyperpolymérisée est représenté sur les histogrammes qui correspondent à la moyenne \pm l'écart type de la quantification de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec *** $p < 0,005$.

Le composé 7b module l'architecture des microtubules dans les cellules PC-3 et LNCaP.

Afin d'évaluer la quantité relative de tubuline- α polymérisée par rapport au contrôle solvant, le fractionnement de la tubuline- α en fonction de son état de polymérisation est suivi d'un Western Blot. Les résultats montrent que le traitement des deux lignées cellulaires par le composé 7b induit une augmentation de la tubuline- α polymérisée de manière importante tout comme le paclitaxel utilisé comme contrôle, alors que la vinblastine induit l'effet inverse (Figure 41).

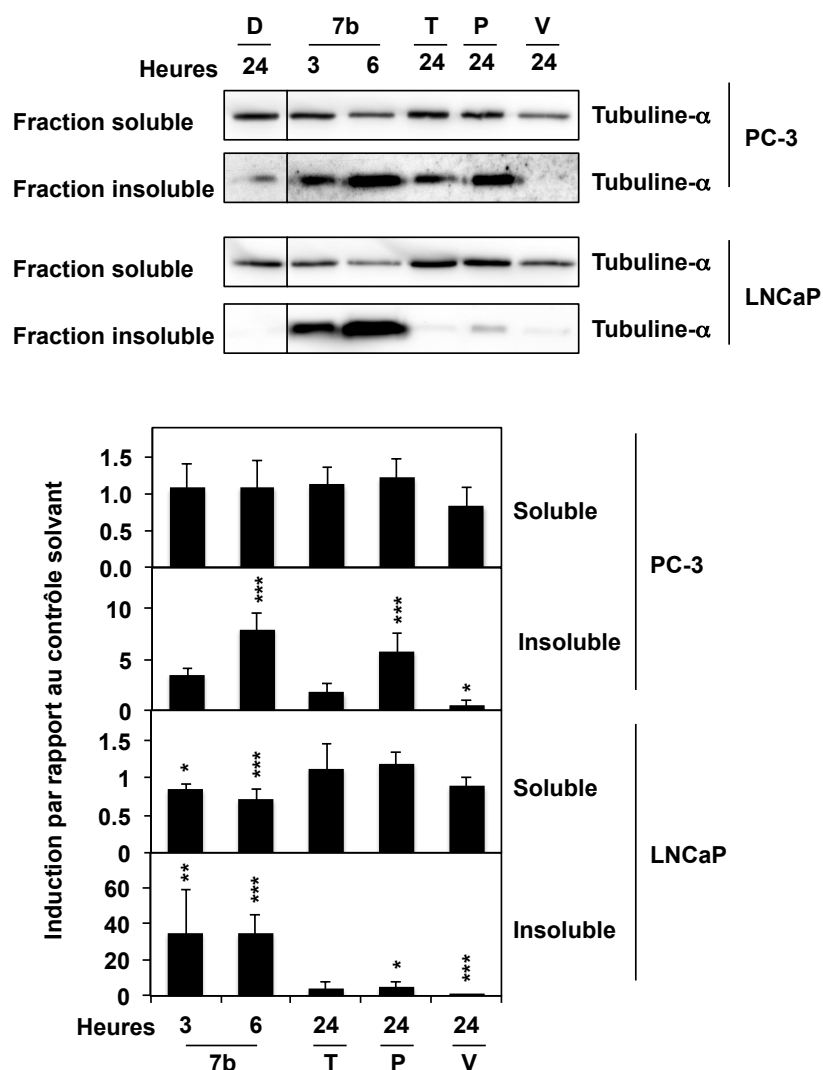


Figure 41: Le composé 7b induit une augmentation de la tubuline- α polymérisée.

Après traitement des cellules PC-3 et LNCaP, les fractions soluble (contenant la tubuline non polymérisée) et insoluble (contenant la tubuline polymérisée) ont été isolées et analysées par Western Blot. La tubastatine (T, 2 μ M) est utilisée comme inhibiteur de HDAC6 de référence. Le paclitaxel (P, 10 nM) et la vinblastine (V, 10 nM) sont utilisés comme inhibiteurs respectifs de la dépolymérisation et de la polymérisation de la tubuline. Les blots sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

IV.3.9. Le composé **7b** affecte la prolifération et la viabilité des cellules K-562

La diminution de la prolifération des cellules K-562 suite au traitement avec le composé **7b** observée précédemment (Figure 29) pourrait être la conséquence d'une accumulation des cellules dans une phase particulière du cycle cellulaire. L'analyse de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle révèle un effet modéré du composé **7b** sur la progression du cycle des cellules K-562 (Figure 42).

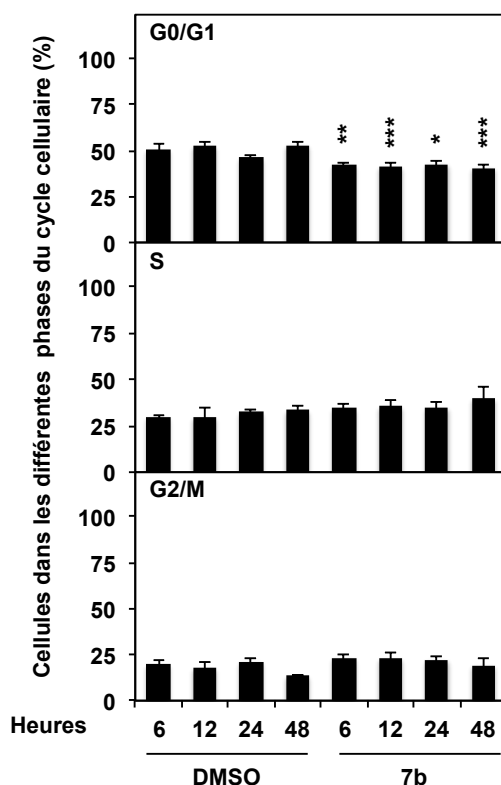


Figure 42: Effet du composé **7b sur le cycle cellulaire de la lignée K-562.**

La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée après traitement des cellules K-562 avec 100 μ M de composé **7b** aux temps indiqués. Les histogrammes représentent la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Par ailleurs, le traitement avec le composé **7b** induit un nombre croissant de cellules positives au bleu de Trypan en fonction du temps de traitement pour atteindre environ 40% après 72 heures (Figure 43A). Ces résultats ont été confirmés par l'augmentation du nombre de cellules en phase subG1 (Figure 43B).

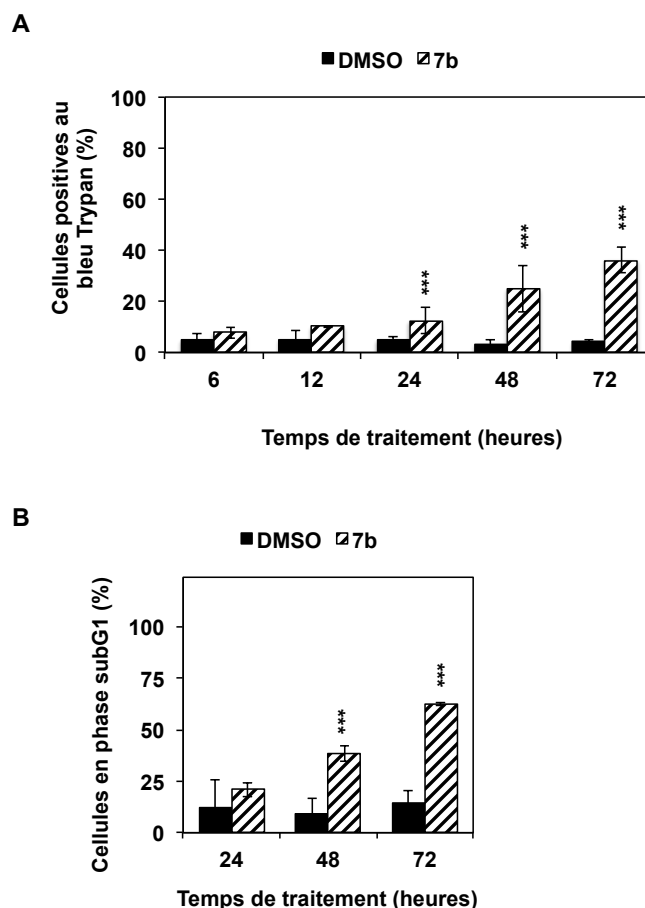


Figure 43: Le composé 7b induit la mort des cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec 100 μ M de composé **7b** aux temps indiqués. Les pourcentages de cellules positives au bleu de Trypan (A) ainsi que celui des cellules en phase subG1 (B) sont présentés sur les histogrammes qui correspondent à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec *** $p < 0,005$.

Afin de déterminer le type de mort cellulaire induit par le composé **7b**, les cellules K-562 ont été marquées au Hoechst et à l'iodure de propidium et la morphologie nucléaire a été analysée. Le traitement des cellules K-562 avec le composé **7b** induit une mort cellulaire par apoptose dépendante du temps de traitement (Figure 44A). La Figure 44B montre un clivage de la caspase initiateuse 9, des caspases effectrices 3 et 7 ainsi que de l'un des substrats des caspases, PARP, mais pas de la caspase 8, dénotant de l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose. Enfin, l'expression de la protéine pro-apoptotique BAX n'est pas affectée par le composé **7b** (Figure 44C).

Le composé 7b induit la voie intrinsèque de l'apoptose des cellules K-562.

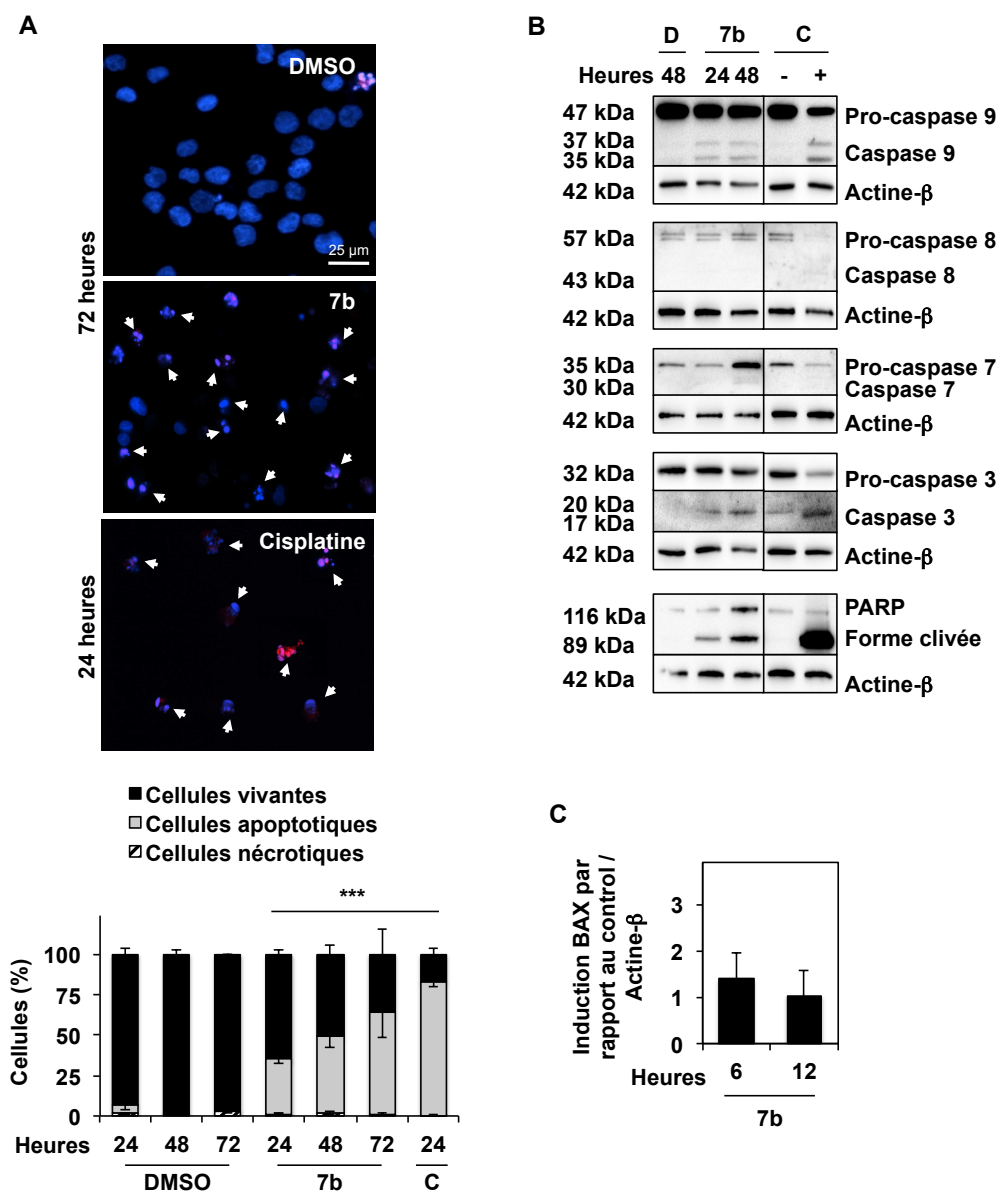


Figure 44: Le composé 7b induit la voie intrinsèque de l'apoptose dans les cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées jusqu'à 72 heures avec 100 μM de composé **7b**. (A) L'analyse de la morphologie nucléaire est réalisée suite au marquage par le Hoechst (bleu) et l'iodure de propidium (IP, rouge). Les photographies, prises après 72 heures de traitement, résultent d'une superposition d'une photographie des cellules marquées au Hoechst et d'une photographie des cellules marquées à l'IP. La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques est représentée dans l'histogramme qui correspond à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO des temps correspondants, avec *** $p < 0,005$. (B) L'évaluation du clivage des caspases 9, 8, 7 et 3 ainsi que de leur substrat PARP est réalisée par Western Blot grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre leur forme entière et clivée. (C) L'expression de l'ARNm de BAX est analysée par PCR en temps réel après 6 et 12 heures de traitement. L'histogramme correspond à la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Le cisplatine (50 μM , 24 heures) est utilisé comme inducteur de l'apoptose de référence.

IV.3.10. Effet du composé 7b sur les protéines clientes de HSP90α

Le taux protéique des protéines clientes de HSP90α, Bcr-Abl et le RA, a été évalué après traitement avec le composé 7b. De manière surprenante, les résultats de Western Blot montrent que le traitement avec le composé 7b n'affecte pas le taux de Bcr-Abl mais diminue de manière importante le RA, 70% dès 2 heures de traitement pour atteindre une quantité résiduelle d'environ 5% après 6 heures de traitement (Figure 45A). De plus, dans les deux lignées cellulaires le taux protéique de HSP90α n'est pas affecté suggérant plutôt la modulation de son activité (Figure 45B).

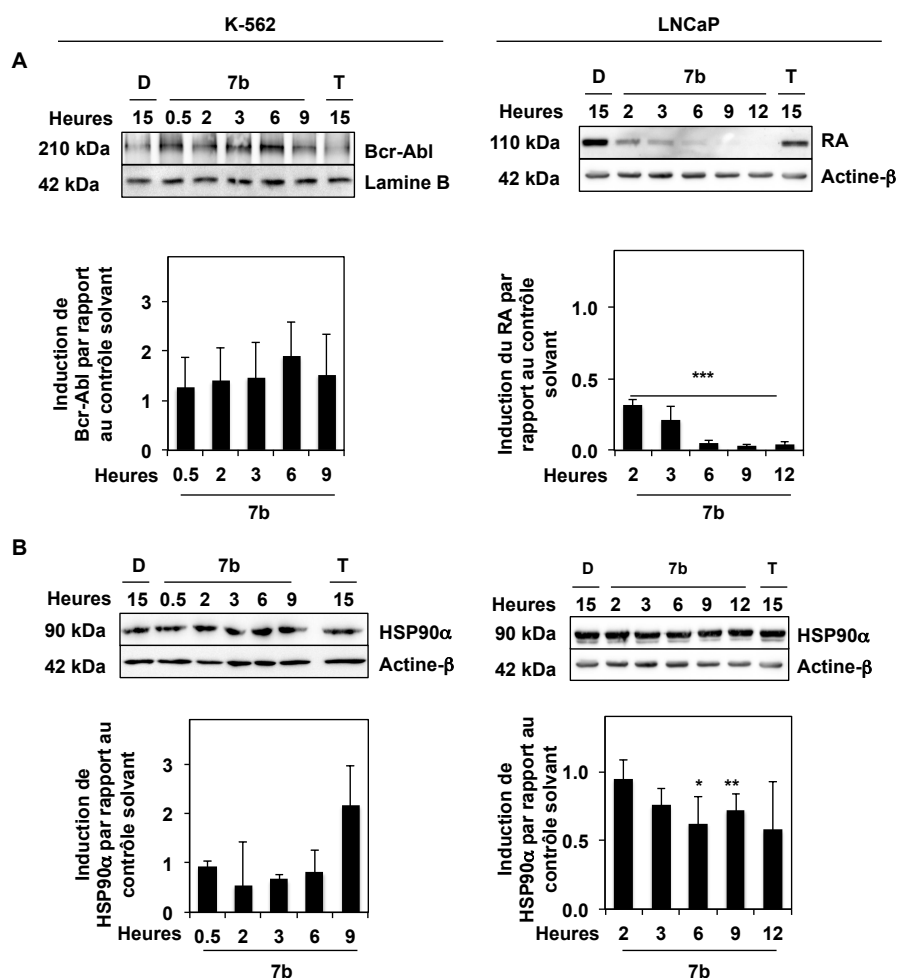


Figure 45: Effet du composé 7b sur les protéines clientes de HSP90α.

L'analyse par Western Blot de Bcr-Abl (A) dans les cellules K-562 (panneau de droite), du RA (A) dans les cellules LNCaP (panneau de gauche) et de HSP90α (B) est réalisée après traitement avec 100 μM de composé 7b aux temps indiqués. Les blots sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La tubacine (T, 2 μM) est utilisée comme inhibiteur de référence de HDAC6. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La quantification des blots est présentée sous forme d'histogramme sous les blots. Le test de Student a été réalisé par rapport au contrôle solvant DMSO (D), avec * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,005.

V. Discussion

V.1. L'épigénétique ciblée pour la thérapie anti-cancéreuse

Il est maintenant bien établi que les altérations épigénétiques régulent la cancérogenèse. En effet, dans de nombreux cancers, l'activité des enzymes impliquées dans la régulation des mécanismes épigénétiques peut être dérégulée. La perturbation de la balance de l'activité entre HAT et HDAC aboutit à un statut aberrant d'acétylation des protéines associé à une modulation pathologique de leur fonction (Bradbury *et al.*, 2005). Contrairement aux mutations génétiques, les modifications épigénétiques sont réversibles. Le ciblage des enzymes impliquées dans la régulation des mécanismes épigénétiques présente alors un grand intérêt pour la thérapie anti-cancéreuse. Ainsi de nombreuses molécules avec des structures chimiques variées ont été identifiées comme inhibiteurs de HDAC.

L'identification de nouvelles molécules capables d'inhiber l'activité HDAC est réalisée par la synthèse de composés basée sur les connaissances du mécanisme catalytique et de la structure des HDAC. Cependant, la plupart des structures cristallines des sites actifs des HDAC ne sont pas disponibles. Des études ont, par ailleurs, été réalisées sur HDAC8, dont la structure a été élucidée lorsque le SAHA est lié dans son site actif (Vannini *et al.*, 2004). Par conséquent, la structure cristalline de HDAC8 sert de modèle prédictif dans lequel les acides aminés de HDAC8 sont remplacés par ceux de HDAC6, par exemple, afin de créer une structure par homologie (Butler *et al.*, 2010). La recherche de nouvelles molécules naturelles a permis de mettre en évidence de nombreux inhibiteurs de HDAC originaires de plantes ou de microorganismes terrestres. Il y a actuellement une émergence pour les molécules d'origine marine, c'est le cas notamment du puissant HDACi Largazole (Delage *et al.*, 2008; Schnekenburger *et al.*, 2014).

La caractérisation des HDACi a montré que certaines molécules inhibent de manière non-spécifique toutes les isoenzymes dépendantes du zinc (*i.e.* les HDAC non-sirtuines), tels que le SAHA ou le butyrate de sodium, alors que d'autres sont spécifiques d'une classe, comme le FK228 ou le FR235222, ou d'une isoenzyme

particulière, comme la tubacine ou le PCI-34051 (Khan *et al.*, 2008). Les inhibiteurs spécifiques présentent notamment un intérêt thérapeutique chez les patients ayant une surexpression d'une isoenzyme particulière, tels que HDAC1 et SIRT1, respectivement, dans les cancers de l'œsophage et de la peau.

Généralement les HDACi possèdent des effets anti-cancéreux intéressants *via* leur capacité à inhiber l'activité HDAC (Dokmanovic *et al.*, 2007). Les HDACi ont pour effet une hyperacétylation des protéines, notamment des histones dans le cas d'inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC ou de protéines spécifiques comme la tubuline- α dans le cas d'un inhibiteur spécifique de HDAC6. L'hyperacétylation des histones est souvent associée à une induction de l'expression du gène codant p21, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, un grand nombre de HDACi inhibe la prolifération des cellules cancéreuses et mène à une accumulation dans une phase particulière du cycle cellulaire. De plus, certains HDACi peuvent induire la mort des cellules cancéreuses par apoptose mais également en activant des voies autophagiques. La différenciation cellulaire a également été observée avec certaines molécules selon le type cellulaire utilisé. De manière intéressante, le traitement des patients par des inhibiteurs d'HDAC est généralement bien supporté par ces derniers. De plus, les résultats des essais cliniques d'HDACi, seuls ou en combinaison, montrent une hyperacétylation des protéines ainsi qu'une amélioration clinique et une augmentation de la survie des patients. L'acide hydroxamique SAHA et le depsipeptide FK228 ont été approuvés par la FDA pour le traitement des LCT et le traitement des patients montre une réponse partielle et une amélioration clinique prometteuse (Duvic *et al.*, 2007; Piekarz *et al.*, 2009). Ces molécules sont également en essai clinique pour d'autres types de cancers tels que les LMA ou les cancers du sein, du poumon ou de la thyroïde. De manière intéressante, la combinaison d'HDACi avec des agents déméthylants telle que la décitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) induit une stabilisation de la maladie de cancers solides et de lymphomes ainsi qu'une amélioration clinique chez des patients atteints de leucémie (Garcia-Manero *et al.*, 2006; Stathis *et al.*, 2011). L'effet synergique de ces deux types d'agents est amélioré lorsqu'ils sont administrés de manière séquentielle. En effet, il semblerait plus prometteur d'administrer l'agent déméthylant avant l'HDACi (Stintzing *et al.*, 2011). La combinaison des HDACi avec d'autres agents thérapeutiques induit également une amélioration du taux de réponse des patients et un effet synergique *in cellulo*. Par exemple, le SAHA est testé cliniquement en combinaison avec un inhibiteur du

protéasome, le marizomib, et sur des lignées cancéreuses avec le bortezomib (Emanuele *et al.*, 2007),(Millward *et al.*, 2012).

Cependant, de nombreux effets secondaires sont toujours à déplorer suite au traitement avec les HDACi, seuls ou en combinaison, ainsi qu'un taux de réponse insuffisant (Subramanian *et al.*, 2010).

Par conséquent, la recherche de nouveaux HDACi permettrait d'identifier de nouvelles molécules qui pourraient potentiellement diminuer les effets secondaires et augmenter la réponse au traitement.

Ainsi, la recherche de HDACi nous a permis d'identifier différentes familles de molécules: les acides 4-hydroxybenzoïques, les polyketides [Annexe A2, (El Amrani *et al.*, 2014)] et les 3-alkenoylcoumarines [Annexe A2, (Seidel *et al.*, In press)]. Parmi les acides 4-hydroxybenzoïques, cinq molécules possèdent des activités inhibitrices prometteuses de l'activité enzymatique des HDAC, trois inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC: **13b**, **13c** et **6e**, et deux inhibiteurs spécifiques de HDAC6: **13a** et **7b**.

V.2. Les inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC

V.2.1. Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation des protéines

Le composé **13b** possède un profil d'inhibition de HDAC (HDAC1, 2, 3 et 11) comparable à d'autres HDACi décrits comme les benzamides synthétiques MGCD0103 et MS-275. De plus le composé **13b** inhibe aussi les sirtuines 1, 2 et 3 comme le sirtinol (Saito *et al.*, 1999; Fournel *et al.*, 2008; Cen, 2010). Le profil d'inhibition du composé **13b** qui cible à la fois des isoenzymes dépendantes du zinc et des isoenzymes de la classe III, est particulièrement intéressant. En effet, la combinaison d'inhibiteurs de sirtuines avec des inhibiteurs des classes I, II et IV potentialiserait l'induction de la mort cellulaire (Cea *et al.*, 2011). Une induction de l'acétylation de l'histone H4, substrat des HDAC des classes I, II, IV et de la sirtuine 1 (Tong, 2002), a été observée en fonction du temps par le composé **13b**. Ce composé induit l'acétylation de H3K9, en corrélation avec l'inhibition de HDAC3 *in vitro* (Bhaskara *et al.*, 2011). L'induction de l'acétylation de H4K8 et de H3K14, associée à l'expression génique, est corrélée à l'inhibition des HDAC1, 2, 11 et de SIRT1 (Strahl

et al., 2000). Cependant, une faible augmentation de l'acétylation de la tubuline- α est observée après 24 heures de traitement. Ce résultat pourrait être expliqué par l'inhibition de la sirtuine 2 mais pas de HDAC6 par le composé **13b** et est comparable à l'effet du MGCD0103 dans les cellules HeLa et du MS-275 dans les cellules U-937 (Rosato *et al.*, 2003; Chia *et al.*, 2010). En effet, SIRT2 est présente principalement dans le cytoplasme où elle désacétyle la tubuline- α (North *et al.*, 2003).

Le composé **13c** inhibe *in vitro* les HDAC1, 2, 6, 11 et SIRT1. De la même façon que le depsipeptide FK228, qui inhibe également ces isoenzymes, le composé **13c** induit l'acétylation de l'histone H4 dans les cellules K-562, probablement par inhibition des HDAC1, 2, de SIRT1 ainsi que de la tubuline- α suite à l'inhibition de HDAC6 (Furumai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007b). Le composé **13c** induit l'acétylation de H4K8, H3K9 et H3K14, comme le composé **13b**.

Enfin, le composé **6e** inhibe les isoenzymes HDAC1, 2, 8, 6 et 10 et induit l'acétylation de l'histone H4, de même que la molécule synthétique menadione dans les cellules HL-60 (Lin *et al.*, 2005), ainsi que celle de H3K14. Il n'est pas exclu que ce composé induise d'une manière plus prononcée l'acétylation d'autres lysines spécifiques des histones H3 et H4. Cependant, le statut d'acétylation de la tubuline- α est faiblement affecté par le traitement des cellules. Ce résultat pourrait être expliqué par l'absence d'inhibition de SIRT2 *in vitro* et une CI_{50} plus haute pour HDAC6 (69 μ M) par rapport aux autres isoenzymes (11 et 14 μ M respectivement pour HDAC1 et 8). Dans notre modèle cellulaire, le SAHA induit l'acétylation des lysines des histones H3 et H4, comme reporté dans la littérature (Gui *et al.*, 2004).

V.2.2. Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la prolifération des cellules cancéreuses

Nos acides 4-hydroxybenzoïques diminuent la prolifération et induisent l'apoptose des cellules K-562. L'effet des composés sur la prolifération et la viabilité cellulaire est comparable à l'effet de la plupart des HDACi sur les cellules cancéreuses.

Le composé **13b** induit une diminution de l'expression protéique des cyclines D, E, A et B ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M après un temps de traitement court, puis en phase G0/G1 à des temps de traitement plus longs. De manière comparable, l'inhibiteur MGCD0103 induit fortement l'accumulation des

cellules HeLa en phase G2/M. Cependant, cette molécule n'affecte pas le niveau protéique des cyclines E et A. Le MGCD0103, comme le composé **13b**, n'induit pas l'expression de la protéine p21 dans les cellules HeLa, impliquée dans l'inhibition du cycle cellulaire (Chia *et al.*, 2010). Le traitement des cellules U-937 par le benzamide MS-275 induit une accumulation des cellules en phase G2/M ainsi qu'une diminution de la cycline D1, tout comme le composé **13b** (Rosato *et al.*, 2003).

Le composé **13c** induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S après 48 heures de traitement. Cet effet peut être expliqué par la diminution du taux des protéines composant le complexe cycline A-cdk2-PCNA indispensable à la progression dans cette phase (Lodish *et al.*, 2003). Contrairement au composé **13c**, le depsipeptide FK228 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 accompagné d'une diminution de la cycline D et d'une augmentation de la cycline E et de p21 (Sandor *et al.*, 2000). La différence observée dans la progression du cycle cellulaire entre le composé **13c** et le FK228 pourrait être due à l'inhibition de SIRT1 et de HDAC11 par le composé **13c** et non par le FK228.

Enfin, le composé **6e** induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 aux temps de traitement courts qui pourrait être la conséquence de l'augmentation de l'expression des protéines inhibitrices du cycle p19, p21 et p27 accompagnée d'une diminution des cyclines D et E ne permettant plus la poursuite du cycle cellulaire vers la phase S. Le composé **6e** induit un arrêt en phase S aux temps de traitement plus longs accompagné d'une diminution de l'expression des cyclines A et B impliquées dans le passage de la phase S à G2/M et dans la progression en phase G2/M (Lodish *et al.*, 2003). De plus, l'induction de l'expression de p21 par le composé **6e** s'exerce au niveau transcriptionnel. En effet, le composé induit un enrichissement des marques actives au niveau du promoteur de ce gène. Le largazole, qui inhibe préférentiellement les HDAC1 et 2 induit un arrêt des cellules en phase G2/M ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine p21 (Liu *et al.*, 2010).

Le traitement des cellules par le SAHA, utilisé comme inhibiteur d'HDAC de référence, montre des similitudes avec les résultats obtenus avec le composé **6e**. En effet, le SAHA induit un arrêt des cellules en phase G0/G1 ainsi que l'expression de p21 de manière transcriptionnelle associée à une hyperacétylation des histones au niveau de son promoteur (Gui *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2011). Le traitement des cellules K-562 par le SAHA induit également l'expression du gène *CDKN2D*, comme le composé **6e**. Une augmentation du le gène *CDKN1C* a aussi été observée. Le

SAHA n'a pas d'effet sur l'expression du gène codant p27, comme attendu (Gui *et al.*, 2004). De manière surprenante, le traitement avec le SAHA ne conduit pas à une diminution du niveau protéique de la cycline D1 comme observée dans la littérature. Ce résultat pourrait être expliqué par la concentration utilisée de 2 μ M, qui est inférieure à celle utilisée dans les publications observant une diminution de la cycline D1 (Kawamata *et al.*, 2007). Cependant, le SAHA diminue les cyclines A et B1 de manière similaire aux composés **13b**, **13c** et **6e**.

V.2.3. Effet des acides 4-hydroxybenzoïques sur la viabilité des cellules cancéreuses

Nos données montrent que l'induction de l'apoptose observée suite au traitement des cellules K-562 avec les composés **13b**, **13c** et **6e** mène à l'activation des caspases initiatrices 8 et 9 ainsi que de celle des caspases effectrices 3 et 7, de façon comparable à de nombreux HDACi. De plus, les acides 4-hydroxybenzoïques n'ont pas d'effet sur la viabilité des cellules circulantes de donneurs sains (PBMC), contrairement au SAHA qui induit l'apoptose de ces cellules. L'induction de la mort cellulaire des PBMC par le SAHA concorde avec des données observées dans la littérature (Santo *et al.*, 2012).

La voie apoptotique induite ne peut pas être déterminée sur la seule base du clivage des caspases. En effet, les composés induisent le clivage de la caspase 8, témoignant d'une activation de la voie extrinsèque. Cependant, cette cascade peut également être activée suite à une activation de la voie intrinsèque. Il est aussi possible que les deux voies soient induites, comme observé dans des cellules cancéreuses de la tête et du cou traitées avec le SAHA (Gillenwater *et al.*, 2007).

La mort cellulaire induite est indépendante de l'inhibition de l'expression des protéines anti-apoptotiques observée tardivement après traitement ainsi que de l'activation des protéines pro-apoptotiques BID et BAX. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans les cellules U-937 traitées avec le benzamide MS-275 ou les cellules K-562 traitées avec le FK228 ou le SAHA. Ces molécules conduisent à une diminution tardive (entre 24 et 48 heures) des protéines anti-apoptotiques MCL-1, XIAP et survivine (Rosato *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007b). Cependant, les acides 4-hydroxybenzoïques augmentent l'expression de la protéine pro-apoptotique BIM après des temps de traitement courts. Cette induction de BIM par les composés **13b**,

13c et **6e** ne résulte pas d'une activation transcriptionnelle contrairement à ce qui est observé suite à un traitement avec le SAHA dans des cellules de lymphomes (Xargay-Torrent *et al.*, 2011). En effet, les acides 4-hydroxybenzoïques n'induisent pas la transcription d'ARNm de BIM ni l'enrichissement de son promoteur par des marques actives de la transcription. L'augmentation du taux protéique de BIM suite au traitement pourrait être la conséquence d'une stabilisation suite à sa phosphorylation (Hubner *et al.*, 2008).

Les acides 4-hydroxybenzoïques diminuent la prolifération et de la viabilité d'autres modèles cancéreux comprenant les cellules PC-3, TF-1, RAJI, SK-N-AS et MCF-7. De plus, la comparaison de l'effet des composés montre que les composés diminuent plus rapidement et à plus faible dose la prolifération et la viabilité des cellules en suspension comparée aux cellules adhérentes. Plusieurs HDACi, tels que le SAHA, le PXD-101 ou le LBH589 génèrent également une meilleure réponse clinique dans le cas des lymphomes ou leucémies (Pecuchet *et al.*, 2010). Néanmoins, les mécanismes sous-jacents qui expliquent cette différence de potentialité restent inconnus.

De plus, les données de viabilité cellulaire obtenues montrent une cytotoxicité différentielle intéressante de nos composés entre les cellules cancéreuses et non-cancéreuses (les cellules non cancéreuses MCF-10A et cellules circulantes provenant de donneurs sains PBMC). La faible toxicité des composés vis-à-vis des cellules saines par rapport aux cellules cancéreuses a également été observée pour de nombreux autres HDACi d'origine naturelle tels que l'acide valproïque, le butyrate de sodium ou le sulforaphane (Cea *et al.*, 2011; Clarke *et al.*, 2011).

Les cellules MCF-7 ont également été utilisées afin de généraliser l'effet inhibiteur d'HDAC au-delà de nos lignées leucémiques utilisées principalement. En effet, suite au traitement avec les composés **13b**, **13c** et **6e**, une augmentation de l'acétylation de deux cibles des HDAC a été observée. De plus, comme les composés inhibent la prolifération des cellules MCF-7, l'étude du cycle cellulaire a été réalisée ; cependant, les composés ne semblent pas modifier la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

V.2.4. Influence de la structure chimique sur le potentiel d'inhibition des HDAC

La comparaison des structures chimiques des acides 4-hydroxybenzoïques testés et leur activité inhibitrice des activités HDAC non-sirtuines montre une importance de la longueur de la chaîne de la molécule. En effet, les molécules possédant une longueur de quatre carbones ne sont pas actifs alors que ceux en possédant trois ou cinq inhibent l'activité HDAC *in vitro*. De plus, la molécule **6e** possède six carbones dans sa chaîne et la molécule **7e** en possède sept, alors que ces deux molécules portent les mêmes groupements chimiques, le composé **6e** inhibe l'activité HDAC contrairement au composé **7e**. Cette observation est également vraie pour les composés **8b**, **9b**, **10b** et **11b** qui ne diffèrent que par la longueur de la chaîne mais parmi lesquels seul le composé **8b** possède une activité inhibitrice. L'importance de la longueur de la chaîne carbonée pourrait être due à la structure tubulaire des sites actifs des HDAC, une certaine longueur serait requise pour le positionnement des groupements chimiques par rapport aux acides aminés indispensables à la réaction catalytique.

La nature des groupements chimiques ainsi que leur position sont également mises en jeu dans l'inhibition des HDAC. Parmi les composés ayant six carbones dans leur chaîne, seul le composé **6e** portant trois groupements hydroxyles inhibe les HDAC, comparé au composé **6d** qui n'en porte que deux, au composé **6a** qui porte deux groupements méthoxy ou aux composés **6b** et **6c** qui portent un groupement hydroxyle et un méthoxy. La nature du groupement chimique est impliquée aussi dans la sélectivité des molécules vis-à-vis des isoenzymes de HDAC. Le composé **13b** possède trois fluores et inhibe les HDAC1, 2, 3, 11 et les SIRT1, 2, 3. Le composé **13c** porte trois groupements chlorure et inhibe les HDAC1, 2, 6, 11 et la SIRT1. Le composé **13a**, quant à lui, porte trois groupements méthoxy et inhibe spécifiquement HDAC6. Par ailleurs, la position des groupements chimiques joue un rôle dans le potentiel inhibiteur des molécules. Par exemple, les composés **7b** et **7c** possèdent un groupement hydroxyle et un méthoxy mais à une position différente et seul le composé **7b** est actif.

Les inhibiteurs de HDAC utilisés dans cette étude ne présentent pas une structure « classique » d'inhibiteur. Néanmoins, d'autres polyphénols, tel que la dihydrocoumarine (Olaharski *et al.*, 2005), sont capables d'induire des effets biologiques similaires à ceux observés dans cette étude. Parmi les trois molécules

inhibitrices de plusieurs HDAC, le composé **6e** génère les effets cellulaires les plus comparables aux HDACi classiques tels que le SAHA.

V.3. Les inhibiteurs spécifiques de HDAC6

Les inhibiteurs spécifiques de HDAC6, **13a** et **7b**, ont été utilisés dans un modèle en suspension (cellules K-562) ainsi que deux modèles adhérents (cellules PC-3 et LNCaP). L'analyse de l'expression de HDAC6, de la tubuline- α acétylée et totale dans ces modèles révèle une expression de HDAC6 plus importante dans les cellules LNCaP que dans les cellules PC-3 et K-562. Cependant, l'expression différentielle de cette protéine n'est pas corrélée au statut d'acétylation de la tubuline- α . En effet, les cellules LNCaP ont un taux plus important de tubuline- α acétylée comparé aux deux autres lignées cellulaires. Cette absence de corrélation pourrait être due à une régulation post-traductionnelle différente de HDAC6 dans ces lignées telles que sa phosphorylation ou son acétylation (Han *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2013), une expression moindre de SIRT2 dans les cellules LNCaP, impliquée également dans la désacétylation de la tubuline- α , ou la combinaison de ces mécanismes. De plus, la localisation cellulaire de HDAC6 peut jouer un rôle important dans son activité de désacétylation de la tubuline- α . Cette isoenzyme est principalement localisée dans le cytoplasme mais peut également migrer vers le noyau suivant le type cellulaire ou au cours de la différenciation (Liu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013a). L'étude de la localisation cellulaire de HDAC6 dans nos modèles a montré que cette protéine est principalement localisée dans le cytoplasme dans les trois lignées étudiées.

La tubuline- α est le substrat le mieux décrit de HDAC6 (Hubbert *et al.*, 2002). L'acétylation de cette protéine a alors été analysée suite au traitement avec les composés **13a** et **7b** afin de confirmer l'inhibition de HDAC6 *in cellulo*. Les deux composés induisent une augmentation rapide et importante de l'acétylation de la tubuline- α dans les cellules K-562, PC-3 et LNCaP. De manière similaire, la tubacine, un inhibiteur spécifique de HDAC6, induit une hyperacétylation importante de la tubuline- α . De plus, les composés n'ont pas d'effet sur l'acétylation d'une protéine nucléaire, l'histone H4, témoignant de l'inhibition de HDAC6 dans le cytoplasme. De manière surprenante, la tubacine induit l'acétylation de l'histone H4 dans les trois modèles cellulaires utilisés. Cette observation est en contradiction avec les données de

la littérature et pourrait être expliquée par l'utilisation de cette molécule à des concentrations différentes (Haggarty *et al.*, 2003; Namdar *et al.*, 2010). De plus, le taux protéique de HDAC6 après traitement avec les composés **13a** et **7b** n'est pas affecté, indiquant que son inhibition fait appel à un mécanisme catalytique et non une diminution de l'expression de la protéine.

V.3.1. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses

Plusieurs lignées cellulaires cancéreuses en suspension (K-562, RAJI, U-937, JURKAT) ont été utilisées pour tester l'effet des composés **13a** et **7b** sur leur prolifération et la viabilité. Les composés inhibent la prolifération entre 5 et 10 μM et diminuent de manière importante la viabilité de ces cellules cancéreuses à partir de 25 μM . Les composés présentent une cytotoxicité différentielle intéressante envers les cellules circulantes issues de donneurs sains (PBMC). La sélectivité des composés **13a** et **7b** vis-à-vis des cellules cancéreuses est comparable à celle observée avec l'inhibiteur de HDAC6 ACY-1215 (Santo *et al.*, 2012).

Les composés **13a** et **7b** ont également été testés sur différentes lignées cancéreuses adhérentes (PC-3, LNCaP, MDA-MB231, MCF-7). Une diminution importante de la prolifération (dès 10 μM) et de la viabilité (à partir de 25 μM) des cellules est observée suite au traitement avec les deux molécules. De plus, l'analyse de l'effet de ces molécules sur les cellules non cancéreuses MCF-10A révèle une diminution de la prolifération à partir de 25 μM et de la viabilité à partir de 50 μM pour le composé **13a** et de 100 μM pour le composé **7b**. Ces résultats montrent que les composés possèdent une cytotoxicité différentielle également dans les modèles cellulaires adhérents. Contrairement aux acides 4-hydroxybenzoïques qui inhibent plusieurs HDAC, les composés **13a** et **7b** affectent la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses en suspension et adhérentes de manière comparable.

V.3.2. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

L'évaluation de l'effet du composé **13a** sur la distribution des cellules K-562, PC-3 et LNCaP dans les différentes phases du cycle cellulaire montre une

accumulation modérée des cellules PC-3 uniquement en phase G2/M à partir de 12 heures de traitement. Le composé **13a** n'induit pas d'accumulation des cellules K-562 et LNCaP dans une phase spécifique du cycle cellulaire, l'inhibition de la prolifération ne serait alors pas la conséquence d'un arrêt du cycle cellulaire. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans les cellules A549 traitées avec la tubacine ou les cellules cancéreuses de pancréas traitées avec la tubastatine A (Haggarty *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). Cependant, l'inhibiteur de HDAC LBH589 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M des cellules PC-3 et LNCaP de manière dépendante de l'inhibition de HDAC6 (Chuang *et al.*, 2013). L'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules LNCaP dépend de l'activation de la voie ERK, qui, dans le cas du composé **13a** n'est peut être pas affectée.

V.3.3. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la mort cellulaire

Les expériences d'exclusion au bleu Trypan ont montré une induction importante de la mort cellulaire dès 24 heures de traitement avec le composé **13a** et de manière plus modérée avec le composé **7b**. L'étude de la morphologie nucléaire montre une forte induction de l'apoptose des cellules K-562 par les deux composés et une forte augmentation du nombre de cellules LNCaP positives à l'iodure de propidium par le composé **13a**. Concernant les cellules PC-3, une faible augmentation du nombre de cellules mortes est observée même après 72 heures de traitement avec le composé **13a**. L'induction de l'apoptose par les composés **13a** et **7b** dans les cellules K-562 est confirmée par le clivage de la caspase initiateur 9 impliquée dans la voie intrinsèque. La caspase 8 activée au cours de la voie extrinsèque n'est pas clivée suite au traitement. De plus, les caspases effectrices 3 et 7 ainsi que leur substrat PARP sont clivés. La tubacine induit également l'apoptose des cellules lymphoblastoïdes accompagnée du clivage de la caspase 3 et de PARP (Kawada *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'induction de l'apoptose suite à l'inhibition de HDAC6 pourrait être la conséquence de l'activation de la protéine pro-apoptotique BAX. L'activité de cette protéine dépend de son association avec la protéine inhibitrice Ku70, dont le statut d'acétylation est régulé par HDAC6. Ainsi, l'inhibition de HDAC6 induit une hyperacétylation de Ku70 permettant la dissociation de BAX qui pourra être localisé à la mitochondrie (Cohen *et al.*, 2004). L'analyse de l'activation de BAX suite au

traitement avec le composé **13a** montre une activation après 24 heures de traitement. Cette induction n'est pas due à une augmentation de l'expression de BAX, le composé **13a** n'ayant pas d'effet sur son taux d'ARNm. Ces résultats ont été observés dans des cellules de neuroblastome traitées avec la tubacine où le traitement induit une perte de l'interaction entre Ku70 et BAX (Subramanian *et al.*, 2011). De plus, Ku70 interagit également avec la protéine anti-apoptotique FLIP, la protégeant ainsi de la dégradation. L'induction de l'apoptose par le composé **13a** pourrait aussi survenir en conséquence de la dégradation protéasomale de FLIP (Kerr *et al.*, 2012).

V.3.4. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur le dynamisme des microtubules

Il est maintenant bien défini que le statut d'acétylation de la tubuline- α joue un rôle important dans la dynamique des microtubules. L'inhibition de HDAC6 induit une hyperacétylation de la tubuline- α conduisant à une perte de la mobilité des cellules (Zilberman *et al.*, 2009). L'étude de l'influence du composé **13a** sur la structure des microtubules est réalisée dans les modèles cellulaires adhérents, PC-3 et LNCaP. Des expériences de microscopie à fluorescence ont montré un réseau plus structuré, confirmant de ce fait que l'inhibition de HDAC6 par le composé **13a**, menant à une hyperacétylation de la tubuline- α , module la structure des microtubules ainsi que la morphologie cellulaire. Le traitement avec le composé **7b** induit rapidement une condensation de la tubuline- α dans les cellules PC-3 et LNCaP confirmant l'implication de l'hyperacétylation de cette protéine. De plus, la quantification des fractions contenant la tubuline polymérisée et non polymérisée appuie les données obtenues avec le composé **7b**. Suite au traitement, le taux de tubuline- α contenue dans la fraction contenant la tubuline polymérisée est très largement augmenté. De manière similaire, la tubacine affecte la polymérisation des microtubules et par conséquent leur vitesse de croissance *via* l'inhibition d'HDAC6 (Matsuyama *et al.*, 2002; Zilberman *et al.*, 2009).

V.3.5. Effet des inhibiteurs de HDAC6 sur la fonction chaperonne de HSP90 α

Un autre substrat bien caractérisé de HDAC6 est la chaperonne HSP90 α (Scroggins *et al.*, 2007). Cette chaperonne interagit avec ses protéines clientes, leur permettant ainsi de conserver un repliement fonctionnel. Le statut d'acétylation de HSP90 α est contrôlé par HDAC6 et est impliqué dans l'interaction avec les protéines clientes (*e.g.* Bcr-Abl, récepteur aux androgènes) et la liaison de l'ATP. L'évaluation du taux protéique des protéines clientes Bcr-Abl et le récepteur aux androgènes (RA) montre une diminution importante de ces dernières suite au traitement avec le composé **13a**. De manière intéressante, le composé **7b** semble moduler l'activité chaperonne de HSP90 α de façon dépendante de la lignée cellulaire. En effet, le traitement avec le composé **7b** n'a pas d'effet sur le taux protéique de Bcr-Abl dans les cellules K-562, alors qu'il diminue fortement le RA dans les cellules LNCaP dès 2 heures de traitement. Le niveau protéique de HSP90 α n'étant pas affecté par le traitement avec ces deux molécules, les résultats suggèrent que le traitement induit une perte de l'activité chaperonne de HSP90 α . Les cellules K-562 traitées avec le LAQ824 présentent également une diminution de la protéine Bcr-Abl qui est dégradée par le protéasome (Bali *et al.*, 2005). De la même manière, le traitement des cellules LNCaP par la TSA diminue la quantité protéique du RA (Ai *et al.*, 2009). Considérant son rôle dans le maintien d'un repliement protéique correct et dans la prévention des agrégats protéiques, l'inhibition de la fonction chaperonne de HSP90 α pourrait participer à l'induction de la mort cellulaire.

V.3.6. Influence de la structure chimique dans la sélectivité des molécules pour l'inhibition spécifique de HDAC6

Les composés **13a** et **7b** ont une structure chimique relativement différente du fait notamment de la présence d'un troisième cycle dans le composé **13a**. Cependant, ces deux molécules portent un groupement hydroxyle et un méthoxy sur chaque cycle. La combinaison de ces deux groupements chimiques ainsi que la longueur de chaîne pourrait correspondre à des conditions spécifiques pour inhiber HDAC6. Ces structures sont particulièrement intéressantes, car parmi les inhibiteurs de HDAC6, la plupart des molécules possèdent un groupement hydroxamique mais ne présentent pas la combinaison des groupements hydroxyle et méthoxy sur un cycle aromatique.

VI. Conclusions - Perspectives

Les acides 4-hydroxybenzoïques **13b**, **13c** et **6e** possèdent des propriétés inhibitrices de plusieurs HDAC et les composés **13a** et **7b** inhibent spécifiquement HDAC6. Les cinq molécules induisent un ralentissement de la croissance et une diminution de la viabilité de différentes lignées cancéreuses et ont une cytotoxicité différentielle intéressante vis-à-vis de cellules de donneurs sains ou de cellules non cancéreuses. Ces observations cellulaires ont été corrélées avec les mécanismes moléculaires mettant en jeu l'inhibition des HDAC. Les molécules inhibitrices de plusieurs HDAC induisent un arrêt du cycle cellulaire *via* la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la progression, ainsi qu'une mort par apoptose probablement par la modulation de l'activité de la protéine pro-apoptotique BIM. Les molécules spécifiques de HDAC6 induisent fortement l'acétylation de la tubuline- α , induction mise en corrélation avec la modulation de la structure des microtubules. De plus, le composé **13a** induit l'activation de la protéine pro-apoptotique BAX qui pourrait participer à l'induction de la mort cellulaire.

VI.1. Perspectives avec les inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC

Les inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC sont capables de diminuer la prolifération dans différents modèles de lignées cancéreuses et une mort cellulaire par apoptose dans les cellules leucémiques K-562. Les mécanismes et hypothèses d'actions des différents composés dans les cellules K-562 utilisés pour cette étude sont résumés dans la Figure 46A.

Afin de compléter l'étude des effets des acides 4-hydroxybenzoïques sur l'acétylation des protéines, et d'expliquer les différences entre les observations *in vitro* et *in cellulo*, il serait intéressant d'évaluer l'effet de ces composés sur : (i) le statut d'acétylation d'autres cibles non-histoniennes (*e.g.* p53, NF- κ B) ; (ii) l'activité des HAT et (iii) l'expression des isoenzymes de HDAC et de HAT.

Des études de "docking" des acides 4-hydroxybenzoïques dans les sites actifs des isoenzymes inhibées permettraient d'analyser le mécanisme d'inhibition de ces

molécules. De plus, il serait intéressant d'analyser le type d'inhibition des enzymes, compétitive ou non compétitive, grâce à l'équation de Michaelis-Menten faisant appel à la vitesse maximale et à la constante de Michaelis.

La synthèse de nouveaux dérivés de ces molécules sur la base des données *in vitro* ainsi que sur les observations *in cellulo* permettrait d'augmenter l'efficacité des molécules dans les cellules.

Enfin, la combinaison thérapeutique des acides 4-hydroxybenzoïques avec des agents anti-cancéreux conventionnels (*e.g.* idarubicine, cisplatine) ou des médicaments épigénétiques (*e.g.* inhibiteurs de DNMT) serait intéressante pour étudier les effets potentiellement synergiques entre ces composés.

VI.2. Perspectives avec les inhibiteurs spécifiques de HDAC6

Les inhibiteurs spécifiques de HDAC6 induisent une diminution de la prolifération et de la viabilité dans différents modèles de lignées cancéreuses et modulent la structure du cytosquelette. Les mécanismes et hypothèses d'actions de ces deux composés *in cellulo* sont résumés dans la Figure 46B.

Afin d'analyser si l'activation de BAX par le composé **13a** est une conséquence d'une hyperacétylation de sa protéine inhibitrice Ku70, le statut d'acétylation de cette dernière pourrait être analysé.

De même, l'acétylation de la chaperonne HSP90 α devrait être étudiée afin de déterminer s'il existe un lien entre l'inhibition de HDAC6 et la diminution des protéines clientes Bcr-Abl et le récepteur aux androgènes. De plus, l'analyse des gènes-cibles du RA ainsi que de la phosphorylation des protéines ciblées par Bcr-Abl pourrait établir un lien entre la diminution du taux de ces protéines et l'induction de la mort cellulaire.

Concernant l'effet des inhibiteurs spécifiques de HDAC6 sur le cytosquelette, il serait intéressant d'étudier l'effet des composés **13a** et **7b**, de manière similaire à la tubuline- α , sur les filaments d'actine. En effet, la polymérisation du réseau d'actine dépend du statut d'acétylation de la cortactine, un autre substrat de HDAC6.

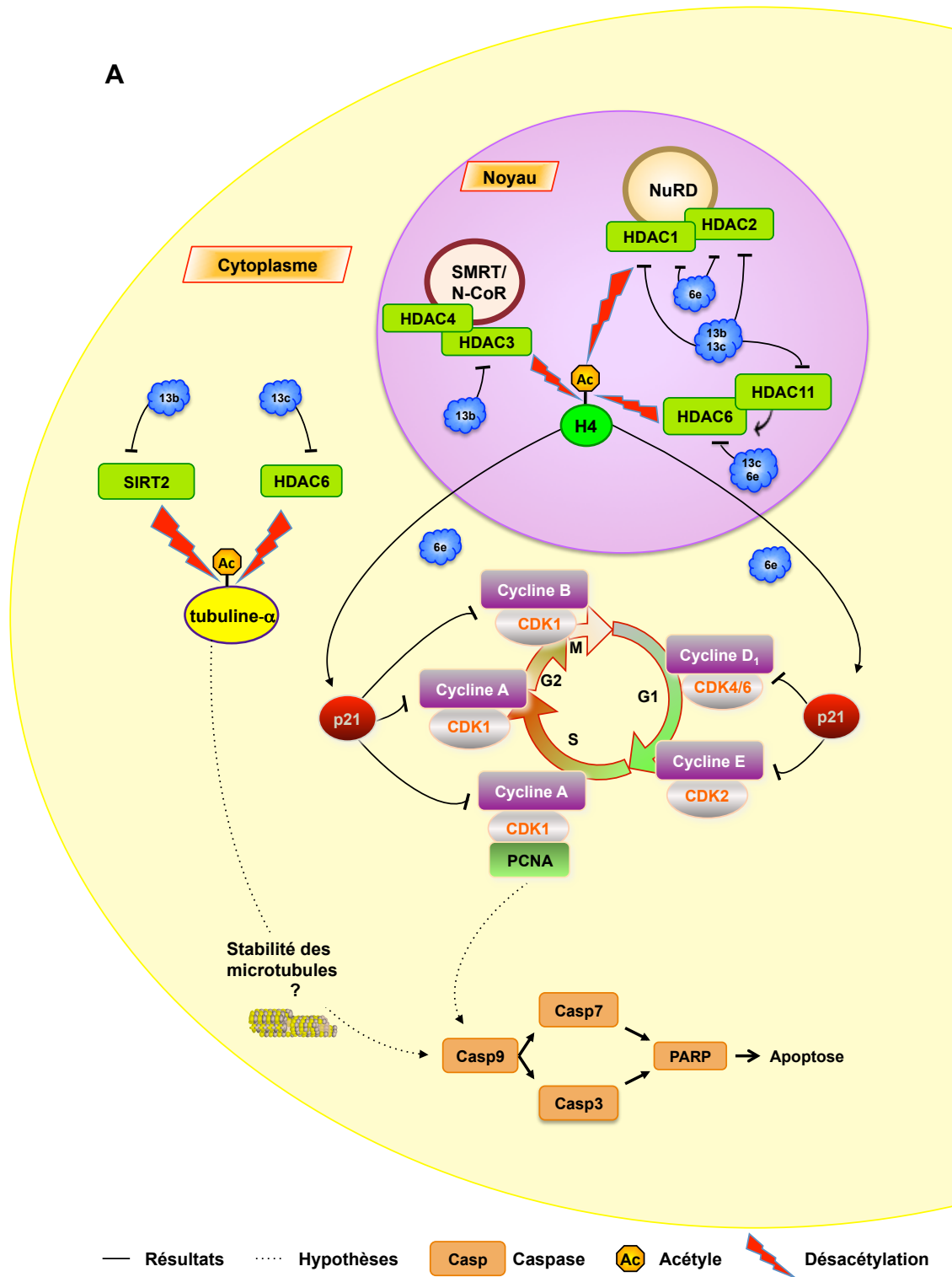
De plus, il serait intéressant de tester la combinaison entre des inhibiteurs spécifiques de HDAC6 avec d'autres agents anti-cancéreux conventionnels (doxorubicine, étoposide) ou médicaments épigénétiques (comme la 5-aza-2'-

deoxycytidine) afin d'évaluer la potentialisation de leurs effets sur la viabilité des cellules tumorales. La combinaison des composés **13a** et **7b** avec des inhibiteurs de HSP90 tel que le 17-AAG serait particulièrement intéressante. La fonction chaperonne de cette protéine semble déjà être très affectée par le traitement avec les inhibiteurs de HDAC6, la combinaison de ces molécules pourrait avoir un effet synergique sur la mort cellulaire.

La modélisation moléculaire des interactions enzymes-substrats en présence de l'inhibiteur sera étudiée dans le but d'élucider le mécanisme d'inhibition de l'activité enzymatique de HDAC6 par les composés. De plus, l'utilisation de mutants catalytiques de HDAC6 dans chacun des sites ainsi que le double mutant pourrait nous renseigner sur la préférence potentielle des composés pour l'un des sites actifs. Une étude de la relation structure-activité pourrait être réalisée par une modulation des groupements chimiques pour potentialiser l'effet des molécules.

Enfin, les composés pourraient être testé *in vivo* sur des xénogreffes de souris afin d'évaluer leur effet sur le développement tumoral ainsi que d'analyser le profil d'acétylation des protéines dans les tissus cancéreux.

A



Légende à la suite de la figure.

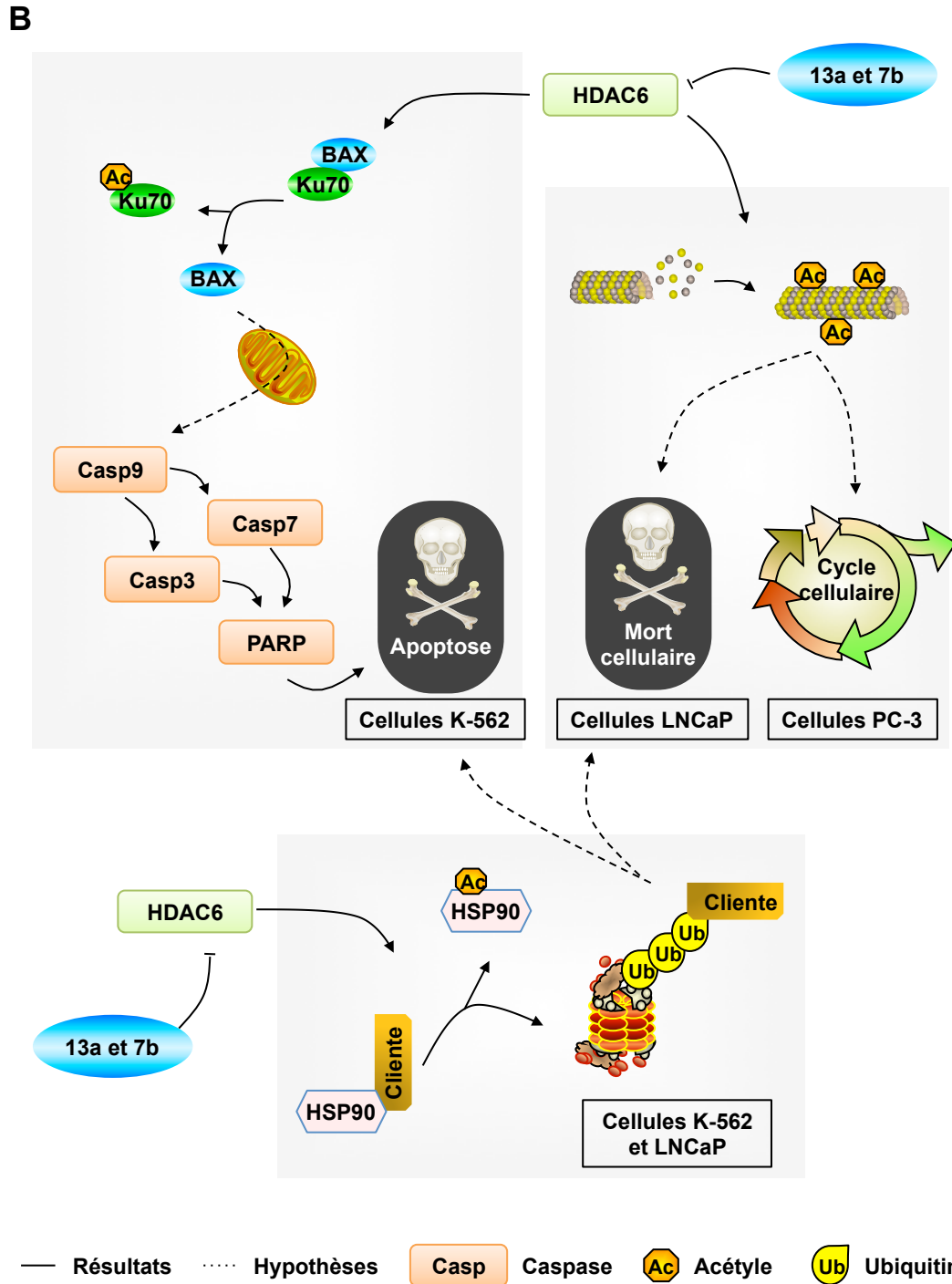


Figure 46: Mécanismes d'action des acides 4-hydroxybenzoïques dans les cellules cancéreuses.

Les flèches rouges signifient qu'il y a désacétylation de la protéine ciblée, les traits en pointillés représentent les mécanismes hypothétiques d'action qu'il reste à analyser en (A) pour les inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC et en (B) pour les inhibiteurs spécifiques de HDAC6.

VII. Bibliographie

- Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14447-52.
- Ai J, Wang Y, Dar JA, Liu J, Liu L, Nelson JB, Wang Z (2009) HDAC6 regulates androgen receptor hypersensitivity and nuclear localization via modulating Hsp90 acetylation in castration-resistant prostate cancer. *Molecular endocrinology* 23: 1963-72.
- Al-Sady B, Madhani HD, Narlikar GJ (2013) Division of labor between the chromodomains of HP1 and Suv39 methylase enables coordination of heterochromatin spread. *Mol Cell* 51: 80-91.
- Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM (2011) The role of HDAC6 in cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011: 875824.
- Andersen JL, Thompson JW, Lindblom KR, Johnson ES, Yang CS, Lilley LR, Freel CD, Moseley MA, Kornbluth S (2011) A biotin switch-based proteomics approach identifies 14-3-3zeta as a target of Sirt1 in the metabolic regulation of caspase-2. *Mol Cell* 43: 834-42.
- Argmann C, Auwerx J (2006) Insulin secretion: SIRT4 gets in on the act. *Cell* 126: 837-9.
- Arts J, Angibaud P, Marien A, Floren W, Janssens B, King P, van Dun J, Janssen L, Geerts T, Tuman RW, Johnson DL, Andries L, Jung M, Janicot M, van Emelen K (2007) R306465 is a novel potent inhibitor of class I histone deacetylases with broad-spectrum antitumoral activity against solid and haematological malignancies. *Br J Cancer* 97: 1344-53.
- Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280: 26729-34.
- Bannister AJ, Miska EA, Gorlich D, Kouzarides T (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Current biology* : CB 10: 467-70.
- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8: 1243-54.
- Basak S, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Mol Cancer Ther* 7: 3195-202.
- Bazzaro M, Lin Z, Santillan A, Lee MK, Wang MC, Chan KC, Bristow RE, Mazitschek R, Bradner J, Roden RB (2008) Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor. *Clin Cancer Res* 14: 7340-7.
- Bertos NR, Gilquin B, Chan GK, Yen TJ, Khochbin S, Yang XJ (2004) Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem* 279: 48246-54.
- Bhaskara S, Hiebert SW (2011) Role for histone deacetylase 3 in maintenance of genome stability. *Cell cycle* 10: 727-8.

- Bhatnagar N, Li X, Chen Y, Zhou X, Garrett SH, Guo B (2009) 3,3'-diindolylmethane enhances the efficacy of butyrate in colon cancer prevention through down-regulation of survivin. *Cancer Prev Res (Phila)* 2: 581-9.
- Black JC, Mosley A, Kitada T, Washburn M, Carey M (2008) The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol Cell* 32: 449-55.
- Boyault C, Gilquin B, Zhang Y, Rybin V, Garman E, Meyer-Klaucke W, Matthias P, Muller CW, Khochbin S (2006) HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *Embo J* 25: 3357-66.
- Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C, Turner BM (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 19: 1751-9.
- Bradner JE, West N, Grachan ML, Greenberg EF, Haggarty SJ, Warnow T, Mazitschek R (2010) Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nat Chem Biol* 6: 238-43.
- Burgess RJ, Zhou H, Han J, Zhang Z (2010) A role for Gcn5 in replication-coupled nucleosome assembly. *Mol Cell* 37: 469-80.
- Butler KV, Kalin J, Brochier C, Vistoli G, Langley B, Kozikowski AP (2010) Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J Am Chem Soc* 132: 10842-6.
- Campos EI, Fillingham J, Li G, Zheng H, Voigt P, Kuo WH, Seepany H, Gao Z, Day LA, Greenblatt JF, Reinberg D (2010) The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nature structural & molecular biology* 17: 1343-51.
- Carew JS, Medina EC, Esquivel JA, 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, Zhang H, Huang P, Mita AC, Mita MM, Giles FJ, Nawrocki ST (2010) Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* 14: 2448-59.
- Catley L, Weisberg E, Tai YT, Atadja P, Remiszewski S, Hideshima T, Mitsiades N, Shringarpure R, LeBlanc R, Chauhan D, Munshi NC, Schlossman R, Richardson P, Griffin J, Anderson KC (2003) NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood* 102: 2615-22.
- Cea M, Soncini D, Fruscione F, Raffaghello L, Garuti A, Emionite L, Moran E, Magnone M, Zoppoli G, Reverberi D, Caffa I, Salis A, Cagnetta A, Bergamaschi M, Casciaro S, Pierri I, Damonte G, Ansaldi F, Gobbi M, Pistoia V, Ballestrero A, Patrone F, Bruzzone S, Nencioni A (2011) Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells. *PLoS One* 6: e22739.
- Cen Y (2010) Sirtuins inhibitors: the approach to affinity and selectivity. *Biochimica et biophysica acta* 1804: 1635-44.
- Chen CS, Wang YC, Yang HC, Huang PH, Kulp SK, Yang CC, Lu YS, Matsuyama S, Chen CY, Chen CS (2007) Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer Res* 67: 5318-27.
- Chen PB, Hung JH, Hickman TL, Coles AH, Carey JF, Weng Z, Chu F, Fazzio TG (2013a) Hdac6 regulates Tip60-p400 function in stem cells. *eLife* 2: e01557.
- Chen S, Seiler J, Santiago-Reichelt M, Felbel K, Grummt I, Voit R (2013b) Repression of RNA polymerase I upon stress is caused by inhibition of RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. *Mol Cell* 52: 303-13.

- Chia K, Beamish H, Jafferri K, Gabrielli B (2010) The histone deacetylase inhibitor MGCD0103 has both deacetylase and microtubule inhibitory activity. *Molecular pharmacology* 78: 436-43.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325: 834-40.
- Chow CM, Georgiou A, Szutorisz H, Maia e Silva A, Pombo A, Barahona I, Dargelos E, Canzonetta C, Dillon N (2005) Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO reports* 6: 354-60.
- Chuang MJ, Wu ST, Tang SH, Lai XM, Lai HC, Hsu KH, Sun KH, Sun GH, Chang SY, Yu DS, Hsiao PW, Huang SM, Cha TL (2013) The HDAC inhibitor LBH589 induces ERK-dependent prometaphase arrest in prostate cancer via HDAC6 inactivation and down-regulation. *PLoS One* 8: e73401.
- Cilloni D, Saglio G (2012) Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res* 18: 930-7.
- Clarke JD, Hsu A, Yu Z, Dashwood RH, Ho E (2011) Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Molecular nutrition & food research* 55: 999-1009.
- Clocchiatti A, Florean C, Brancolini C (2011) Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumourigenesis. *J Cell Mol Med* 15: 1833-46.
- Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA (2004) Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 13: 627-38.
- Crabb SJ, Howell M, Rogers H, Ishfaq M, Yurek-George A, Carey K, Pickering BM, East P, Mitter R, Maeda S, Johnson PW, Townsend P, Shin-ya K, Yoshida M, Ganesan A, Packham G (2008) Characterisation of the in vitro activity of the depsipeptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A. *Biochem Pharmacol* 76: 463-75.
- Dastjerdi MN, Salahshoor MR, Mardani M, Rabbani M, Hashemibeni B, Gharagozloo M, Kazemi M, Esmail N, Roshankhah S, Golmohammadi R, Mobarakian M (2013) The apoptotic effects of sirtuin1 inhibitor on the MCF-7 and MRC-5 cell lines. *Research in pharmaceutical sciences* 8: 79-89.
- Davie JR (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133: 2485S-93S.
- de Bono JS, Kristeleit R, Tolcher A, Fong P, Pacey S, Karavasilis V, Mita M, Shaw H, Workman P, Kaye S, Rowinsky EK, Aherne W, Atadja P, Scott JW, Patnaik A (2008) Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of LAQ824, a hydroxamate histone deacetylase inhibitor with a heat shock protein-90 inhibitory profile, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 14: 6663-73.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370: 737-49.
- Delage B, Dashwood RH (2008) Dietary manipulation of histone structure and function. *Annual review of nutrition* 28: 347-66.
- Deribe YL, Wild P, Chandrashaker A, Curak J, Schmidt MH, Kalaidzidis Y, Milutinovic N, Kratchmarova I, Buerkle L, Fetchko MJ, Schmidt P, Kittanakom S, Brown KR, Jurisica I, Blagoev B, Zerial M, Stagljar I, Dikic I (2009) Regulation of epidermal

- growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Science signaling* 2: ra84.
- Dobbin MM, Madabhushi R, Pan L, Chen Y, Kim D, Gao J, Ahanonu B, Pao PC, Qiu Y, Zhao Y, Tsai LH (2013) SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons. *Nature neuroscience* 16: 1008-15.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular cancer research : MCR* 5: 981-9.
- Druesne N, Pagniez A, Mayeur C, Thomas M, Cherbuy C, Duee PH, Martel P, Chaumontet C (2004) Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis* 25: 1227-36.
- Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S, Kao HY, Xu Y, Willis J, Markowitz SD, Sedwick D, Ewing RM, Wang Z (2010) DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Science signaling* 3: ra80.
- Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR (2007) Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 109: 31-9.
- El Amrani M, Lai D, Debbab A, Aly AH, Siems K, Seidel C, Schnekenburger M, Gaigneaux A, Diederich M, Feger D, Lin W, Proksch P (2014) Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of natural products* 77: 49-56.
- Emanuele S, Lauricella M, Carlisi D, Vassallo B, D'Anneo A, Di Fazio P, Vento R, Tesoriere G (2007) SAHA induces apoptosis in hepatoma cells and synergistically interacts with the proteasome inhibitor Bortezomib. *Apoptosis* 12: 1327-38.
- Eom GH, Nam YS, Oh JG, Choe N, Min HK, Yoo EK, Kang G, Nguyen VH, Min JJ, Kim JK, Lee IK, Bassel-Duby R, Olson EN, Park WJ, Kook H (2014) Regulation of Acetylation of Histone Deacetylase 2 by p300/CBP-Associated Factor/Histone Deacetylase 5 in the Development of Cardiac Hypertrophy. *Circulation research* 114: 1133-43.
- Fadri-Moskwik M, Weiderhold KN, Deeraksa A, Chuang C, Pan J, Lin SH, Yu-Lee LY (2012) Aurora B is regulated by acetylation/deacetylation during mitosis in prostate cancer cells. *Faseb J* 26: 4057-67.
- Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W, Verdin E (2002) Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell* 9: 45-57.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology* 15: 172-83.
- Florea C, Schnekenburger M, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M (2011) Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics* 3: 581-609.
- Fournel M, Bonfils C, Hou Y, Yan PT, Trachy-Bourget MC, Kalita A, Liu J, Lu AH, Zhou NZ, Robert MF, Gillespie J, Wang JJ, Ste-Croix H, Rahil J, Lefebvre S, Moradei O, Delorme D, Macleod AR, Besterman JM, Li Z (2008) MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 7: 759-68.
- Friedmann DR, Aguilar A, Fan J, Nachury MV, Marmorstein R (2012) Structure of the alpha-tubulin acetyltransferase, alphaTAT1, and implications for tubulin-specific acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 19655-60.

- Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Ogryzko V, Avantiaggiati ML, Pestell RG (2000) p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem* 275: 20853-60.
- Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 87-92.
- Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, Horinouchi S (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 62: 4916-21.
- Fusco C, Micale L, Augello B, Mandriani B, Pellico MT, De Nittis P, Calcagni A, Monti M, Cozzolino F, Pucci P, Merla G (2014) HDAC6 mediates the acetylation of TRIM50. *Cellular signalling* 26: 363-9.
- Gabrielli B, Brown M (2012) Histone deacetylase inhibitors disrupt the mitotic spindle assembly checkpoint by targeting histone and nonhistone proteins. *Advances in cancer research* 116: 1-37.
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277: 25748-55.
- Gao YS, Hubbert CC, Lu J, Lee YS, Lee JY, Yao TP (2007) Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis. *Mol Cell Biol* 27: 8637-47.
- Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, Rytting M, Wierda WG, Ravandi F, Koller C, Xiao L, Faderl S, Estrov Z, Cortes J, O'Brien S, Estey E, Bueso-Ramos C, Fiorentino J, Jabbour E, Issa JP (2006) Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* 108: 3271-9.
- Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN (2002) Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* 277: 25904-13.
- Ge X, Jin Q, Zhang F, Yan T, Zhai Q (2009) PCAF acetylates β -catenin and improves its stability. *Molecular biology of the cell* 20: 419-27.
- Gillenwater AM, Zhong M, Lotan R (2007) Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 6: 2967-75.
- Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, Garcia-Wilson E, Perkins ND, Hay RT (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11: 1043-54.
- Gorres KL, Raines RT (2010) Prolyl 4-hydroxylase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45: 106-24.
- Gronroos E, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J (2002) Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell* 10: 483-93.
- Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL (2001) Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem* 276: 38837-43.
- Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA (2004) Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1241-6.

- Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS (2004) Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* 64: 1079-86.
- Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4389-94.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126: 941-54.
- Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW (2000) Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res* 60: 6068-74.
- Han Y, Jeong HM, Jin YH, Kim YJ, Jeong HG, Yeo CY, Lee KY (2009) Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 88-92.
- Handschin C, Spiegelman BM (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocrine reviews* 27: 728-35.
- Hawkes NA, Otero G, Winkler GS, Marshall N, Dahmus ME, Krappmann D, Scheidereit C, Thomas CL, Schiavo G, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2002) Purification and characterization of the human elongator complex. *J Biol Chem* 277: 3047-52.
- Heyd F, Lynch KW (2011) Degrade, move, regroup: signaling control of splicing proteins. *Trends in biochemical sciences* 36: 397-404.
- Hicke L, Schubert HL, Hill CP (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 610-21.
- Hideshima T, Bradner JE, Wong J, Chauhan D, Richardson P, Schreiber SL, Anderson KC (2005) Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8567-72.
- Higashida K, Kim SH, Jung SR, Asaka M, Holloszy JO, Han DH (2013) Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1alpha activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation. *PLoS biology* 11: e1001603.
- Hildmann C, Riester D, Schwienhorst A (2007) Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 487-97.
- Hnilicova J, Hozeifi S, Duskova E, Icha J, Tomankova T, Stanek D (2011) Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS One* 6: e16727.
- Hodawadekar SC, Marmorstein R (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26: 5528-40.
- Hook SS, Orian A, Cowley SM, Eisenman RN (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13425-30.
- Huang S, Wang S, Bian C, Yang Z, Zhou H, Zeng Y, Li H, Han Q, Zhao RC (2012) Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. *Stem cells and development* 21: 2531-40.

- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417: 455-8.
- Hubner A, Barrett T, Flavell RA, Davis RJ (2008) Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol Cell* 30: 415-25.
- Hunter T (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100: 113-27.
- Jansen LE, Black BE, Foltz DR, Cleveland DW (2007) Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *The Journal of cell biology* 176: 795-805.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111: 709-20.
- Jung KH, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Bae HJ, Chang YG, Kim MG, Park WS, Lee JY, Lee SY, Chu IS, Nam SW (2012) Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. *Hepatology* 56: 644-57.
- Kaluza D, Kroll J, Gesierich S, Yao TP, Boon RA, Hergenreider E, Tjwa M, Rossig L, Seto E, Augustin HG, Zeiher AM, Dimmeler S, Urbich C (2011) Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *Embo J* 30: 4142-56.
- Kanno K, Kanno S, Nitta H, Uesugi N, Sugai T, Masuda T, Wakabayashi G, Maesawa C (2012) Overexpression of histone deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* 28: 867-73.
- Kawada J, Zou P, Mazitschek R, Bradner JE, Cohen JI (2009) Tubacin kills Epstein-Barr virus (EBV)-Burkitt lymphoma cells by inducing reactive oxygen species and EBV lymphoblastoid cells by inducing apoptosis. *J Biol Chem* 284: 17102-9.
- Kawamata N, Chen J, Koeffler HP (2007) Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat) suppresses translation of cyclin D1 in mantle cell lymphoma cells. *Blood* 110: 2667-73.
- Ke Q, Costa M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology* 70: 1469-80.
- Kelly G (2010) A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 15: 245-63.
- Kerr E, Holohan C, McLaughlin KM, Majkut J, Dolan S, Redmond K, Riley J, McLaughlin K, Stasik I, Crudden M, Van Schaeybroeck S, Fenning C, O'Connor R, Kiely P, Sgobba M, Haigh D, Johnston PG, Longley DB (2012) Identification of an acetylation-dependant Ku70/FLIP complex that regulates FLIP expression and HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 19: 1317-27.
- Khabele D, Son DS, Parl AK, Goldberg GL, Augenlicht LH, Mariadason JM, Rice VM (2007) Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy. *Cancer Biol Ther* 6: 795-801.
- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M (2008) Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 409: 581-9.
- Kim DH, Shin J, Kwon HJ (2007) Psammaplin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Exp Mol Med* 39: 47-55.

- Kimura A, Matsubara K, Horikoshi M (2005) A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *Journal of biochemistry* 138: 647-62.
- Kirsh O, Seeler JS, Pichler A, Gast A, Muller S, Miska E, Mathieu M, Harel-Bellan A, Kouzarides T, Melchior F, Dejean A (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* 21: 2682-91.
- Kolch W, Pitt A (2010) Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 618-29.
- Kumagai T, Wakimoto N, Yin D, Gery S, Kawamata N, Takai N, Komatsu N, Chumakov A, Imai Y, Koeffler HP (2007) Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 121: 656-65.
- Lahm A, Paolini C, Pallaoro M, Nardi MC, Jones P, Neddermann P, Sambucini S, Bottomley MJ, Lo Surdo P, Carfi A, Koch U, De Francesco R, Steinkuhler C, Gallinari P (2007) Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17335-40.
- Lam HC, Cloonan SM, Bhashyam AR, Haspel JA, Singh A, Sathirapongsasuti JF, Cervo M, Yao H, Chung AL, Mizumura K, An CH, Shan B, Franks JM, Haley KJ, Owen CA, Tesfaigzi Y, Washko GR, Quackenbush J, Silverman EK, Rahman I, Kim HP, Mahmood A, Biswal SS, Ryter SW, Choi AM (2013) Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *J Clin Invest* 123: 5212-30.
- Lamoral-Theys D, Pottier L, Kerff F, Dufrasne F, Proutiere F, Wauthoz N, Neven P, Ingrassia L, Antwerpen PV, Lefranc F, Gelbcke M, Pirotte B, Kraus JL, Neve J, Kornienko A, Kiss R, Dubois J (2010) Simple di- and trivanillates exhibit cytostatic properties toward cancer cells resistant to pro-apoptotic stimuli. *Bioorg Med Chem* 18: 3823-33.
- Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, Taylor JP, Cuervo AM, Yao TP (2010a) HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *Embo J* 29: 969-80.
- Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP (2010b) Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *The Journal of cell biology* 189: 671-9.
- Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 284-95.
- Lee YH, Bedford MT, Stallcup MR (2011) Regulated recruitment of tumor suppressor BRCA1 to the p21 gene by coactivator methylation. *Genes Dev* 25: 176-88.
- Lee YS, Lim KH, Guo X, Kawaguchi Y, Gao Y, Barrientos T, Ordentlich P, Wang XF, Counter CM, Yao TP (2008) The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Res* 68: 7561-9.
- Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee JK, Porro G, Pagani P, Modena D, Moras ML, Pozzi P, Reznikov LL, Siegmund B, Fantuzzi G, Dinarello CA, Mascagni P (2005) The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med* 11: 1-15.
- Li L, Zhang G, Zhang Y, Tan J, Huang H, Huang B, Lu J (2008a) Sodium butyrate-induced upregulation of p18(INK4C) gene affects K562 cell G(0)/G(1) arrest and differentiation. *Molecular and cellular biochemistry* 319: 9-15.

- Li Y, Zhang X, Polakiewicz RD, Yao TP, Comb MJ (2008b) HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J Biol Chem* 283: 12686-90.
- Lin C, Kang J, Zheng R (2005) Vitamin K3 triggers human leukemia cell death through hydrogen peroxide generation and histone hyperacetylation. *Die Pharmazie* 60: 765-71.
- Linares LK, Kiernan R, Triboulet R, Chable-Bessia C, Latreille D, Cuvier O, Lacroix M, Le Cam L, Coux O, Benkirane M (2007) Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nature cell biology* 9: 331-8.
- Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, Berger SL (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19: 1202-9.
- Liu S, Cheng H, Kwan W, Lubieniecka JM, Nielsen TO (2008) Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models. *Mol Cancer Ther* 7: 1751-61.
- Liu Y, Salvador LA, Byeon S, Ying Y, Kwan JC, Law BK, Hong J, Luesch H (2010) Anticancer activity of largazole, a marine-derived tunable histone deacetylase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 351-61.
- Liu Y, Peng L, Seto E, Huang S, Qiu Y (2012) Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation. *J Biol Chem* 287: 29168-74.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J (2003) *Molecular structure of genes and chromosomes*; Ltd WHFC, editor.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-48.
- Luu TH, Morgan RJ, Leong L, Lim D, McNamara M, Portnow J, Frankel P, Smith DD, Doroshow JH, Wong C, Aparicio A, Gandara DR, Somlo G (2008) A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. *Clin Cancer Res* 14: 7138-42.
- Lv J, Liu H, Wang Q, Tang Z, Hou L, Zhang B (2003) Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase-like protein involved in transcriptional activation of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 506-13.
- Lwin T, Zhao X, Cheng F, Zhang X, Huang A, Shah B, Zhang Y, Moscinski LC, Choi YS, Kozikowski AP, Bradner JE, Dalton WS, Sotomayor E, Tao J (2013) A microenvironment-mediated c-Myc/miR-548m/HDAC6 amplification loop in non-Hodgkin B cell lymphomas. *J Clin Invest* 123: 4612-26.
- Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* 21: 255-61.
- Marino-Ramirez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D (2005) Histone structure and nucleosome stability. *Expert review of proteomics* 2: 719-29.
- Marmorstein R, Roth SY (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Current opinion in genetics & development* 11: 155-61.
- Marquard L, Gjerdrum LM, Christensen IJ, Jensen PB, Sehested M, Ralfkiaer E (2008) Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. *Histopathology* 53: 267-77.
- Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* 19: 662-71.

- Marzio G, Wagener C, Gutierrez MI, Cartwright P, Helin K, Giacca M (2000) E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* 275: 10887-92.
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J* 21: 6820-31.
- Meneghini MD, Wu M, Madhani HD (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112: 725-36.
- Millward M, Price T, Townsend A, Sweeney C, Spencer A, Sukumaran S, Longenecker A, Lee L, Lay A, Sharma G, Gemmill RM, Drabkin HA, Lloyd GK, Neuteboom ST, McConkey DJ, Palladino MA, Spear MA (2012) Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on in vitro assessments of the combination. *Investigational new drugs* 30: 2303-17.
- Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 38-51.
- Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, Caldas C (2007) Cancer genetics of epigenetic genes. *Human molecular genetics* 16 Spec No 1: R28-49.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 448-62.
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315: 201-5.
- Myzak MC, Karplus PA, Chung FL, Dashwood RH (2004) A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res* 64: 5767-74.
- Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L (2009) SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137: 560-70.
- Namdar M, Perez G, Ngo L, Marks PA (2010) Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20003-8.
- Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T (2005) SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 {alpha}. *J Biol Chem* 280: 16456-60.
- Nian H, Delage B, Pinto JT, Dashwood RH (2008) Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter. *Carcinogenesis* 29: 1816-24.
- Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, Gasparetto M, Glozak M, Tao J, Moscinski L, Smith C, Wu J, Jove R, Atadja P, Bhalla K (2003) Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. *Cancer Res* 63: 5126-35.
- Nishioka K, Rice JC, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Werner J, Wang Y, Chuikov S, Valenzuela P, Tempst P, Steward R, Lis JT, Allis CD, Reinberg D (2002) PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9: 1201-13.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11: 437-44.

- Olaharski AJ, Rine J, Marshall BL, Babiarz J, Zhang L, Verdin E, Smith MT (2005) The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. *PLoS Genet* 1: e77.
- Osada H, Tatematsu Y, Saito H, Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004) Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int J Cancer* 112: 26-32.
- Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M, Dong A, Qiu W, MacKenzie F, Dhe-Paganon S, Arrowsmith CH, Zhai RG (2012) Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini. *J Biol Chem* 287: 2317-27.
- Ozdogan H, Teschendorff AE, Ahmed AA, Hyland SJ, Blenkiron C, Bobrow L, Veerakumarasivam A, Burt G, Subkhankulova T, Arends MJ, Collins VP, Bowtell D, Kouzarides T, Brenton JD, Caldas C (2006) Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics* 7: 90.
- Palijan A, Fernandes I, Bastien Y, Tang L, Verway M, Kourelis M, Tavera-Mendoza LE, Li Z, Bourdeau V, Mader S, Yang XJ, White JH (2009) Function of histone deacetylase 6 as a cofactor of nuclear receptor coregulator LCoR. *J Biol Chem* 284: 30264-74.
- Park SY, Jun JA, Jeong KJ, Heo HJ, Sohn JS, Lee HY, Park CG, Kang J (2011) Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncol Rep* 25: 1677-81.
- Parmigiani RB, Xu WS, Venta-Perez G, Erdjument-Bromage H, Yaneva M, Tempst P, Marks PA (2008) HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9633-8.
- Passos DO, Quaresma AJ, Kobarg J (2006) The methylation of the C-terminal region of hnRNPQ (NSAP1) is important for its nuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 517-25.
- Pecuchet N, Cluzeau T, Thibault C, Mounier N, Vignot S (2010) [Histone deacetylase inhibitors: highlight on epigenetic regulation]. *Bulletin du cancer* 97: 917-35.
- Peng L, Yuan Z, Ling H, Fukasawa K, Robertson K, Olashaw N, Koomen J, Chen J, Lane WS, Seto E (2011) SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Mol Cell Biol* 31: 4720-34.
- Perdiz D, Mackeh R, Pous C, Baillet A (2011) The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cellular signalling* 23: 763-71.
- Peterson CL, Laniel MA (2004) Histones and histone modifications. *Current biology* : CB 14: R546-51.
- Petrella A, D'Acunzio CW, Rodriguez M, Festa M, Tosco A, Bruno I, Terracciano S, Taddei M, Paloma LG, Parente L (2008) Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1. *Eur J Cancer* 44: 740-9.
- Piekarz RL, Frye R, Turner M, Wright JJ, Allen SL, Kirschbaum MH, Zain J, Prince HM, Leonard JP, Geskin LJ, Reeder C, Joske D, Figg WD, Gardner ER, Steinberg SM, Jaffe ES, Stetler-Stevenson M, Lade S, Fojo AT, Bates SE (2009) Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27: 5410-7.
- Plumb JA, Finn PW, Williams RJ, Bandara MJ, Romero MR, Watkins CJ, La Thangue NB, Brown R (2003) Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol Cancer Ther* 2: 721-8.

- Portmann S, Fahrner R, Lechleiter A, Keogh A, Overney S, Laemmle A, Mikami K, Montani M, Tschan MP, Candinas D, Stroka D (2013) Antitumor effect of SIRT1 inhibition in human HCC tumor models in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 12: 499-508.
- Posada J, Cooper JA (1992) Molecular signal integration. Interplay between serine, threonine, and tyrosine phosphorylation. *Molecular biology of the cell* 3: 583-92.
- Prior CP, Cantor CR, Johnson EM, Littau VC, Allfrey VG (1983) Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin. *Cell* 34: 1033-42.
- Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA (2007) HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129: 1351-63.
- Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, Wei Y, Verheul HM, Salumbides B, Sanni T, Atadja P, Pili R (2006) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res* 12: 634-42.
- Qiu Y, Zhao Y, Becker M, John S, Parekh BS, Huang S, Hendarwanto A, Martinez ED, Chen Y, Lu H, Adkins NL, Stavreva DA, Wiench M, Georgel PT, Schiltz RL, Hager GL (2006) HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transcription. *Mol Cell* 22: 669-79.
- Rao R, Fiskus W, Yang Y, Lee P, Joshi R, Fernandez P, Mandawat A, Atadja P, Bradner JE, Bhalla K (2008) HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* 112: 1886-93.
- Rao R, Nalluri S, Kolhe R, Yang Y, Fiskus W, Chen J, Ha K, Buckley KM, Balusu R, Coothankandaswamy V, Joshi A, Atadja P, Bhalla KN (2010) Treatment with panobinostat induces glucose-regulated protein 78 acetylation and endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 9: 942-52.
- Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3003-7.
- Roach PJ (1991) Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J Biol Chem* 266: 14139-42.
- Robert C, Rassool FV (2012) HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair. *Advances in cancer research* 116: 87-129.
- Rosato RR, Almenara JA, Grant S (2003) The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res* 63: 3637-45.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* 70: 81-120.
- Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4592-7.
- Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, Itoh A, Funata N, Schreiber SL, Yoshida M, Toi M (2005) Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* 24: 4531-9.
- Sakuma T, Uzawa K, Onda T, Shiiba M, Yokoe H, Shibahara T, Tanzawa H (2006) Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 29: 117-24.

- Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, Sackett D, Sausville E, Blagosklonny MV, Bates SE (2000) P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer* 83: 817-25.
- Santo L, Hideshima T, Kung AL, Tseng JC, Tamang D, Yang M, Jarpe M, van Duzer JH, Mazitschek R, Ogier WC, Cirstea D, Rodig S, Eda H, Scullen T, Canavese M, Bradner J, Anderson KC, Jones SS, Raje N (2012) Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood* 119: 2579-89.
- Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M (2014) Epigenetic modulators from "The Big Blue": a treasure to fight against cancer. *Cancer letters*.
- Schroder S, Herker E, Itzen F, He D, Thomas S, Gilchrist DA, Kaehlcke K, Cho S, Pollard KS, Capra JA, Schnolzer M, Cole PA, Geyer M, Bruneau BG, Adelman K, Ott M (2013) Acetylation of RNA polymerase II regulates growth-factor-induced gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell* 52: 314-24.
- Schuetz A, Min J, Antoshenko T, Wang CL, Allali-Hassani A, Dong A, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Sternglanz R, Plotnikov AN (2007) Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin. *Structure* 15: 377-89.
- Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E (2006) Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10224-9.
- Scott I, Webster BR, Li JH, Sack MN (2012) Identification of a molecular component of the mitochondrial acetyltransferase programme: a novel role for GCN5L1. *Biochem J* 443: 655-61.
- Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N, Neckers L (2007) An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell* 25: 151-9.
- Seidel C, Schnekenburger M, Zwergel C, Gaascht F, Mai A, Kirsch G, Valente S, Diederich M (In press) Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis and bioactivity of 3-alkenoylcoumarines. *Bioorg Med Chem Lett*.
- Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007: cm8.
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 18030-5.
- Shimazu T, Horinouchi S, Yoshida M (2007) Multiple histone deacetylases and the CREB-binding protein regulate pre-mRNA 3'-end processing. *J Biol Chem* 282: 4470-8.
- Simon D, Laloo B, Barillot M, Barnette T, Blanchard C, Rooryck C, Marche M, Burgelin I, Coupry I, Chassaing N, Gilbert-Dussardier B, Lacombe D, Grosset C, Arveiler B (2010) A mutation in the 3'-UTR of the HDAC6 gene abolishing the post-transcriptional regulation mediated by hsa-miR-433 is linked to a new form of dominant X-linked chondrodysplasia. *Human molecular genetics* 19: 2015-27.
- Simonsson M, Heldin CH, Ericsson J, Gronroos E (2005) The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability. *J Biol Chem* 280: 21797-803.
- Singh BN, Zhang G, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW (2010) Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev Anticancer Ther* 10: 935-54.
- Singh EK, Ravula S, Pan CM, Pan PS, Vasko RC, Lapera SA, Weerasinghe SV, Pflum MK, McAlpine SR (2008) Synthesis and biological evaluation of histone deacetylase

- inhibitors that are based on FR235222: a cyclic tetrapeptide scaffold. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 2549-54.
- Spange S, Wagner T, Heinzl T, Kramer OH (2009) Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 185-98.
- Stathis A, Hotte SJ, Chen EX, Hirte HW, Oza AM, Moretto P, Webster S, Laughlin A, Stayner LA, McGill S, Wang L, Zhang WJ, Espinoza-Delgado I, Holleran JL, Egorin MJ, Siu LL (2011) Phase I study of decitabine in combination with vorinostat in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res* 17: 1582-90.
- Stintzing S, Kemmerling R, Kiesslich T, Alinger B, Ocker M, Neureiter D (2011) Myelodysplastic syndrome and histone deacetylase inhibitors: "to be or not to be acetylated"? *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011: 214143.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-5.
- Subramanian C, Jarzembowski JA, Opipari AW, Jr., Castle VP, Kwok RP (2011) HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma. *Neoplasia* 13: 726-34.
- Subramanian S, Bates SE, Wright JJ, Espinoza-Delgado I, Piekarczyk RL (2010) Clinical toxicities of histone deacetylase inhibitors. *Pharmaceuticals*: 2751-67.
- Sun S, Han Y, Liu J, Fang Y, Tian Y, Zhou J, Ma D, Wu P (2014) Trichostatin A targets the mitochondrial respiratory chain, increasing mitochondrial reactive oxygen species production to trigger apoptosis in human breast cancer cells. *PLoS One* 9: e91610.
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13182-7.
- Sun Y, Xu Y, Roy K, Price BD (2007) DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol Cell Biol* 27: 8502-9.
- Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T, Ito H (2003) Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 10: 209-16.
- Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W (2006) Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24: 827-39.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231-41.
- Tervo AJ, Kyrylenko S, Niskanen P, Salminen A, Leppanen J, Nyronen TH, Jarvinen T, Poso A (2004) An in silico approach to discovering novel inhibitors of human sirtuin type 2. *J Med Chem* 47: 6292-8.
- Tong JJ, Liu J, Bertos NR, Yang XJ (2002) Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res* 30: 1114-23.
- Tong JK (2002) Dissecting histone deacetylase function. *Chem Biol* 9: 668-70.
- Tong WG, Wei Y, Stevenson W, Kuang SQ, Fang Z, Zhang M, Arts J, Garcia-Manero G (2010) Preclinical antileukemia activity of JNJ-26481585, a potent second-generation histone deacetylase inhibitor. *Leuk Res* 34: 221-8.
- Tran AD, Marmo TP, Salam AA, Che S, Finkelstein E, Kabarriti R, Xenias HS, Mazitschek R, Hubbert C, Kawaguchi Y, Sheetz MP, Yao TP, Bulinski JC (2007) HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *Journal of cell science* 120: 1469-79.

- Traynor AM, Dubey S, Eickhoff JC, Kolesar JM, Schell K, Huie MS, Groteluschen DL, Marcotte SM, Hallahan CM, Weeks HR, Wilding G, Espinoza-Delgado I, Schiller JH (2009) Vorinostat (NSC# 701852) in patients with relapsed non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network phase II study. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 4: 522-6.
- Van Damme M, Crompot E, Meuleman N, Mineur P, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B (2012) HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 7: 1403-12.
- Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, Chakravarty P, Paolini C, De Francesco R, Gallinari P, Steinkuhler C, Di Marco S (2004) Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15064-9.
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemerrier C, Yoshida M, Khochbin S (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Current biology : CB* 10: 747-9.
- Ververis K, Karagiannis TC (2012) An atlas of histone deacetylase expression in breast cancer: fluorescence methodology for comparative semi-quantitative analysis. *American journal of translational research* 4: 24-43.
- Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U (2003) Cloning and structural characterization of the human histone deacetylase 6 gene. *International journal of molecular medicine* 12: 87-93.
- Wang G, He J, Zhao J, Yun W, Xie C, Taub JW, Azmi A, Mohammad RM, Dong Y, Kong W, Guo Y, Ge Y (2012) Class I and class II histone deacetylases are potential therapeutic targets for treating pancreatic cancer. *PLoS One* 7: e52095.
- Wang GG, Allis CD, Chi P (2007a) Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends in molecular medicine* 13: 363-72.
- Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y (2001) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* 8: 1207-17.
- Wang RH, Zheng Y, Kim HS, Xu X, Cao L, Luhasen T, Lee MH, Xiao C, Vassilopoulos A, Chen W, Gardner K, Man YG, Hung MC, Finkel T, Deng CX (2008) Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell* 32: 11-20.
- Wang Y, Wang SY, Zhang XH, Zhao M, Hou CM, Xu YJ, Du ZY, Yu XD (2007b) FK228 inhibits Hsp90 chaperone function in K562 cells via hyperacetylation of Hsp70. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 998-1003.
- Watabe M, Nakaki T (2011) Protein kinase CK2 regulates the formation and clearance of aggregates in response to stress. *Journal of cell science* 124: 1519-32.
- Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, van Wijnen AJ, Lian JB, Yoshida M, Stein GS, Li X (2002) Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol* 22: 7982-92.
- Williams KA, Zhang M, Xiang S, Hu C, Wu JY, Zhang S, Ryan M, Cox AD, Der CJ, Fang B, Koomen J, Haura E, Bepler G, Nicosia SV, Matthias P, Wang C, Bai W, Zhang X (2013) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylates histone

- deacetylase 6 (HDAC6) at serine 1035 to stimulate cell migration. *J Biol Chem* 288: 33156-70.
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I (2009) HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer letters* 277: 8-21.
- Woo HJ, Lee SJ, Choi BT, Park YM, Choi YH (2007) Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells. *Exp Mol Pathol* 82: 77-84.
- Woyach JA, Kloos RT, Ringel MD, Arbogast D, Collamore M, Zwiebel JA, Grever M, Villalona-Calero M, Shah MH (2009) Lack of therapeutic effect of the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with metastatic radioiodine-refractory thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94: 164-70.
- Xargay-Torrent S, Lopez-Guerra M, Saborit-Villarroya I, Rosich L, Campo E, Roue G, Colomer D (2011) Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin Cancer Res* 17: 3956-68.
- Yang X, Li L, Liang J, Shi L, Yang J, Yi X, Zhang D, Han X, Yu N, Shang Y (2013a) Histone acetyltransferase 1 promotes homologous recombination in DNA repair by facilitating histone turnover. *J Biol Chem* 288: 18271-82.
- Yang Y, Fiskus W, Yong B, Atadja P, Takahashi Y, Pandita TK, Wang HG, Bhalla KN (2013b) Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 6841-6.
- Yardley DA, Ismail-Khan RR, Melichar B, Lichinitser M, Munster PN, Klein PM, Cruickshank S, Miller KD, Lee MJ, Trepel JB (2013) Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31: 2128-35.
- Ying Y, Taori K, Kim H, Hong J, Luesch H (2008) Total synthesis and molecular target of largazole, a histone deacetylase inhibitor. *J Am Chem Soc* 130: 8455-9.
- Yoo YG, Kong G, Lee MO (2006) Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1. *Embo J* 25: 1231-41.
- Yoshida N, Omoto Y, Inoue A, Eguchi H, Kobayashi Y, Kurosumi M, Saji S, Suemasu K, Okazaki T, Nakachi K, Fujita T, Hayashi S (2004) Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer science* 95: 496-502.
- Yu J, Auwerx J (2009) The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173 Suppl 1: E10-9.
- Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR, Yao TP, Lane WS, Seto E (2007) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* 27: 197-213.
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & development* 13: 1924-35.
- Zhang Y, Zhang M, Dong H, Yong S, Li X, Olashaw N, Kruk PA, Cheng JQ, Bai W, Chen J, Nicosia SV, Zhang X (2009) Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration. *Oncogene* 28: 445-60.

- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hayashi S, Iwase H (2004) HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 6962-8.
- Zhou Q, Dalgard CL, Wynder C, Doughty ML (2011) Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells. *BMC neuroscience* 12: 50.
- Zhuang Y, Nguyen HT, Lasky JA, Cao S, Li C, Hu J, Guo X, Burow ME, Shan B (2010) Requirement of a novel splicing variant of human histone deacetylase 6 for TGF-beta1-mediated gene activation. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 608-13.
- Zilberman Y, Ballestrem C, Carramusa L, Mazitschek R, Khochbin S, Bershadsky A (2009) Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *Journal of cell science* 122: 3531-41.

VIII. Annexes

Annexe A1: Liste des inhibiteurs de HDAC

Ce tableau vient en complément du Tableau 6. Les noms alternatifs des composés sont indiqués entre parenthèses. <http://clinicaltrials.gov/>, <http://cancer.gov/clinicaltrials>.

Classe chimique	Inhibiteurs	Origine	Cibles	Commentaires	Réf.
Acides gras à chaîne courte	4-phenylbutyrate de sodium	Synthétique	ND	Phase clinique II (Tumeur du cerveau)	(Warrell <i>et al.</i> , 1998)
	Acide valproïque (VPA)	Synthétique	Classes I et IIa	Phase clinique I (tumeur solide)	(Gurvich <i>et al.</i> , 2004)
	AN-1 (butyroyloxymethyl butyrate)	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Entin-Meer <i>et al.</i> , 2005)
	AN-7 (Butyroyloxy-methyl diethylphosphate)	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Tarasenko <i>et al.</i> , 2012)
	AN-9 (Pivanex, pivaloyloxymethyl butyrate)	Synthétique	Classes I, IIa et IV	Phase clinique II (CLL, mélanome)	(Entin-Meer <i>et al.</i> , 2005)
	AR-42 (S-HDAC-42)	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Kulp <i>et al.</i> , 2006)
	Butyrate de sodium	Fermentation des fibres alimentaires	Classes I, IIa et IV	Phase pré-clinique	(Davie, 2003)
OSU-HDAC-44	Synthétique	Classes I, IIa et IV	Phase pré-clinique	(Tang <i>et al.</i> , 2010)	
Benzamides	2-anilinobenzamide analogues 32a et 33i	Synthétiques	SIRT2	Phase pré-clinique	(Suzuki <i>et al.</i> , 2012)
	Chidamide	Synthétique	HDAC1, 2, 3 et 10	Phase pré-clinique	(Ning <i>et al.</i> , 2012)
	CI-994 (Tacedinaline, N-acetyldinaline)	Synthétique	HDAC1 et 2	Phase clinique II (Myélome)	(Kraker <i>et al.</i> , 2003)
	HTPB (N-Hydroxy-4-(4-phenylbutyrylamino) benzamide)	Synthétique	HDAC1, 4, 6, 8, 11	Phase pré-clinique	(Shieh <i>et al.</i> , 2012)
	M344	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Takai <i>et al.</i> , 2006)
	MGCD0103 (Mocetinostat)	Synthétique	HDAC1, 2, 3, 11	II (Lymphome, leucémie, tumeur solide)	(Fournel <i>et al.</i> , 2008)
	MS-275 (Entinostat, SNDX-275)	Synthétique	HDAC1, 2, 3 et 11	II (Mélanome métastatique)	(Saito <i>et al.</i> , 1999)
	PABAs class	Synthétique	ND	Phase pré-cliniqu	(Varghese <i>et al.</i> , 2008)
	Sirtinol	Synthétique	SIRT1, 2 et 3	Phase pré-clinique	(Grozinger <i>et al.</i> , 2001)
Depsipeptides	Dérivés de 4-(aminomethyl)-N-hydroxybenzamide	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Blackburn <i>et al.</i> , 2013)
	FK228 (Romidepsin, FR901228)	<i>Chromobacterium violaceum</i>	HDAC1, 2, 4 et 6	FDA en 2009 (CTCL)	(Furumai <i>et al.</i> , 2002)
	Largazole	<i>Symploca sp.</i>	Classe I	pré-clinique	(Ying <i>et al.</i> ,

	Spiruchostatins A à D	<i>Pseudomonas</i>	Classe I	pré-clinique	2008) (Crabb <i>et al.</i> , 2008)
	Thailandepsin A et B	<i>Burkholderia thailandensis</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Wilson <i>et al.</i> , 2012)
Hydroxamates	A-161906	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Glaser <i>et al.</i> , 2002)
	AAHA	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Qiu <i>et al.</i> , 1999)
	ABHA	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Qiu <i>et al.</i> , 1999)
	Amamistatin	<i>Nocardia asteroides</i>	ND	Phase pré-clinique	(Fennell <i>et al.</i> , 2007)
	Acides hydroxamiques biarryl	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
	Acides hydroxamiques isoxazole	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
	ACY-738	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Jochems <i>et al.</i> , 2013)
	ACY-775	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Jochems <i>et al.</i> , 2013)
	ACY-1215 (Rocilinostat)	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Santo <i>et al.</i> , 2012)
	Azaindoly-sulfonamides	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Lee <i>et al.</i> , 2014)
	CAY10398	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Huber <i>et al.</i> , 2011)
	CBHA (M-carboxycinnamic acid bishydroxamide)	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Richon <i>et al.</i> , 1998)
	CHAPs 1, 14, 17-19, 27, 30, 31, 38, 39, 42-45, 49, 50, 56-57, 58 (cyl-1), 77 (cyl-2), 80, 88, 131, 132	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Komatsu <i>et al.</i> , 2001)
	CHR-3996	Synthétique	Classe I	Phase clinique I (tumeurs solides)	(Moffat <i>et al.</i> , 2010)
	CG0006	Synthétique	Classe I, II et IV	Phase pré-clinique	(Kim <i>et al.</i> , 2011)
	CG-1521	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Roy <i>et al.</i> , 2005)
	CR2408	Synthétique	Classes I, II et IV	Phase pré-clinique	(Baumann <i>et al.</i> , 2012)
	CRA-026440	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Cao <i>et al.</i> , 2006)
	Dérivés de 4-(Aminomethyl)-N-hydroxybenzamide	Synthétiques	HDAC6	Phase pré-clinique	(Blackburn <i>et al.</i> , 2013)
	Dérivés 3,4-dihydroquinoxalin-1(2H)-one	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
	Dérivés quinazolin-4-one	Synthétiques	HDAC6	Phase pré-clinique	(Yu <i>et al.</i> , 2013)
	Dérivés de tétrahydrocarboline	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
	dPAHAs class	Synthétique	Classe	Phase pré-clinique	(Tessier <i>et al.</i> ,

Droxinostat	Synthétique	IIa HDAC3, 6 et 8	Phase pré-clinique	2009) (Wood <i>et al.</i> , 2010)
HPOB	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Lee <i>et al.</i> , 2013)
I2	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Min <i>et al.</i> , 2012)
IN-2001	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	
ITF2357 (Givinostat)	Synthétique	Classes I et II	II (néoplasmes chronique, myélome multiple)	(Leoni <i>et al.</i> , 2005)
JNJ-16241199 (R306465)	Synthétique	Classe I	I (cancers solides)	(Arts <i>et al.</i> , 2007)
JNJ-26481585	Synthétique	Classe I	I (cancers solides et lymphomes)	(Tong <i>et al.</i> , 2010)
KBH-A42	Synthétique	Classes I et II	Phase pré-clinique	(Kang <i>et al.</i> , 2009)
LBH-589 (Panobinostat)	Synthétique	Classes I, II et IV	III (CTCL, CML)	(Qian <i>et al.</i> , 2006)
MPT0E028	Synthétique	Classes I et IIb	Phase pré-clinique	(Huang <i>et al.</i> , 2012a)
MHY218	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Park <i>et al.</i> , 2012)
MPT0G009	Synthétique	HDAC1, 2, 3, 6 et 8	Phase pré-clinique	(Hsieh <i>et al.</i> , 2014)
Nexturastat A	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Bergman <i>et al.</i> , 2012)
NVP-LAQ824 (Dacinostat)	Synthétique	Classes I et II	I (tumeurs solides et hématologiques)	(Catley <i>et al.</i> , 2003)
Oxamflatin	Synthétique	Classes I, II et IV	Phase pré-clinique	(Kim <i>et al.</i> , 1999)
PAHAs class	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Varghese <i>et al.</i> , 2008)
PCI-24781 (CRA- 024781, Abexinostat)	Synthétique	Classes I et IIb	Phase clinique I (tumeurs solides et hématologiques)	(Buggy <i>et al.</i> , 2006)
PCI-34051	Synthétique	HDAC8	Phase pré-clinique	(Balasubramani an <i>et al.</i> , 2008)
Phénylalanine et pyridylalanine substitués	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
PXD101 (Belinostat)	Synthétique	Classes I, II et IV	II (mésothéliome pleural malin, myéloïde multiple, AML)	(Plumb <i>et al.</i> , 2003)
Pyroxamide	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Butler <i>et al.</i> , 2001)
SB207	Synthétique	Classes I et II	Phase pré-clinique	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
SB639	Synthétique	Classes I, II et IV	Phase pré-clinique	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
SB939	Synthétique	Classes I, II et IV	Phase clinique I (tumeur solide)	(Novotny- Diermayr <i>et al.</i> , 2010)
Scriptaid	Synthétique	Classes I, II et IV	Phase pré-clinique	(Lee <i>et al.</i> , 2008)

	SK7031	Synthétique	Classe I	Phase pré-clinique	(Park <i>et al.</i> , 2004)
	SK7041	Synthétique	Classe I	Phase pré-clinique	(Park <i>et al.</i> , 2004)
	SK7045	Synthétique	Classe I	Phase pré-clinique	(Park <i>et al.</i> , 2004)
	SK7068	Synthétique	Classe I	Phase pré-clinique	(Park <i>et al.</i> , 2004)
	SK7080	Synthétique	Classe I	Phase pré-clinique	(Park <i>et al.</i> , 2004)
	ST80	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	
	Suberic bishydroxamate (SBHA)	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Richon <i>et al.</i> , 1998)
	Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat)	Dérivé synthétique de la TSA	Classes I, II et IV	FDA en 2006 (CTCL)	(Richon <i>et al.</i> , 1998)
	1,2,3-Triazoles	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
	Tubacine	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Namdar <i>et al.</i> , 2010)
	Tubastatine A	Synthétique	HDAC6 et 8	Phase pré-clinique	(Butler <i>et al.</i> , 2010)
	Vorinostat substitué en C-3	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
Peptides cycliques	Apicidine D	<i>Fusarium spp.</i>	Classes I et II	Phase pré-clinique	(Han <i>et al.</i> , 2000)
	Azumamides A à E	<i>Mycale izuensis</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Maulucci <i>et al.</i> , 2007; Villadsen <i>et al.</i> , 2013)
	Chlamydocin	<i>Diheterospora chlamydosporia</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(De Schepper <i>et al.</i> , 2003)
	Diheteropeptin	<i>Diheterospora chlamydosporia</i>	ND	Phase pré-clinique	(Masuoka <i>et al.</i> , 2000)
	FR235222	<i>Acremonium sp.</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Petrella <i>et al.</i> , 2008)
	Retrohydroxamates 10a - 10l	Synthétiques	ND	Phase pré-clinique	(Nishino <i>et al.</i> , 2004)
	Trapoxin A et B	<i>Corollospora intermedia</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Furumai <i>et al.</i> , 2001)
WF-3161	<i>Petriella guttulata</i>	ND	Phase pré-clinique	(Umehara <i>et al.</i> , 1983)	
Divers	2-trifluoroacetyl thiophene	Synthétique	Classe II	Phase pré-clinique	(Muraglia <i>et al.</i> , 2008)
	1,3,4-oxadiazole derivatives				
	AGK2	Synthétique	SIRT1, 2 et 3	Phase pré-clinique	(Outeiro <i>et al.</i> , 2007)
	α -ketoamides 5 et 6	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Glaser <i>et al.</i> , 2004)
	Allyl mercaptan (AM)	<i>Allium sativum</i>	ND	Phase pré-clinique	(Nian <i>et al.</i> , 2008)
	APHAs class	Synthétique	Classes I et II	Phase pré-clinique	(Mai <i>et al.</i> , 2009)
	Arsenic trioxide	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Qu <i>et al.</i> , 2012)
Aurothioglucose	Synthétique	Classes I et IIa	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)	
bis (4-hydroxybenzyl) sulfide	Renouée des oiseaux	Classe I	Phase pré-clinique	(Son <i>et al.</i> , 2007b)	

Bispyridinium Dienes 10a et 10b	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Perez-Balado <i>et al.</i> , 2007)
BML-210	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Savickiene <i>et al.</i> , 2006)
Cafféine	<i>Coffea arabica</i> et autres plantes	HDAC5	Phase pré-clinique	(Mukwevho <i>et al.</i> , 2008)
Cambinol	Synthétique	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Heltweg <i>et al.</i> , 2006)
Chalcone 12	Fruits, légumes, épices et noix	ND	Phase pré-clinique	(Orlikova <i>et al.</i> , 2012)
Chalcone 17	Synthétique	SIRT1	Phase pré-clinique	(Kahyo <i>et al.</i> , 2008)
Composés portant un groupement cétone trifluorométhyl	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
Composés portant un groupement cycohephyl et thiol	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
CUDC-101	Synthétique	ND	Phase clinique I (tumeurs solides)	(Lai <i>et al.</i> , 2010)
Cyclostelletamines	<i>Haliclona</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Oku <i>et al.</i> , 2004)
Dérivés d'isoxazole	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Kalin <i>et al.</i> , 2013)
Diallyl disulfide (DADS)	Ail	ND	Phase pré-clinique	(Druesne <i>et al.</i> , 2004)
Dihydrocoumarine	<i>Melitous officinalis</i>	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Olaharski <i>et al.</i> , 2005)
DW2a	Synthétique	HDAC1 et 2	Phase pré-clinique	(Kral <i>et al.</i> , 2014)
Ebselen	Synthétique	Classes I et IIa	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)
EX-527	Synthétique	SIRT1, 2 et 3	Phase pré-clinique	(Solomon <i>et al.</i> , 2006)
Flavone	<i>Feijoa sellowiana</i>	HDAC1	Phase clinique II	(Bontempo <i>et al.</i> , 2007)
Genistein	<i>Flemingia vestita</i>	ND	III (cancer de la prostate)	(Basak <i>et al.</i> , 2008)
GNTI ditrifluoroacetate	Synthétique	HDAC5	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)
GW5074	Synthétique	SIRT1,2 et 3	Phase pré-clinique	(Trapp <i>et al.</i> , 2006)
Histacin	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Haggarty <i>et al.</i> , 2003)
Indole-3-carbinol	Choux-fleurs et brocolis	Classe I	III	(Bhatnagar <i>et al.</i> , 2009)
KD5150	Synthétique	Classes I, II et IV	Phase pré-clinique	(Wash <i>et al.</i> , 2008)
KD5170	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Payne <i>et al.</i> , 2008)
MC 1293	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Mai <i>et al.</i> , 2002)
MC 2141 et dérivés	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Rotili <i>et al.</i> , 2011)
MCP30	<i>Bitter melon seeds</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Xiong <i>et al.</i> , 2009)
Menadione (Vitamine K3)	Synthétique	HDAC6 et 8	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)
NBM-HD1	Tree buds and	ND	Phase pré-clinique	(Huang <i>et al.</i> ,

Nicotinamide	sap flows Endogène	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	2012b) (Tervo <i>et al.</i> , 2004)
NQN-1	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)
NQN-2	Synthétique	HDAC6	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)
NSC-95397	Synthétique	HDAC6 et classe IIa	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)
Osajin	Maclura pomifera	Classe I	Phase pré-clinique	(Son <i>et al.</i> , 2007a)
Pentafluoroethyl ketone 2	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Jose <i>et al.</i> , 2004)
Phenethyl isothiocyanate	Légumes	Classe I	I (cancer du poumon)	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
Pimelic diphenylamide 4b	Synthétique	HDAC1, 2, 3	Phase pré-clinique	(Beconi <i>et al.</i> , 2012)
Pomiférine	<i>Maclura pomifera</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Son <i>et al.</i> , 2007a)
Psammaline A	<i>Aplysinella rhax</i>	Classe I	Phase pré-clinique	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
Quercetine*	Agrumes et sarrasin	SIRT1	Phase pré-clinique	(Link <i>et al.</i> , 2010)
Resveratrol	Raisin	SIRT1	II	(Venturelli <i>et al.</i> , 2013)
Ro31-8220	Synthétique	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Trapp <i>et al.</i> , 2006)
Salermide	Synthétique	SIRT1, 2 et 3	Phase pré-clinique	(Lara <i>et al.</i> , 2009)
SelSA	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Desai <i>et al.</i> , 2010)
Splitomicins et analogues	Synthétiques	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Neugebauer <i>et al.</i> , 2008),(Freitag <i>et al.</i> , 2011)
Sulforaphane cystéine	Légumes	Classes I et II	Phase pré-clinique	(Myzak <i>et al.</i> , 2004)
Suramine	Synthétique	SIRT1, 2 et 5	III (cancer de la prostate)	(Schuetz <i>et al.</i> , 2007)
Tanikolide dimers	Lyngbya majuscula	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Gutierrez <i>et al.</i> , 2009)
Tenovins	Synthétique	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Lain <i>et al.</i> , 2008)
Thiol-based SAHA analogs	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Suzuki <i>et al.</i> , 2004)
Toxoflavin	Bactérie	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Choi <i>et al.</i> , 2013)
Trifluoromethyl ketone 1-3	Synthétique	ND	Phase pré-clinique	(Suzuki <i>et al.</i> , 2004)
Tryptamides	Synthétique	SIRT1 et 2	Phase pré-clinique	(Kiviranta <i>et al.</i> , 2007)
U-73122	Synthétique	HDAC3	Phase pré-clinique	(Inks <i>et al.</i> , 2012)
W2		HDAC6		

Bibliographie de l'Annexe A1

- Arts J, Angibaud P, Marien A, Floren W, Janssens B, King P, van Dun J, Janssen L, Geerts T, Tuman RW, Johnson DL, Andries L, Jung M, Janicot M, van Emelen K (2007) R306465 is a novel potent inhibitor of class I histone deacetylases with broad-spectrum antitumoral activity against solid and haematological malignancies. *Br J Cancer* 97: 1344-53.
- Balasubramanian S, Ramos J, Luo W, Sirisawad M, Verner E, Buggy JJ (2008) A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* 22: 1026-34.
- Basak S, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Mol Cancer Ther* 7: 3195-202.
- Baumann P, Junghanns C, Mandl-Weber S, Strobl S, Oduncu F, Schmidmaier R (2012) The pan-histone deacetylase inhibitor CR2408 disrupts cell cycle progression, diminishes proliferation and causes apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 156: 633-42.
- Beconi M, Aziz O, Matthews K, Moumne L, O'Connell C, Yates D, Clifton S, Pett H, Vann J, Crowley L, Haughan AF, Smith DL, Woodman B, Bates GP, Brookfield F, Burli RW, McAllister G, Dominguez C, Munoz-Sanjuan I, Beaumont V (2012) Oral administration of the pimelic diphenylamide HDAC inhibitor HDACi 4b is unsuitable for chronic inhibition of HDAC activity in the CNS in vivo. *PLoS One* 7: e44498.
- Bergman JA, Woan K, Perez-Villaruel P, Villagra A, Sotomayor EM, Kozikowski AP (2012) Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth. *J Med Chem*.
- Bhatnagar N, Li X, Chen Y, Zhou X, Garrett SH, Guo B (2009) 3,3'-diindolylmethane enhances the efficacy of butyrate in colon cancer prevention through down-regulation of survivin. *Cancer Prev Res (Phila)* 2: 581-9.
- Blackburn C, Barrett C, Chin J, Garcia K, Gigstad K, Gould A, Gutierrez J, Harrison S, Hoar K, Lynch C, Rowland RS, Tsu C, Ringeling J, Xu H (2013) Potent histone deacetylase inhibitors derived from 4-(aminomethyl)-N-hydroxybenzamide with high selectivity for the HDAC6 isoform. *J Med Chem* 56: 7201-11.
- Bontempo P, Mita L, Miceli M, Doto A, Nebbioso A, De Bellis F, Conte M, Minichiello A, Manzo F, Carafa V, Basile A, Rigano D, Sorbo S, Castaldo C, Cobianni R, Schiavone EM, Ferrara F, De Simone M, Vietri M, Cioffi M, Sica V, Bresciani F, de Lera AR, Altucci L, Molinari AM (2007) Feijoa sellowiana derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1902-14.
- Buggy JJ, Cao ZA, Bass KE, Verner E, Balasubramanian S, Liu L, Schultz BE, Young PR, Dalrymple SA (2006) CRA-024781: a novel synthetic inhibitor of histone deacetylase enzymes with antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 5: 1309-17.
- Butler KV, Kalin J, Brochier C, Vistoli G, Langley B, Kozikowski AP (2010) Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J Am Chem Soc* 132: 10842-6.
- Butler LM, Webb Y, Agus DB, Higgins B, Tolentino TR, Kutko MC, LaQuaglia MP, Drobnjak M, Cordon-Cardo C, Scher HI, Breslow R, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA (2001) Inhibition of transformed cell growth and induction of cellular differentiation by pyroxamide, an inhibitor of histone deacetylase. *Clin Cancer Res* 7: 962-70.

- Cao ZA, Bass KE, Balasubramanian S, Liu L, Schultz B, Verner E, Dai Y, Molina RA, Davis JR, Misialek S, Sendzik M, Orr CJ, Leung L, Callan O, Young P, Dalrymple SA, Buggy JJ (2006) CRA-026440: a potent, broad-spectrum, hydroxamic histone deacetylase inhibitor with antiproliferative and antiangiogenic activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 5: 1693-701.
- Catley L, Weisberg E, Tai YT, Atadja P, Remiszewski S, Hideshima T, Mitsiades N, Shringarpure R, LeBlanc R, Chauhan D, Munshi NC, Schlossman R, Richardson P, Griffin J, Anderson KC (2003) NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood* 102: 2615-22.
- Choi G, Lee J, Ji JY, Woo J, Kang NS, Cho SY, Kim HR, Ha JD, Han SY (2013) Discovery of a potent small molecule SIRT1/2 inhibitor with anticancer effects. *Int J Oncol* 43: 1205-11.
- Crabb SJ, Howell M, Rogers H, Ishfaq M, Yurek-George A, Carey K, Pickering BM, East P, Mitter R, Maeda S, Johnson PW, Townsend P, Shin-ya K, Yoshida M, Ganesan A, Packham G (2008) Characterisation of the in vitro activity of the depsipeptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A. *Biochem Pharmacol* 76: 463-75.
- Davie JR (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133: 2485S-93S.
- De Schepper S, Bruwiere H, Verhulst T, Steller U, Andries L, Wouters W, Janicot M, Arts J, Van Heusden J (2003) Inhibition of histone deacetylases by chlamydocin induces apoptosis and proteasome-mediated degradation of survivin. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 881-8.
- Desai D, Salli U, Vrana KE, Amin S (2010) SelSA, selenium analogs of SAHA as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 2044-7.
- Druesne N, Pagniez A, Mayeur C, Thomas M, Cherbuy C, Duee PH, Martel P, Chaumontet C (2004) Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis* 25: 1227-36.
- Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X, Nudelman A, VandenBerg SR, Haas-Kogan DA (2005) Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* 4: 1952-61.
- Fennell KA, Miller MJ (2007) Syntheses of amamistatin fragments and determination of their HDAC and antitumor activity. *Org Lett* 9: 1683-5.
- Fournel M, Bonfils C, Hou Y, Yan PT, Trachy-Bourget MC, Kalita A, Liu J, Lu AH, Zhou NZ, Robert MF, Gillespie J, Wang JJ, Ste-Croix H, Rahil J, Lefebvre S, Moradei O, Delorme D, Macleod AR, Besterman JM, Li Z (2008) MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 7: 759-68.
- Freitag M, Schemies J, Larsen T, El Gaghlab K, Schulz F, Rumpf T, Jung M, Link A (2011) Synthesis and biological activity of splitomicin analogs targeted at human NAD(+)-dependent histone deacetylases (sirtuins). *Bioorg Med Chem* 19: 3669-77.
- Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 87-92.
- Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, Horinouchi S (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 62: 4916-21.

- Glaser KB, Li J, Aakre ME, Morgan DW, Sheppard G, Stewart KD, Pollock J, Lee P, O'Connor CZ, Anderson SN, Mussatto DJ, Wegner CW, Moses HL (2002) Transforming growth factor beta mimetics: discovery of 7-[4-(4-cyanophenyl)phenoxy]-heptanohydroxamic acid, a biaryl hydroxamate inhibitor of histone deacetylase. *Mol Cancer Ther* 1: 759-68.
- Glaser KB, Li J, Pease LJ, Staver MJ, Marcotte PA, Guo J, Frey RR, Garland RB, Heyman HR, Wada CK, Vasudevan A, Michaelides MR, Davidsen SK, Curtin ML (2004) Differential protein acetylation induced by novel histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 683-90.
- Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL (2001) Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem* 276: 38837-43.
- Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS (2004) Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* 64: 1079-86.
- Gutierrez M, Andrianasolo EH, Shin WK, Goeger DE, Yokochi A, Schemies J, Jung M, France D, Cornell-Kennon S, Lee E, Gerwick WH (2009) Structural and synthetic investigations of tanikolide dimer, a SIRT2 selective inhibitor, and tanikolide seco-acid from the Madagascar marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Org Chem* 74: 5267-75.
- Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Butcher RA, Schreiber SL (2003) Multidimensional chemical genetic analysis of diversity-oriented synthesis-derived deacetylase inhibitors using cell-based assays. *Chem Biol* 10: 383-96.
- Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW (2000) Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res* 60: 6068-74.
- Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, Kollipara R, Depinho RA, Gu Y, Simon JA, Bedalov A (2006) Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res* 66: 4368-77.
- Hsieh IN, Liou JP, Lee HY, Lai MJ, Li YH, Yang CR (2014) Preclinical anti-arthritis study and pharmacokinetic properties of a potent histone deacetylase inhibitor MPT0G009. *Cell death & disease* 5: e1166.
- Huang HL, Lee HY, Tsai AC, Peng CY, Lai MJ, Wang JC, Pan SL, Teng CM, Liou JP (2012a) Anticancer activity of MPT0E028, a novel potent histone deacetylase inhibitor, in human colorectal cancer HCT116 cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 7: e43645.
- Huang WJ, Liang YC, Chuang SE, Chi LL, Lee CY, Lin CW, Chen AL, Huang JS, Chiu CJ, Lee CF, Huang CY, Chen CN (2012b) NBM-HD-1: A Novel Histone Deacetylase Inhibitor with Anticancer Activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 781417.
- Huber K, Doyon G, Plaks J, Fyne E, Mellors JW, Sluis-Cremer N (2011) Inhibitors of histone deacetylases: correlation between isoform specificity and reactivation of HIV type 1 (HIV-1) from latently infected cells. *J Biol Chem* 286: 22211-8.
- Inks ES, Josey BJ, Jesinkey SR, Chou CJ (2012) A novel class of small molecule inhibitors of HDAC6. *ACS Chem Biol* 7: 331-9.
- Jochems J, Boulden J, Lee BG, Blendy JA, Jarpe M, Mazitschek R, Van Duzer JH, Jones S, Berton O (2013) Antidepressant-Like Properties of Novel HDAC6-Selective Inhibitors with Improved Brain Bioavailability. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.

- Jose B, Oniki Y, Kato T, Nishino N, Sumida Y, Yoshida M (2004) Novel histone deacetylase inhibitors: cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 5343-6.
- Kahyo T, Ichikawa S, Hatanaka T, Yamada MK, Setou M (2008) A novel chalcone polyphenol inhibits the deacetylase activity of SIRT1 and cell growth in HEK293T cells. *Journal of pharmacological sciences* 108: 364-71.
- Kalin JH, Bergman JA (2013) Development and therapeutic implications of selective histone deacetylase 6 inhibitors. *J Med Chem* 56: 6297-313.
- Kang MR, Kang JS, Han SB, Kim JH, Kim DM, Lee K, Lee CW, Lee KH, Lee CH, Han G, Kim HM, Park SK (2009) A novel delta-lactam-based histone deacetylase inhibitor, KBH-A42, induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 78: 486-94.
- Kim DH, Shin J, Kwon HJ (2007) Psammaplin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Exp Mol Med* 39: 47-55.
- Kim HM, Kim CS, Lee JH, Jang SJ, Hwang JJ, Ro S, Hyun YL, Choi J (2011) CG0006, a novel histone deacetylase inhibitor, induces breast cancer cell death via histone-acetylation and chaperone-disrupting pathways independent of ER status. *Breast Cancer Res Treat* 130: 365-75.
- Kim YB, Lee KH, Sugita K, Yoshida M, Horinouchi S (1999) Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene* 18: 2461-70.
- Kiviranta PH, Leppanen J, Rinne VM, Suuronen T, Kyrilenko O, Kyrilenko S, Kuusisto E, Tervo AJ, Jarvinen T, Salminen A, Poso A, Wallen EA (2007) N-(3-(4-Hydroxyphenyl)-propenoyl)-amino acid tryptamides as SIRT2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 2448-51.
- Komatsu Y, Tomizaki KY, Tsukamoto M, Kato T, Nishino N, Sato S, Yamori T, Tsuruo T, Furumai R, Yoshida M, Horinouchi S, Hayashi H (2001) Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. *Cancer Res* 61: 4459-66.
- Kraker AJ, Mizzen CA, Hartl BG, Miin J, Allis CD, Merriman RL (2003) Modulation of histone acetylation by [4-(acetylamino)-N-(2-amino-phenyl) benzamide] in HCT-8 colon carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2: 401-8.
- Kral AM, Ozerova N, Close J, Jung J, Chenard M, Fleming J, Haines BB, Harrington P, Maclean J, Miller TA, Secrist P, Wang H, Heidebrecht RW, Jr. (2014) Divergent kinetics differentiate the mechanism of action of two HDAC inhibitors. *Biochemistry* 53: 725-34.
- Kulp SK, Chen CS, Wang DS, Chen CY (2006) Antitumor effects of a novel phenylbutyrate-based histone deacetylase inhibitor, (S)-HDAC-42, in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12: 5199-206.
- Lai CJ, Bao R, Tao X, Wang J, Atoyan R, Qu H, Wang DG, Yin L, Samson M, Forrester J, Zifcak B, Xu GX, DellaRocca S, Zhai HX, Cai X, Munger WE, Keegan M, Pepicelli CV, Qian C (2010) CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity. *Cancer Res* 70: 3647-56.
- Lain S, Hollick JJ, Campbell J, Staples OD, Higgins M, Aoubala M, McCarthy A, Appleyard V, Murray KE, Baker L, Thompson A, Mathers J, Holland SJ, Stark MJ, Pass G, Woods J, Lane DP, Westwood NJ (2008) Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell* 13: 454-63.

- Lara E, Mai A, Calvanese V, Altucci L, Lopez-Nieva P, Martinez-Chantar ML, Varela-Rey M, Rotili D, Nebbioso A, Ropero S, Montoya G, Oyarzabal J, Velasco S, Serrano M, Witt M, Villar-Garea A, Imhof A, Mato JM, Esteller M, Fraga MF (2009) Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. *Oncogene* 28: 781-91.
- Lee EJ, Lee BB, Kim SJ, Park YD, Park J, Kim DH (2008) Histone deacetylase inhibitor scriptaid induces cell cycle arrest and epigenetic change in colon cancer cells. *Int J Oncol* 33: 767-76.
- Lee HY, Tsai AC, Chen MC, Shen PJ, Cheng YC, Kuo CC, Pan SL, Liu YM, Liu JF, Yeh TK, Wang JC, Chang CY, Chang JY, Liou JP (2014) Azaindolylsulfonamides, with a More Selective Inhibitory Effect on Histone Deacetylase 6 Activity, Exhibit Antitumor Activity in Colorectal Cancer HCT116 Cells. *J Med Chem* 57: 4009-22.
- Lee JH, Mahendran A, Yao Y, Ngo L, Venta-Perez G, Choy ML, Kim N, Ham WS, Breslow R, Marks PA (2013) Development of a histone deacetylase 6 inhibitor and its biological effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15704-9.
- Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee JK, Porro G, Pagani P, Modena D, Moras ML, Pozzi P, Reznikov LL, Siegmund B, Fantuzzi G, Dinarello CA, Mascagni P (2005) The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med* 11: 1-15.
- Link A, Balaguer F, Goel A (2010) Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 80: 1771-92.
- Mai A, Massa S, Ragno R, Esposito M, Sbardella G, Nocca G, Scatena R, Jesacher F, Loidl P, Brosch G (2002) Binding mode analysis of 3-(4-benzoyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-propenamide: a new synthetic histone deacetylase inhibitor inducing histone hyperacetylation, growth inhibition, and terminal cell differentiation. *J Med Chem* 45: 1778-84.
- Mai A, Valente S, Nebbioso A, Simeoni S, Ragno R, Massa S, Brosch G, De Bellis F, Manzo F, Altucci L (2009) New pyrrole-based histone deacetylase inhibitors: binding mode, enzyme- and cell-based investigations. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 235-47.
- Masuoka Y, Shin-Ya K, Kim YB, Yoshida M, Nagai K, Suzuki K, Hayakawa Y, Seto H (2000) Diheteropeptin, a new substance with TGF-beta-like activity, produced by a fungus, *Diheterospora chlamydosporia*. I. Production, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 53: 788-92.
- Maulucci N, Chini MG, Micco SD, Izzo I, Cafaro E, Russo A, Gallinari P, Paolini C, Nardi MC, Casapullo A, Riccio R, Bifulco G, Riccardis FD (2007) Molecular insights into azumamide e histone deacetylases inhibitory activity. *J Am Chem Soc* 129: 3007-12.
- Min KN, Joung KE, Kim DK, Sheen YY (2012) Anti-Cancer Effect of 3-(4-dimethylamino phenyl)-N-hydroxy-2-propenamide in MCF-7 Human Breast Cancer. *Environ Health Toxicol* 27: e2012010.
- Moffat D, Patel S, Day F, Belfield A, Donald A, Rowlands M, Wibawa J, Brotherton D, Stimson L, Clark V, Owen J, Bawden L, Box G, Bone E, Mortenson P, Hardcastle A, van Meurs S, Eccles S, Raynaud F, Aherne W (2010) Discovery of 2-(6-((6-fluoroquinolin-2-yl)methyl)amino)bicyclo[3.1.0]hex-3-yl)-N-hydroxypyrimidine-5-carboxamide (CHR-3996), a class I selective orally active histone deacetylase inhibitor. *J Med Chem* 53: 8663-78.
- Mukwevho E, Kohn TA, Lang D, Nyatia E, Smith J, Ojuka EO (2008) Caffeine induces hyperacetylation of histones at the MEF2 site on the Glut4 promoter and increases

- MEF2A binding to the site via a CaMK-dependent mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E582-8.
- Muraglia E, Altamura S, Branca D, Cecchetti O, Ferrigno F, Orsale MV, Palumbi MC, Rowley M, Scarpelli R, Steinkuhler C, Jones P (2008) 2-Trifluoroacetylthiophene oxadiazoles as potent and selective class II human histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 6083-7.
- Myzak MC, Karplus PA, Chung FL, Dashwood RH (2004) A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res* 64: 5767-74.
- Namdar M, Perez G, Ngo L, Marks PA (2010) Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20003-8.
- Neugebauer RC, Uchiechowska U, Meier R, Hrubby H, Valkov V, Verdin E, Sippl W, Jung M (2008) Structure-activity studies on splitomicin derivatives as sirtuin inhibitors and computational prediction of binding mode. *J Med Chem* 51: 1203-13.
- Nian H, Delage B, Pinto JT, Dashwood RH (2008) Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter. *Carcinogenesis* 29: 1816-24.
- Ning ZQ, Li ZB, Newman MJ, Shan S, Wang XH, Pan DS, Zhang J, Dong M, Du X, Lu XP (2012) Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 69: 901-9.
- Nishino N, Yoshikawa D, Watanabe LA, Kato T, Jose B, Komatsu Y, Sumida Y, Yoshida M (2004) Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of cyclic tetrapeptides containing a retrohydroxamate as zinc ligand. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 2427-31.
- Novotny-Diermayr V, Sangthongpitag K, Hu CY, Wu X, Sausgruber N, Yeo P, Greicius G, Pettersson S, Liang AL, Loh YK, Bonday Z, Goh KC, Hentze H, Hart S, Wang H, Ethirajulu K, Wood JM (2010) SB939, a novel potent and orally active histone deacetylase inhibitor with high tumor exposure and efficacy in mouse models of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 9: 642-52.
- Oku N, Nagai K, Shindoh N, Terada Y, van Soest RW, Matsunaga S, Fusetani N (2004) Three new cyclostelletamines, which inhibit histone deacetylase, from a marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 2617-20.
- Olaharski AJ, Rine J, Marshall BL, Babiarz J, Zhang L, Verdin E, Smith MT (2005) The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. *PLoS Genet* 1: e77.
- Orlikova B, Schnekenburger M, Zloh M, Golais F, Diederich M, Tasdemir D (2012) Natural chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF-kappaB. *Oncol Rep* 28: 797-805.
- Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet JC, McLean PJ, Young AB, Abagyan R, Feany MB, Hyman BT, Kazantsev AG (2007) Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 317: 516-9.
- Park JH, Jung Y, Kim TY, Kim SG, Jong HS, Lee JW, Kim DK, Lee JS, Kim NK, Bang YJ (2004) Class I histone deacetylase-selective novel synthetic inhibitors potently inhibit human tumor proliferation. *Clin Cancer Res* 10: 5271-81.
- Park JH, Ahn MY, Kim TH, Yoon S, Kang KW, Lee J, Moon HR, Jung JH, Chung HY, Kim HS (2012) A new synthetic HDAC inhibitor, MHY218, induces apoptosis or

- autophagy-related cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Investigational new drugs* 30: 1887-98.
- Payne JE, Bonnefous C, Hassig CA, Symons KT, Guo X, Nguyen PM, Annable T, Wash PL, Hoffman TZ, Rao TS, Shiao AK, Malecha JW, Noble SA, Hager JH, Smith ND (2008) Identification of KD5170: a novel mercaptoketone-based histone deacetylase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 6093-6.
- Perez-Balado C, Nebbioso A, Rodriguez-Grana P, Minichiello A, Miceli M, Altucci L, de Lera AR (2007) Bispyridinium dienes: histone deacetylase inhibitors with selective activities. *J Med Chem* 50: 2497-505.
- Petrella A, D'Acunto CW, Rodriguez M, Festa M, Tosco A, Bruno I, Terracciano S, Taddei M, Paloma LG, Parente L (2008) Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1. *Eur J Cancer* 44: 740-9.
- Plumb JA, Finn PW, Williams RJ, Bandara MJ, Romero MR, Watkins CJ, La Thangue NB, Brown R (2003) Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol Cancer Ther* 2: 721-8.
- Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, Wei Y, Verheul HM, Salumbides B, Sanni T, Atadja P, Pili R (2006) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res* 12: 634-42.
- Qiu L, Kelso MJ, Hansen C, West ML, Fairlie DP, Parsons PG (1999) Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate. *Br J Cancer* 80: 1252-8.
- Qu X, Du J, Zhang C, Fu W, Xi H, Zou J, Hou J (2012) Arsenic trioxide exerts antimyeloma effects by inhibiting activity in the cytoplasmic substrates of histone deacetylase 6. *PLoS One* 7: e32215.
- Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3003-7.
- Rotili D, Carafa V, Tarantino D, Botta G, Nebbioso A, Altucci L, Mai A (2011) Simplification of the tetracyclic SIRT1-selective inhibitor MC2141: coumarin- and pyrimidine-based SIRT1/2 inhibitors with different selectivity profile. *Bioorg Med Chem* 19: 3659-68.
- Roy S, Packman K, Jeffrey R, Tenniswood M (2005) Histone deacetylase inhibitors differentially stabilize acetylated p53 and induce cell cycle arrest or apoptosis in prostate cancer cells. *Cell death and differentiation* 12: 482-91.
- Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4592-7.
- Santo L, Hideshima T, Kung AL, Tseng JC, Tamang D, Yang M, Jarpe M, van Duzer JH, Mazitschek R, Ogier WC, Cirstea D, Rodig S, Eda H, Scullen T, Canavese M, Bradner J, Anderson KC, Jones SS, Raje N (2012) Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood* 119: 2579-89.
- Savickiene J, Borutinskaite VV, Treigyte G, Magnusson KE, Navakauskiene R (2006) The novel histone deacetylase inhibitor BML-210 exerts growth inhibitory, proapoptotic

- and differentiation stimulating effects on the human leukemia cell lines. *Eur J Pharmacol* 549: 9-18.
- Schuetz A, Min J, Antoshenko T, Wang CL, Allali-Hassani A, Dong A, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Sternglanz R, Plotnikov AN (2007) Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin. *Structure* 15: 377-89.
- Shieh JM, Wei TT, Tang YA, Huang SM, Wen WL, Chen MY, Cheng HC, Salunke SB, Chen CS, Lin P, Chen CT, Wang YC (2012) Mitochondrial apoptosis and FAK signaling disruption by a novel histone deacetylase inhibitor, HTPB, in antitumor and antimetastatic mouse models. *PLoS One* 7: e30240.
- Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, Huber LJ (2006) Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol* 26: 28-38.
- Son IH, Chung IM, Lee SI, Yang HD, Moon HI (2007a) Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of *Maclura pomifera*. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 4753-5.
- Son IH, Lee SI, Yang HD, Moon HI (2007b) Bis(4-hydroxybenzyl)sulfide: a sulfur compound inhibitor of histone deacetylase isolated from root extract of *Pleuropterus ciliinervis*. *Molecules* 12: 815-20.
- Suzuki T, Kouketsu A, Matsuura A, Kohara A, Ninomiya S, Kohda K, Miyata N (2004) Thiol-based SAHA analogues as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 3313-7.
- Suzuki T, Khan MN, Sawada H, Imai E, Itoh Y, Yamatsuta K, Tokuda N, Takeuchi J, Seko T, Nakagawa H, Miyata N (2012) Design, synthesis, and biological activity of a novel series of human sirtuin-2-selective inhibitors. *J Med Chem* 55: 5760-73.
- Takai N, Ueda T, Nishida M, Nasu K, Narahara H (2006) M344 is a novel synthesized histone deacetylase inhibitor that induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 101: 108-13.
- Tang YA, Wen WL, Chang JW, Wei TT, Tan YH, Salunke S, Chen CT, Chen CS, Wang YC (2010) A novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction, F-actin disruption and gene acetylation in lung cancer. *PLoS One* 5: e12417.
- Tarasenko N, Cutts SM, Phillips DR, Inbal A, Nudelman A, Kessler-Icekson G, Rephaeli A (2012) Disparate impact of butyroyloxymethyl diethylphosphate (AN-7), a histone deacetylase inhibitor, and doxorubicin in mice bearing a mammary tumor. *PLoS One* 7: e31393.
- Tervo AJ, Kyrylenko S, Niskanen P, Salminen A, Leppanen J, Nyronen TH, Jarvinen T, Poso A (2004) An in silico approach to discovering novel inhibitors of human sirtuin type 2. *J Med Chem* 47: 6292-8.
- Tessier P, Smil DV, Wahhab A, Leit S, Rahil J, Li Z, Deziel R, Besterman JM (2009) Diphenylmethylenedihydroxamic acids as selective class IIa histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 5684-8.
- Tong WG, Wei Y, Stevenson W, Kuang SQ, Fang Z, Zhang M, Arts J, Garcia-Manero G (2010) Preclinical antileukemia activity of JNJ-26481585, a potent second-generation histone deacetylase inhibitor. *Leuk Res* 34: 221-8.
- Trapp J, Jochum A, Meier R, Saunders L, Marshall B, Kunick C, Verdin E, Goekjian P, Sippl W, Jung M (2006) Adenosine mimetics as inhibitors of NAD⁺-dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition. *J Med Chem* 49: 7307-16.

- Umehara K, Nakahara K, Kiyoto S, Iwami M, Okamoto M, Tanaka H, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H (1983) Studies on WF-3161, a new antitumor antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 36: 478-83.
- Varghese S, Senanayake T, Murray-Stewart T, Doering K, Fraser A, Casero RA, Jr., Woster PM (2008) Polyaminohydroxamic acids and polyaminobenzamides as isoform selective histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 51: 2447-56.
- Venturelli S, Berger A, Bocker A, Busch C, Weiland T, Noor S, Leischner C, Schleicher S, Mayer M, Weiss TS, Bischoff SC, Lauer UM, Bitzer M (2013) Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone proteins in human-derived hepatoblastoma cells. *PLoS One* 8: e73097.
- Villadsen JS, Stephansen HM, Maolanon AR, Harris P, Olsen CA (2013) Total synthesis and full histone deacetylase inhibitory profiling of Azumamides A-E as well as beta(2)-epi-Azumamide E and beta(3)-epi-Azumamide E. *J Med Chem* 56: 6512-20.
- Wang H, Yu N, Song H, Chen D, Zou Y, Deng W, Lye PL, Chang J, Ng M, Sun ET, Sangthongpitag K, Wang X, Wu X, Khng HH, Fang L, Goh SK, Ong WC, Bonday Z, Stunkel W, Poulsen A, Entzeroth M (2009) N-Hydroxy-1,2-disubstituted-1H-benzimidazol-5-yl acrylamides as novel histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, SAR studies, and in vivo antitumor activity. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 1403-8.
- Wang H, Lim ZY, Zhou Y, Ng M, Lu T, Lee K, Sangthongpitag K, Goh KC, Wang X, Wu X, Khng HH, Goh SK, Ong WC, Bonday Z, Sun ET (2010) Acylurea connected straight chain hydroxamates as novel histone deacetylase inhibitors: Synthesis, SAR, and in vivo antitumor activity. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 3314-21.
- Wang LG, Liu XM, Fang Y, Dai W, Chiao FB, Puccio GM, Feng J, Liu D, Chiao JW (2008) De-repression of the p21 promoter in prostate cancer cells by an isothiocyanate via inhibition of HDACs and c-Myc. *Int J Oncol* 33: 375-80.
- Warrell RP, Jr., He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP (1998) Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 90: 1621-5.
- Wash PL, Hoffman TZ, Wiley BM, Bonnefous C, Smith ND, Sertic MS, Lawrence CM, Symons KT, Nguyen PM, Lustig KD, Guo X, Annable T, Noble SA, Hager JH, Hassig CA, Malecha JW (2008) Alpha-mercaptoketone based histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 6482-5.
- Wilson AJ, Cheng YQ, Khabele D (2012) Thailandepsins are new small molecule class I HDAC inhibitors with potent cytotoxic activity in ovarian cancer cells: a preclinical study of epigenetic ovarian cancer therapy. *J Ovarian Res* 5: 12.
- Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Sukhai MA, Hurren R, Anyiwe K, Mao X, Suarez Saiz F, Gronda M, Eberhard Y, MacLean N, Ketela T, Reed JC, Moffat J, Minden MD, Batey RA, Schimmer AD (2010) Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther* 9: 246-56.
- Xiong SD, Yu K, Liu XH, Yin LH, Kirschenbaum A, Yao S, Narla G, DiFeo A, Wu JB, Yuan Y, Ho SM, Lam YW, Levine AC (2009) Ribosome-inactivating proteins isolated from dietary bitter melon induce apoptosis and inhibit histone deacetylase-1 selectively in premalignant and malignant prostate cancer cells. *Int J Cancer* 125: 774-82.
- Ying Y, Taori K, Kim H, Hong J, Luesch H (2008) Total synthesis and molecular target of largazole, a histone deacetylase inhibitor. *J Am Chem Soc* 130: 8455-9.

Yu CW, Chang PT, Hsin LW, Chern JW (2013) Quinazolin-4-one derivatives as selective histone deacetylase-6 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 56: 6775-91.

Annexe A2: Molécules issues du criblage *in vitro* ayant une activité inhibitrice de l'activité HDAC totale

Le criblage *in vitro* de l'activité totale de HDAC (classes I, II et IV) a été réalisé grâce à une incubation de 45 minutes à 37°C de 10 µg d'extrait protéique des cellules K-562 en présence des différents composés et du substrat (HDAC Assay Kit Fluorescent, Active Motif®). La réaction est arrêtée par ajout d'une solution de « développeur » additionnée de TSA. Les molécules proviennent du laboratoire du Dr Robert Kiss (RK ; Université Libre de Bruxelles, Belgique), du Pr Peter Proksch (PP ; Université de Düsseldorf, Allemagne), du Pr Gilbert Kirsch (GK ; Université de Lorraine, Metz, France), du Pr Claus Jacob (CJ ; Université de Saarbrücken, Allemagne), Arthur Silva (AS ; Université de Aveiro, Portugal) et David Ross (DR ; Université du Colorado, Denver, Etats-Unis).

CI₅₀: concentration inhibitrice à 50%, dans les cas où l'CI₅₀ n'a pas pu être calculée le pourcentage d'inhibition à 100 µM est indiqué.

Classe chimique	Molécule	Origine	CI ₅₀ (µM)	% d'inhibition à 100 µM	Provenance
Polyphénol	3b	Synthétique	127		RK
	5b	Synthétique	152		RK
	6d	Synthétique		20%	RK
	6e	Synthétique		20%	RK
	7b	Synthétique		20%	RK
	8b	Synthétique		40%	RK
	9d	Synthétique		30%	RK
	12a	Synthétique	114		RK
	13a	Synthétique		25%	RK
	13b	Synthétique		20%	RK
	13c	Synthétique	200		RK
	17b	Synthétique		30%	RK
	Alterporriol	Champignon <i>Stemphylium</i>			PP
	A&B		65		
	F		39		
	G&H		74		
	Divers	Altersolanol A	Champignon <i>Stemphylium</i>	112	
Macrosporin		Champignon <i>Stemphylium</i>	149		PP
Skirin		Champignon	33		PP
Ltl 57		Champignon	92		PP
Ltl 58		Champignon	76		PP
Ltl 60		Champignon	73		PP
Ltl 62		Champignon	102		PP
Ltl 63		Champignon	97		PP
Polyketides		Champignon <i>Epicoccum nigrum</i>			PP
1			9.8		
10		14.2			
FA5734	Synthétique	97		AS	
FA-AS3	Synthétique	92		AS	
SV55	Synthétique	100		GK	

Annexe A3: Molécules issues du criblage *in vitro* ne possédant pas d'activité d'inhibition des HDAC

Classe chimique	Molécule	Origine	Provenance	
Dérivé bromé	Aerophobin 2	Eponge marine <i>Aplysina</i>	PP	
	Aerothionin	Eponge marine <i>Aplysina</i>	PP	
	Agelanesin A	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP	
	Dibromophakellin	Eponge marine <i>Phakellia</i>	PP	
	Dienone	Eponge marine <i>Pseudoceratina</i>	PP	
	Hymenidin	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP	
	Mauritamide B	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP	
	Midpacamide	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP	
Dérivé chloré	N-methyl-4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP	
	Alterporriol D	Champignon <i>Stemphylium</i>	PP	
	Dérivé soufré	Agelasidine C	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP
		Agelasidine D	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP
		DBTTS	Synthétique	CJ
		DPSTTS	Synthétique	CJ
		DPSEETTS	Synthétique	CJ
		DEETTS	Synthétique	CJ
DPhTTS		Synthétique	CJ	
BnTTSPs		Synthétique	CJ	
PrTTSPs	Synthétique	CJ		
Peptide cyclique	Enniatin B1	Champignon <i>Fusarium</i>	PP	
	Theonellapeptolide Ie	Eponge marine <i>Okinawan</i>	PP	
	777Da	Champignon <i>Talaromyces</i>	PP	
	EEKristall	Champignon <i>Embellisia</i>	PP	
Polyphénol	1b	Synthétique	RK	
	4b	Synthétique	RK	
	4f	Synthétique	RK	
	4g	Synthétique	RK	
	6a	Synthétique	RK	
	6b	Synthétique	RK	
	6c	Synthétique	RK	
	6d	Synthétique	RK	
	7a	Synthétique	RK	
	7c	Synthétique	RK	
	7e	Synthétique	RK	
	8d	Synthétique	RK	
	9b	Synthétique	RK	
	10b	Synthétique	RK	
	11b	Synthétique	RK	
	22a	Synthétique	RK	
	3,5-Dicaffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid A)	Plante <i>Solanum</i>	PP	
	(-)-Matairesinol	Cèdres deodar	PP	
	Alœresin A	Plante Alœ	PP	
	Alœsin	Plante Alœ	PP	
	Alternariol	Champignon <i>Alternaria</i>	PP	
	Alterporriol E	Champignon <i>Stemphylium</i>	PP	
	Atromentin	Champignon <i>Hydnellum</i>	PP	
	Avarol	Eponge marine <i>Dysidea</i>	PP	
	Broussochalcone	Mûrier d'Espagne <i>Broussonetia</i>	PP	

	Curcuphenol	Eponge marine <i>Porifera</i>	PP
	Dehydrocurvularin	Champignon <i>Nectria</i>	PP
	Feralolide	Plante <i>Alœ</i>	PP
	Isobavachalcone	Plante <i>Erythrina</i>	PP
	Orsellinic acid	Champignon	PP
	Pinoresinol	Huile d'olive extra-vierge	PP
	Scorzodihydrostilbene A (1)	Plante <i>Scorzonera</i>	PP
	Scorzodihydrostilbene B (2)	Plante <i>Scorzonera</i>	PP
Divers	3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA)	Patate douce	PP
	5-pentadecyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde	Eponge marine	PP
	7-O-Methylalœeresin A	Plante <i>Commiphora</i>	PP
	8-OH-Manzamin A	Eponge marine	PP
	18-dehydroxycytochalasin	Fermentation du champignon <i>Hypoxylon</i>	PP
	8LS 80-5-1	Champignon	PP
	AM2b 2	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM2b 5.4.1	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM2b 5.4.5.1	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM2b 5.5	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM2b 6.7.1	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM4 5.7	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 5.3.7.2	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 5.3.7.5	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 5.3.7.6	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM6 3	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 6.6.2.2	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 6.7.3.2	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 6.7.5.1	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 7.8.3.2	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 7.8.3.3	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 7.8.3.4	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 7.8.5.1	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 7.8.5.2	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 7.8.7.4	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AM7b 7.8.10.2	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	AAV14S8semi	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	Chetomine	Champignon <i>Chaetomium</i>	PP
	Citreoviridin	Champignon <i>Penicillium</i>	PP
	Cochliodinol	Champignon dans la culture du riz	PP
	Dammarenolic acid	Résine dammar	PP
	Debromosceptrin	Eponge marine <i>Agelas</i>	PP
	Demethylencecalin	Fleure <i>Helianthella</i>	PP
	Indol-3-carboxylic acid	Bactérie <i>Chromobacterium</i>	PP
	Kojic acid	Champignon <i>Aspergillus</i>	PP
	Ltl 54	Champignon	PP
	Ltl 55	Champignon	PP
	Ltl 56	Champignon	PP
	Ltl 59	Champignon	PP
	Ltl 61	Champignon	PP
	MAC 730	Synthétique	DR
	MAC 681	Synthétique	DR
	MD 299	Synthétique	DR
	Meleagrins	Dindon sauvage	PP
	OT1	Synthétique	AS
	OT2	Synthétique	AS
	OT3	Synthétique	AS

OT4	Synthétique	AS
OT6	Synthétique	AS
OT7	Synthétique	AS
OT12	Synthétique	AS
OT13	Synthétique	AS
OT19	Synthétique	AS
OT22	Synthétique	AS
OT25	Synthétique	AS
OT27	Synthétique	AS
Piceoside	Arbuste <i>Arctostaphylos</i>	PP
Precocen II	Pesticide	PP
RB60-2-3	Champignon <i>Rhizoctonia</i>	PP
RB60-5-1	Champignon <i>Rhizoctonia</i>	PP
RB80-3-2	Champignon <i>Rhizoctonia</i>	PP
RB80-7	Champignon <i>Rhizoctonia</i>	PP
SV6	Synthétique	GK
SV13	Synthétique	GK
SV16	Synthétique	GK
SV33	Synthétique	GK
SV38	Synthétique	GK
SV48	Synthétique	GK
SV49	Synthétique	GK
SV52	Synthétique	GK
SV53	Synthétique	GK
SV54	Synthétique	GK
SV56	Synthétique	GK
FA-AS1	Synthétique	AS
FA-AS2	Synthétique	AS
FA-AS4	Synthétique	AS

Annexe A4: Communications - Publications

Communications

Présentations orales

A novel series of polyvanillic acid-based inhibitors of histone deacetylases displaying anti-cancer activities

Life Sciences PhD days - Luxembourg (Luxembourg, 2012)

Etude préclinique d'acides 4-hydroxybenzoïques en tant qu'inhibiteurs spécifiques de l'histone désacétylase 6

Journée des doctorants - Nancy (France, 2014)

Posters

Polyvanillic polyphenol derivatives as a new family of class- and isoform-selective HDAC inhibitors with anticancer properties

Annual mini-symposium - Namur (Belgique, 2011)

A novel series of polyvanillic acid-based inhibitors of histone deacetylases

Clinical Epigenetics International Meetings 2012 - Homburg (Allemagne, 2012)

Antiproliferative and proapoptotic activities of a novel series of polyvanillic acid-based inhibitors of histone deacetylases

Annual Télévie day - Liège (Belgique, 2012)

Clinical Epigenetics International Meetings 2013 - Soligen (Allemagne, 2013)

Annual Télévie day - Brussels (Belgique, 2013)

Effect of polysulfane-based derivatives of naturally occurring garlic compounds on the acetylation of histones and α -tubulin in human leukemia cells

Luxembourgish Nutrition Conference - Luxembourg (Luxembourg, 2013)

Publications

Articles

Mustapha El Amrani, Daowan Lai, Abdessamad Debbab, Amal H. Aly, Karsten Siems, Carole Seidel, Michael Schnekenburger, Anthoula Gaigneaux, Marc Diederich, Daniel Feger, Peter Proksch. Protein-kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*, Journal of Natural Products (2013) 77(1):49-56.

Carole Seidel, Michael Schnekenburger, Mario Dicato, Marc Diederich. Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases, Cancer Letters (2014) 343(1): 134-46.

Carole Seidel, Michael Schnekenburger, Clemens Zwergel, François Gaascht, Antonello Mai, Mario Dicato, Gilbert Kirsch, Sergio Valente, Marc Diederich. Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis and bioactivity of 3-alkenoylcoumarines, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (*Accepté*).

Revues

Carole Seidel, Michael Schnekenburger, Mario Dicato, Marc Diederich. Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature, Genes Nutrition (2012) 7(3):357-67.

Carole Seidel, Cristina Florean, Michael Schnekenburger, Mario Dicato, Marc Diederich. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy, Biochimie (2012) 94(11):2264-79.

Protein Kinase and HDAC Inhibitors from the Endophytic Fungus *Epicoccum nigrum*

Mustapha El Amrani,[†] Daowan Lai,[†] Abdessamad Debbab,[†] Amal H. Aly,[†] Karsten Siems,[‡] Carole Seidel,[§] Michael Schneckeburger,[§] Anthonla Gaigneaux,[§] Marc Diederich,[‡] Daniel Feger,^{||} Wenhan Lin,[∇] and Peter Proksch^{*,†}

[†]Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, Geb. 26.23, 40225 Düsseldorf, Germany

[‡]AnalytiCon Discovery GmbH, Hermannswerder Haus 17, 14473 Potsdam, Germany

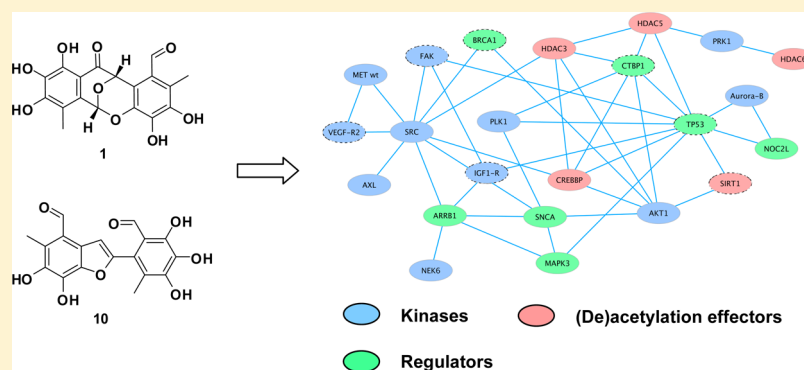
[§]Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, Rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

[‡]College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

^{||}ProQinase GmbH, Breisacher Strasse 117, 79106 Freiburg, Germany

[∇]State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, People's Republic of China

Supporting Information



ABSTRACT: A chemical investigation of the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* isolated from leaves of *Mentha suaveolens* collected in Morocco resulted in the isolation of five new polyketides, epicocconigrone A and B (1 and 2), 3-methoxyepicoccone B (3), 3-methoxyepicoccone (4), and 2,3,4-trihydroxy-6-(methoxymethyl)-5-methylbenzaldehyde (5), together with five known compounds (6–10). The structures of the new compounds were unambiguously determined by extensive analysis of the 1D and 2D NMR and mass spectroscopic data. Compounds 1 and 10 showed potent inhibition of at least 15 protein kinases with IC_{50} values ranging from 0.07 to 9.00 μ M. Moreover, compounds 1 and 10 inhibited histone deacetylase (HDAC) activities with IC_{50} values of 9.8 and 14.2 μ M, respectively. A preliminary structure–activity relationship is discussed. Interestingly, compounds 1 and 10 exert mainly cytostatic effects in human lymphoma RAJI and U-937 cell lines.

Endophytic fungi that reside in plants are promising sources of a variety of bioactive substances.^{1,2} These compounds are usually structurally novel and display important biological or pharmaceutical properties, such as antimicrobial or cytotoxic activities.^{1,2}

In this study, the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* Link was isolated from leaves of *Mentha suaveolens* Ehr. collected in Morocco. *M. suaveolens* is a common wild plant and traditionally used as an antiemetic, antiarrhythmic, antihemorrhoidal, and analgesic agent in folk medicine of Morocco.³ The essential oil of this plant was reported to have antibacterial and antifungal activity.³

E. nigrum is distributed worldwide, has been frequently isolated as an endophyte of plants,^{4–6} and has been found to live in association with other organisms.^{7–9} Previous chemical investigations of *E. nigrum* have yielded several bioactive secondary

metabolites, including flavipin,¹⁰ epicorazines A–C,^{11–13} epicocconone,⁹ epicolactone,⁴ diketopiperazines,^{5,7,8} and orevaetaene.⁶ Herein, we report the isolation, structure elucidation, and biological activities of new polyketide derivatives that show moderate to potent inhibition of protein kinases and histone deacetylases (HDAC) *in vitro*.

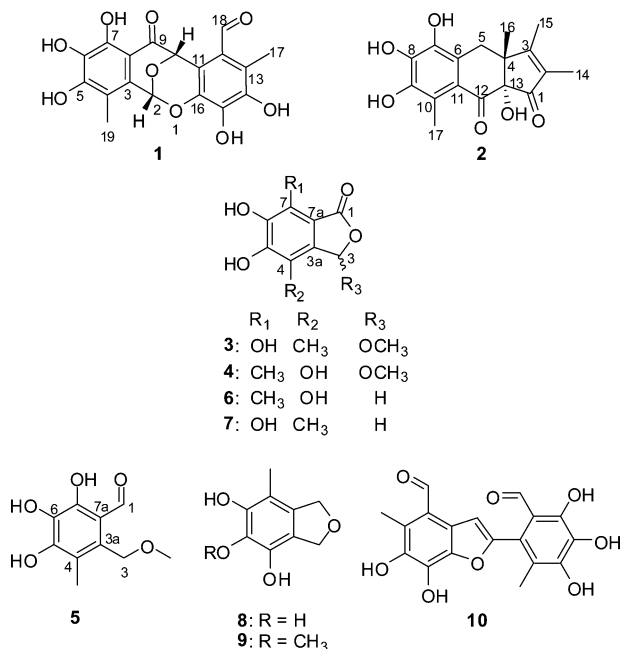
RESULTS AND DISCUSSION

E. nigrum (internal strain No. BSL1W) isolated from leaves of *M. suaveolens* Ehr. was fermented on solid rice medium for four

Received: July 15, 2013

Published: December 16, 2013

weeks and then extracted with EtOAc. The obtained EtOAc extract was separated by repeated column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20, and C₁₈ to yield five new polyketides (1–5) and five known compounds (6–10).



Compound **1** was isolated as a brown, amorphous solid. Its molecular formula was established as C₁₈H₁₄O₉ by HRESIMS (m/z 375.0707 [M + H]⁺), implying 12 degrees of unsaturation. The ¹H NMR spectrum exhibited five signals assignable to two methyls, Me-19 (δ_{H} 2.25, s) and Me-17 (δ_{H} 2.31, s), two oxymethine protons, H-2 (δ_{H} 6.35, s) and H-10 (δ_{H} 6.80, s), one aldehyde proton, H-18 (δ_{H} 10.35, s), and five D₂O-exchangeable protons (δ_{H} 10.13 brs, 9.85 brs, 11.15 s, 8.92 brs, 9.42 brs). The ¹³C NMR spectrum showed a total of 18 carbon signals (Table 1), which include two carbonyls (δ_{C} 191.2 and 196.9), two oxygenated sp³-hybridized carbons (δ_{C} 68.7 and δ_{C} 90.0), two methyls (δ_{C} 10.1 and 11.8), and 12 sp²-hybridized quaternary carbons that were assigned to two persubstituted benzene rings. These functionalities, i.e., two benzene rings and two carbonyls, account for 10 degrees of unsaturation, thus indicating two more rings being present in **1** to satisfy the two remaining degrees of unsaturation. The HMBC correlations from Me-17 to C-12, C-13, and C-14, from the aldehyde proton (H-18) to C-12, C-13, and C-11, and from H-10 to C-11, C-12, and C-16, as well as the ROESY interactions between H-10, H-18, and Me-17, suggested vicinal relationships of Me-17, H-18, and H-10 (ring A, Figure 1). The HMBC correlations from Me-19 to C-3, C-4, and C-5 and from H-2 to C-4 and C-8, together with the ROESY correlation between H-2 and Me-19, established their neighboring position in the D ring. The remaining correlations from H-2 to C-10 and C-16, as well as from H-10 to C-2 in the HMBC spectrum, suggested the presence of two oxygen bridges between C-16/C-2 and C-2/C-10 in ring B, which could rationalize the downfield shifted signals for CH-2 (δ_{H} 6.35, δ_{C} 90.0). The carbonyl group (C9) has to be incorporated into ring C to complete the whole structure as indicated by the HMBC correlations from H-10 to C-9 and C-8 and from 7-OH to C-6, C-7, and C-8. In addition, a sharp singlet for OH-7, in contrast to the broad singlets detected for the other hydroxyl groups, was observed in the ¹H NMR spectrum.

Table 1. ¹H and ¹³C NMR Data of **1** and HMBC and ROESY Correlations (DMSO-*d*₆)^a

position	δ_{C} , type	δ_{H} , mult.	HMBC (H→C)	ROESY
2	90.0, CH	6.35, s	4, 8, 10, 16	19, 10
3	126.6, C			
4	115.4, C			
5	153.0, C			
6	132.5, C			
7	148.6, C			
8	104.0, C			
9	196.9, C			
10	68.7, CH	6.80, s	2, 8w, ^b 9, 11, 12w, 16	2, 18
11	112.9, C			
12	121.6, C			
13	121.6, C			
14	144.2, C			
15	138.4, C			
16	135.8, C			
17	11.8, CH ₃	2.31, s	12, 13, 14	18
18	191.2, CH	10.35, s	11w, 12, 13, 14w	10, 17
19	10.1, CH ₃	2.25, s	3, 4, 5	2
5-OH		10.13 brs	4	
6-OH		9.85 brs ^c		
7-OH		11.15 s	6, 7, 8	
14-OH		8.92 brs	13	
15-OH		9.42 brs ^c		

^aRecorded at 300 and 600 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C. ^b“w” denotes weak correlation. ^cTentative assignments may be interchanged within the same column.

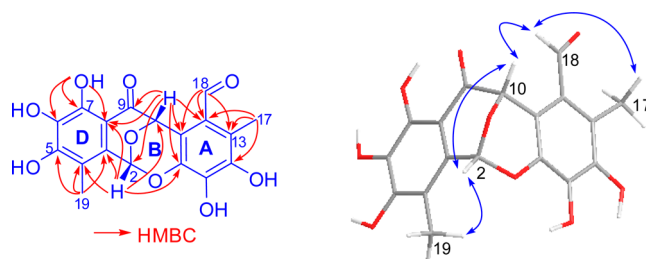


Figure 1. HMBC (left) and ROESY (right) correlations of **1**.

This could only be explained by an intramolecular hydrogen bond formed between OH-7 and the neighboring carbonyl (C-9) group. The ROESY correlation between H-2 and H-10 was indicative of their *cis* relationship (Figure 1). The specific rotation of **1** is close to 0, thus suggesting that it was a racemate. Therefore, compound **1** was identified as a highly oxygenated polyketide and named epicocconigrone A.

During the preparation of this paper, we found that a closely related analogue, epicoccolide A, was recently reported from another endophytic fungus *Epicoccum* sp.¹⁴ isolated from *Theobroma cacao*. Epicocconigrone A (**1**) and epicoccolide A differ only in the D ring, in which the positions of Me-19 and 7-OH of the former are opposite of those of the latter. The condensation of two molecules of flavipin, which was previously isolated from *E. nigrum*,¹⁰ can easily explain the formation of compound **1** and epicoccolide A.¹⁴

Compound **2** was isolated as a yellow-brown, amorphous solid. The HRESIMS of **2** established its molecular formula as C₁₇H₁₈O₆ (9 degrees of unsaturation). The ¹H NMR spectrum (CD₃OD) displayed four singlets at δ_{H} 1.29 (Me-16), 2.08 (Me-17), 1.52 (Me-14), and 1.97 (Me-15) that were attributable

to four methyl groups, and two doublets at δ_{H} 2.42 ($J = 15.5$ Hz) and at δ_{H} 3.43 ($J = 15.5$ Hz) assignable to two geminal protons (CH_2 -5). Analysis of the ^{13}C NMR spectrum confirmed the presence of four primary carbons (δ_{C} 22.5, 12.2, 12.1, and 8.2), one secondary carbon (δ_{C} 29.5), and 12 quaternary carbons, which include two keto groups (δ_{C} 197.2 and 204.7), eight sp^2 -hybridized carbons, and two sp^3 -hybridized carbons (Table 2).

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR Data and HMBC Correlations of 2

position	δ_{C} , type ^a	δ_{H} , mult. (J in Hz) ^b	δ_{H} , mult. (J in Hz) ^a	HMBC (H→C)
1	204.7, C			
2	136.0, C			
3	179.9, C			
4	48.9, C ^c			
5	29.5, CH ₂	2.32, d (15.6)	2.43, d (15.6)	16, 4, 13, 11, 6, 7, 3
		3.33 ^d	3.44, d (15.6)	
6	121.5, C			
7	140.8, C ^e			
8	140.6, C ^e			
9	143.9, C			
10	119.2, C			
11	123.3, C			
12	197.2, C			
13	89.2, C			
14	8.2, CH ₃	1.44, s	1.52, s	2, 1, 3
15	12.2, CH ₃ ^f	1.88, s	1.97, s	3, 4, 2, 1(weak)
16	22.5, CH ₃	1.17, s	1.28, s	4, 5, 3, 13
17	12.1, CH ₃ ^f	1.96, s	2.08, s	10, 11, 9, 12 (weak)
13-OH		5.66, brs		
7,8,9-OH		9.11, 8.54, 8.34		
		each 1H, brs		

^aRecorded in CD₃OD at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C .

^bRecorded in DMSO- d_6 at 300 MHz. ^cSignal overlapped with the solvent peak and deduced from HMBC. ^dSignal overlapped with the water peak. ^{e,f}Assignments may be interchanged within the same column.

Among these eight sp^2 carbons, six of them were incorporated into a benzene ring. In the HMBC spectrum, Me-17 (δ_{H} 2.08) showed correlations to C-9, C-10, and C-11 and long-range correlation to the keto group (C-12, δ_{C} 197.2), while H₂-5 showed interactions with C-11, C-6, and C-7 (δ_{C} 140.8), suggesting that Me-17, CO-12, and CH₂-5 resided at C-10, C-11, and C-6 of the benzene ring, respectively. The HMBC correlations from Me-14 to the other keto group (C-1, δ_{C} 204.7) and from both Me-14 and Me-15 to the remaining two olefinic carbons (δ_{C} 136.0, δ_{C} 179.9) were consistent with the presence of an α,β -unsaturated keto group. Moreover, the HMBC correlations from Me-16 to C-5, C-4, C-3, and C-13 and from H₂-5 to C-3 (δ_{C} 179.9), C-4, and C-13 established the connection between CH₂-5, C-4, C-3, and C-13 (Figure 2). In consideration of the chemical shifts of C-13, C-12, and C-1, as well as the 9 degrees of unsaturation required by the molecular formula, C-12 and C-1 were then connected via C-13 to complete the structure of 2. This was supported by NMR experiments using DMSO- d_6 as solvent. In the ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6), four D₂O-exchangeable protons attributable to three aromatic hydroxyls (δ_{H} 9.11, 8.54, 8.34) and one further hydroxyl (δ_{H} 5.66) assigned to 13-OH were clearly

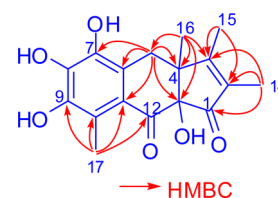


Figure 2. Selected HMBC correlations of 2.

discerned. In order to determine the relative configuration, 1D NOE experiments were performed. No enhancement of 13-OH was observed when Me-16 was irradiated, and *vice versa*. Thus, these two groups are *trans* oriented. The specific optical rotation measurement indicated this compound to be a racemate. Compound 2 was then identified as a new polyketide and named epicocconigron B. It shares a common structural unit with flavipin, and it seems possible that the latter (or its derivatives) is a starting unit to biosynthesize 2 through a yet unknown mechanism.

Compound 3 was isolated as a yellow, amorphous solid. Its molecular formula was established as C₁₀H₁₀O₆ based on HRESIMS, corresponding to 6 degrees of unsaturation. ^1H NMR spectrum showed three signals attributed to a methyl group at δ_{H} 2.03 (4-Me), a methoxy group at δ_{H} 3.37 (3-OMe), and an oxymethine proton at δ_{H} 6.29 (H-3). Analysis of the ^{13}C and DEPT spectra revealed the presence of seven sp^2 -hybridized carbons, including a carbonyl group at δ_{C} 167.3, and six quaternary carbons that were assigned to a fully substituted benzene ring, in addition to one oxygenated methine (δ_{C} 101.0), one methoxyl (δ_{C} 54.6), and one methyl group (δ_{C} 10.6). The NMR data of 3 (Table 3) are similar to those of epicoccone B (7),¹⁵ except for chemical shifts for a methoxyl and an oxymethine of the former replacing the oxymethylene of the latter. The methoxy group was found to show HMBC correlation to C-3; hence it was substituted at C-3. Compound 3 was then identified as 3-methoxyepicoccone B. The specific optical rotation value ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} +1.0$) of 3 indicates it to be a racemate.

Compound 4 shared the same molecular formula (C₁₀H₁₀O₆) as 3 by analysis of the HRESIMS data. The NMR data of 4 were similar to those of 3 (Table 3), indicating 4 to be an isomer of 3. However, the chemical shifts of the methyl (δ_{H} 2.40, 7-Me) and lactone carbonyl of 4 were significantly downfield shifted compared to those of 3. Hence, the position of the carbonyl should be different in both compounds. Indeed, in the HMBC spectrum of 4, 7-Me showed a long-range correlation to the carbonyl group (C-1), thus indicating the close spatial proximity of both functional groups. Therefore, compounds 4 and 3 differed in positions 4 and 7, in which the substituents were exchanged in both compounds. It is worth noting that 4 is closely related to 4,5,6-trihydroxy-7-methylphthalide (epicoccone, 6),¹⁶ with the only difference at C-3, in which an additional methoxy group is present in 4. Compound 4 was thus determined as 3-methoxyepicoccone. The specific optical rotation value (close to 0) suggests 4 is a racemate.

The molecular formula of compound 5 was deduced as C₁₀H₁₂O₅ by HRESIMS measurements. The ^{13}C NMR spectrum showed 10 carbon signals including an aldehyde carbon at δ_{C} 196.4, a methyl at δ_{C} 10.9 (4-Me), a methoxyl at δ_{C} 58.2 (3-OCH₃), a methylene at δ_{C} 67.0 (CH₂-3), and six sp^2 -hybridized carbons. The NMR data of 5 (Table 3) were similar to those of 3 except that the chemical shifts for the aldehyde group of 5 replaced the lactone group of 3, and the methylene of the former replaced the methine of the latter. Thus, compound 5 was

Table 3. ¹H and ¹³C NMR Data of 3–5

position	3 ^a		4 ^b		5 ^c	
	δ _C , type	δ _H , mult.	δ _C , type	δ _H , mult.	δ _C , type	δ _H , mult.
1	167.3, C		171.9, C		196.4, CH	10.10, s
3	101.0, CH	6.29, s	102.2, CH	6.26, s	67.0, CH ₂	4.70, s
3a	134.8, C		124.8, C		131.9, C	
4	112.2, C		140.1, C		119.0, C	
5	151.2, C		141.6, C		152.8, C	
6	143.0, C		147.8, C		132.8, C	
7	134.5, C		118.8, C		152.1, C	
7a	103.9, C		115.8, C		113.6, C	
3-OCH ₃	54.6, CH ₃	3.37, s	55.6, CH ₃	3.47, s	58.2, CH ₃	3.41, s
4/7-CH ₃	10.6, CH ₃	2.03, s	10.0, CH ₃	2.40, s	11.0, CH ₃	2.21, s

^aRecorded in DMSO-*d*₆ at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C. ^bRecorded in CD₃OD at 600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C. ^cRecorded in CD₃OD at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C.

Table 4. Protein Kinase Inhibition Activities (IC₅₀, μM)^a

compound	protein kinase							
	AKT1	ALK	ARK5	Aurora-B	AXL	FAK	IGF1-R	MEK1 wt
1	2.15	0.18	2.51	2.51	0.16	0.42	0.07	>30
3	>30	9.76	29.8	22.6	6.39	16.3	2.04	>30
5	>30	9.33	>30	20.6	11.0	20.6	3.50	>30
7	23.2	5.02	10.0	8.69	2.46	7.52	0.56	>100
10	4.07	0.25	3.77	7.29	0.22	0.80	0.15	>30
staurosporine ^b	0.03	0.03	0.008	0.008	0.04	0.08	0.19	0.30
quercetin ^b	5.39	3.32	5.09	0.91	0.96	1.20	0.30	>10

compound	protein kinase							
	MET wt	NEK2	NEK6	PIM1	PLK1	PRK1	SRC	VEGF-R2
1	0.58	1.83	0.52	3.10	3.18	4.48	0.37	0.32
3	9.65	11.8	>30	>30	>30	>30	12.6	26.4
5	>30	>30	>30	>30	>30	>30	20.0	>30
7	8.63	6.55	13.6	21.3	11.8	18.6	3.56	5.96
10	1.12	3.78	1.85	4.44	6.31	9.00	0.49	0.39
staurosporine ^b	0.94	4.79	>10	0.11	0.54	0.001	0.04	0.01
quercetin ^b	0.58	5.73	4.23	0.50	5.75	5.80	0.12	0.28

^aIC₅₀ values were calculated from the inhibitory dose–response curves using the solvent control DMSO set to 100% activity and the negative control without enzyme set to 0% activity. ^bStaurosporine and quercetin were used as positive controls.

determined as 2,3,4-trihydroxy-6-(methoxymethyl)-5-methylbenzaldehyde.

The known compounds were identified by comparison of their spectroscopic data with the literature and include epicoccone (6),¹⁶ epicoccone B (7),¹⁵ 4,5,6-trihydroxy-7-methyl-1,3-dihydroisobenzofuran (8),¹⁷ 4,6-dihydroxy-5-methoxy-7-methyl-1,3-dihydroisobenzofuran (9),¹⁸ and epicoccolide B (10).^{14,19}

In order to prove whether compounds that bear a methoxyl group, such as 3, 4, and 9, could be artifacts generated during extraction and/or isolation with methanol, the postulated parent compounds, i.e., 6–8, were incubated in methanol for more than two weeks. No methoxylated products were detected by HPLC and LC-MS.

All compounds are probably biosynthetically related to flavipin (3,4,5-trihydroxy-6-methylphthalaldehyde). Compounds 3–8 could be derived from one molecule of flavipin by reduction of the aldehyde function followed by ring closure. The condensation of two molecules of flavipin, on the other hand, would lead to the formation of 1 and 10, and perhaps of 2.

All isolated compounds were evaluated for their inhibition against a panel of 16 protein kinases. As positive controls staurosporine and quercetin were used, both known to inhibit a

broad panel of protein kinases.^{20,21} Compounds 1, 7, and 10 were active toward all tested enzymes except MEK1 wt, with IC₅₀ values ranging from 0.07 to 23.2 μM (Table 4), while compounds 3 and 5 inhibited only some kinases. The remaining compounds were inactive (IC₅₀ > 30 μM). Both 1 and 10 selectively inhibited tyrosine kinases including anaplastic lymphoma kinase (ALK), AXL receptor tyrosine kinase, focal adhesion kinase (FAK), type I IGF receptor tyrosine kinase (IGF1-R), SRC nonreceptor tyrosine kinase, and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGF-R2) with IC₅₀ values less than 0.8 μM. Moreover, they also demonstrated inhibition against MET wt (a tyrosine kinase) and NEK6 (a serine/threonine kinase), with IC₅₀ values of 0.58 and 0.52 μM for 1 and of 1.12 and 1.85 μM for 10, respectively.

ALK is a receptor tyrosine kinase involved in several human tumors.^{22,23} Recent advances in the development of inhibitors that target ALK for the treatment of cancer have been reviewed.^{22–24} AXL is a receptor tyrosine kinase that is overexpressed in chronic myelogenous leukemia and several carcinomas, such as colon, breast, and lung cancer. Inhibition of AXL may enhance the sensitivity of cancer cells to cytotoxic agents and thus be a therapeutic target for drug development.²⁵ FAK plays a positive role in promoting cell migration and

Table 5. Inhibitory Activities of Compounds **1** and **10** on HDAC Activities (IC₅₀, μM)^a

compound	total	class I				class IIb		class IV
		HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC6	HDAC10	HDAC11
1	9.8 ± 3.0	8.6 ± 0.8	10.0 ± 1.2	12.4 ± 1.0	1.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	8.4 ± 2.0	11.7 ± 1.6
10	14.2 ± 3.9	8.8 ± 1.7	9.1 ± 0.6	6.9 ± 0.0	2.1 ± 0.2	6.5 ± 0.2	8.1 ± 0.6	12.9 ± 1.5
SAHA ^b	0.14 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.10 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.09 ± 0.01

^aIC₅₀ values were calculated from the inhibitory dose–response curves using the negative solvent control DMSO set to 100% activity. Values are the mean ± SD of three independent experiments. ^bSAHA: suberoylanilide hydroxamic acid, positive control.

invasion. It has been shown that the elevated expression of FAK in human tumors is correlated with increased malignancy and invasiveness.²⁶ IGF1-R is implicated in several cancers, such as breast and prostate cancers.²⁷ It has been reported that the activation of IGF1-R correlates with breast cancer progression, and thus IGF1-R is a relevant therapeutic target in breast cancer.²⁸ SRC is a nonreceptor tyrosine kinase protein. An increased SRC tyrosine kinase activity is suggested to be linked to cancer progression and metastatic diseases by promoting several signaling pathways.²⁹ Increasing evidence has indicated that SRC could be a promising target for the treatment of solid tumors.²⁹ VEGF-R2 signaling is important for tumor angiogenesis, which is crucial for cancer development.^{30,31} Several antiangiogenic compounds that target the VEGF-R2 signaling pathway have been developed.³⁰ The MET pathway plays an important role in the development of cancer, and thus targeting the MET signaling pathway appears to be a promising therapeutic approach to treat cancer.^{32–34} Nek6 is a serine/threonine-protein kinase that plays a pivotal role in tumorigenesis and seems to be a promising target for the treatment of a variety of cancers.³⁵

A preliminary structure–activity relationship is proposed based on the results described in this study. A β-hydroxy-α,β-unsaturated carbonyl moiety is present in all active compounds (i.e., **1**, **3**, **5**, **7**, and **10**), but absent in all inactive compounds (i.e., **2**, **4**, **6**, **8**, and **9**), thus suggesting that this moiety—which is liable to form an intramolecular hydrogen bond—is necessary for the inhibition of protein kinases. The dimeric structures (i.e., **1** and **10**) displayed much better activities than the monomeric ones (i.e., **3**, **5**, and **7**). Among the dimeric compounds, **1**, which is almost twice as active as **2**, exhibited the strongest activity against all investigated enzymes (except MEK1 wt). The lactone group seems to be important for the inhibitory activity of the monomeric compounds, because the ring-opened product **5** showed the least inhibitory potential compared to **3** and **7**, while the presence of an additional methoxyl group, as present in **3**, renders it less active if compared to **7**.

Histone deacetylase enzymes play a crucial role in various cellular processes including gene expression, cell mobility, and the regulation of transcription factor activities by regulating the level of acetylation of many proteins.³⁶ Noteworthy, an alteration of their activity is associated with tumor development and aggressiveness of many cancers. Consequently, molecules able to inhibit HDAC activity are promising for anticancer therapy.^{36–40}

Owing to their strong inhibitory potential against protein kinases, compounds **1** and **10** were further tested against HDAC. Both compounds exhibited inhibitory activities toward total HDACs *in vitro* in a concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 9.8 μM (for **1**) and 14.2 μM (for **10**), respectively (Table 5). In addition, these molecules were tested for *in vitro* activity of specific HDAC isoforms within classes I, IIb, and IV. As shown in Table 5, both compounds inhibited activity of HDAC1, **2**, **3**, **8**, **6**, **10**, and **11** with IC₅₀ values between 1.6 and 12.9 μM. As a positive control, we used suberoylanilide

hydroxamic acid (SAHA), a well-described potent pan-HDAC inhibitor.³⁹ SAHA possessed IC₅₀ values in the nanomolar range against all HDAC isoenzymes tested compared to the low micromolar range of compounds **1** and **10**. However, SAHA is a synthetic, optimized molecule, whereas compounds **1** and **10** are unmodified compounds from natural origins presenting an unprecedented scaffold compared to other know HDAC inhibitors. Furthermore, compounds **1** and **10** displayed an interesting selectivity. Indeed, they were about 7 times more potent against HDAC8 (IC₅₀ of 1.6 and 2.1 μM for compounds **1** and **10**, respectively) compared to HDAC1, whereas SAHA is about 3 times less potent against HDAC8 than all the other isoenzymes. Therefore, the chemical structure of these natural compounds could be optimized in the future to increase their potency and selectivity.

In addition, compounds **1** and **10** were tested for proliferation and viability of Burkitt's lymphoma RAJI and histiocytic lymphoma U-937 cell lines (Figure 3). Compound **1** inhibited 50% of the proliferation of RAJI cells at 72 h of treatment by 5 μM and induced about 30% cell death from 72 h of treatment by 25 μM. This compound had no effect on U-937 cell viability, while it induced a growth inhibition of 32% from 5 μM after 72 h of treatment. Compound **10** was less active than compound **1**, and it had no effect on RAJI and U-937 cell viability. However, **10** (25 μM) inhibited the growth of RAJI and U-937 cells by 55% and 30% after 72 h of treatment, respectively. These results reveal that **1** and **10** act mostly as cytostatic agents. Furthermore, compounds **1** and **10** were tested after 48 h of treatment on the viability of healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), where they had no effect on cell viability and therefore present an important selective toxicity for cancer cells compared to normal cells (Figure 4).

Compound **1** was more potent than compound **10** in inhibiting the proliferation of RAJI and U-937 cells, which was in agreement with its better inhibitory activities against kinase and HDAC. The dual capacity of these molecules to inhibit two important classes of enzymes involved in proliferation and cell survival may explain their effect on cancer cells. It was previously reported that the HDAC inhibitor romidepsin (FK228) and its analogues inhibit phosphatidylinositol 3 kinase activity leading to increased effects on cancer cell death.⁴¹ Furthermore, several kinases inhibited by these compounds interact with proteins either associated with histone acetylation or deacetylation or with regulators of this activity (Figure 5). Indeed, SRC and AKT interact directly with HDAC3, while PRK1 interacts with both HDAC5 and HDAC6. Moreover, several of these proteins are involved in regulation of cell proliferation, either on the kinase side (IGF1-R, VEGF-R2, ARK5, FAK) or on the epigenetic side (BRCA1, CTBP1, SIRT1, TP53).

Taken together, these data show that compounds **1** and **10** are potent inhibitors of both kinase and HDAC and may be promising leads for the development of anticancer drugs.

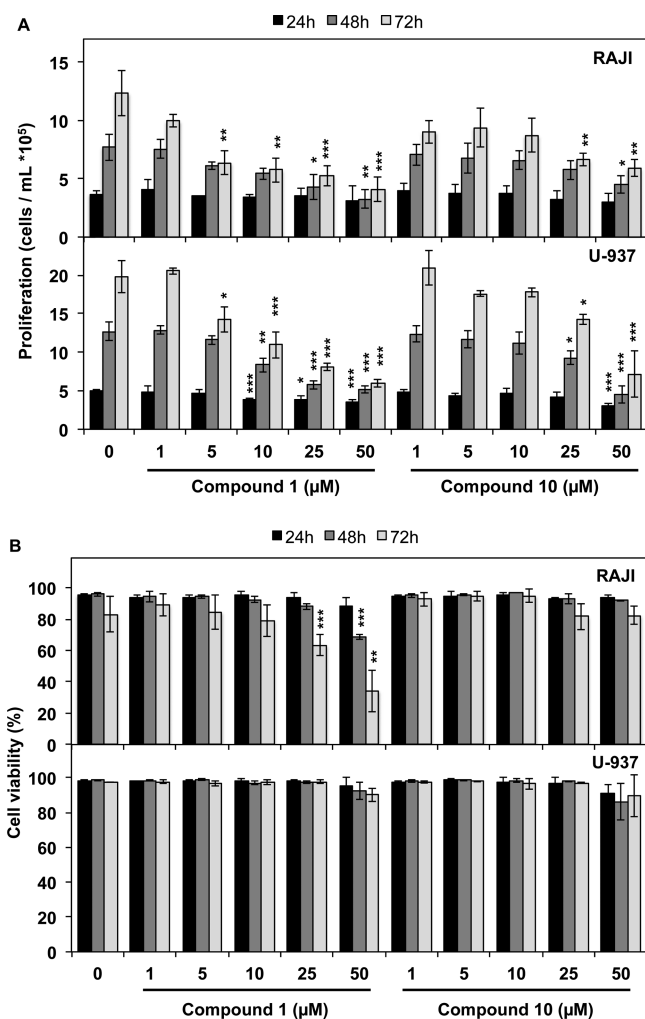


Figure 3. Effect of compounds **1** and **10** on RAJI and U-937 cell proliferation (A) and viability (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ versus control.

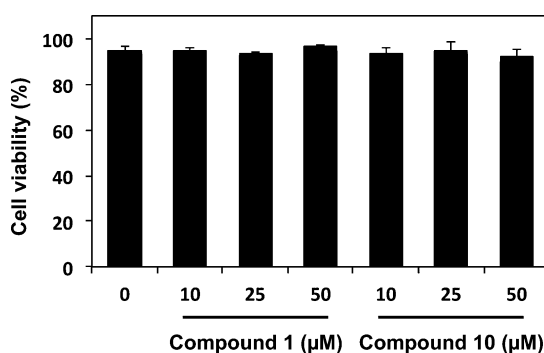


Figure 4. Effect of compounds **1** and **10** on PBMC viability.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. UV spectra were measured in a Perkin-Elmer Lambda 25 UV/vis spectrometer. NMR spectra were recorded in CD_3OD or $DMSO-d_6$ on Bruker Avance III-600 and/or Bruker DRX 500 and 300 spectrometers. NMR spectra were referenced to the residual solvent peak at δ_H 3.31 (CD_3OD) and 2.50 ($DMSO-d_6$) for 1H and δ_C 49.15 (CD_3OD) and 39.50 ($DMSO-d_6$) for ^{13}C . High-resolution mass measurements were performed on a Bruker UHR-QTOF maXis 4G. Low-resolution ESI mass spectra were recorded on a Thermoquest Finnigan LCQDeca connected to an Agilent 1100 Series

LC. Analytical HPLC investigations for all compounds were performed on a Dionex Ultimate 3000 System employing a DAD and a Knauer VertexPlus column (125×4 mm, Eurospher 100-10, C_{18}), employing a linear gradient of methanol and water (adjusted to pH 2.0 by addition of phosphoric acid and a flow rate of 1 mL/min). Semipreparative purification was accomplished on a Merck Hitachi system consisting of an L-7400 UV detector and L-7100 pump connected with a Kipp&Zonen flatbed recorder. The attached column was a Knauer VertexPlus C_{18} column (300×8 mm, Eurospher 100-10).

Isolation of Endophytic Fungi. The fungal strain *E. nigrum* was isolated from leaves of *M. suaveolens* Ehr. growing wild in Morocco. The leaves were first washed with demineralized water, dried, and immersed in 70% EtOH for 30 s, then dipped in sterile water to stop the sterilization. After pressing them against a control Petri dish containing isolation medium,⁴² pieces of tissue were cut into small segments and placed on other Petri dishes containing isolation medium and chloramphenicol (0.1 g/L). All plates were incubated at 21 °C in the dark. The purification of the fungal strains was performed by repeated transfer of small hyphal tips onto fresh malt agar dishes.

Identification of Fungal Cultures. As previously described, the identification was performed using the ITS region.⁴² After amplification and sequencing of the rDNA, GenBank comparison afforded a 99% identity with *Epicoccum nigrum* (HM061316). The amplified nucleotide sequence has been submitted to GenBank, where it was assigned the accession number KF002489. A voucher strain is kept at one of the authors' laboratory (P.P.).

Fermentation. Fermentation of the fungus for the isolation of the metabolites was carried out on solid rice medium at 21 °C under static conditions for 4 weeks. Ten Erlenmeyer flasks (1 L) with 100 g of rice and 110 mL of distilled water were kept overnight prior to autoclaving and inoculation with the pure fungal isolate.

Extraction and Separation of Metabolites. The cultures were extracted three times with EtOAc to yield 1 g of residue, which was first partitioned by liquid–liquid fractionation between *n*-hexane and 90% aqueous methanol. The latter was fractionated by vacuum liquid chromatography on a silica gel column using a step gradient of *n*-hexane/dichloromethane/methanol. The resulting fractions were analyzed by analytic HPLC using a reversed-phase column. Promising fractions were subjected to further chromatographic separation using Sephadex LH-20 with methanol as solvent and semipreparative reversed-phase HPLC to yield **1** (16 mg), **2** (16.3 mg), **3** (15 mg), **4** (9 mg), **5** (8.1 mg), **6** (6 mg), **7** (8 mg), **8** (200 mg), **9** (9 mg), and **10** (7.8 mg).

Epicocconigrone A (1): brown, amorphous solid; UV (λ_{max} MeOH) 232.3, 309.4 nm; $[\alpha]_D^{20} = +1.0$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; HRESIMS m/z 375.0707 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{18}H_{15}O_9$, 375.0711).

Epicocconigrone B (2): yellow-brown, amorphous solid; UV (λ_{max} MeOH) 238.5, 261.6, and 315.5 nm; $[\alpha]_D^{20} = +0.2$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR data, see Table 2; HRESIMS m/z 319.1175 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{17}H_{19}O_6$, 319.1176).

3-Methoxyepicoccone B (3): yellow, amorphous solid; UV (λ_{max} MeOH) 226.4, 270.9 nm; $[\alpha]_D^{20} = +1.0$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR data, see Table 3; HRESIMS m/z 227.0550 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{10}H_{11}O_6$, 227.0550), 249.0369 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{10}H_{10}O_6Na$, 249.0370).

3-Methoxyepicoccone (4): yellow, amorphous solid; UV (λ_{max} MeOH) 221.6, 278.3 nm; $[\alpha]_D^{20} = +0.8$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR data, see Table 3; HRESIMS m/z 225.04082 $[M - H]^-$ (calcd for $C_{10}H_9O_6$, 225.04046).

2,3,4-Trihydroxy-6-(methoxymethyl)-5-methylbenzaldehyde (5): brown, amorphous solid; UV (λ_{max} MeOH) 234.5, 305.1 nm; 1H and ^{13}C NMR data, see Table 3; HRESIMS m/z 235.0577 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{10}H_{12}O_5Na$, 235.0571).

Biochemical Protein Kinase Inhibition Assay. The tested protein kinases were AKT1, ALK, ARK5, aurora B, AXL, FAK, IGF1-R, MEK1 wt, MET wt, NEK2, NEK6, PIM1, PLK1, PRK1, SRC, and VEGF-R2. Experiments were conducted as described before.⁴³

HDAC Inhibiting Assay. *In vitro* total HDAC activity (classes I, II, and IV) was measured using 25 μ g of total protein extract from K-562

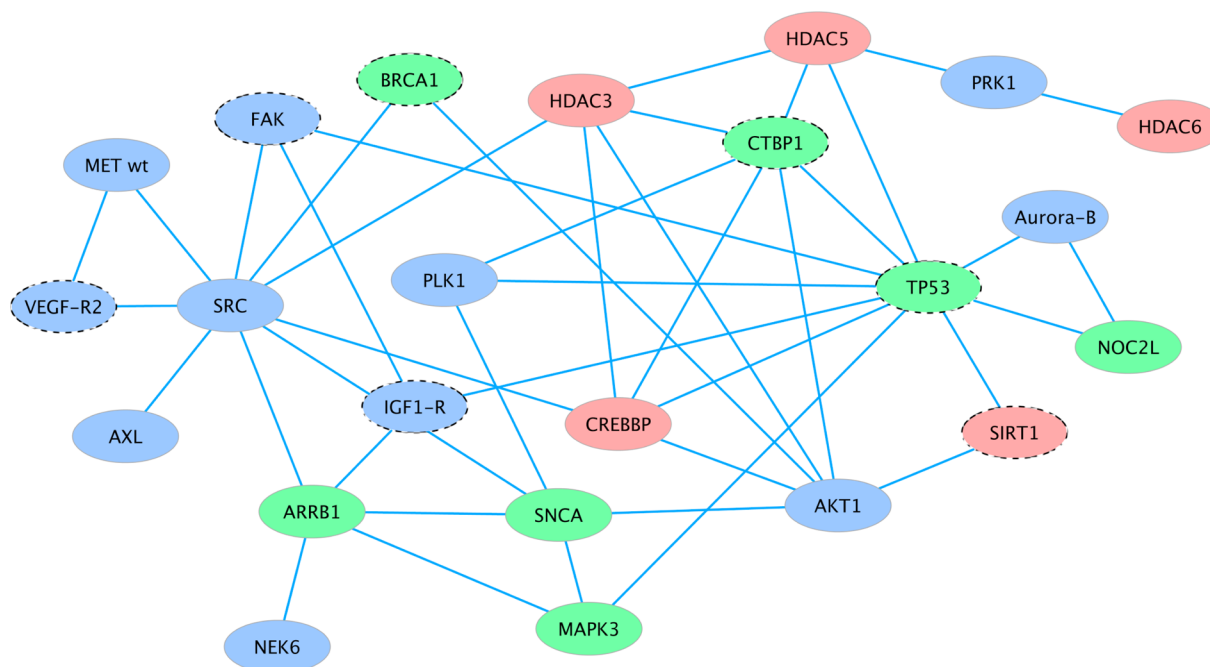


Figure 5. Network view of the interactions between kinases (blue) inhibited by compounds **1** and **10** and (de)acetylation effectors (red) or regulators (green). Proteins linked to cell proliferation have a dashed border. AKT1: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; ARR1: beta-arrestin-1; Aurora-B: aurora kinase B; AXL: tyrosine-protein kinase receptor UFO; BRCA1: breast cancer type 1 susceptibility protein; CREBBP: cAMP response element binding protein-binding protein; CTBP1: C-terminal-binding protein 1; FAK: cDNA FLJ37680 fis, clone BRHIP2012923, highly similar to focal adhesion kinase 1 (EC 2.7.1.112); HDAC: histone deacetylase; IGF1-R insulin-like growth factor 1 receptor; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MET wt: SAFB-like transcription modulator; NEK6: serine/threonine-protein kinase Nek6; NOC2L: nucleolar complex protein 2 homologue; PLK1: serine/threonine-protein kinase PLK1; PRK1: serine/threonine-protein kinase N1; SIRT1: sirtuin-1; SNCA: alpha-synuclein; SRC: proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; TP53: cellular tumor antigen p53; VEGF-R2: vascular endothelial growth factor receptor 2.

cells incubated for 45 min at 37 °C with a synthetic substrate (Fluor-de-Lys deacetylase substrate, Enzo Life Sciences, Antwerpen, Belgium) and a range of concentrations of compounds. Reaction was stopped by addition of a developing solution (Fluor-de-Lys developer I concentrate, Enzo Life Sciences) containing SAHA (2 μ M). After 15 min of incubation at room temperature, fluorescence signal was measured on a fluorescence microplate reader (Spectra MAX Gemini, Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA) using the Soft Max Pro software with an exciting wavelength of 360 nm and emission wavelength of 460 nm. All dilutions were prepared in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; and 1 mM MgCl₂.

In vitro HDAC isoform activities were tested using recombinant proteins (Enzo Life Sciences) incubated with the substrate Fluor-de-Lys-SIRT1 (Enzo Life Sciences), except for HDAC8, which needed the substrate Fluor-de-Lys-HDAC8. The quantity of enzymes per well, concentration of substrates and cofactor, and incubation times were used as previously described.⁴⁴ Reactions were stopped by adding a developer II solution (Fluor-de-Lys developer II concentrate, Enzo Life Sciences) containing 2 μ M SAHA for 10 min at room temperature. The fluorescence was measured in a same manner as total HDAC activity. Buffer used contained 50 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1 mg/mL BSA, except for HDAC8, which needed in addition 10% of polyethylene glycol.

Cell Proliferation Assay. The acute myeloid leukemia U-937 cell line and the Burkitt's lymphoma RAJI cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). PBMCs were isolated as previously reported.⁴⁵ All cells were cultured in RPMI 1640 (BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (BioWhittaker) and 1% antibiotic-antimycotic (BioWhittaker) at 37 °C in a humid atmosphere and 5% CO₂. Cell proliferation and viability were measured as described previously.⁴⁵ As negative controls, cells were treated with DMSO.

Network Analysis. To find whether kinases inhibited by compounds **1** and **10** are linked to histone (de)acetylation activity proteins or their regulators, we first built the interactome of these

kinases. We retrieved interactions using the Mentha database (<http://mentha.uniroma2.it>). The network was built in Cytoscape,⁴⁶ and associated GO annotations were retrieved from <http://www.geneontology.org/ontology/>. These annotations were used to flag proteins as follows: (1) Proteins matching histone acetylation, histone deacetylation, or histone deacetylase activity were flagged as histone (de)acetylation; (2) proteins matching histone deacetylase regulator, regulation of histone acetylation, or regulation of histone deacetylation were flagged as (de)acetylation regulators. The network was subsequently filtered to keep only kinase neighbors with either histone (de)acetylation activity or regulator activity. Proteins associated with cell proliferation were found by matching cell proliferation in their associated GO biological processes.

■ ASSOCIATED CONTENT

§ Supporting Information

¹H, ¹³C, and 2D NMR and MS spectra for compounds **1–5** are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +49 211 81 14163. Fax: +49 211 81 11923. E-mail: proksch@uni-duesseldorf.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant of the BMBF awarded to P.P. C.S. is a recipient of a doctoral grant from Télévie Luxembourg. M.S. is supported by a "Waxweiler grant for cancer prevention research" from the Action Lions "Vaincre le Cancer". This work was supported by Télévie Luxembourg, the

“Recherche Cancer et Sang” Foundation, and “Recherches Scientifiques Luxembourg” Association. The authors thank the “Een Häerz fir Kriibskrank Kanner” Association and the Action Lions “Vaincre le Cancer” for generous support. Further support was received from the European Union (ITN “RedCat” 215009 and Interreg IVa project “Corena”). M.D. is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for the Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant (grant number 2012-0001184), by the Seoul National University Research grant, and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU.

■ REFERENCES

- (1) Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1829–1845.
- (2) Aly, A. H.; Debbab, A.; Kjer, J.; Proksch, P. *Fungal Diversity* **2010**, *41*, 1–16.
- (3) Oumzil, H.; Ghoulami, S.; Rhajaoui, M.; Iidirissi, A.; Fkih-Tetouani, S.; Faïd, M.; Benjouad, A. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 727–731.
- (4) Araujo, F. D. d. S.; Favaro, L. C. d. L.; Araujo, W. L.; Lazzarotto de Oliveira, F.; Aparicio, R.; Marsaioli, A. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 5225–5230.
- (5) Wang, J.-M.; Ding, G.-Z.; Fang, L.; Dai, J.-G.; Yu, S.-S.; Wang, Y.-H.; Chen, X.-G.; Ma, S.-G.; Qu, J.; Xu, S.; Du, D. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1240–1249.
- (6) Shu, Y.-Z.; Ye, Q.; Li, H.; Kadow, K. F.; Hussain, R. A.; Huang, S.; Gustavson, D. R.; Lowe, S. E.; Chang, L.-P.; Pirnik, D. M.; Kodukula, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2295–2298.
- (7) Guo, H.; Sun, B.; Gao, H.; Chen, X.; Liu, S.; Yao, X.; Liu, X.; Che, Y. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2115–2119.
- (8) Zhang, Y.; Liu, S.; Che, Y.; Liu, X. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1522–1525.
- (9) Bell, P. J. L.; Karuso, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9304–9305.
- (10) Bamford, P. C.; Norris, G. L. F.; Ward, G. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1961**, *44*, 354–356.
- (11) Deffieux, G.; Baute, M. A.; Baute, R.; Filleau, M. J. *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 1102–1105.
- (12) Deffieux, G.; Filleau, M. J.; Baute, R. *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 1106–1109.
- (13) Kleinwachter, P.; Dahse, H. M.; Luhmann, U.; Schlegel, B.; Dornberger, K. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 521–525.
- (14) Talontsi, F. M.; Dittrich, B.; Schüffler, A.; Sun, H.; Laatsch, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3174–3180.
- (15) Kemami Wangun, H. V.; Ishida, K.; Hertweck, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 3781–3784.
- (16) Abdel-Lateff, A.; Fisch, K. M.; Wright, A. D.; König, G. M. *Planta Med.* **2003**, *69*, 831–834.
- (17) Ishikawa, Y.; Ito, T.; Lee, K. H. *Jpn. Oil Chem. Soc.* **1996**, *45*, 1321–1325.
- (18) Lee, N. H.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*, 877–879.
- (19) Vertesy, L.; Kurz, M.; Markus-Erb, A.; Toti, L. WO 2005/047275 A1, 2005.
- (20) Fabian, M. A.; Biggs, W. H.; Treiber, D. K.; Atteridge, C. E.; Azimioara, M. D.; Benedetti, M. G.; Carter, T. A.; Ciceri, P.; Edeen, P. T.; Floyd, M.; Ford, J. M.; Galvin, M.; Gerlach, J. L.; Grotzfeld, R. M.; Herrgard, S.; Insko, D. E.; Insko, M. A.; Lai, A. G.; Lelias, J.-M.; Mehta, S. A.; Milanov, Z. V.; Velasco, A. M.; Wodicka, L. M.; Patel, H. K.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 329–336.
- (21) Boly, R.; Gras, T.; Lamkami, T.; Guissou, P.; Serteyn, D.; Kiss, R.; Dubois, J. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 833–842.
- (22) Li, R.; Morris, S. W. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 372–412.
- (23) Roskoski, R., Jr. *Pharmacol. Res.* **2013**, *68*, 68–94.
- (24) Mologni, L. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2012**, *21*, 985–994.
- (25) Verma, A.; Warner, S. L.; Vankayalapati, H.; Bearss, D. J.; Sharma, S. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1763–1773.
- (26) Hauck, C. R.; Hsia, D. A.; Schlaepfer, D. D. *IUBMB Life* **2002**, *53*, 115–119.
- (27) Jones, H. E.; Goddard, L.; Gee, J. M. W.; Hiscox, S.; Rubini, M.; Barrow, D.; Knowlden, J. M.; Williams, S.; Wakeling, A. E.; Nicholson, R. I. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11*, 793–814.
- (28) Gross, J.; Yee, D. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22*, 327–336.
- (29) Wheeler, D. L.; Iida, M.; Dunn, E. F. *Oncologist* **2009**, *14*, 667–678.
- (30) Holmes, K.; Roberts, O. L.; Thomas, A. M.; Cross, M. J. *Cell. Signalling* **2007**, *19*, 2003–2012.
- (31) Matsumoto, T.; Mugishima, H. *J. Atheroscler. Thromb.* **2006**, *13*, 130–135.
- (32) Ma, P.; Maulik, G.; Christensen, J.; Salgia, R. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**, *22*, 309–325.
- (33) Gentile, A.; Trusolino, L.; Comoglio, P. *Cancer Metastasis Rev.* **2008**, *27*, 85–94.
- (34) Peruzzi, B.; Bottaro, D. P. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 3657–3660.
- (35) Nassirpour, R.; Shao, L.; Flanagan, P.; Abrams, T.; Jallal, B.; Smeal, T.; Yin, M.-J. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 717–728.
- (36) de Ruijter, A. J.; van Gennip, A. H.; Caron, H. N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A. B. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 737–749.
- (37) Florean, C.; Schneckeburger, M.; Grandjette, C.; Dicato, M.; Diederich, M. *Epigenomics* **2011**, *3*, 581–609.
- (38) Seidel, C.; Schneckeburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Genes Nutr.* **2012**, *7*, 357–367.
- (39) Seidel, C.; Florean, C.; Schneckeburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochimie* **2012**, *94*, 2264–2279.
- (40) Schneckeburger, M.; Diederich, M. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **2012**, *8*, 66–81.
- (41) Saijo, K.; Katoh, T.; Shimodaira, H.; Oda, A.; Takahashi, O.; Ishioka, C. *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 1994–2001.
- (42) Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 479–490.
- (43) Niemann, H.; Lin, W.; Müller, W. E. G.; Kubbutat, M.; Lai, D.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 121–125.
- (44) Seidel, C.; Schneckeburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Cancer Lett.* **2013**, in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.026>.
- (45) Schneckeburger, M.; Grandjette, C.; Ghelfi, J.; Karius, T.; Foliguet, B.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 364–378.
- (46) Smoot, M. E.; Ono, K.; Ruschinski, J.; Wang, P. L.; Ideker, T. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 431–432.



Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases



Carole Seidel^a, Michael Schnekenburger^a, Mario Dicato^a, Marc Diederich^{a,b,*}

^a Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

^b Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2013

Received in revised form 14 September 2013

Accepted 23 September 2013

Keywords:

Acetylation
HDAC inhibitor
Cell cycle arrest
Apoptosis
Leukemia
Cancer

ABSTRACT

Histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) regulate cellular processes by modifying the acetylation status of many proteins. Pathologically altered HDAC activity contributes to cancer development and thus characterization of novel acetylation modulators is important for future anti-cancer therapies.

In this study, we identified three novel 4-hydroxybenzoic acid derivatives as pan-HDAC inhibitors that increased protein acetylation levels, arrested cell cycle progression and triggered apoptotic cell death, without affecting viability of normal cells. Our data support the potential of 4-hydroxybenzoic acid derivatives as pan-HDAC inhibitors with anticancer properties.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lysine acetylation is a major post-translational modification regulating function, activity, subcellular localization and protein-protein interaction. Histone acetylation controls gene expression together with other histone modifications and epigenetic mechanisms including DNA methylation. Enzymes responsible for addition and removal of histone acetylation were identified as histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), respectively [6].

As altered acetylation profiles were associated to tumor development, HDACs became an interesting target for anticancer therapy [8,22,27]. HDAC family comprises 18 members, subdivided in four classes (Class I: HDACs 1, 2, 3 and 8; class II: HDACs 4, 5, 6, 7, 9 and 10; class IV: HDAC11; class III, also called sirtuins (SIRT): SIRT1 to 7) based on activity, sequence similarity and cellular localization.

To date, numerous proteins were reported as HDAC targets: Class I HDACs maintain proliferation and survival of cancer cells by inhibiting p53 or p21 expression [33]. HDAC5 and 9 repress transcriptional activity of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) and

Yin Yang 1 (YY1) that prevent cardiac hypertrophy [4,30]. HDAC6 deacetylates α -tubulin and cortactin, which contribute to the polymerization of microtubule and actin filaments, thus affecting cellular mobility and division [12,35].

Inhibition of HDAC activity became an interesting therapeutic target for patients relapsing or refractory to classical chemotherapy [8,22,27]. HDAC inhibitors (HDACi) lead to hyper-acetylation of histone and non-histone proteins inducing differentiation, inhibition of cell cycle progression and/or apoptotic cell death. HDACi target many cancer cell models with moderate effects on normal cells [9,28]. HDACi inhibit aberrant cell cycle progression by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A, p21) and by inhibiting cyclin E [7,11,20]. In addition, HDACi induce cell death by inducing or inhibiting transcription of pro-apoptotic (e.g. Bim) or anti-apoptotic (e.g. survivin) proteins [3,34].

Accordingly, over the last decades, numerous natural and synthetic HDACi were identified. So far, Food and Drug Administration approved Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) against zinc-dependent HDACs and Romidepsin (FK228, FR901228) against class I HDACs for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma [10,21]. However, improved HDACi are required for increased specificity and reduced side effects.

Here, we describe novel 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA)-based compounds with HDAC inhibitory properties. Biological activities on proliferation, cell cycle progression and apoptotic cell death were characterized in both normal and cancer cells.

* Corresponding author. Address: Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 20, Room 303, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Republic of Korea. Tel.: +82 2 880 8919.

E-mail address: marcdiederich@snu.ac.kr (M. Diederich).

Table 1

In vitro screening of 4-hydroxybenzoic acid derivatives on total HDAC activity. Values represent percentage of residual activity at 100 μ M. Inactive means that 100 μ M of compounds is not enough to inhibit 10% of HDAC activity.

Compounds	Residual activity at 100 μ M (%)
1b	90
3b	60
4b	90
4f	85
4g	Inactive
5b	65
6a	Inactive
6b	85
6c	85
6d	80
6e	80
7a	85
7b	85
7c	Inactive
7e	Inactive
8b	80
9b	80
9d	70
10b	90
11b	80
12a	60
13a	75
13b	90
13c	65
17b	75
22a	Inactive

2. Materials and methods

2.1. Compounds

Derivatives of 4-HBA: 1b, 3b, 4b, 4f, 4g, 5b, 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 7a, 7b, 7c, 7e, 8b, 9b, 9d, 10b, 11b, 12a, 13a, 13b, 13c, 17b, 22a, were synthesized as previously described [15]. 4-HBA derivatives, SAHA (Cayman, Bio-connect, Huissen, The Netherlands) and etoposide (VP16; Sigma, Bornem, Belgium) were dissolved in DMSO.

2.2. *In vitro* HDAC activity assay

In vitro total HDAC activity (classes I, II and IV) was measured according to manufacturers instructions using 25 μ g of total protein extract from K-562 cells incubated for 45 min at 37 °C (Fluor-de-Lys[®], Enzo[®] Life Sciences, Antwerpen, Belgium). Reaction was stopped by addition of a developing solution (Fluor-de-Lys[®] developer I concentrate, Enzo[®] Life Sciences) containing SAHA (2 μ M). After 15 min of incubation at room temperature, fluorescence signal was measured on a fluorescence microplate reader (Spectra MAX Gemini, Molecular devices, Inc. Sunnyvale, CA, USA) using the Soft Max Pro software with an exiting wavelength of 360 nm and emission wavelength of 460 nm. All dilutions were prepared in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl and 1 mM MgCl₂.

In vitro HDAC isoenzyme activities were tested using recombinants proteins (Enzo[®] Life Sciences) incubated with the substrate Fluor-de-Lys[®]-SIRT1 (Enzo[®] Life Sciences), except for HDAC8 requiring Fluor-de-Lys[®]-HDAC8 substrate. Quantity of enzymes per well, concentration of substrates and cofactor, and incubation times are presented in supplementary data (Table S1). Reactions were stopped by adding a developer II solution (Fluor-de-Lys[®] developer II concentrate, Enzo[®] Life

Table 2

In vitro inhibition of selected HDAC isoenzymes by 4-hydroxybenzoic acid derivatives. Inactive means that 100 μ M of compounds is not enough to inhibit 50% of HDAC activity. Compounds 3b, 5b, 6d, 7b, 8b, 12a and 13a are inactive against HDAC1, 2, 3, 8, 10 and 11.

Compounds	IC ₅₀ (μ M)									
	Class I				Class IIb		Class III			Class IV
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC6	HDAC10	SIRT1	SIRT2	SIRT3	HDAC11
6e	11	61	Inactive	14	69	100	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
9d	82	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	ND	ND	ND	100
13b	5	40	75	Inactive	Inactive	Inactive	12	56	96	4
13c	12	8	Inactive	Inactive	14	Inactive	29	Inactive	Inactive	0.6
17b	Inactive	Inactive	Inactive	77	Inactive	Inactive	ND	ND	ND	Inactive
SAHA	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	NA	NA	NA	0.1

ND: not determined, NA: not applicable.

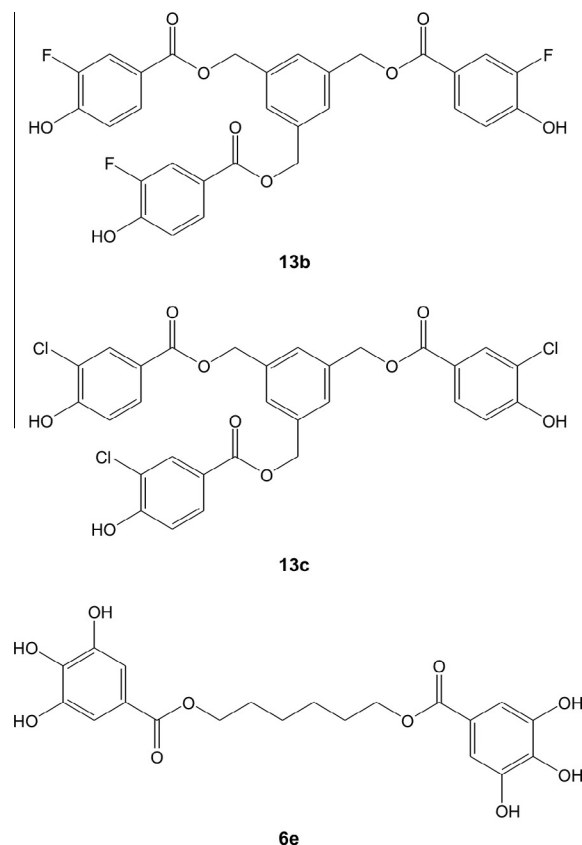


Fig. 1. Chemical structure of the 4-hydroxybenzoic acid derivatives 13b, 13c and 6e.

Sciences) containing 2 μ M SAHA for HDACs from classes I, II and IV, or 1 mM nicotinamide for sirtuins. After 10 min of incubation at room temperature, fluorescence is measured as for total HDAC activity in 50 mM Tris-HCl pH 8; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1 mM MgCl₂ and 1 mg/mL BSA, except for HDAC8 requiring in addition 10% of polyethylene glycol.

2.3. Cell culture and treatment

Chronic myelogenous leukemia K-562, histiocytic lymphoma U-937, breast cancer MCF-7, prostate cancer PC-3, erythroleukemia TF-1, Burkitt's lymphoma RAJ1, neuroblastoma SK-N-AS and the non-tumorigenic mammary epithelial MCF-10A cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated as previously reported [23]. All cells, except MCF-10A, were cultured in RPMI 1640 (BioWhittaker[®], Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (BioWhittaker[®]) and 1% antibiotic-antimycotic (BioWhittaker[®]) at 37 °C in humid atmosphere and 5% CO₂. MCF-10A cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 supplemented with 5% heat-inactivated horse serum (BioWhittaker[®]), 100 ng/ml cholera toxin (Sigma), 0.5 mg/ml hydrocortisone (Sigma), 10 mg/ml insulin (Sigma) and 20 ng/ml recombinant human epidermal growth factor (Sigma).

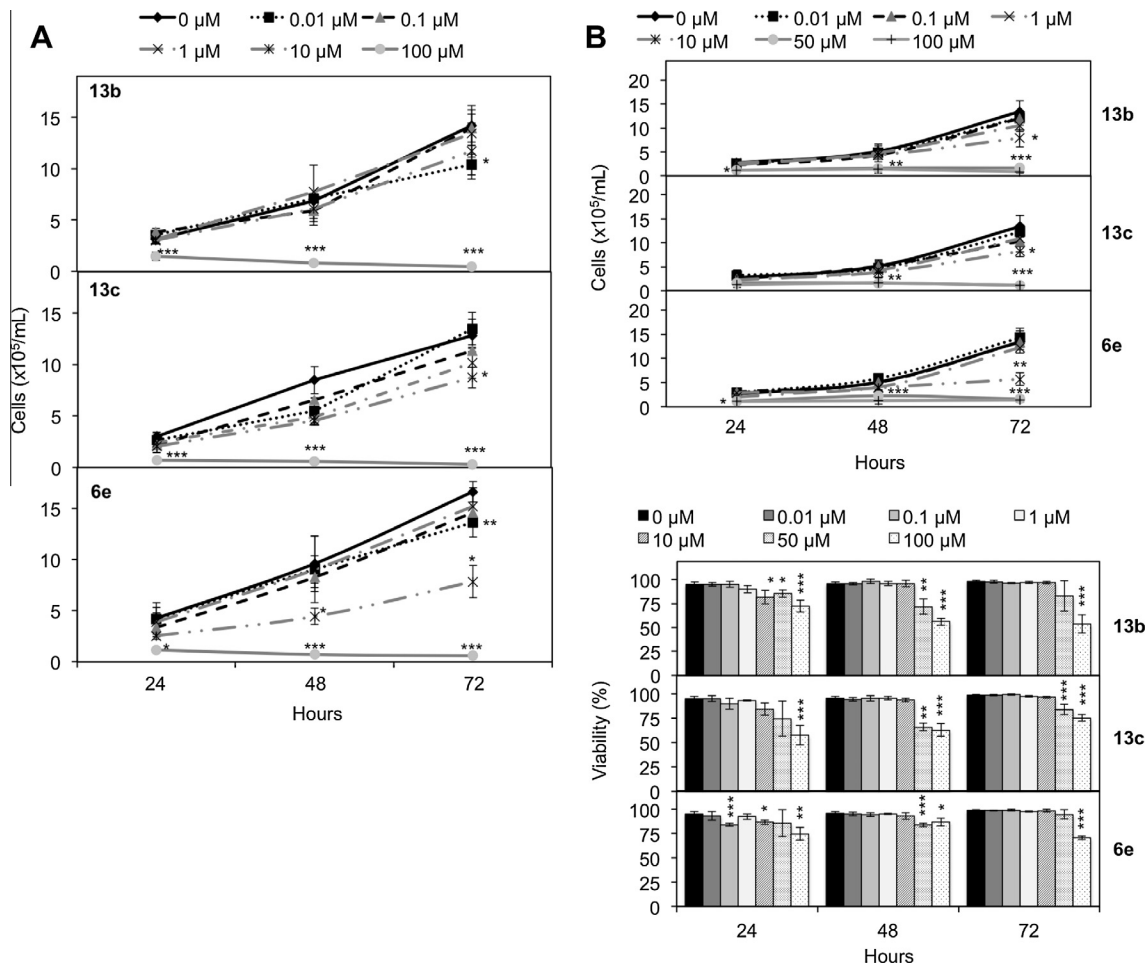


Fig. 2. 4-hydroxybenzoic acid derivatives inhibit normal and cancer cell proliferation and viability. (A) K-562 cells were treated with the indicated concentration of 4-HBA derivatives. After 24, 48 and 72 h cell numbers were determined. Results correspond to mean \pm SD of three independent experiments. PC-3 (B), TF-1 (C), RAJ1 (D), SK-N-AS (E), MCF-10A (F) cells were treated by a range of concentration of 4-HBA derivatives. After 24, 48 and 72 h proliferation and viability were evaluated. Results correspond to mean \pm SD of three independent experiments. *, **, *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$ versus untreated cells, respectively. (G) Lymphocyte population (pink circle) was analyzed by flow cytometry using a biparametric analysis of cell size (FSC-H) versus cell granularity (SSC-H) after 48 h of treatment with 100 μ M of compounds. Plots are representative of two independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.).

2.4. Cell viability test

Cells were processed through a semi-automated image-based cell analyzer (Cedex XS Innovatis, Roche, Luxembourg). Lymphocyte population was analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur™ system driven by Cell Quest Pro software (BD Biosciences) based on cell size (FSC-H) and granularity (SSC-H). Data were analyzed by FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA).

2.5. Erythroid differentiation analysis

Determination of erythroid differentiation was scored by the benzidine staining method as previously described [25].

2.6. Western Blot analysis

For preparation of total proteins, cells were harvested, washed in cold 1x PBS, and lysed in MPER® (Thermo-scientific, Erembodegem-Aalst, Belgium) supplemented by 1x protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free, Roche, Prohac, Luxembourg, Luxembourg) according to manufacturer's instructions. Histones were enriched as previously described [19]. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands). Membranes were incubated sequentially with a blocking agent, a primary antibody [form Cell Signaling, Leiden, The Netherlands: BID (200), Bim (2819), caspase 3 (9668), caspase 7 (9494), caspase 8 (9746), caspase 9 (9502), cyclin A (4656S), cyclin D1 (2926), cyclin E (4129), Mcl-1 (4572), poly-ADP ribose polymerase (PARP, 9542); from Santa Cruz Biotechnology, Tebubio, Boechout, Belgium: acetylated α -tubulin (sc-23950); from Millipore, Brussels, Belgium: Bcl-2 (OP60), cyclin B1 (5373), acetylated histone H4 (31992), acetylated histones

H3K9 (1692626), H3K14 (1548623), H4K8 (1676174), H4K16 (1687546); from R&D Systems, Abingdon, UK: Survivin (AF886); from BD Biosciences, Erembodegem, Belgium: Bcl-xl (610212), XIAP (61763)]; and the corresponding secondary antibody. β -actin (A5441, Sigma) and Coomassie blue (LKB, Villeneuve-la-Garenne, France) were used as loading controls for non-histone and histone proteins, respectively. Chemo-luminescence signal is detected with the kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands) and ImageQuant LAS 4000 mini system (GE Healthcare). Quantification of Western Blots was performed with ImageQuant TL (GE Healthcare) using the Rolling Ball method for background subtraction. Results are represented as histograms corresponding to the mean \pm SD of the quantification of three different blots using samples from three independent treatments and reported to the control of each blot.

2.7. Cell cycle analysis

Cells were washed with 1x PBS then fixed at 4 °C with 70% ethanol. After 20 min of incubation in the dark with propidium iodide (Sigma, 1 μ g/mL) and RNase A (Roche, 0.1 μ g/mL), samples were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur™ system driven by Cell Quest Pro software. Data were analyzed by Dean-Jet-Fox method in FlowJo software.

2.8. Gene expression analysis by Q-RT-PCR

Total RNAs were extracted with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following supplier's instructions. Reverse transcription was assay with incubation of 1 μ g of RNA and 0.5 μ g of oligo-dT (Promega) at 70 °C for 10 min followed by 5 min at 4 °C. Then, enzyme buffer, dNTP (0.5 mM each), DTT (0.1 M), RNase inhibitor (40 units/ μ L) and 2.5 units of reverse transcriptase (Promega) were added for 1h30 at 42 °C followed by 15 min at 70 °C. RNA were digested by 40 units of RNase

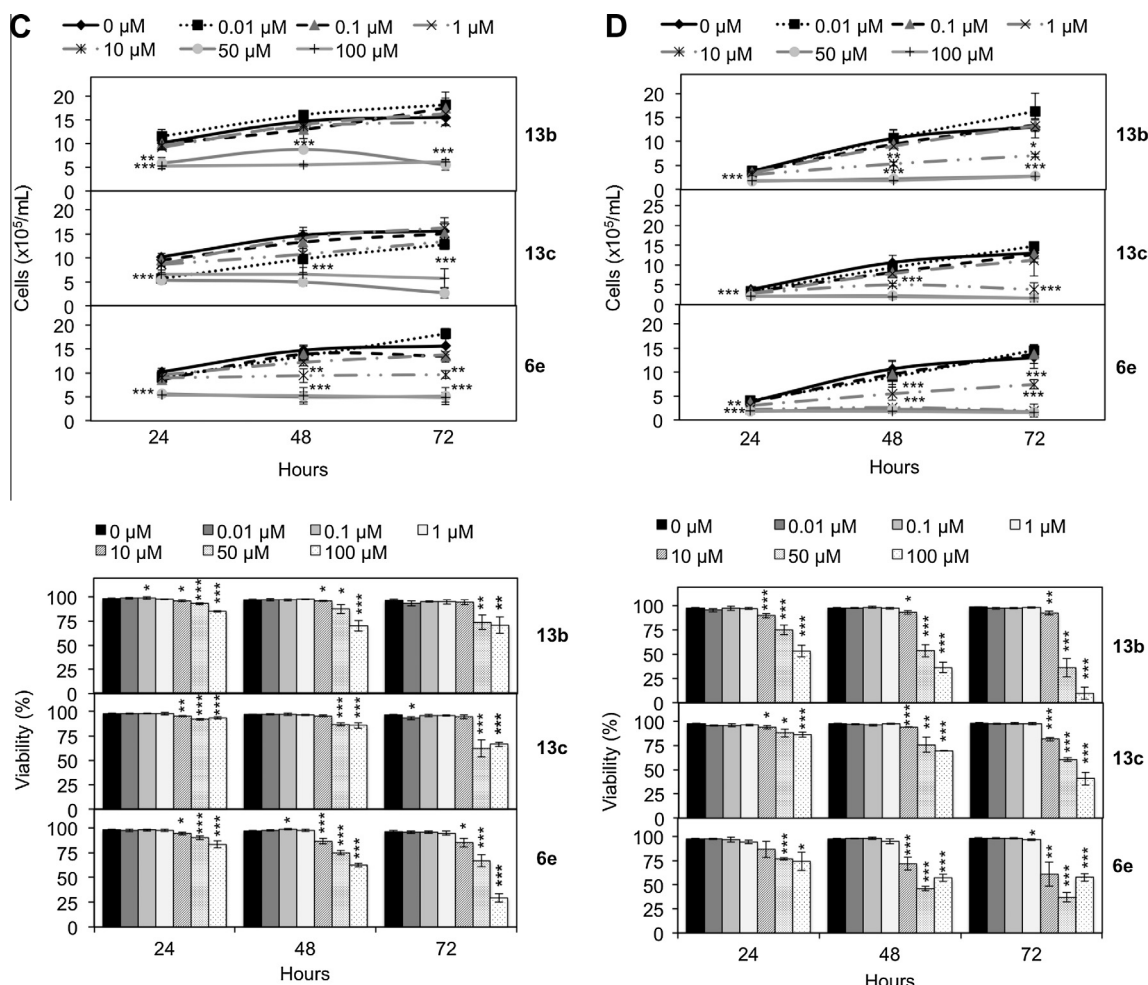


Fig. 2 (continued)

H at 37 °C for 30 min and cDNA were storage at -20 °C. Real-time PCR was performed with 8 ng of cDNA in presence of Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Halle, Belgium) and 0.1 μM of primers (Eurogentec, Liege, Belgium, *β-actin*: forward 5'-CTCTCCAGCCTTCTCTCT-3', reverse 5'-AGCACTGTGTGGCGTACAG-3'; *CDKN1A* (p21): forward 5'-GACTCTCAGGGTCGAAAACG-3', reverse 5'-GGAT-TAGGGCTTCCTCTTGG-3'; BimEL: forward 5'-CAACACAAACCCCAAGTCCT-3', reverse 5'-TCTTGGGCGATCCATATCTC-3'; BimLEL: forward 5'-AGATCCCCGCTTTTCATCT-3', reverse 5'-TACCACTGGAGGATCGAGA-3', BimSLEL: forward 5'-AATTACCA AGCAGCCGAAGA-3', reverse 5'-CAATGCATTCTCCA CACCAG-3'). Amplification and detection were realized in 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem) driven by 7300 System software. Cycle threshold (Ct) were obtained and converted in $2^{-\Delta Ct}$.

2.9. Mitosis analysis

Cells were stained using the kit Diff-Quik (Medion Diagnostics) following the protocol described by the supplier. Cells in mitosis were then identified by standard light microscopy.

2.10. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP was assessed as previously described [13] using the following antibodies: RNA polymerase II (Millipore, 05-623), acetylated histone H4 (Millipore, 31992) and normal mouse IgG (Santa Cruz, sc-2025). Primers were designed to target the basal promoter region of *CDKN1A* (p21) and *BCL2L11* (Bim) genes (sequences are available on request).

2.11. Apoptosis analysis

Microscopic analyses of apoptotic cells were assessed as described previously [5].

2.12. Statistical analysis

Variation between samples were evaluated using Student's *t*-test and the significant threshold was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. In vitro screening of 4-hydroxybenzoic acid derivatives

We screened 26 derivatives of 4-HBA *in vitro* to characterize novel HDACi (Table 1). Compounds 4g, 6a, 7c, 7e and 22a were inactive *in vitro*, remaining molecules inhibited 10–40% of total HDAC activity. SAHA was used as a control (IC₅₀: 136 nM). Active compounds were further tested on HDAC1, 2, 3, 8, 6, 10 and 11 and SIRT1, 2 and 3 (Table 2). Compounds 6e, 9d, 13b, 13c, 17b had an IC₅₀ under 100 μM on one or more HDAC isoenzymes.

3.2. 4-Hydroxybenzoic acid derivatives inhibit K-562 cell proliferation

Based on previous results, compounds 13b, 13c and 6e (Fig. 1) were investigated on human K-562 leukemia cells. As shown in Fig. 2A, 100 μM of these compounds inhibited cell proliferation after 24–72 h of treatment. After 24 h of treatment, cell proliferation is reduced by treatments with 13b, 13c and 6e of 41%, 21% and 33% compared to the control. Interestingly, compound 6e decreased K-562 cell proliferation at 10 μM after 48 h of treatment by up to 46%.

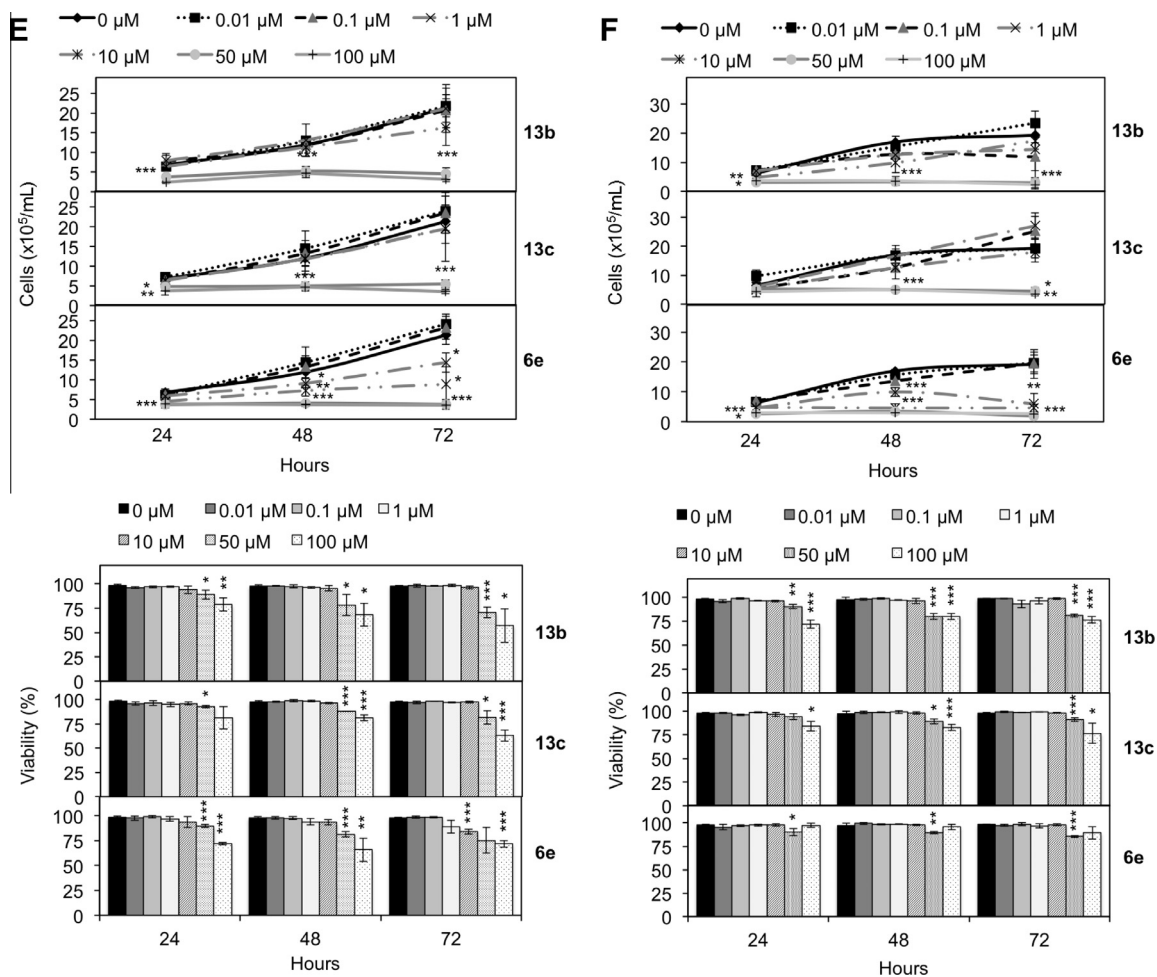


Fig. 2 (continued)

In order to generalize our initial findings, we assessed the effect of 4-HBA derivatives on cell proliferation, viability and bioselectivity for various types of cancer cells. Additional cell models were treated with compounds 13b, 13c and 6e for up to 72 h (Fig. 2B–F). Although compounds decreased proliferation and viability of PC-3, TF-1, RAJI and SK-N-AS cancer cell lines between 50 and 100 μM at 24 h of treatment, they had less effect on normal MCF-10A cells and did not alter the distribution of the lymphocyte population from healthy donors (Fig. 2G). These results strongly suggest that compounds 13b, 13c and 6e display an interesting differential toxicity against cancer cells and deserve further mechanistic investigations.

3.3. Accumulation of acetylated proteins in K-562 cells treated by 4-hydroxybenzoic acid derivatives

To assess *in cellulo* HDAC-inhibitory activity of compounds 13b, 13c and 6e, we analyzed acetylation status of histone and non-histone proteins. Based on a preliminary evaluation of the effect of these derivatives, we set a concentration of 50 μM to induce protein acetylation in K-562 cells. First, cells were treated for 6, 12 and 24 h and the acetylation status of total histone H4 (Ac H4), histones H3K9 and K14 and histones H4K8 and K16 were analyzed by Western Blot. K-562 cells treated with 2 μM SAHA for 24 h served as a positive control. Only compound 13c induced an increase of total histone H4 acetylation (Fig. 3A). Compound 13b induced acetylation of H4K8, H3K9 and H3K14, after 6 h of treatment and of

H4K16 after 24 h of treatment. Compound 13c induced acetylation of H4K8, H3K9 after 6 h of treatment and of H3K14 after 24 h of treatment. Finally, compound 6e only induced acetylation of H3K14 after 12 h of treatment.

Analysis of α -tubulin acetylation, a cytoplasmic substrate of HDAC, revealed that compound 13c increased α -tubulin acetylation after 24 h of treatment (Fig. 3B).

3.4. 4-Hydroxybenzoic acid derivatives affect K-562 cell cycle distribution

We next studied the effect of 13b, 13c and 6e on cell cycle progression. Cell cycle analysis was performed in K-562 cells treated with 50 μM of compounds for 6, 12, 24 and 48 h. Analysis of DNA content showed that compound 13b induced G2/M arrest after 12 h of treatment followed by G0/G1 arrest after 48 h of treatment (Fig. 4A). Moreover, compound 13c induced an accumulation in S phase after 48 h and compound 6e induced G0/G1 phase arrest after 6–24 h of treatment. In SAHA-treated cells, we observed a pronounced accumulation in G0/G1 phase after 24 and 48 h.

Data were confirmed by quantification of cells undergoing mitosis (Fig. 4B). Results showed that compound 13b inhibits mitotic index after 48 h, whereas compounds 13c and 6e strongly reduced mitotic index from 6 h of treatment.

In order to further investigate molecular mechanisms leading to both HDAC and cell cycle inhibition, we analyzed the impact

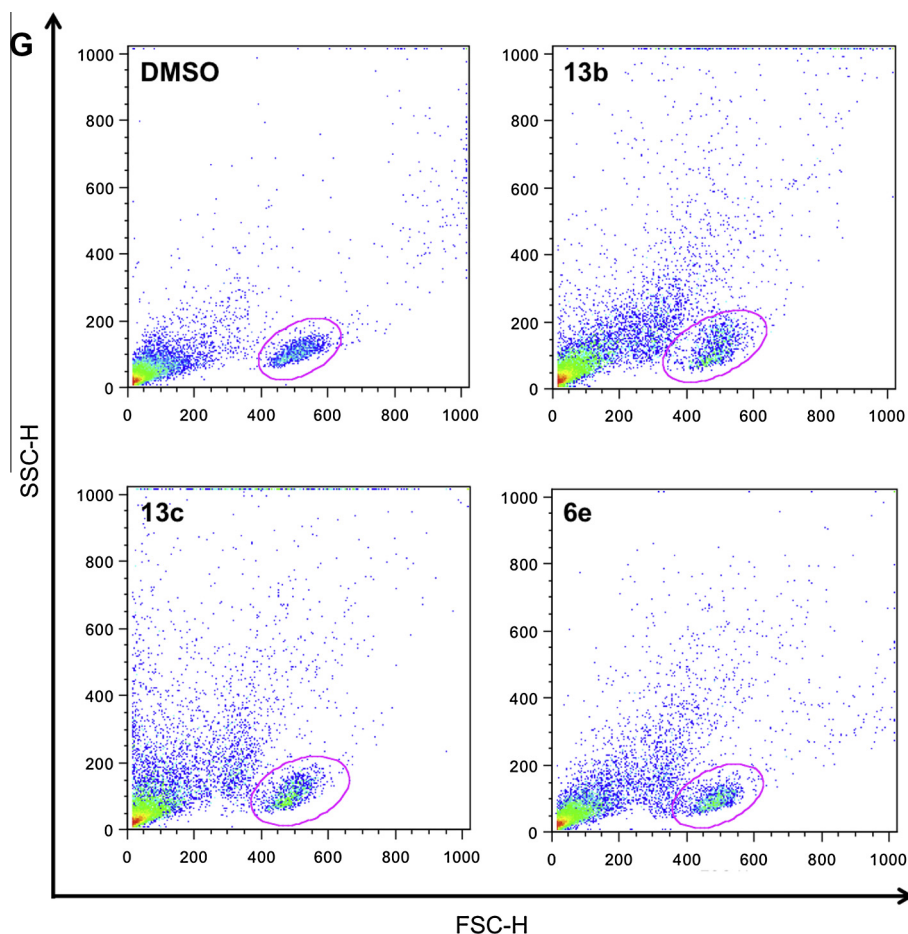


Fig. 2 (continued)

of 4-HBA derivatives on mRNA and protein expression levels of key cell cycle regulator *CDKN1A* (p21) in K-562 cells treated by 50 μ M of compounds for 6 and 12 h (Fig. 4C). Compound 13b and 13c had no effect on *CDKN1A* (p21) gene expression, but compound 6e strongly induced *CDKN1A* (p21) expression. As HDACi such as SAHA induce p21 expression by histone acetylation within its promoter [11], we performed ChIP assays for acetylated histone H4 and RNA polymerase II. After 8 h of treatment with SAHA, acetylated histone H4 and RNA polymerase II were enriched within the p21 promoter as expected (Fig. 4D). Among the three derivatives tested, only treatment with compound 6e induced an enrichment of these active marks at the p21 promoter in correlation with increased mRNA levels.

In addition, we analyzed the effect of compounds on cyclin A, B1, D1 and E protein levels by Western Blot (Fig. 4E). Compounds 13b, 13c and 6e decreased cyclin A and E protein levels in a time-dependent manner. Cyclin D1 expression is decreased after 6 h of treatment by compounds. Cyclin B1 decreased in a time-dependent manner after treatment by compound 13b, and increased after a short period of treatment by compounds 13c and 6e. These data are in agreement with the cell cycle arrest observed by flow cytometry.

Cell cycle arrest can be linked to an induction of differentiation or cell death. Considering that many molecules can trigger K-562 cell differentiation towards the erythroid pathway [24–26] and that many HDACi were reported to be able to modulate cell differentiation [14,16], we investigated whether decreased proliferation observed after treatment with 4-HBA derivatives might be due to an induction of erythroid differentiation. However, compounds

failed to induce a robust level of erythroid differentiation in K-562 cells (Supplementary data, Fig. S1).

3.5. 4-Hydroxybenzoic acid derivatives induce apoptotic cell death

Next, we investigated the effect of 4-HBA derivatives on K-562 cell viability. Compounds 13c and 6e induced a strong decrease of cell viability from 24 h of treatment and reached 69 and 49% of Trypan Blue-positive cells, respectively, after 72 h of treatment (Fig. 5A). Compound 13b induced a weaker decrease of cell viability with 24% of Trypan Blue-positive cells after 72 h of treatment.

These results were confirmed by observed nuclear condensation after 72 h of treatment by compounds 13c and 6e (about 80% of apoptotic cells) and to a lesser extent by compound 13b (34% of apoptotic cells) (Fig. 5B).

Moreover, cleavage of initiator pro-caspases -9 and -8, executioner caspases-7 and -3 and of their substrate, PARP, confirmed the induction of apoptosis (Fig. 5C). Nor Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, survivin or XIAP expression, nor cleavage of pro-apoptotic protein BID were affected (Supplementary data, Fig. S2). Interestingly, analysis of three splicing variants of pro-apoptotic Bim (BimEL, BimL and BimS) showed an increase of BimL levels after 6 and 12 h (Fig. 5D) indicating that increased BimL protein could contribute to induction of apoptotic cell death.

3.6. Effect of 4-hydroxybenzoic acid derivatives on other normal and cancer cell lines

In order to generalize and validate our findings, we investigated the effect of compounds 6e, 13b and 13c on the viability, nuclear

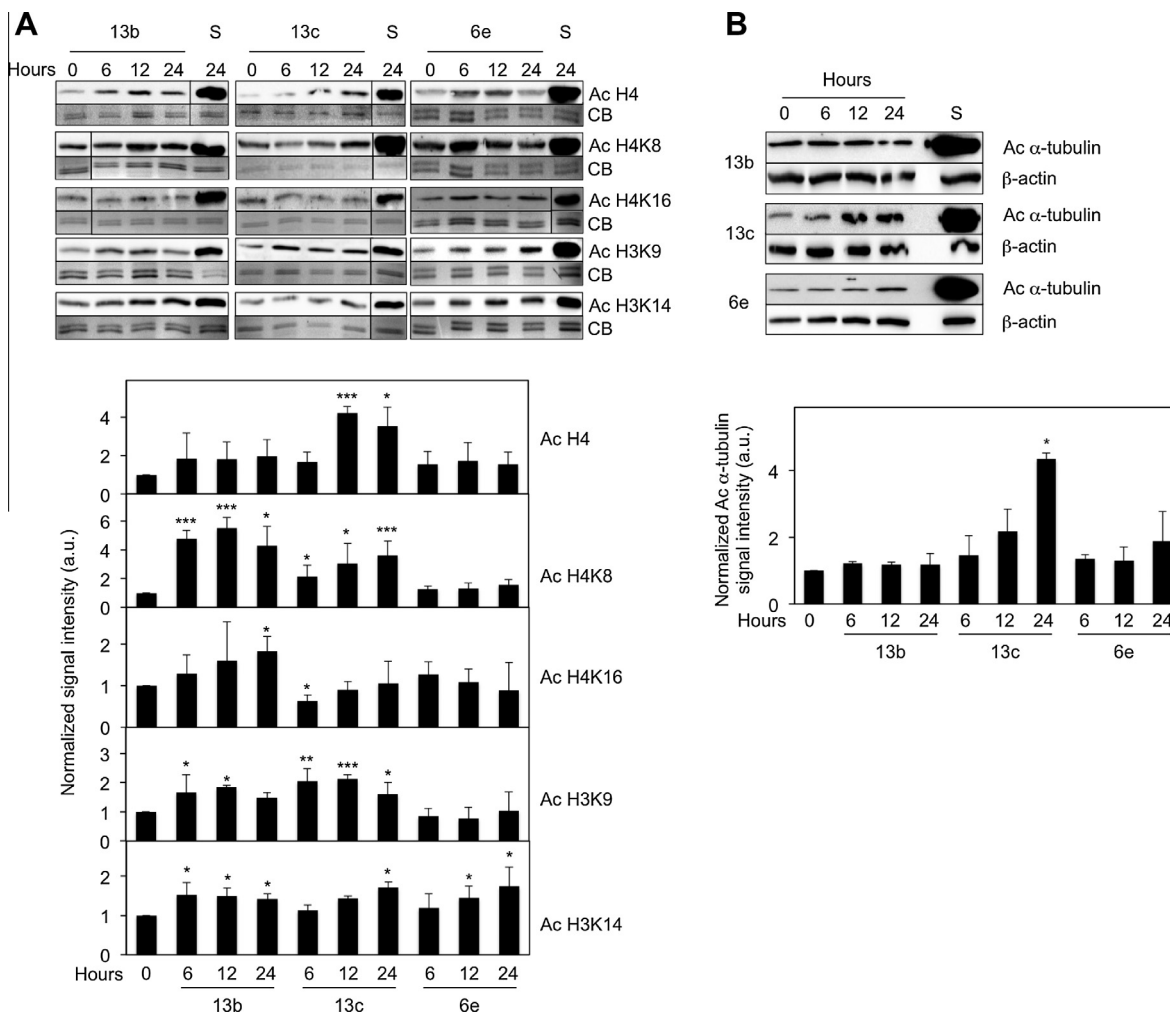


Fig. 3. Effect of compounds 13b, 13c and 6e on the acetylation status of HDAC targets. K-562 cells were treated for 6, 12 and 24 h with 50 μ M of the indicated 4-HBA derivatives. The acetylation (Ac) of histone H4 and specific lysine residues within histones H3 and H4 (A) as well as α -tubulin (B) was analyzed by Western Blot. β -actin and Coomassie Blue (CB) were used as loading controls. SAHA (S, 2 μ M) was used as a reference HDAC inhibitor. (A and B) Upper panel: blots represent chemiluminescence signal, lower panel: blot quantification. Blots are representative of three independent experiments. Histograms correspond to the mean \pm SD of the quantification of three independent experiments; values were reported to the control. All results presented correspond to mean \pm SD of three independent experiments. *, **, *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$ versus untreated cells, respectively.

morphology, cell cycle distribution and protein acetylation in PBMCs isolated from healthy patients and MCF-7 breast cancer cells. Although compounds reduced MCF-7 proliferation, they had a moderate effect on PBMC and MCF-7 cell viability (Fig. 6A), confirmed by an absence of apoptosis and necrosis (Fig. 6B). Regarding cell cycle distribution, compounds had no effect on PBMCs, which are mainly in G0/G1 phase as expected and had a moderate effect on MCF-7 cells (Fig. 6C). Furthermore, we observed an increased protein acetylation in MCF-7 cells (Fig. 6D) but not in PBMCs.

4. Discussion

HDACi were initially classified into five groups based on their chemical structure: short fatty acids, benzamide, hydroxamic acids, cyclic peptides and depsipeptides [28]. However, many potent molecules that do not belong to these classes were recently discovered.

Lamorale-Theys et al. reported biological effects of a series of "simple di- and trianillates" on several cancer cell lines in comparison to curcumin, a divanillate-based polyphenol well known

for its anti-inflammatory and chemopreventive properties [15]. Interestingly, curcumin was already reported to balance between HAT and HDAC activities to modulate expression of genes implicated in cancer death and progression [31]. Accordingly, we investigated here HDAC inhibitory effect and anti-tumor potential of di- and trianillates or 4-HBA derivatives.

Fig. 7 summarizes data obtained with 4-HBA derivatives in K-562 cells and links HDAC inhibition and observed cellular mechanisms. Indeed, three derivatives of 4-HBAs, 13b, 13c and 6e, are able to inhibit *in vitro* and *in cellulo* distinct HDAC isoenzymes localized in both nucleus and cytoplasm. These derivatives induce cell cycle arrest characterized by increased cell cycle inhibitor p21 expression and active transcription marks on its promoter, as well as by decreased cyclin levels. Moreover, we demonstrated that these compounds triggered apoptotic cell death in K-562 cells.

As we observed that several 4-HBA derivatives inhibit HDAC isoenzymes *in vitro*, we analyzed their effect on protein acetylation. *In vitro* inhibition is correlated to increased histone acetylation regulating transcription [29]. Distinctive patterns of isoenzyme inhibition and histone acetylation were also observed. HDAC3 leads to H3K9 deacetylation linked to histone deposition

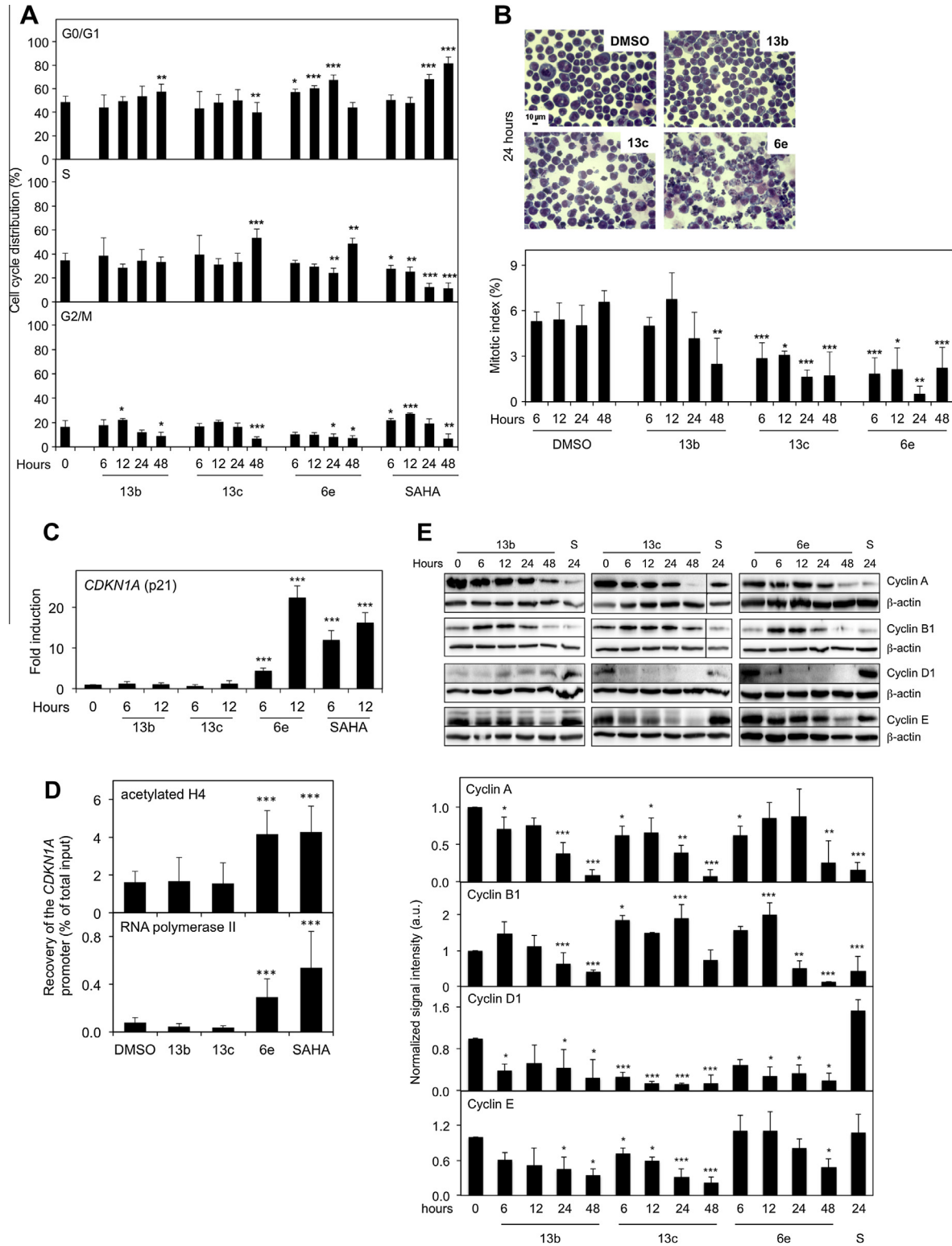


Fig. 4. Effect of 4-hydroxybenzoic acid derivatives on K-562 cell cycle. K-562 cells were treated by 50 μ M of 4-HBA derivatives, 2 μ M SAHA or DMSO vehicle for the indicated period of time. (A) Cells were stained with propidium iodide and DNA content was measured by flow cytometry to estimate cell cycle distribution. (B) K-562 cells were stained by May-Grünwald-Giemsa method and cells in mitotic phase were counted under microscope. Upper panel: Pictures represent cells after 24 h of treatment. Lower panel: histogram represents mitotic index. (C) mRNA were extracted and the expression level of *CDKN1A* (p21) was analyzed by Q-RT-PCR. (D) ChIP experiments were performed after 8 h of treatment using acetylated histone H4 and RNA polymerase II antibodies. Primers target the basal promoter of p21. Histograms show the percentage of recovery that represent the specific enrichment of the immunoprecipitate fraction compared to IgG and normalized to the input. (E) Total proteins were isolated and analyzed by Western Blot for the expression of cyclins. β -actin was used as loading control. Upper panel: blots represent chemiluminescence signal, lower panel: blot quantification. All results presented correspond to mean \pm SD of three independent experiments. Blots and pictures are representative of three independent experiments. Histograms correspond to the mean \pm SD of the quantification of three independent experiments; values were reported to the control. *, **, *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$ versus untreated cells, respectively.

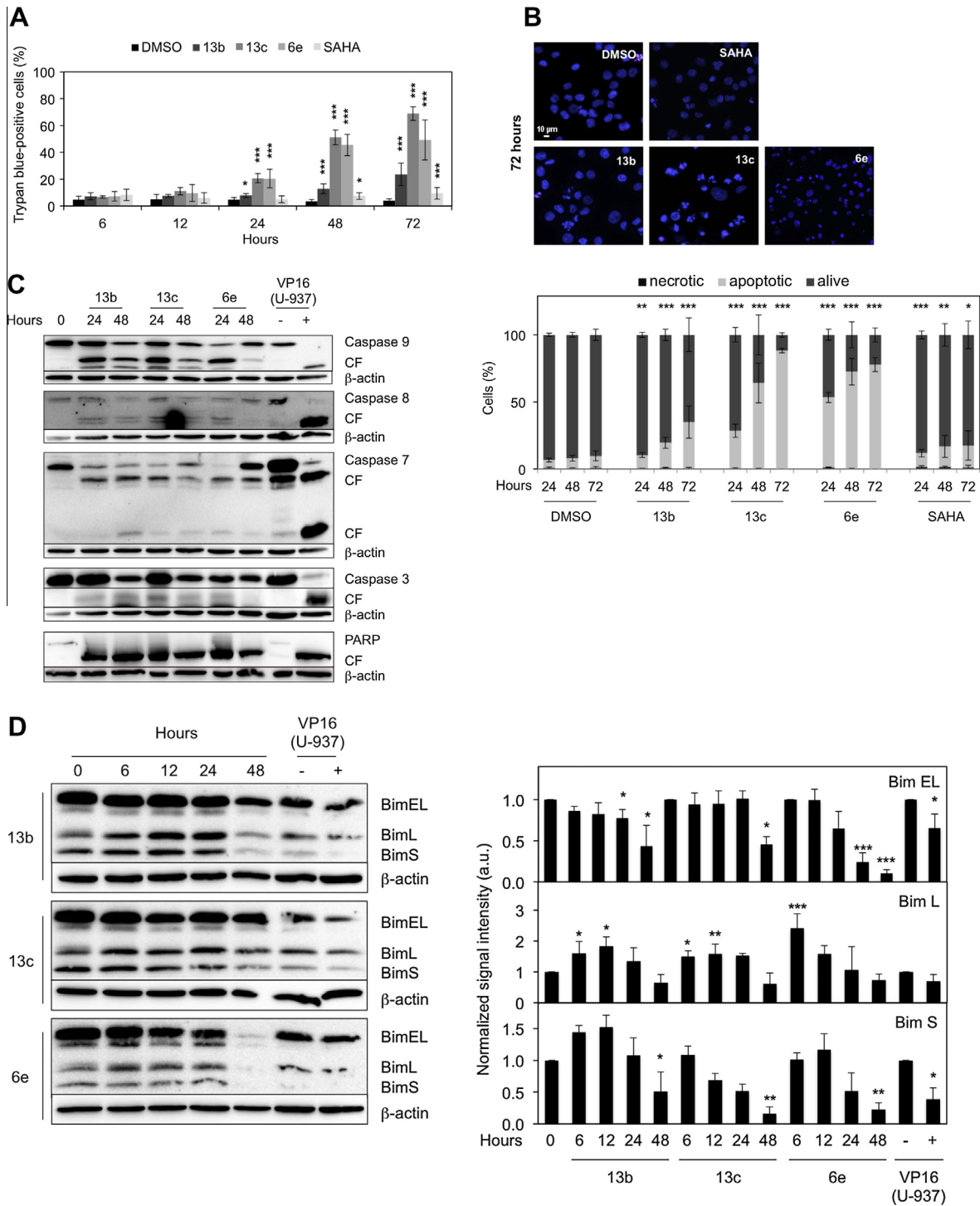


Fig. 5. 4-Hydroxybenzoic acid derivatives trigger apoptosis in K-562 cells. K-562 cells were treated by 50 μM of 4-HBA derivatives, 2 μM SAHA or DMSO vehicle and cell death was evaluated after various time of incubation. (A) Cell viability was evaluated by Trypan Blue exclusion staining. (B) Cells were stained with Hoechst and propidium iodide followed by fluorescence microscopic observation. Upper panel: Pictures after 72 h of treatment representative of three independent experiments. Lower panel: Number of apoptotic and necrotic cells as a percentage of the total number of cells counted. (C and D) Total proteins were isolated and analyzed by Western Blot for caspase activation and PARP cleavage (C), and the expression of three splicing isoforms of the pro-apoptotic protein Bim, named BimEL, BimL and BimS (D). Left panel: blots represent chemiluminescence signal, right panel: blot quantification. β-actin was used as a loading control. U-937 cells left untreated (-) or treated with 100 μM etoposide (VP16) for 4 h (+) were used as controls of apoptosis and caspase cleavage. Blots are representative of three independent experiments. Histograms correspond to the mean ± SD of the quantification of three independent experiments; values were reported to the control. Data are the mean ± SD of three independent cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ versus control. CF: Cleaved form, PARP: Poly-ADP ribose polymerase.

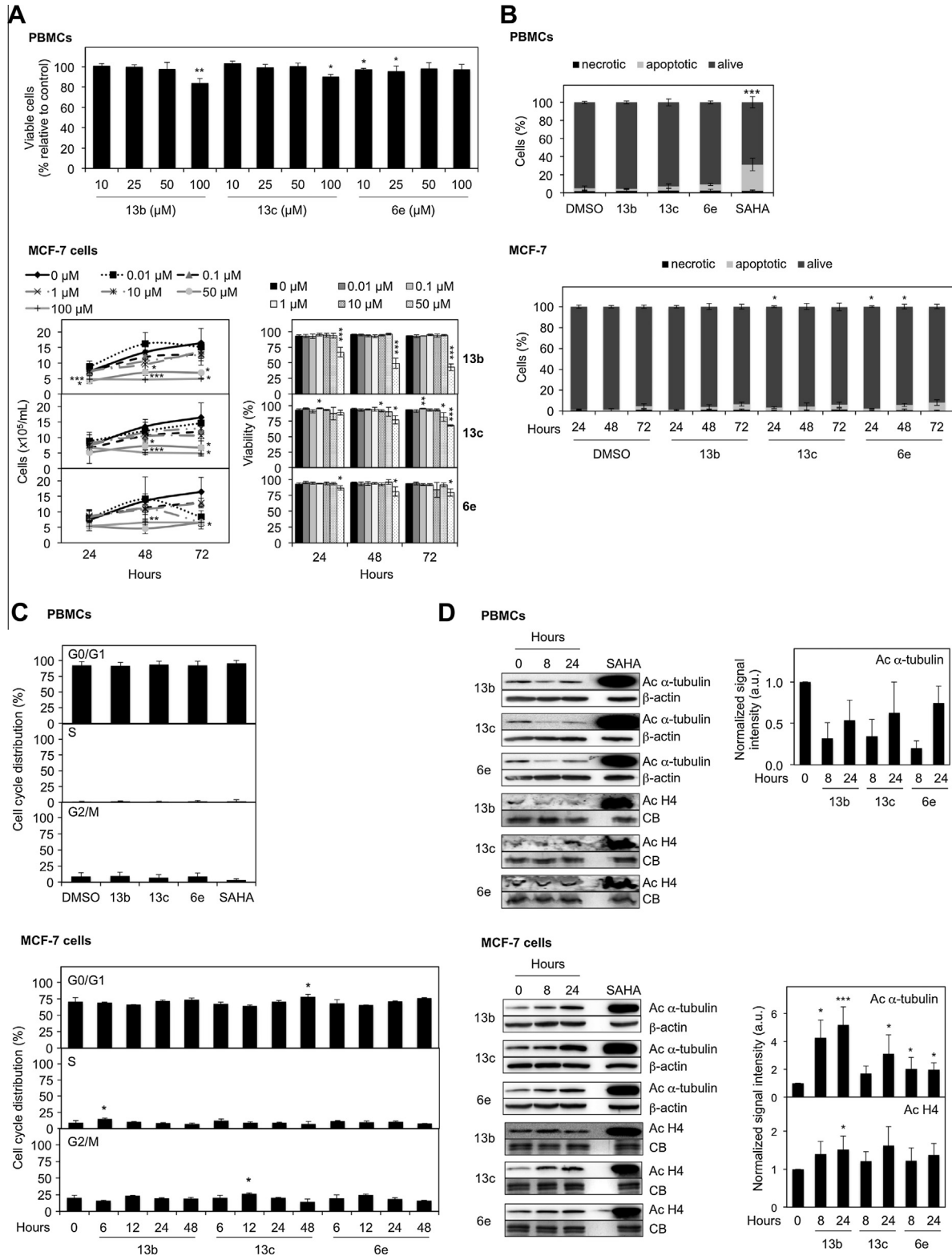


Fig. 6. PBMCs were treated for 48h and MCF-7 cells for up to 72h with the indicated compounds. (A) Cell viability and proliferation were evaluated with a range of concentration of 4-HBA derivatives. (B) Nuclear morphology, (C) cell cycle distribution and (D) protein acetylation were assessed in cells treated with DMSO vehicle, 50 μM 4-HBA derivatives or 2 μM SAHA. (D) β-actin and Coomassie Blue (CB) were used as loading controls. Left panel: blots represent chemiluminescence signal, blots are representative of three independent experiments; right panel: blot quantification, histograms correspond to the mean ± SD of the quantification of three independent experiments; values were reported to the control. Quantification of acetylated histone H4 in PBMCs was not applicable. Results correspond to mean ± SD of three independent experiments. *, **, *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$ versus untreated cells, respectively.

during replication. Here we observed a transient increase of H3K9 acetylation after treatment by compound 13b, which inhibits

HDAC3 *in vitro* [2]. Furthermore, acetylation on H4K8, H4K16 and H3K14 are associated to open chromatin structure allowing

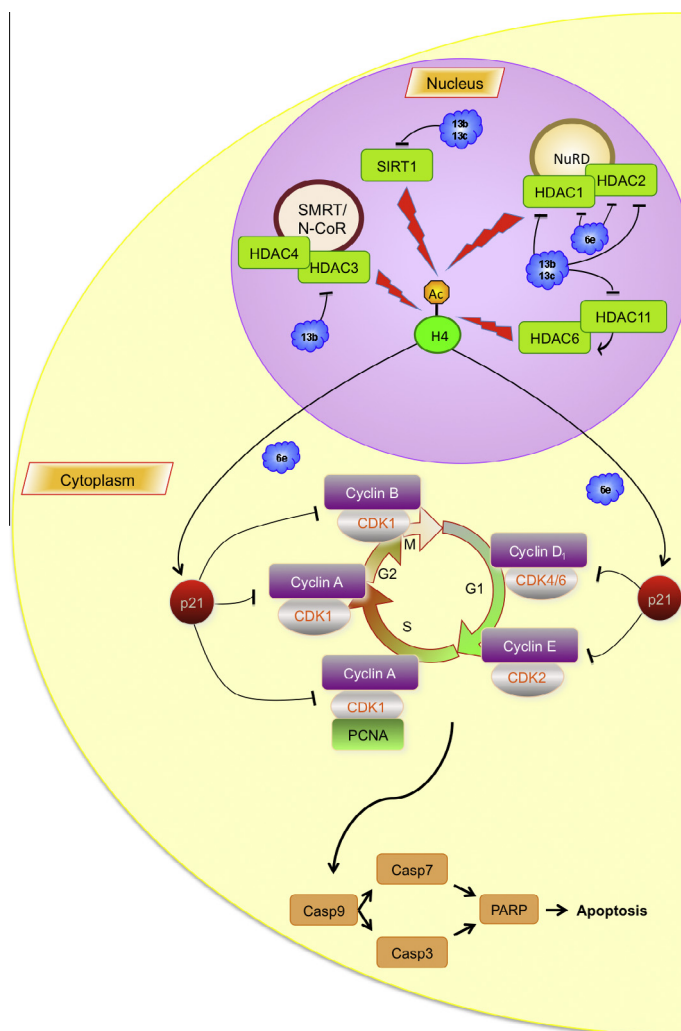


Fig. 7. Hypothetic mechanism of action of 4-hydroxybenzoic acid derivatives in K-562 cells. Red arrows represent deacetylation of targeted proteins; arrows indicated activation and bars indicated inhibition. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

gene expression [29]. Compounds 13b and 13c induce a robust increase of acetylation of H4K8 and H3K14 that correlates with *in vitro* inhibition of HDACs 1, 2, 11 and SIRT1. Compound 6e inhibits HDAC1, 2, 8 and 10 *in vitro*, and induces a specific increase of H3K14.

Moreover, we analyzed four H3 and H4 marks but we cannot exclude that compound 6e possess a stronger effect on acetylation of one or several other lysine residues. In addition, compounds 13c and 6e inhibit HDAC6 *in vitro* with IC_{50} values of 14 and 69 μ M, respectively.

The acetylation status of a specific substrate of HDAC6, α -tubulin, is essential for the regulation of microtubule dynamics, which in turn controls cell division, migration and invasion. Analysis of α -tubulin acetylation increased after 13c and 6e treatment. This mechanism could account for cell cycle arrest and apoptosis induction [17]. Furthermore, to generalize the effect of 4-HBA derivatives, we show increased histone H4 and α -tubulin acetylation in MCF-7 cells.

HDAC inhibitors including FR235222 disturb cell cycle progression [20]. As we observed an inhibition of K-562 cell proliferation, we assessed cell cycle progression by flow cytometry and showed that 13b induces early G2/M phase arrest correlated with decreased cyclin B protein levels. Moreover, a time-dependent decrease of mitotic cells correlates with a transition from G2/M to G0/G1 after prolonged treatment. However, compound 13c in-

duces accumulation of cells in S phase in agreement with the observed cyclin A decrease. In addition, compound 6e arrests cells in G0/G1 phase in a time-dependent manner after 6–24 h, in agreement with decreased cyclin D1 involved in G1 phase progression and increased cyclin B1 involved in G2/M transition.

Recent studies showed an increase of p21 expression after HDACi treatment [7,18]. Based on these studies and on the disruption of cell cycle progression after 4-HBA treatment, we showed that compound 6e increases *CDKN1A* (p21) mRNA levels and enrichment of acetylated histone H4 and RNA polymerase II on the p21 promoter comparable to SAHA.

Treatment of K-562 cells by 13c and 6e induces apoptotic cell death independent of the inhibition of anti-apoptotic proteins. Interestingly, increased expression of the pro-apoptotic protein Bim, that inhibits anti-apoptotic activity of Bcl-2, Bcl-xl and Mcl-1, was observed. We hypothesize that Bim induction abrogates antiapoptotic protein function without affecting expression [32]. HDAC inhibitor Vorinostat induces Bim transcription through increased histone acetylation [1]. ChIP assays on Bim promoter showed no induction but rather a decrease of acetylated histone H4 and RNA polymerase II enrichment (Supplementary data, Fig. S3A). In addition, none of our compounds induced Bim transcription (Supplementary data, Fig. S3B). We hypothesize that increased Bim protein levels are potentially linked to enhanced protein stability.

Interestingly, our compounds did not induce cell death of PBMCs and did not affect distribution of the lymphocyte population from healthy donors. In addition, they had less effect on MCF7-10A than on cancer cell lines. These results are in agreement with previously published data obtained on WI-38 and NHDF normal fibroblast cell lines for which compounds 6e, 13b and 13c displayed a cancer cell line selectivity with a factor of 1.6 [15].

In conclusion, our study characterized anti-tumor, antiproliferative and proapoptotic activities of new 4-HBA-derived pan-HDAC inhibitors. These molecules are interesting candidates for further lead optimization to develop new molecules displaying isoenzyme-specific HDAC inhibition potential.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

The authors thank Robert Kiss (Laboratoire de Toxicologie – Faculté de Pharmacie – ULB) and Delphine Lamoral-Theys (Laboratoire de Chimie Analytique, Toxicologie et Chimie Physique Appliquée – Faculté de Pharmacie – ULB) for providing 4-HBA derivatives. CS is recipient of a Télévie Luxembourg fellowship. MS is supported by a “Waxweiler grant for cancer prevention research” from the Action Lions “Vaincre le Cancer”. This work was supported by the “Recherche Cancer et Sang” foundation, the “Recherches Scientifiques Luxembourg” association, by the “Een Häerz fir kriibskrank Kanner” association, by the Action LIONS “Vaincre le Cancer” association and by Télévie Luxembourg. MD is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant, [Grant number 2012-0001184]; by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.026>.

References

- [1] P.S. Bachmann, R.G. Piazza, M.E. Janes, N.C. Wong, C. Davies, A. Mogavero, V.A. Bhadri, B. Szymanska, G. Geninson, V. Magistrini, G. Cazzaniga, A. Biondi, D. Miranda-Saavedra, B. Gottgens, R. Saffery, J.M. Craig, G.M. Marshall, C. Gambacorti-Passerini, J.E. Pimanda, R.B. Lock, Epigenetic silencing of BIM in glucocorticoid poor-responsive pediatric acute lymphoblastic leukemia, and its reversal by histone deacetylase inhibition, *Blood* 116 (2010) 3013–3022.
- [2] S. Bhaskara, S.W. Hiebert, Role for histone deacetylase 3 in maintenance of genome stability, *Cell Cycle* 10 (2011) 727–728.
- [3] N. Bhatnagar, X. Li, Y. Chen, X. Zhou, S.H. Garrett, B. Guo, 3,3'-Diindolylmethane enhances the efficacy of butyrate in colon cancer prevention through down-regulation of survivin, *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 2 (2009) 581–589.
- [4] S. Chang, T.A. McKinsey, C.L. Zhang, J.A. Richardson, J.A. Hill, E.N. Olson, Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 8467–8476.
- [5] J. Charlet, M. Schneckeburger, K.W. Brown, M. Diederich, DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 858–865.
- [6] A.J. de Ruijter, A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, A.B. van Kuilenburg, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *Biochem. J.* 370 (2003) 737–749.
- [7] N. Druesne, A. Pagniez, C. Mayeur, M. Thomas, C. Cherbuy, P.H. Duee, P. Martel, C. Chaumontet, Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines, *Carcinogenesis* 25 (2004) 1227–1236.
- [8] C. Florean, M. Schneckeburger, C. Grandjette, M. Dicato, M. Diederich, Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications, *Epigenomics* 3 (2011) 581–609.
- [9] F. Folmer, B. Orlikova, M. Schneckeburger, M. Dicato, M. Diederich, Naturally occurring regulators of histone acetylation/deacetylation, *Curr. Nutr. Food Sci.* 6 (2010) 78–99.
- [10] R. Furumai, A. Matsuyama, N. Kobashi, K.H. Lee, M. Nishiyama, H. Nakajima, A. Tanaka, Y. Komatsu, N. Nishino, M. Yoshida, S. Horinouchi, FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases, *Cancer Res.* 62 (2002) 4916–4921.
- [11] C.Y. Gui, L. Ngo, W.S. Xu, V.M. Richon, P.A. Marks, Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 1241–1246.
- [12] D. Kaluza, J. Kroll, S. Gesierich, T.P. Yao, R.A. Boon, E. Hergenreider, M. Tjwa, L. Rössig, E. Seto, H.G. Augustin, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, C. Urbich, Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin, *EMBO J.* 30 (2011) 4142–4156.
- [13] T. Karius, M. Schneckeburger, J. Ghelfi, J. Walter, M. Dicato, M. Diederich, Reversible epigenetic fingerprint-mediated glutathione-S-transferase P1 gene silencing in human leukemia cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 1329–1342.
- [14] T. Kumagai, N. Wakimoto, D. Yin, S. Gery, N. Kawamata, N. Takai, N. Komatsu, A. Chumakov, Y. Imai, H.P. Koeffler, Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells, *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 121 (2007) 656–665.
- [15] D. Lamoral-Theys, L. Pottier, F. Kerff, F. Dufrasne, F. Proutiere, N. Wauthoz, P. Neven, L. Ingrassia, P.V. Antwerpen, F. Lefranc, M. Gelbcke, B. Piroette, J.L. Kraus, J. Neve, A. Kornienko, R. Kiss, J. Dubois, Simple di- and trianilides exhibit cytostatic properties toward cancer cells resistant to pro-apoptotic stimuli, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3823–3833.
- [16] S. Liu, H. Cheng, W. Kwan, J.M. Lubienicka, T.O. Nielsen, Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 1751–1761.
- [17] A. Matsuyama, T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, S. Horinouchi, M. Yoshida, In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation, *EMBO J.* 21 (2002) 6820–6831.
- [18] H. Nian, B. Delage, J.T. Pinto, R.H. Dashwood, Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter, *Carcinogenesis* 29 (2008) 1816–1824.
- [19] M.J. Nunes, I. Milagre, M. Schneckeburger, M.J. Gama, M. Diederich, E. Rodrigues, Sp proteins play a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression of CYP46A1 gene transcription, *J. Neurochem.* 113 (2010) 418–431.
- [20] A. Petrella, C.W. D'Acunto, M. Rodriguez, M. Festa, A. Tosco, I. Bruno, S. Terracciano, M. Taddei, L.G. Paloma, L. Parente, Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1, *Eur. J. Cancer* 44 (2008) 740–749.
- [21] V.M. Richon, S. Emiliani, E. Verdin, Y. Webb, R. Breslow, R.A. Rifkind, P.A. Marks, A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3003–3007.
- [22] M. Schneckeburger, M. Diederich, Epigenetics offer new horizons for colorectal cancer prevention, *Curr. Colorect. Cancer Rep.* 8 (2012) 66–81.
- [23] M. Schneckeburger, C. Grandjette, J. Ghelfi, T. Karius, B. Foliguet, M. Dicato, M. Diederich, Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence, and autophagy, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 364–378.
- [24] M. Schneckeburger, F. Morceau, A. Duvoix, S. Delhalle, C. Trentesaux, M. Dicato, M. Diederich, Expression of glutathione S-transferase P1-1 in differentiating K562: role of GATA-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 815–821.
- [25] M. Schneckeburger, F. Morceau, A. Duvoix, S. Delhalle, C. Trentesaux, M. Dicato, M. Diederich, Increased glutathione S-transferase P1-1 expression by mRNA stabilization in hemin-induced differentiation of K562 cells, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 1269–1277.
- [26] M. Schneckeburger, F. Morceau, E. Henry, R. Blasius, M. Dicato, C. Trentesaux, M. Diederich, Transcriptional and post-transcriptional regulation of glutathione S-transferase P1 expression during butyric acid-induced differentiation of K562 cells, *Leuk. Res.* 30 (2006) 561–568.
- [27] C. Seidel, C. Florean, M. Schneckeburger, M. Dicato, M. Diederich, Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy, *Biochimie* 94 (2012) 2264–2279.
- [28] C. Seidel, M. Schneckeburger, M. Dicato, M. Diederich, Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature, *Gen. Nutr.* 7 (2012) 357–367.
- [29] B.D. Strahl, C.D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature* 403 (2000) 41–45.
- [30] C.C. Sucharov, K. Dockstader, T.A. McKinsey, YY1 protects cardiac myocytes from pathologic hypertrophy by interacting with HDAC5, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 4141–4153.
- [31] M.H. Teiten, M. Dicato, M. Diederich, Curcumin as a regulator of epigenetic events, *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (2013) 1619–1629.
- [32] S.N. Willis, J.I. Fletcher, T. Kaufmann, M.F. van Delft, L. Chen, P.E. Czabotar, H. Ierino, E.F. Lee, W.D. Fairlie, P. Bouilliet, A. Strasser, R.M. Kluck, J.M. Adams, D.C. Huang, Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak, *Science* 315 (2007) 856–859.

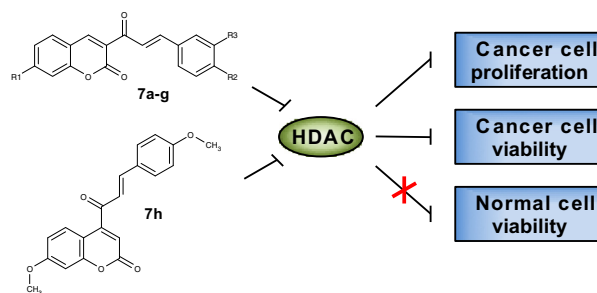
- [33] A.J. Wilson, D.S. Byun, N. Popova, L.B. Murray, K. L'Italien, Y. Sowa, D. Arango, A. Velcich, L.H. Augenlicht, J.M. Mariadason, Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 13548–13558.
- [34] S. Xargay-Torrent, M. Lopez-Guerra, I. Saborit-Villarroya, L. Rosich, E. Campo, G. Roue, D. Colomer, Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (2011) 3956–3968.
- [35] Y. Zhang, N. Li, C. Caron, G. Matthias, D. Hess, S. Khochbin, P. Matthias, HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo, *EMBO J.* 22 (2003) 1168–1179.

Graphical abstract

Novel inhibitors of human histone deacetylases: Design, synthesis and bioactivity of 3-alkenylcoumarines

pp xxx-xxx

Carole Seidel, Michael Schneckeburger, Clemens Zwergel, François Gaascht, Antonello Mai, Mario Dicato, Gilbert Kirsch, Sergio Valente*, Marc Diederich*





Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Novel inhibitors of human histone deacetylases: Design, synthesis and bioactivity of 3-alkenylcoumarines

Carole Seidel^a, Michael Schnekenburger^a, Clemens Zwergel^b, François Gaascht^a, Antonello Mai^c, Mario Dicato^a, Gilbert Kirsch^b, Sergio Valente^{b,c,*}, Marc Diederich^{d,*}

^aLaboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

^bUMR CNRS 7565 SRSMC, Université de Lorraine, 57070 Metz, France

^cDipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma, P.le Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy

^dDepartment of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 20 Room 303, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2014

Revised 19 June 2014

Accepted 21 June 2014

Available online xxxxx

Keywords:

Chalcone

Coumarin

Histone deacetylase inhibitors

Anti-proliferative activity

Cancer

ABSTRACT

Histone deacetylases (HDACs) are well-established, promising targets for anticancer therapy due to their critical role in cancer development. Accordingly, an increasing number of HDAC inhibitors displaying cytotoxic effects against cancer cells have been reported. Among them, a large panel of chemical structures was described including coumarin-containing molecules. In this study, we described synthesis and biological activity of new coumarin-based derivatives as HDAC inhibitors. Among eight derivatives, three compounds showed HDAC inhibitory activities and antitumor activities against leukemia cell lines without affecting the viability of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

Histone deacetylases (HDACs) are enzymes that catalyze removal of acetyl groups from lysine residues. Beyond their originally identified histone substrates, HDACs target non-histone proteins including α -tubulin, heat shock protein 90 or p53.¹ The HDAC family comprises 18 members subdivided into four classes based on sequence similarity and catalytic activity.² HDACs play a critical role in epigenetic gene regulation and therefore control multiple cellular processes.^{1,3}

Since expression and/or activity of HDACs are deregulated in various cancer subtypes, they became an interesting target for anticancer therapy.^{4,5} Accordingly, numerous compounds from natural sources as well as synthetic derivatives were identified and further developed as HDAC inhibitors (HDACi) and some of them are already undergoing clinical trials for anticancer therapy.^{6–8} Among HDACi, chalcone-based compounds (1,3-diaryl-2-propen-1-ones) are a group of aromatic natural or synthetic unsaturated ketones with anti-inflammatory and anticancer activities.^{9,10} Ease of preparation, oral administration and safety also support the feasibility of chalcone-based compounds as therapeutic agents.^{11–13}

Additionally, their simple and efficient synthesis makes them attractive for industrial production.¹⁴

Curcumin is a promising molecule that also modulates the acetylation status of proteins.¹⁵ In vitro studies demonstrated that it possesses potent cytotoxic and chemotherapeutic properties in different models.^{16–24} Whilst curcumin itself has limited efficacy due to its low bioavailability and stability in physiological media,²⁵ analogs including *N*-methylpiperidone were generated.²⁶ Natural products bearing 2*H*-1-benzopyran-2-one (coumarin) possess cytotoxic antitumor potential.^{27,28} Coumarin-based compounds were previously described as Cdc25 phosphatase and HDAC inhibitors.^{27,29–32}

So far only two molecules, FK228 (Romidepsin) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat), gained Food and Drug Administration approval for cutaneous T-cell lymphoma.⁸ In this context, development of novel HDACi with good anticancer properties and low toxicity remains a challenge. Here we designed novel coumarin-containing analogs **7a–h** and we assessed their HDACi potential and effects on cell proliferation and viability in K-562 and U-937 leukemia cell lines compared to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors.

The new series of coumarin-based analogues (**7a–h**) bearing an α,β -(mono- or bis)-unsaturated ketone at the C3 or C4 position (Fig. 1) were prepared carrying out aldolic condensation between

* Corresponding authors. Tel.: +39 06 49913891; fax: +39 06 491491. (S.V.); tel.: +82 2 880 8919 (M.D.).

E-mail addresses: sergio.valente@uniroma1.it (S. Valente), marcdiederich@snu.ac.kr (M. Diederich).

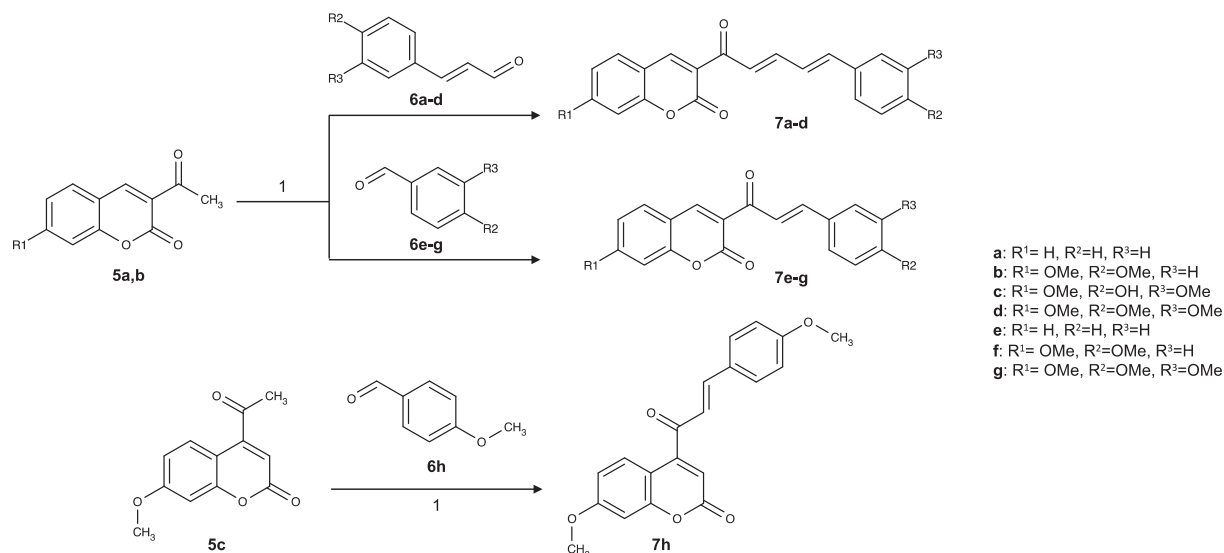


Figure 1. Synthesis of coumarin-based compounds **7a–h**. Reagent and conditions: (1) Pyrrolidine, ethanol, 80 °C, 1–3 h.

3-acetylcoumarins (**5a–b**) or 4-acetyl coumarin (**5c**), previously synthesized by us according to the literature^{33–35} and the appropriate aldehydes (**6a–h**) following an adapted procedure of Cechinel-Filho et al.³⁶ All the chemical-physical data, elemental analyses, ¹H NMR and ¹³C NMR of the compounds as well as all the conditions for their biological evaluation are described in the Supporting information.

Coumarin-based compounds were tested for their total HDAC inhibitory potential on K-562 nuclear extracts.^{37,38} Compounds **7b**, **7d** and **7h** showed a 20–50% of inhibition of total HDAC activity at 100 μM (Table 1). In opposition to **7b**, compound **7d**, with a methoxy group at R³, presented increased levels of inhibition. Noteworthy, compound **7c** with a hydroxyl group instead of the methoxy group in R² was inactive against HDACs further demonstrating the importance of the methoxy group in this position. Compound **7d** was tested against seven HDAC isoenzymes representing classes I, IIb and IV and acted as a pan-HDACi (Table 2) with IC₅₀s between 12 and 85 μM.

Interestingly, **7d** inhibited HDAC3 with an IC₅₀ at 12 μM and may serve as a lead for targeting this nuclear isoenzyme.

Compounds **7b** and **7d** showed moderate effects on proliferation and viability of chronic myeloid leukemia K-562 and histiocytic lymphoma U-937 cell lines (Fig. 2A). Compound **7h** strongly inhibited proliferation in both cell lines. In U-937 cells, loss of proliferation was accompanied by a marked decrease of cell viability (Fig. 2B). We noticed that compound **7d** precipitated at 100 μM in cell culture medium that could explain why this compound was less effective at this concentration compared to 50 μM. Thus,

Table 1

Effect of compounds **7a–h** on in vitro total HDAC activity. Values represent the mean of the percentage of inhibition measured in two independent experiments. Inactive means inhibition <10% at 100 μM

Compound	Effect on HDAC activity
7a	Inactive
7b	30% inhibition at 100 μM
7c	Inactive
7d	50% inhibition at 100 μM
7e	Inactive
7f	Inactive
7g	Inactive
7h	20% inhibition at 100 μM

Table 2

Effect of **7d** on in vitro activity of HDAC isoenzymes. Values represent the mean of the percentage of inhibition measured in two independent experiments. Inactive means inhibition <10% at 100 μM

Class	HDAC		IC ₅₀ (μM)
	Isoenzyme		
I	HDAC1		59
	HDAC2		33
	HDAC3		12
	HDAC8		28
IIb	HDAC6		32
	HDAC10		85
IV	HDAC11		74

we observed a close effect between compounds **7b** and **7d** on leukemia cancer cell lines. Indeed, these two compounds are structurally identical except a methoxy group present in compound **7d**. Interestingly, among compounds with one unsaturation (**7e–g**), compound **7h**, the more active compound on cell viability and proliferation, was the only structure inhibiting HDAC activities and corresponds to the C4 regioisomer of compound **7f**, which was inactive. These differential activities could result from 3D structure variations depending on the position of the keto function. To assess for differential toxicity, PBMCs from healthy donors³⁹ were treated with compounds **7b**, **7d** and **7h** under the same conditions. Results showed no effect on PBMC viability (Fig. 2C).

Since among newly synthesized compounds, **7d** was the most active compound on HDAC activity, we further tested whether this hybrid compound possessed an HDAC inhibitory potential superior to the two parent compounds, namely the 3-acetylcoumarin **5b** and the aldehyde **6d**. First, **5b** and **6d** were tested on in vitro total HDAC activity. Results demonstrated that 100 μM compound **5b** inhibited only 20% of total HDAC activity, whereas at the same concentration compound **6d** enhanced total HDAC activity by 80%. Compounds **5b** and **6d** were further tested on cancer as well as on PBMCs from healthy donors. Results demonstrated that both compounds slightly decreased proliferation only in U-937 cells after 72 h of treatment without affecting viability of both cancer K-562 and U-937 cell lines and healthy PBMCs (Fig. 3). All together these results clearly demonstrated that the newly synthesized hybrid compound **7d** possesses an inhibitor potential superior to both parent compounds **5b** and **6d**.

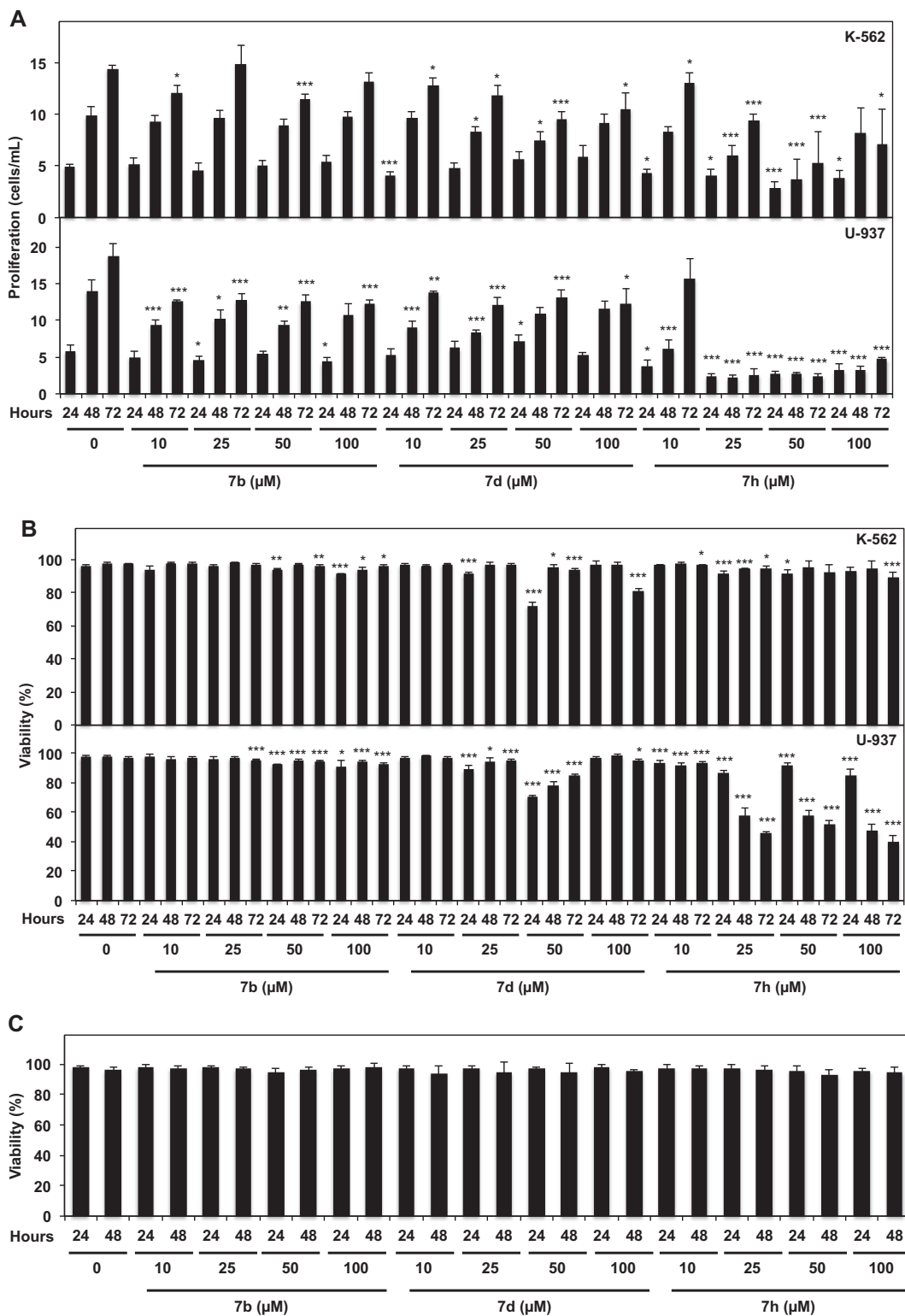


Figure 2. Effect of **7b**, **7d**, **7h** on cell proliferation and viability. K-562 and U-937 cells were treated with the indicated concentration of compound. (A) Cell viability and (B) proliferation were assessed after 24, 48 and 72 h. (C) PBMCs from healthy donors were incubated with **7b**, **7d**, **7h** and then cell viability was evaluated after 24 and 48 h of treatment. Data are the mean \pm SD of three independent cultures. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005 versus control.

In this study, we have described three new coumarin-based derivatives, **7b**, **7d** and **7h**, endowed with HDAC inhibitory and antitumor properties. Regarding differences in their chemical

structures and biological effects, these compounds can support a new design of molecules to increase their reactivity against HDAC activity and cancer cells.

2 July 2014

4

C. Seidel et al./Bioorg. Med. Chem. Lett. xxx (2014) xxx–xxx

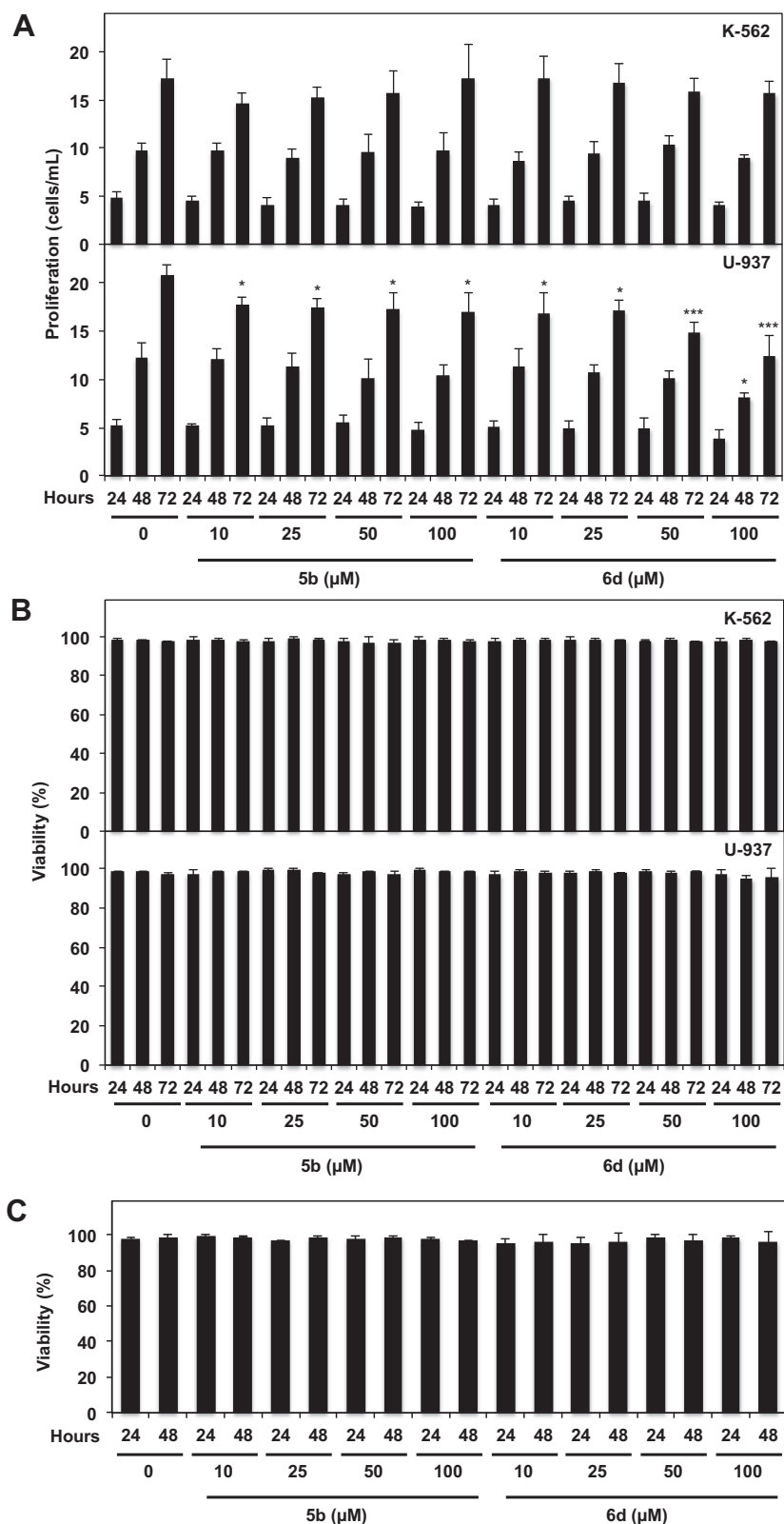


Figure 3. Effect of **5b** and **6d** on cell proliferation and viability. K-562 and U-937 cells were treated with the indicated concentration of compound. (A) Cell viability and (B) proliferation were assessed after 24, 48 and 72 h. (C) The viability of PBMCs from healthy donors was evaluated after 24 and 48 h of treatment with compounds **5b** and **6d**. Data are the mean \pm SD of three independent cultures. * p < 0.05, *** p < 0.005 versus control.

Acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the [European Community's] Seventh Framework Programme

([FP7/2007–2013] under Grant Agreement n° 215009. C.S. is recipient of a Télévie Luxembourg fellowship. M.S. is supported by a 'Waxweiler grant for cancer prevention research' from the Action Lions 'Vaincre le Cancer'. This work was supported by the 'Recher-

150

the Cancer et Sang' foundation, the 'Recherches Scientifiques Luxembourg' association, by the 'Een Häerz fir kriibskrank Kanner' association, by the Action LIONS 'Vaincre le Cancer' association and by Télévie Luxembourg. M.D. is supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) Grant for the Global Core Research Center (GCRC) funded by the Korea government, Ministry of Science, ICT & Future Planning (MSIP) (No. 2011-0030001).

References and notes

- Spange, S.; Wagner, T.; Heinzl, T.; Kramer, O. H. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 185.
- de Ruijter, A. J.; van Gennip, A. H.; Caron, H. N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A. B. *Biochem. J.* **2003**, *370*, 737.
- Hildmann, C.; Riester, D.; Schwienhorst, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 487.
- Florea, C.; Schnekenburger, M.; Grandjett, C.; Dicato, M.; Diederich, M. *Epigenomics* **2011**, *3*, 581.
- Schnekenburger, M.; Diederich, M. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **2012**, *8*, 66.
- Folmer, F.; Orlikova, B.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 78.
- Seidel, C.; Florea, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochimie* **2012**.
- Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Genes Nutr.* **2012**, *7*, 357.
- Lee, S. H.; Zhao, Y. Z.; Park, E. J.; Che, X. H.; Seo, G. S.; Sohn, D. H. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *658*, 9.
- Orlikova, B.; Schnekenburger, M.; Zloh, M.; Golais, F.; Diederich, M.; Tasdemir, D. *Oncol. Rep.* **2012**, *28*, 797.
- Baba, M.; Asano, R.; Takigami, I.; Takahashi, T.; Ohmura, M.; Okada, Y.; Sugimoto, H.; Arika, T.; Nishino, H.; Okuyama, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 247.
- Israfi, D. A.; Khaizurin, T. A.; Syahida, A.; Lajis, N. H.; Khozirah, S. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 673.
- Wattenberg, L. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1995**, *22*, 162.
- Orlikova, B.; Tasdemir, D.; Golais, F.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 620.
- Teiten, M. H.; Dicato, M.; Diederich, M. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 1619.
- Chiu, T. L.; Su, C. C. *Int. J. Mol. Med.* **2009**, *23*, 469.
- Duvoix, A.; Blasius, R.; Delhalle, S.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. *Cancer Lett.* **2005**, *223*, 181.
- Duvoix, A.; Morceau, F.; Delhalle, S.; Schmitz, M.; Schnekenburger, M.; Galteau, M. M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1475.
- Duvoix, A.; Morceau, F.; Schnekenburger, M.; Delhalle, S.; Galteau, M. M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *1010*, 389.
- Kang, H. J.; Lee, S. H.; Price, J. E.; Kim, L. S. *Breast J.* **2009**, *15*, 223.
- Liu, Q.; Loo, W. T.; Sze, S. C.; Tong, Y. *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharmacol.* **2009**, *16*, 916.
- Prasad, C. P.; Rath, G.; Mathur, S.; Bhatnagar, D.; Ralhan, R. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *181*, 263.
- Teiten, M. H.; Eifes, S.; Dicato, M.; Diederich, M. *Toxins* **2010**, *2*, 128.
- Teiten, M. H.; Gaascht, F.; Cronauer, M.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 603.
- Cheng, A. L.; Hsu, C. H.; Lin, J. K.; Hsu, M. M.; Ho, Y. F.; Shen, T. S.; Ko, J. Y.; Lin, J. T.; Lin, B. R.; Ming-Shiang, W.; Yu, H. S.; Jee, S. H.; Chen, G. S.; Chen, T. M.; Chen, C. A.; Lai, M. K.; Pu, Y. S.; Pan, M. H.; Wang, Y. J.; Tsai, C. C.; Hsieh, C. Y. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2895.
- Yadav, B.; Taurin, S.; Rosengren, R. J.; Schumacher, M.; Diederich, M.; Somers-Edgar, T. J.; Larsen, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6701.
- Kostova, I. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2005**, *5*, 29.
- Riveiro, M. E.; De Kimpe, N.; Moglioni, A.; Vazquez, R.; Monczor, F.; Shayo, C.; Davio, C. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1325.
- Beillerot, A.; Domínguez, J.-C. R.; Kirsch, G.; Bagrel, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1102.
- Olaharski, A. J.; Rine, J.; Marshall, B. L.; Babiarz, J.; Zhang, L.; Verdin, E.; Smith, M. T. *PLoS Genet.* **2005**, *1*, e77.
- Rotili, D.; Carafa, V.; Tarantino, D.; Botta, G.; Nebbioso, A.; Altucci, L.; Mai, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3659.
- Valente, S.; Bana, E.; Viry, E.; Bagrel, D.; Kirsch, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5827.
- Hirai, T.; Togo, H. *Synthesis* **2005**, *2005*, 2664.
- Starčević, S. T.; Brožič, P.; Turk, S.; Cesar, J. K.; Lanišnik Rižner, S.; Gobec, T. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *54*, 248.
- Valente, S.; Kirsch, G. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3429.
- Cechinel-Filho, V.; Vaz, Z. R.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 833.
- Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Cancer Lett.* **2013**.
- El Amrani, M.; Lai, D.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Siems, K.; Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Gaigneaux, A.; Diederich, M.; Feger, D.; Lin, W.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 49.
- Schnekenburger, M.; Grandjett, C.; Ghelfi, J.; Karius, T.; Folguet, B.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 364.

Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature

Carole Seidel · Michael Schnekenburger ·
Mario Dicato · Marc Diederich

Received: 12 October 2011 / Accepted: 24 January 2012 / Published online: 12 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Protein acetylation status results from a balance between histone acetyltransferase and histone deacetylase (HDAC) activities. Alteration of this balance leads to a disruption of cellular integrity and participates in the development of numerous diseases, including cancer. Therefore, modulation of these activities appears to be a promising approach for anticancer therapy. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) are epigenetically active drugs that induce the hyperacetylation of lysine residues within histone and non-histone proteins, thus affecting gene expression and cellular processes such as protein–protein interactions, protein stability, DNA binding and protein sub-cellular localization. Therefore, HDACi are promising anti-tumor agents as they may affect the cell cycle, inhibit proliferation, stimulate differentiation and induce apoptotic cell death. Over the last 30 years, numerous synthetic and natural products, including a broad range of dietary compounds, have been identified as HDACi. This review focuses on molecules from natural origins modulating HDAC activities and presenting promising anticancer activities.

Keywords Protein acetylation · HDAC · HDAC modulators · Natural compounds · Cancer

Introduction

Post-translational modifications of proteins play a crucial role in the modulation of their function by altering protein–protein and protein–nucleic acid interactions as well as their subcellular localization and activity. Specialized enzymes catalyze the addition and elimination of these modifications at specific sites. For example, kinases and phosphatases are responsible for the addition and removal of phosphate groups, respectively, on factors regulating signaling pathways or the cell cycle, whereas ubiquitin ligases are mainly involved in protein targeting to the proteasome. Histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) regulate the balance of lysine acetylation on histones and non-histone proteins (Fig. 1; Spange et al. 2009). Lysine acetylation is deeply implicated in the control of highly regulated biological functions. Thus, alteration of the acetylation status is involved in the development of many diseases, including tumorigenesis. Therefore, the control of the acetylation status by modulating HDAC activities is a promising approach to anti-cancer therapy. Over the last 30 years, numerous synthetic and natural products, including a broad range of dietary compounds, have been identified as HDAC modulators. This review focuses on promising modulators of HDAC activity from natural sources and discusses their potential for anticancer therapy.

The HDAC family: classification, roles and substrates

HDAC isoforms

HDACs are ubiquitous enzymes, initially identified as being responsible for the deacetylation of histones (Fig. 1),

C. Seidel · M. Schnekenburger · M. Dicato · M. Diederich (✉)
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer,
Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg,
9 Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg
e-mail: marc.diederich@lbmcc.lu

Fig. 1 Acetylation/ deacetylation of lysine residues. The reaction of acetylation on the ϵ -nitrogen of lysine residues is catalyzed by enzymes within the histone acetyl transferase (HAT) family, using acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) as donor of acetyl moiety. This is a reversible reaction catalyzed by enzymes within the histone deacetylase (HDAC) family

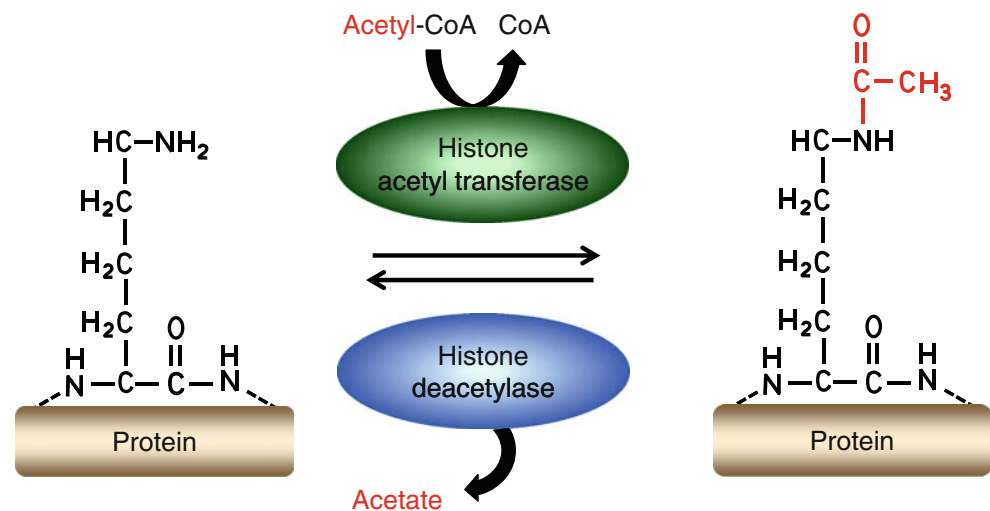


Table 1 Presentation of the different HDAC isoforms

HDAC		Cellular localization	Substrates
Class	Member		
I	HDAC1	Nucleus	Histones, DNMT1, SHP, ATM, MEF2, MyoD, p53, NF- κ B, AR, BRCA1, MECP2, pRb
	HDAC2	Nucleus	Histones, NF- κ B, GATA2, BRCA1, pRb, MECP
	HDAC3	Nucleus	Histones, HDAC4, 5, 7 et 9, SHP, GATA1, NF- κ B, pRb
	HDAC8	Mainly in the nucleus	HSP70
IIa	HDAC4	Nucleocytoplasmic traffic	Histones, HDAC3, MEF2, CaM, 14-3-3
	HDAC5	Nucleocytoplasmic traffic	Histones, HDAC3, MEF2, CaM, 14-3-3
	HDAC7	Nucleocytoplasmic traffic	Histones, HDAC3, MEF2, CaM, 14-3-3, HIF-1 α
	HDAC9	Nucleus	Histones, HDAC3, MEF2, CaM, 14-3-3
IIb	HDAC6	Mainly in the cytoplasm	HDAC11, SHP, PP1, α -tubulin, HSP90
	HDAC10	Nucleus and cytoplasm	LcoR, PP1
III	SIRT1	Mainly in the nucleus	FOXO, p53, p300, NF- κ B, histones
	SIRT2	Nucleus and cytoplasm	Histone H4, α -tubulin, PPAR- γ , FOXO, p53, p300
	SIRT3 ^b	Mitochondria	PGC-1 α , FOXO, p53, Ku70, Acetyl-CoA synthetase 2, complex I
	SIRT4 ^a	Mitochondria	Glutamate dehydrogenase
	SIRT5	Mitochondria	Cytochrome c, carbamoyl phosphate synthetase 1
	SIRT6 ^b	Nucleus	Histone H3, TNF- α
	SIRT7	Mainly in the nucleus	p53, RNA polymerase I
IV	HDAC11	Nucleus	HDAC6

AR androgen receptor, ATM ataxia-telangiectasia-mutated, BRCA breast cancer, CaM calmodulin, CoA co-enzyme A, DNMT DNA methyltransferase, FOXO forkhead box O, GATA GATA binding protein, HDAC histone deacetylase, HIF hypoxia-inducible factor, HSP heat shock protein, LcoR ligand-dependent receptor co-repressor, MECP methyl-CpG-binding domain protein, MEF myocyte enhancer factor, NF- κ B nuclear transcription factor-kappa B, PGC peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator, PP1 protein phosphatase, PPAR peroxisome proliferator-activated receptor, pRb retinoblastoma protein, SHP Src homology region 2-domain-containing phosphatase, SIRT sirtuin, TNF tumor necrosis factor

^a SIRT4 is an ADP-ribosyltransferase and lacks deacetylase activity

^b SIRT3 and 6 possess, in addition to their deacetylase activity, the ADP-ribosyltransferase activity (adapted from Folmer et al. 2010)

and are capable of targeting many non-histone proteins as substrates (Table 1). The 18 HDACs identified in mammals are divided into four classes according to both their sequence identity and catalytic activity.

Class I includes HDAC1, 2, 3 and 8, which are located mainly in the nucleus. HDAC3 forms an exception to this class because it possesses, in addition to the nuclear localization signal (NLS) present in this HDAC class, a

nuclear export signal (NES), which suggests a possible cytoplasmic localization. The activity of these enzymes is modulated when they interact with chromatin proteins such as Sin3 (Switch intensive 3), NuRDs (nucleosome remodeling and deacetylating) and Co-REST (Co-repressor of REST; Zhang et al. 1999).

Class II is divided into two subclasses: subclass IIa includes HDAC4, 5, 7 and 9 and subclass IIb consists of HDAC6 and 10. HDAC9 is localized exclusively to the nucleus, whereas HDAC4, 5 and 7 contain an NLS and NES. These three enzymes are localized to both the nucleus and the cytoplasm. The catalytic activity of class IIa HDACs is very low and is hardly detectable *in vitro* (Fischle et al. 2002). In addition, it has been shown *in cellulo* that these enzymes are often complexed with other HDACs, suggesting a role different from that of a deacetylase. For example, HDAC4 allows the recruitment of the SMRT/N-CoR-HDAC3 complex to specific promoters, leading to transcriptional repression of targeted genes (Fischle et al. 2002). HDAC6 is mainly localized to the cytoplasm, where it is involved in the deacetylation of α -tubulin and consequently, regulation of microtubule-dependent cell motility. Moreover, this enzyme is able to target the chaperon protein HSP90, which stabilizes client proteins (Bali et al. 2005). This HDAC has two catalytic domains arranged in tandem and one functional HUB (HDAC6-, USP3- and Brap2-related zinc finger motif) domain absent in other HDACs. This domain is located in the C-terminal region and acts as a signal for ubiquitination of HDAC6, leading to its degradation. HDAC10 possesses, like other class IIa HDACs, both NLS and NES domains. Although the catalytic domain is located in the N-terminal region, a second putative domain is located in the C-terminal region. In addition, two putative retinoblastoma (Rb) protein-binding domains are present, which could explain the involvement of this enzyme in regulating the cell cycle. HDAC10 interacts with six other HDACs (HDAC1, 2, 3, 4, 5 and 7), suggesting a recruiting role rather than acting as a deacetylase (Tong et al. 2002). Class III, also called sirtuins for their analogy to the protein SIR2 (Silent Information Regulator 2) in yeast, contains seven members, SIRT1 to 7. SIRT1, 6 and 7 are localized to the nucleus. SIRT1 positively regulates transcription factors such as the nuclear factor kappa-B (NF- κ B), p53 and forkhead box (FOX) proteins and plays a role in chromatin condensation (i.e., histone deacetylation). SIRT6 and 7 are involved in DNA repair and ribosomal RNA transcription, respectively. SIRT2 is mainly localized to the cytoplasm and affects α -tubulin acetylation status. SIRT3, 4 and 5 are mitochondrial proteins. SIRT3 positively regulates the activity of the acetyl-Coenzyme A synthetase 2, leading to the production of acetyl-coenzyme A (Hallows et al. 2006; Schwer et al. 2006), and deacetylates complex I of the

respiratory chain involved in ATP production (Ahn et al. 2008). Thus, SIRT3 regulates energetic cell homeostasis. SIRT4 lacks deacetylase activity; however, it has an ADP-ribosylase activity. This ribosylation inactivates glutamate dehydrogenase, which in turn inhibits insulin secretion in pancreatic β -cells (Argmann and Auwerx 2006). Lastly, SIRT5 deacetylates and thus activates carbamoyl phosphate synthetase 1, which promotes ammonia detoxification (Nakagawa and Guarente 2009; Nakagawa et al. 2009).

Class IV comprises only HDAC11, which is localized in the nucleus and has a catalytic domain in the N-terminal region. This enzyme is structurally related to HDAC3 and 8 of class I, but also has similarities with class II; for these reasons, this new class of enzyme was created (Gao et al. 2002).

The reaction of deacetylation

Classes I, II and IV possess a zinc-dependent mechanism of action. Their catalytic domain in the N- or C-terminal region forms a tubular pocket with the zinc ion at the bottom. This ion is stabilized by two aspartate and one histidine residue and forms electrostatic bonds with a catalytic water molecule and the oxygen of the acetyl functional moiety of the substrate. Due to an electron transfer between the aspartate and histidine residues, the catalytic water molecule is activated, allowing a nucleophilic attack on the carbon of the acetyl moiety. This reaction leads to an oxyanion tetrahedral intermediate stabilized by a tyrosine residue in the catalytic site. Then, the nitrogen of the substrate lysine involved in the bond with the acetate accepts a proton from an aspartate-histidine relay. Hence, the carbon–nitrogen bond is broken and both the deacetylated substrate and the acetate are released (Finnin et al. 1999; Hodawadekar and Marmorstein 2007).

Class III relies on a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent mechanism. However, based on crystallographic studies, two alternative mechanisms have been suggested. In the first model, the nicotinamide group is hydrolyzed, allowing the nucleophilic attack of the acetate's oxygen to the 1' carbon of the remaining ribose. In the second model, the nucleophilic attack of the acetate's oxygen at the 1' carbon of the NAD⁺-ribose leads to the release of the nicotinamide. In both cases, once the acetyl group is bonded to the 1' carbon of the ribose, there is a proton transfer facilitated by a histidine in the catalytic site, which renders the 2' oxygen nucleophilic. This oxygen will then attack the carbon of the acetate, and this reaction will result in the formation of a cyclic intermediate. The nitrogen of the substrate's lysine then accepts a proton from a histidine. This transfer then breaks the connection between the acetate and the lysine. Reaction products are

nicotinamide, deacetylated protein and 2-O'-acetyl-ADP-ribose. The latter will be recycled with the addition of nicotinamide and removal of the acetyl group (Hodawadekar and Marmorstein 2007; Hoff et al. 2006).

Cellular targets of acetylation

HDAC activity is involved, due to the large range of substrates, in many cellular processes (Table 1). Indeed, gene expression is modulated by the acetylation status of histones and transcription factors. Acetylation of histone lysine residues modulates histone-DNA and histone-protein interactions as well as chromatin remodeling. Thus, hyperacetylation of histones is associated with a relaxed state of chromatin and active gene expression (Minucci and Pelicci 2006). Moreover, acetylation of transcription factors affects their cellular localization. Indeed, NF- κ B, as well as STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) and STAT3, is translocated into the nucleus following acetylation of specific lysine residues, where they activate the transcription of target genes. Interestingly, the transactivation function of other transcription factors, such as p53 and FOXO proteins, is also positively regulated by acetylation. In addition, the activity of the Rb protein is modulated by the presence of acetyl groups blocking its cyclin E-CDK (cyclin-dependent kinase) 2-dependent phosphorylation. This acetylation-dependent hypophosphorylation leads to cell cycle arrest. Moreover, the acetylation of factors involved in maturation, stability and translation of messenger RNA can have an impact on their function. Indeed, the acetylation of hnRPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) and PAP (poly-[A]-polymerase) modifies the interaction between these proteins with pre-mRNA. Protein stability can also be affected by acetylation of proteins destined to the proteasome. Indeed, the acetylation of p53, p73, Smad7 (mothers against decapentaplegic homolog 7) and c-myc prevents their ubiquitination and thus their degradation. In contrast, acetylation of HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) facilitates its interaction with ubiquitin-ligase E3 and transit to the proteasome. Interestingly, cell mobility is dependent on α -tubulin and cortactin acetylation status. Indeed, HDAC6- and SIRT2-mediated deacetylation of α -tubulin promotes microtubule depolymerization and therefore increases microtubule dynamics and cell mobility (Hubbert et al. 2002). In addition, deacetylated cortactin promotes cell motility by interacting with F-actin, leading to actin polymerization (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011).

Finally, the microtubule network is necessary for an active clearance of cytotoxic misfolded protein through the aggresome pathway (Johnston et al. 1998). This alternative pathway of protein degradation via aggresome organelles protects cells against an overloading of the ubiquitin

proteasome-system (UPS) due to an accumulation of misfolded proteins in cellular stress conditions. In this system, HDAC6 that possesses a ZnF-UBP (zinc-finger ubiquitin binding) domain binds polyubiquitinated misfolded proteins and delivers them to p150(Glued), a component of dynein/dynactin microtubule motor complex. Misfolded protein are then transported to the MTOC (microtubule organizing center), where aggresomes are formed leading to the activation of the autophagic clearance activation that allow degradation of misfolded proteins in a proteasome-independent manner (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011; Lee et al. 2010).

HDAC inhibitors in cancer therapy

Epigenetic alterations and cancer

Carcinogenesis is not exclusively due to mutations of the nucleotide sequence but also involves epigenetic alterations. Thus, according to the major role played by protein acetylation in gene expression, a disruption in the balance between HAT and HDAC activities may contribute to the transformation of a normal cell to a cancerous cell (Fig. 2). Indeed, aberrant hypoacetylation of histones and non-histone proteins, caused by a decrease in HAT activities, aberrant HDAC recruitment to the promoter regions of certain genes (e.g., tumor suppressor genes [TSGs]) and/or increase in HDAC expression leading to excessive gene silencing, is frequently observed in many forms of cancer. More precisely, a decrease in HAT activities could be due to either mutations of HAT isoforms, such as p300, or chromosomal translocations. The latter leads to the formation of fusion proteins such as MLL-CBP, MLL-p300, MOZ-CBP, MOZ-p300 or MOZ-TIF2 involved in aberrant gene expression. For example, in a normal state, MOZ controls RUNX1 expression, which is involved in cell differentiation, whereas the fusion protein MOZ-CBP induces the repression of this protein, thus promoting carcinogenesis (Bug and Ottmann 2010; Florean et al. 2011). Moreover, chromatin modifications induced by alterations in histone acetylation status of specific genes could be due to aberrant HDAC recruitment triggered by leukemia-associated fusion proteins, such as PLZF-RAR (promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor- α) or PML-RAR (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor- α) in promyelocytic leukemia. Indeed, the RAR is able to bind DNA with HDAC-containing complexes and repress transcription of target genes in the absence of a ligand. The presence of retinoic acid disrupts these inhibitory complexes to the benefit of transcriptional activator complexes, which contain HAT. The fusion-proteins PLZF-RAR and PML-

RAR block this dissociation and recruit other enzymes involved in chromatin structure modifications, promoting a drastic inhibition of transcription (Florea et al. 2011; Minucci and Pelicci 2006). This mechanism is responsible for aberrant recruitment of HDACs to specific promoters involved in differentiation and impairs p53 functions, which play an important role in leukemogenesis. In addition to their involvement in the early stages of tumorigenesis and cancer development, aberrant cooperation between HATs and HDACs can influence tumor invasion and metastasis properties (Tai et al. 2007). Moreover, in some cancers, HDAC isoforms are either overexpressed, as with HDAC1, 2, 6, 8 and SIRT1, or

underexpressed, as with HDAC4, 5 and SIRT4 (Bradbury et al. 2005). Finally, sirtuins are known to induce angiogenesis, which is critical for tumor growth and metastasis (Liu et al. 2009; Potente et al. 2007). In addition to histone acetylation, other histone modifications such as methylation are involved in chromatin structure and act together with DNA methylation on TSG silencing (Fig. 2; Florea et al. 2011; Hassan et al. 2007; Jones et al. 1998; Wade et al. 1999). Altogether, these mechanisms are implicated in apoptosis resistance, differentiation arrest, cell cycle perturbations leading to aberrant proliferation associated with tumorigenesis and tumor aggressiveness, including invasiveness and metastasis.

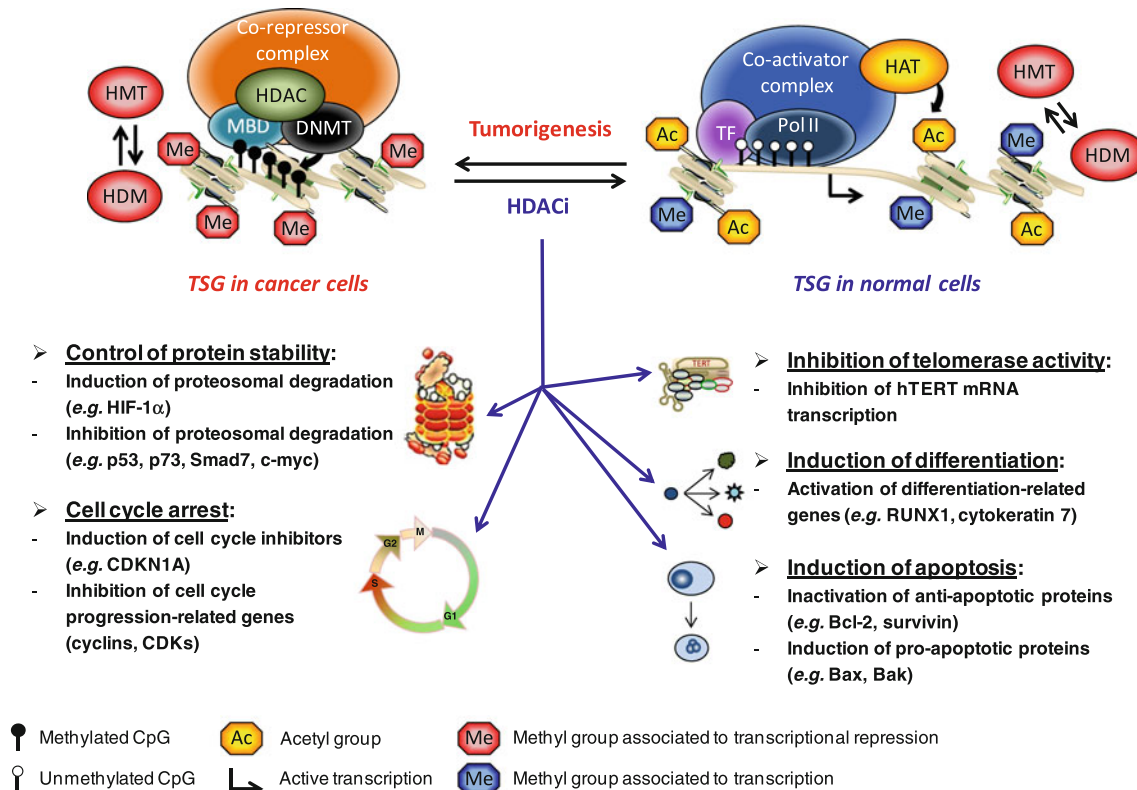


Fig. 2 Effects of HDAC inhibitors in cancer cells. In healthy cells, promoters of TSGs are unmethylated and present an enrichment of active histone marks such as acetylation and methylation (e.g., H3K4, H3K79, H3R17), which are actively maintained by HATs and HMTs, respectively. Repressive histone marks (H3K9 and H3K27) are maintained unmethylated by specific HDMs. These chromatin marks promote the recruitment of co-activator complexes such as chromatin remodeling complex (e.g., SWI/SNF), transcription factors and RNA polymerase II, which in turn trigger transcription. In cancer cells, TSGs are transcriptionally silenced due to DNMT-mediated DNA hypermethylation, which allows the recruitment of MBDs that bind methyl CpG, which in turn promote the recruitment of repressive complexes (e.g., mSin3A or SMRT/N-CoR) and HDACs leading to histone hypoacetylation. Additionally, active histone methylation marks are removed by specific HDMs and replaced by repressive methylation marks (e.g., H3K9, H3K27, H3R2) by specific HMTs. These modifications promote chromatin condensation and block the

recruitment of TF and RNA poly II complex. Consequently, inhibition of HDAC activities is responsible for the modulation of protein degradation, induction of cellular differentiation and apoptosis, and inhibition of telomerase expression and cell cycle progression. *Bax* Bcl-2-associated X protein, *Bcl-2* B-cell lymphoma 2, *CDK* cyclin-dependent kinase, *CDKN* CDK inhibitor, *DNMT* DNA methyl transferase, *HAT* histone acetyl transferase, *HDAC* histone deacetylase, *HDACi* HDAC inhibitor, *HIF* hypoxia-inducible factor, *HDM* histone demethylase, *HMT* histone methyl transferase, *hTERT* human telomerase reverse transcriptase, *MBD* methyl binding domain protein, *Pol II* RNA polymerase II, *RUNX* runt-related transcription factor, *Sin3* switch intensive 3, *Smad7* mothers against decapentaplegic homolog 7, *SMRT/N-CoR* silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors/nuclear hormone receptor co-repressor, *SWI/SNF* switch/sucrose non-Fermentable, *TF* transcription factor, *TSG* tumor suppressor gene

Classification of HDAC inhibitors

Epigenetic mechanisms, in contrast to mutations, are potentially reversible and are thus, interesting therapeutic targets. With regard to the involvement of HDACs in cancer, HDAC inhibitors (HDACi) are currently under development for anticancer therapy. Most of these molecules have a binding site for catalytic zinc, a tail (linker) mimicking the side chain of lysine and a “cap” for obstructing the entrance to the active site. These inhibitors can be classified according to their structure into five categories: short-chain fatty acids, hydroxamates, cyclic peptides, benzamides and depsipeptide (Bieliauskas and Pflum 2008; Khan et al. 2008). Nevertheless, many molecules with a potential inhibitory activity against HDAC but with a chemical structure different than the first five have been identified. A significant number of these molecules were isolated from natural sources (Table 2). Among these molecules, pan-HDAC inhibitors and isoform- or class-specific inhibitors have been identified. Interestingly, HDAC inhibitors are used in anti-cancer therapy for their anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-inflammatory activities. Moreover, HDACi can restore differentiation processes in cancer cells (Fig. 2).

HDAC inhibitors of natural and dietary origins

Within the chemical class of short-chain fatty acids, sodium butyrate is present in the gastrointestinal tract as a consequence of microbial fermentation of dietary fiber (Fig. 3). It has been shown that butyrate inhibits HDAC classes I, IIa and IV (Davie 2003). This compound leads to growth arrest, differentiation of leukemic cells and induces apoptosis following the deterioration of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Rosato et al. 2003; Schneckeburger et al. 2006). In addition, another short-chain fatty acid, propionate, was shown to inhibit HDAC activity (Davie 2003). Both compounds induce autophagy with the up-regulation of LAM-2 (lysosomal-associated membrane protein 2) expression and LC3 conversion (Tang et al. 2011). However, considering the low stability of this compound, its use is limited to in vitro studies.

The hydroxamic acid trichostatin A (TSA) from the actinomycete *Streptomyces hygroscopicus* is a potent pan-HDACi. This molecule presents anti-proliferative properties, induces apoptosis through induction of both the pro-apoptotic protein Bax and caspase 3 and reduces telomerase activity by inhibiting hTERT (human telomerase reverse transcriptase) mRNA expression (Woo et al. 2007). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) is a synthetic derivative of TSA, which was approved by FDA (Food and Drug Administration) for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma in 2006 (Wagner et al. 2010). Interestingly,

cells treated by these two related molecules enter in autophagy to protect themselves from the stress induced by these drugs (Shao et al. 2004; Zou et al. 2011). Moreover, regarding the involvement of HDAC6 in the formation of aggresomes, tubacin, a synthetic hydroxamic acid that inhibits specifically HDAC6, should be able to impair autophagy (Hideshima et al. 2005). Indeed, Lee et al. 2010 shown that knock-down of HDAC6 induces a defect of fusion of autophagosomes and lysosomes resulting in an accumulation of ubiquitinated proteins.

Natural cyclic peptides have also been demonstrated to act as HDACi. This is the case of FR235222, isolated from *Acremonium* sp., which induces an accumulation of cells in G1 phase accompanied by an increase in p21 expression and down-regulation of cyclin E in the human promyelocytic leukemia U937 cell line (Petrella et al. 2008).

The depsipeptide FK228 (or Romidepsin), isolated from *Chromobacterium violaceum*, which preferably inhibits class I HDACs, leads to cell growth inhibition and apoptosis induction in leukemic cells (Furumai et al. 2002; Rosato et al. 2003). Moreover, this compound leads to induction of the autophagy pathway with the involvement of AIF (apoptosis inducible factor) translocation from mitochondria to the nucleus (Watanabe et al. 2009). The FDA approved this compound in 2009 for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (Wagner et al. 2010).

Benzamides represent a chemical class wherein no promising natural compounds have yet been identified. However, some synthetic products belong to this class, such as MS-275 and MGCD0103. Such compounds are interesting due to their selectivity against class I HDACs compared to the pan-HDACi SAHA. These molecules are currently undergoing phase II clinical trials (Khan et al. 2008).

Other chemical classes that demonstrate interesting anticancer properties have also been investigated. Psammaphin A, isolated from the marine sponge *Aplysina rhax*, demonstrates inhibitory activities against class I HDACs, accompanied by an increase in histone H3 acetylation (Kim et al. 2007).

Organosulfur compounds isolated from garlic, such as allyl mercaptan (AM) and diallyl disulfide (DADS), represent an interesting class of HDACi. Indeed, AM and DADS induce, following inhibition of HDACs (including HDAC8), an increase in the acetylation of core histones H3 and H4 in the promoter region of the CDKN1A (CDK inhibitor 1A) gene. Increased CDKN1A promoter acetylation induces p21 overexpression, which subsequently leads to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells (Druesne et al. 2004; Link et al. 2010; Nian et al. 2008).

Isothiocyanates such as phenethyl isothiocyanate (PEITC) from cruciferous vegetables (e.g., broccoli) show inhibitory activities against HDACs and induce an increase

Table 2 List of natural HDAC modulators

Chemical class	Compound	Origin	Target	Comments	References
Cyclic peptides ^a	Apicidin D	<i>Fusarium</i> spp.	Class I		Han et al. (2000)
	Azumamide E	<i>Mycale izuensis</i>	Class I		Maulucci et al. (2007)
	Chlamydocin	<i>Diheterospora chlamydosporia</i>	Class I		De Schepper et al. (2003)
	FR235222	<i>Acremonium</i> sp.	Class I		Petrella et al. (2008)
	Trapoxin A and B	<i>Corollospora intermedia</i>	Class I		Furumai et al. (2001)
Depsipeptides ^a	FK228 (Romidepsin)	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Class I	Approved by the FDA for CTCL	Furumai et al. (2002)
	Largazole	<i>Symploca</i> sp.	Class I		Ying et al. (2008)
	Spiruchostatin A	<i>Pseudomonas</i>	Class I		Crabb et al. (2008)
Flavonoïdes	Butein [#]	<i>Rhus verniciflua</i>	SIRT1		Yang et al. (2009)
	Daidzein [#]	Soybean	SIRT1	Clinical phase IV	Rasbach and Schnellmann (2008)
	Flavone	<i>Feijoa sellowiana</i>	HDAC1	Clinical phase II	Bontempo et al. (2007)
	Genistein	Soy		Clinical phase IV	Basak et al. (2008)
	Luteolin [#]	Sweet pepper, celery, parsley	SIRT1		Attoub et al. (2011)
	Pomiferin	<i>Maclura pomifera</i>	Class I		Son et al. (2007)
	Quercetin [#]	Citrus fruits, buckwheat	SIRT1	Clinical phase IV	Link et al. (2010)
	Silibilin [#]	Milk thistle	SIRT1		Zhou et al. (2006)
Hydroxamates ^a	Amamistatin	<i>Nocardia asteroides</i>			Fennell and Miller (2007)
	TSA	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Class I, II and IV	Too toxic	Woo et al. (2007)
Isothiocyanates	PEITC	Cruciferous vegetables	Class I	Clinical phase II	Wang et al. (2008)
	Sulforaphane	Cruciferous vegetables		Clinical phase II	Myzak et al. (2004)
Organosulfures	AM	Garlic (<i>Allium sativum</i>)	HDAC8		Nian et al. (2008)
	bis (4-hydroxybenzyl) sulfide	Knotweed (<i>Pleuropteris ciliinervis</i>)	Class I		Son et al. (2007)
	DADS	Garlic (<i>Allium sativum</i>)			Druesne et al. (2004)
Short-chain fatty acids ^a	Sodium butyrate	Fermentation of dietary fibers	Class I, IIa and IV	Low stability	Davie (2003)
	Sodium propionate	Fermentation of dietary fibers	ND		Aoyama et al. (2010)
Stilbenes	Piceatannol [#]	Blueberries	SIRT1	Clinical phase IV	Wang et al. (2008)
	Resveratrol [#]	Red grapes	SIRT1		
Others	Caffeine	<i>Coffea arabica</i>	HDAC5	Clinical phase IV	Mukweho et al. (2008)
	Cyclostelletamines	Marine sponges	Class I		Oku et al. (2004)
	Dihydrocoumarin	<i>Melilotous officinalis</i>	SIRT1 and 2		Olaharski et al. (2005)
	DIM	Cauliflower and broccoli	Class I	Clinical phase II	Bhatnagar et al. (2009)
	Depudecin	<i>Alternaria brassicicola</i>			Kwon et al. (1998)
	MCP30	Bitter melon seeds	Class I		Xiong et al. (2009)
	Nicotinamide	Vitamin B3 metabolite	SIRT1	Clinical phase IV	Zhang et al. (2011)
	Psammaphlin A	<i>Aplysinella rhax</i>	Class I		Kim et al. (2007)

AM allyl mercaptan, DADS diallyl disulfide, CTCL cutaneous T-cell lymphoma, DIM 3,3'-diindolylmethane, FDA food and drug administration, HDAC histone deacetylase, ND not determined, PEITC phenethyl isothiocyanate, SIRT sirtuin, TSA trichostatin A

^a Chemical class of compounds that have a “classical” structure of HDAC inhibitors. All molecules are HDAC inhibitors (unless otherwise indicated, [#] for activators). More information about clinical trials can be found at <http://clinicaltrials.gov/>

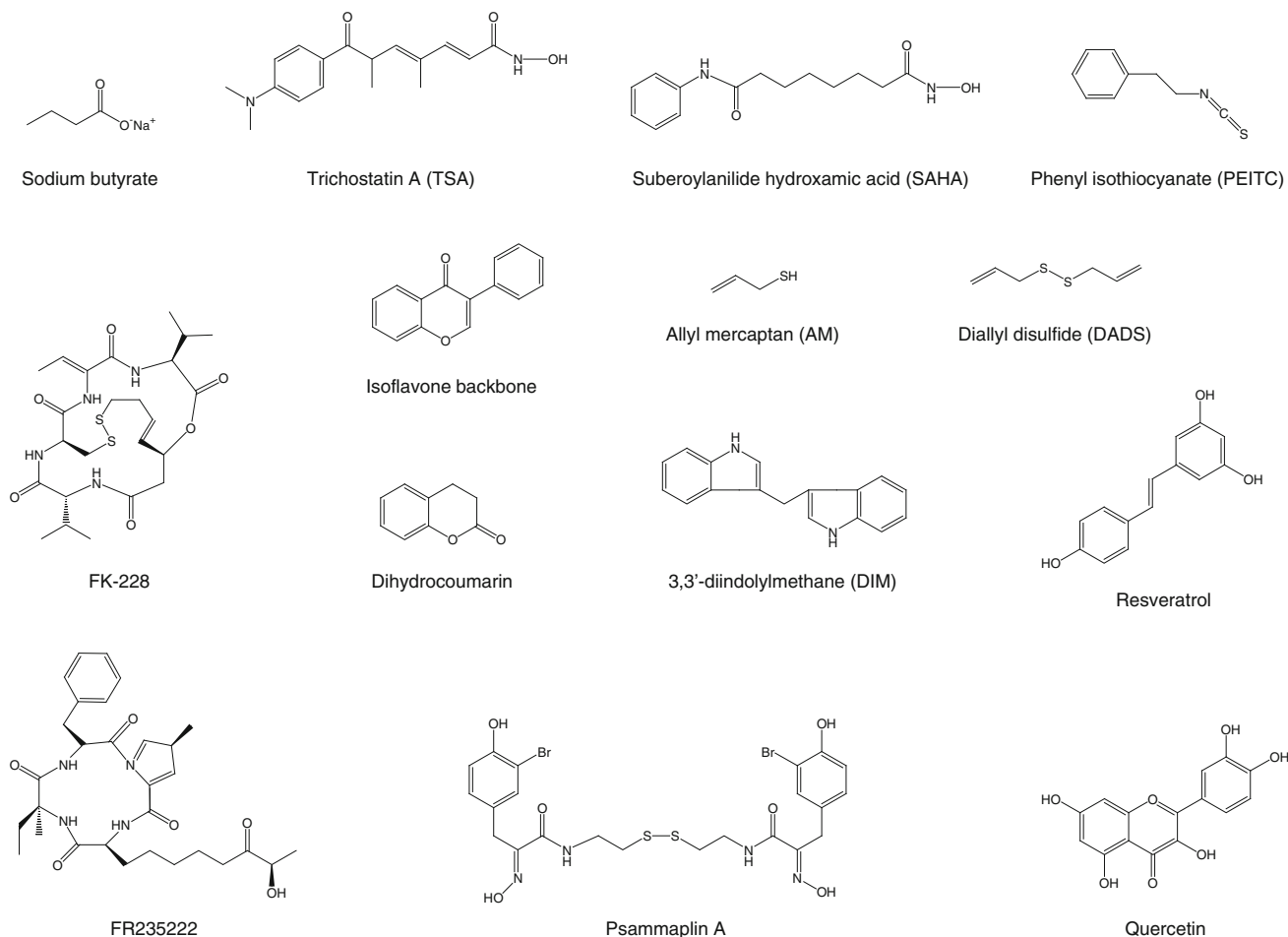


Fig. 3 Structure of HDAC modulators

in histone acetylation, particularly at promoters of genes encoding p21 and Bax, which are involved in the cell cycle and apoptosis, respectively (Wang et al. 2008).

Indole-3-carbinol from broccoli and cauliflower is metabolized to 3,3'-diindolylmethane (DIM) and induces the proteasomal degradation of class I HDACs (1, 2, 3 and 8), thereby inhibiting the anti-apoptotic protein survivin. Moreover, it has been reported that this treatment induces the expression of the genes encoding p21 and p27, which are proteins involved in cell cycle arrest in G1 phase (Bhatnagar et al. 2009; Link et al. 2010).

Regarding class III HDACs, it seems therapeutically interesting to find activators of sirtuins. The activators resveratrol and quercetin are polyphenols isolated from grapes and citrus fruits, respectively. These molecules induce SIRT1 activity, which in turn deacetylates survivin and subsequently triggers apoptosis (Wang et al. 2008). However, it has been reported that inhibition of class III HDACs might favor tumor suppression. For example, isoflavones isolated from soybeans are capable of inhibiting HDACs and activate HATs. These modulations result

in TSG activation (CDKN1A, CDKN2A and PTEN) and oncogene inhibition (hTERT; Link et al. 2010). Finally, dihydrocoumarin, a molecule isolated from *Melilotus officinalis* that is widely used as a dietary supplement, is able to reverse heterochromatin-induced epigenetic silencing concomitantly with induction of a senescence- and aging-like phenotype associated with inhibition of SIRT1 activity, leading to an increase in p53 acetylation and apoptosis rate (Olaharski et al. 2005).

Conclusion and perspectives

Alterations in the balance of HAT/HDAC activities resulting in aberrant protein acetylation status are frequently observed in many forms of cancer. In particular, increased deacetylation is involved in epigenetically mediated TSG silencing associated with tumorigenesis. Therefore, HDACs represent a promising class of anti-cancer drug targets. Regarding HDACi, there are numerous molecules currently undergoing clinical trials, and some

are already approved for anticancer therapy. HDACi have multiple biological effects (Fig. 2) that could probably be attributed to the large number of proteins post-transcriptionally modified by lysine acetylation. Consequently, it would be more appropriate to call HATs and HDACs lysine acetyltransferases (KATs) and lysine deacetyltransferases (KDACs), respectively. Furthermore, HDACi, from a chemosensitization point of view, seem particularly attractive when combined with either conventional chemotherapeutic drugs inducing apoptosis (e.g., doxorubicin or etoposide) and/or with other epigenetically active drugs, such as the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine, to restore epigenetically mediated gene silencing (Chai et al. 2008; Schnekenburger et al. 2011; Yoon et al. 2010). Hence, it seems that HDACi offer promising alternatives for anticancer therapies. However, researchers are still actively looking for new HDACi from natural origins because they represent an almost inexhaustible source of new chemical structures that could be used for the design of future potent HDACi and the development of new class- or isoform-specific HDACi. Among natural HDACi, dietary compounds are of particular interest because of their potential for chemoprevention purposes. Nevertheless, to fully exploit this aspect, rigorous studies still need to be conducted in order to evaluate the potential as well as the proportion of specific dietary HDACi, compared to other dietary constituents, to reduce the occurrence of cancer. In addition, it is necessary to take in account the possible side effects of a diet enriched with naturally occurring epigenetic modulators. Nonetheless, besides technical challenges, the potential of dietary HDACi and, by extension, epigenetic modulators should be considered for future cancer chemoprevention.

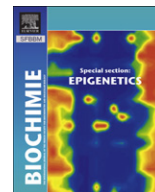
Acknowledgments CS and MS are supported by an Action Lions “Vaincre le Cancer” grant. M. Diederich’s research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by the “Recherche Cancer et Sang” foundation, “Recherches Scientifiques Luxembourg,” the “Een Häerz fir Kriibskrank Kanner” association, the Action Lions “Vaincre le Cancer” Luxembourg and Televie Luxembourg. Editing and print costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

References

- Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14447–14452
- Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM (2011) The role of HDAC6 in cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011:875824
- Aoyama M, Kotani J, Usami M (2010) Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition* 26:653–661
- Argmann C, Auwerx J (2006) Insulin secretion: SIRT4 gets in on the act. *Cell* 126:837–839
- Attoub S, Hassan AH, Vanhoecke B, Iratni R, Takahashi T, Gaben AM, Bracke M, Awad S, John A, Kamalboor HA, Al Sultan MA, Arafat K, Gespach C, Petroianu G (2011) Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *Eur J Pharmacol* 651:18–25
- Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280:26729–26734
- Basak S, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Mol Cancer Ther* 7:3195–3202
- Bhatnagar N, Li X, Chen Y, Zhou X, Garrett SH, Guo B (2009) 3,3'-diindolylmethane enhances the efficacy of butyrate in colon cancer prevention through down-regulation of survivin. *Cancer Prev Res* 2:581–589
- Bieliauskas AV, Pflum MK (2008) Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chem Soc Rev* 37:1402–1413
- Bontempo P, Mita L, Miceli M, Doto A, Nebbioso A, De Bellis F, Conte M, Minichiello A, Manzo F, Carafa V, Basile A, Rigano D, Sorbo S, Castaldo Cobianni R, Schiavone EM, Ferrara F, De Simone M, Vietri M, Cioffi M, Sica V, Bresciani F, de Lera AR, Altucci L, Molinari AM (2007) Feijoa sellowiana derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1902–1914
- Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C, Turner BM (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 19:1751–1759
- Bug G, Ottmann OG (2010) The DAC system and associations with acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Invest New Drugs* 28(Suppl 1):S36–S49
- Chai G, Li L, Zhou W, Wu L, Zhao Y, Wang D, Lu S, Yu Y, Wang H, McNutt MA, Hu YG, Chen Y, Yang Y, Wu X, Otterson GA, Zhu WG (2008) HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells. *PLoS One* 3:e2445
- Crabb SJ, Howell M, Rogers H, Ishaq M, Yurek-George A, Carey K, Pickering BM, East P, Mitter R, Maeda S, Johnson PW, Townsend P, Shin-ya K, Yoshida M, Ganesan A, Packham G (2008) Characterisation of the in vitro activity of the decapeptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A. *Biochem Pharmacol* 76:463–475
- Davie JR (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133:2485S–2493S
- De Schepper S, Bruwiere H, Verhulst T, Steller U, Andries L, Wouters W, Janicot M, Arts J, Van Heusden J (2003) Inhibition of histone deacetylases by chlamydocin induces apoptosis and proteasome-mediated degradation of survivin. *J Pharmacology Exp Ther* 304:881–888
- Druesne N, Pagniez A, Mayeur C, Thomas M, Cherbuy C, Duee PH, Martel P, Chaumontet C (2004) Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis* 25:1227–1236
- Fennell KA, Miller MJ (2007) Syntheses of amamistatin fragments and determination of their HDAC and antitumor activity. *Organic Lett* 9:1683–1685
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP (1999) Structures of a histone

- deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401:188–193
- Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W, Verdin E (2002) Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Molecular Cell* 9:45–57
- Florea C, Schnekenburger M, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M (2011) Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics* 3:581–609
- Folmer F, Orlikova B, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M (2010) Naturally occurring regulators of histone acetylation/deacetylation. *Curr Nutr Food Sci* 6:78–99
- Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:87–92
- Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H, Tanaka A, Komatsu Y, Nishino N, Yoshida M, Horinouchi S (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 62:4916–4921
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277:25748–25755
- Hallows WC, Lee S, Denu JM (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10230–10235
- Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW (2000) Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res* 60:6068–6074
- Hassan AH, Awad S, Al-Natour Z, Othman S, Mustafa F, Rizvi TA (2007) Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators. *Biochem J* 402:125–133
- Hideshima T, Bradner JE, Wong J, Chauhan D, Richardson P, Schreiber SL, Anderson KC (2005) Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8567–8572
- Hodawadekar SC, Marmorstein R (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26:5528–5540
- Hoff KG, Avalos JL, Sens K, Wolberger C (2006) Insights into the sirtuin mechanism from ternary complexes containing NAD⁺ and acetylated peptide. *Structure* 14:1231–1240
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455–458
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143:1883–1898
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187–191
- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M (2008) Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 409:581–589
- Kim DH, Shin J, Kwon HJ (2007) Psammoplanin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Exp Mol Med* 39:47–55
- Kwon HJ, Owa T, Hassig CA, Shimada J, Schreiber SL (1998) Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3356–3361
- Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, Taylor JP, Cuervo AM, Yao TP (2010) HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J* 29:969–980
- Link A, Balaguer F, Goel A (2010) Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 80:1771–1792
- Liu T, Liu PY, Marshall GM (2009) The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res* 69:1702–1705
- Maulucci N, Chini MG, Micco SD, Izzo I, Cafaro E, Russo A, Gallinari P, Paolini C, Nardi MC, Casapullo A, Riccio R, Bifulco G, Riccardis FD (2007) Molecular insights into azumamide e histone deacetylases inhibitory activity. *J Am Chem Soc* 129:3007–3012
- Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6:38–51
- Mukwevho E, Kohn TA, Lang D, Nyatia E, Smith J, Ojuka EO (2008) Caffeine induces hyperacetylation of histones at the MEF2 site on the Glut4 promoter and increases MEF2A binding to the site via a CaMK-dependent mechanism. *American journal of physiology. Endocrinol Metab* 294:E582–E588
- Myzak MC, Karplus PA, Chung FL, Dashwood RH (2004) A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res* 64:5767–5774
- Nakagawa T, Guarente L (2009) Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, SIRT5. *Aging* 1:578–581
- Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L (2009) SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137:560–570
- Nian H, Delage B, Pinto JT, Dashwood RH (2008) Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter. *Carcinogenesis* 29:1816–1824
- Oku N, Nagai K, Shindoh N, Terada Y, van Soest RW, Matsunaga S, Fusetani N (2004) Three new cyclostellamines, which inhibit histone deacetylase, from a marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Bioorgan Med Chem Lett* 14:2617–2620
- Olaharski AJ, Rine J, Marshall BL, Babiarz J, Zhang L, Verdin E, Smith MT (2005) The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. *PLoS Genetics* 1:e77
- Petrella A, D'Acunto CW, Rodriguez M, Festa M, Tosco A, Bruno I, Terracciano S, Taddei M, Paloma LG, Parente L (2008) Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1. *Eur J Cancer* 44:740–749
- Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, Mione M, Dejama E, Alt FW, Zeiher AM, Dimmeler S (2007) SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 21:2644–2658
- Rasbach KA, Schnellmann RG (2008) Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *J Pharmacology Exp Ther* 325:536–543
- Rosato RR, Almenara JA, Grant S (2003) The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res* 63:3637–3645
- Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Blasius R, Dicato M, Trentesaux C, Diederich M (2006) Transcriptional and post-transcriptional regulation of glutathione S-transferase P1 expression during butyric acid-induced differentiation of K562 cells. *Leuk Res* 30:561–568

- Schnekenburger M, Grandjenette C, Ghelfi J, Karius T, Foliguet B, Dicato M, Diederich M (2011) Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence, and autophagy. *Biochem Pharmacol* 81:364–378
- Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E (2006) Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10224–10229
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:18030–18035
- Son IH, Lee SI, Yang HD, Moon HI (2007a) Bis(4-hydroxybenzyl)sulfide: a sulfur compound inhibitor of histone deacetylase isolated from root extract of *Pleuropterus ciliinervis*. *Molecules* 12:815–820
- Son IH, Chung IM, Lee SI, Yang HD, Moon HI (2007b) Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of *Maclura pomifera*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17:4753–4755
- Spange S, Wagner T, Heinzel T, Kramer OH (2009) Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 41:185–198
- Tai KY, Shiah SG, Shieh YS, Kao YR, Chi CY, Huang E, Lee HS, Chang LC, Yang PC, Wu CW (2007) DNA methylation and histone modification regulate silencing of epithelial cell adhesion molecule for tumor invasion and progression. *Oncogene* 26:3989–3997
- Tang Y, Chen Y, Jiang H, Nie D (2011) Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 18:602–618
- Tong JJ, Liu J, Bertos NR, Yang XJ (2002) Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res* 30:1114–1123
- Wade PA, Geronne A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23:62–66
- Wagner JM, Hackanson B, Lubbert M, Jung M (2010) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clinical Epigen* 1:117–136
- Wang LG, Liu XM, Fang Y, Dai W, Chiao FB, Puccio GM, Feng J, Liu D, Chiao JW (2008a) De-repression of the p21 promoter in prostate cancer cells by an isothiocyanate via inhibition of HDACs and c-Myc. *Int J Oncol* 33:375–380
- Wang RH, Zheng Y, Kim HS, Xu X, Cao L, Luhasen T, Lee MH, Xiao C, Vassilopoulos A, Chen W, Gardner K, Man YG, Hung MC, Finkel T, Deng CX (2008b) Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Molecular Cell* 32:11–20
- Watanabe M, Adachi S, Matsubara H, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Watanabe K, Kamitsuji Y, Toyokuni SY, Hosoi H, Sugimoto T, Toguchida J, Nakahata T (2009) Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation. *Int J Cancer* 124:55–67
- Woo HJ, Lee SJ, Choi BT, Park YM, Choi YH (2007) Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells. *Exp Mol Pathol* 82:77–84
- Xiong SD, Yu K, Liu XH, Yin LH, Kirschenbaum A, Yao S, Narla G, DiFeo A, Wu JB, Yuan Y, Ho SM, Lam YW, Levine AC (2009) Ribosome-inactivating proteins isolated from dietary bitter melon induce apoptosis and inhibit histone deacetylase-1 selectively in premalignant and malignant prostate cancer cells. *Int J Cancer* 125:774–782
- Yang J, Kong X, Martins-Santos ME, Aleman G, Chaco E, Liu GE, Wu SY, Samols D, Hakimi P, Chiang CM, Hanson RW (2009) Activation of SIRT1 by resveratrol represses transcription of the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) by deacetylating hepatic nuclear factor 4alpha. *J Biol Chem* 284:27042–27053
- Ying Y, Taori K, Kim H, Hong J, Luesch H (2008) Total synthesis and molecular target of largazole, a histone deacetylase inhibitor. *J Am Chem Soc* 130:8455–8459
- Yoon SN, Roh SA, Cho DH, Kim MB, Hyun YL, Ro S, Kim BS, Kim SY, Kim YS, Kim JC (2010) In vitro chemosensitivity of gastric adenocarcinomas to histone deacetylase inhibitors, compared to established drugs. *Hepatogastroenterology* 57:657–662
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13:1924–1935
- Zhang Y, Wang J, Chen G, Fan D, Deng M (2011) Inhibition of Sirt1 promotes neural progenitors toward motoneuron differentiation from human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 404:610–614
- Zhou B, Wu LJ, Li LH, Tashiro S, Onodera S, Uchiyama F, Ikejima T (2006) Silibinin protects against isoproterenol-induced rat cardiac myocyte injury through mitochondrial pathway after up-regulation of SIRT1. *J Pharmacol Sci* 102:387–395
- Zou CF, Jia L, Jin H, Yao M, Zhao N, Huan J, Lu Z, Bast RC Jr, Feng Y, Yu Y (2011) Re-expression of ARHI (DIRAS3) induces autophagy in breast cancer cells and enhances the inhibitory effect of paclitaxel. *BMC Cancer* 11:22



Review

Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy

Carole Seidel¹, Cristina Florean¹, Michael Schnekenburger, Mario Dicato, Marc Diederich*

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2012

Accepted 14 May 2012

Available online 22 May 2012

Keywords:

Epigenetic inhibitors

HDAC

DNMT

Anti-cancer therapy

Clinical trials

Combinatory treatments

ABSTRACT

Epigenetic alterations are involved in every step of carcinogenesis. The development of chromatin-modifying agents (CMAs) has provided the ability to fight cancer by reversing these alterations. Currently, four CMAs have been approved for cancer treatment; two DNA demethylating agents and two deacetylase inhibitors. A number of promising CMAs are undergoing clinical trials in several cancer types. Moreover, already approved CMAs are still under clinical investigation to improve their efficacy and to extend their use to a broader panel of cancers. Combinatorial treatments with CMAs are already considered a promising strategy to improve clinical benefits and to limit side effects. The real mechanisms by which these CMAs allow the improvement and remission of patients are still obscure. A deeper analysis of the molecular features expressed by responding patients should be performed to reveal this information. In this review, we focus on clinical trials with CMAs, discussing the success and the pitfalls of this new class of anti-cancer drugs.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Epigenetics (literally meaning “what stands above genetics”) refers to all the changes in gene expression independent of DNA sequence alterations. DNA methylation, histone modification and small RNA-mediated gene silencing are considered the three main epigenetic mechanisms [1]. These mechanisms work synergistically to regulate the chromatin structure and to establish the precise pattern of gene expression required for normal physiological cell functions and a wide variety of biological processes. In particular, DNA methylation and histone modification regulate the access of the transcription machinery to their target genes, modulating transitions from euchromatin to heterochromatin and vice versa [2].

Together with genetic alterations, aberrant epigenetic modifications are responsible for the development of many diseases, including cancer [3–5]. Unlike mutations and other structural alterations of DNA, epigenetic modifications can be reversed. This

important feature explains the increasing interest of scientists in a better understanding of the epigenetic mechanisms and the increasing role of research in the development of new drugs able to restore normal epigenetic gene regulation. Currently, only a few chromatin-modifying agents (CMAs) have been approved for clinical use, and relatively few other molecules are undergoing clinical trials. The preclinical development of more new compounds provides the hope for a larger panel of therapeutic CMAs in the future. In this review, we will describe the currently known CMAs, with a special focus on clinical trials of these drugs either alone or in combination, and discuss the alternative strategies of epigenetic modulation for anti-cancer therapeutic purposes.

2. DNA demethylation as an anti-cancer strategy

DNA methylation was discovered decades ago as a covalent DNA modification that was clearly implicated in many physiological mechanisms. DNA methylation, together with specific histone residue modifications, is a mark typical of heterochromatin. The methylation of gene promoters results in the transcriptional silencing of the targeted genes. Repetitive DNA regions and mobile sequences (*i.e.*, retrotransposons) are also subject to methylation; this prevents retrotransposon activation and promotes chromosomal stability, acting as a guardian of the genome. Altogether, DNA methylation is implicated in tissue-specific gene transcription both during development and in adult life as well as in female X-chromosome inactivation, parental imprinting and the maintenance of genomic stability [6].

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; AZA, 5-azacytidine; CMA, chromatin-modifying agent; CML, chronic myeloid leukemia; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; CTCL, cutaneous T-cell lymphoma; DAC, 2'-deoxy-5-azacytidine; DHAC, 5,6-dihydro-5-azacytidine; DHDAC, 2'-deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine; DNMTi, DNMT inhibitor; FDA, Food and Drug Administration; HDACi, HDAC inhibitor; MDS, myelodysplastic syndrome; TSG, tumor suppressor gene; VPA, valproic acid.

* Corresponding author. Tel.: +352 24684040; fax: +352 2468 4060.

E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

¹ These authors contributed equally to this work.

DNA methyltransferases (DNMTs) are a family of enzymes responsible for DNA methylation. This modification is carried out on the cytosine of CpG dinucleotides. DNMTs transfer a methyl group from the methyl donor molecule *S*-adenosyl-*L*-methionine to the carbon 5 of the cytosine. CpGs are prevalent in clusters of long stretches of DNA called CpG islands, which are present in both the promoter and the body of most human genes [6]. Four main DNMT isoforms are present in mammalian cells. DNMT1 is considered the maintenance methyltransferase, with a strong affinity for hemimethylated DNA and responsible for the conservation of methyl marks during DNA replication. In contrast, DNMT3A and DNMT3B are mainly involved in *de novo* DNA methylation, synergizing with the catalytically inactive isoform DNMT3L. These isoforms play an important role in establishing the DNA methylation pattern of differentiating stem cells during embryonic and germ cell development [7,8]. Nevertheless, some recent data seem to argue against this rigid classification between *de novo* and conservative methylating enzymes [9]. The concerted activity of DNMT isoforms is responsible for the establishment and conservation of inheritable DNA methylation patterns.

The functional DNA methylation pattern of cells is often disrupted in tumors, with a general genomic hypomethylation and a local hypermethylation of tumor suppressor genes (TSGs). Hypomethylation is associated with genomic instability, including the possible activation of oncogenes, whereas hypermethylation leads to aberrant TSG silencing [10]. Mutations of, or the overexpression of DNMTs are possible mechanisms leading to these alterations [11,12], but other epigenetic regulators including histone-modifying enzymes can also be involved in this deregulatory process [13]. As the majority of cancers exhibit hypermethylation at specific TSGs as an early event, the TSG methylation pattern of coding genes as well as non-coding RNA genes has been suggested as a biomarker for tumor transformation [4,5,11,14]. The pharmacological inhibition of DNA methylation can lead to the re-

expression of TSGs, which ultimately impairs cell proliferation and causes cancer regression. These findings have encouraged researchers to develop demethylating agents and, more specifically, DNMT inhibitors (DNMTi) as anti-cancer therapeutics.

2.1. DNMT inhibitors

Inhibition of DNMT activity results in both global and local DNA demethylation with the subsequent reactivation of silenced TSGs. The reactivation of such genes forces tumor cells to exit the survival pathway by, for example, reactivating the proapoptotic pathways or by promoting differentiation (Fig. 1). New DNMTi are being actively developed to provide a novel arsenal of anti-cancer drugs.

The most well-characterized and potent CMAs able to revert methylation belong to the class of the nucleoside analogs. 5-azacytidine (AZA, Vidaza®) and 2'-deoxy-5-azacytidine (DAC, Decitabine, Dacogen®) were approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS) in the last decade (Fig. 2). Their mechanism of action *in vivo* is still not completely understood. Both CMAs undergo intracellular structural modification before their incorporation into nucleic acids. The metabolites of AZA are incorporated into RNA and, to a lesser degree, into DNA, whereas DAC is incorporated solely into DNA during replication. Once integrated into the newly synthesized DNA strand, these molecules form an irreversible bond with DNMT1. Trapping of the enzyme triggers its proteasomal degradation, leading to a passive genomic DNA demethylation by preventing methylation of newly synthesized DNA [15]. Due to their incorporation into DNA during DNA synthesis, these drugs are more effective in actively proliferating tumor cells than in normal differentiated cells. Treatment of cells with these agents at low concentrations leads to a genomic and gene-specific decrease in methylation and, later, can involve apoptosis, autophagy, senescence and differentiation [16,17]. At higher doses, these drugs

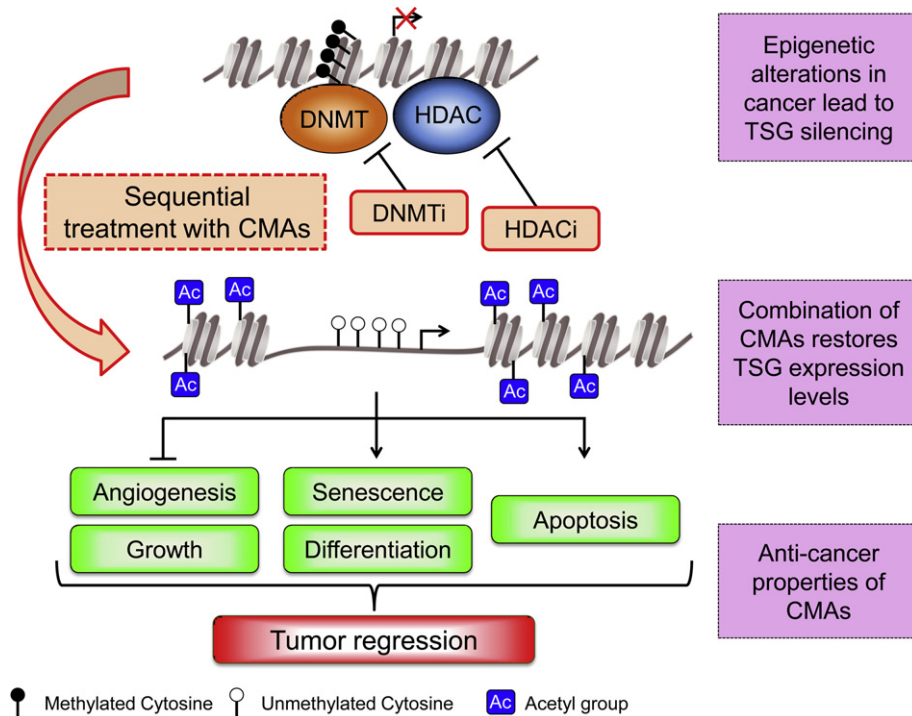


Fig. 1. The therapeutic use of chromatin-modifying drugs in anti-cancer therapy. In cancer cells, DNA hypermethylation and histone hypoacetylation in promoter regions of TSGs act synergistically to promote chromatin condensation and gene silencing. Combinatory treatments with chromatin-modifying agents (CMAs) such as DNMT and HDAC inhibitors (DNMTi and HDACi, respectively) reverse these epigenetic alterations, open chromatin structure and increase TSG gene expression levels. Restoration of normal TSG functions inhibits angiogenesis, tumor cell growth and induces senescence, differentiation or apoptosis. Together, these effects are promoting anti-cancer properties of CMAs.

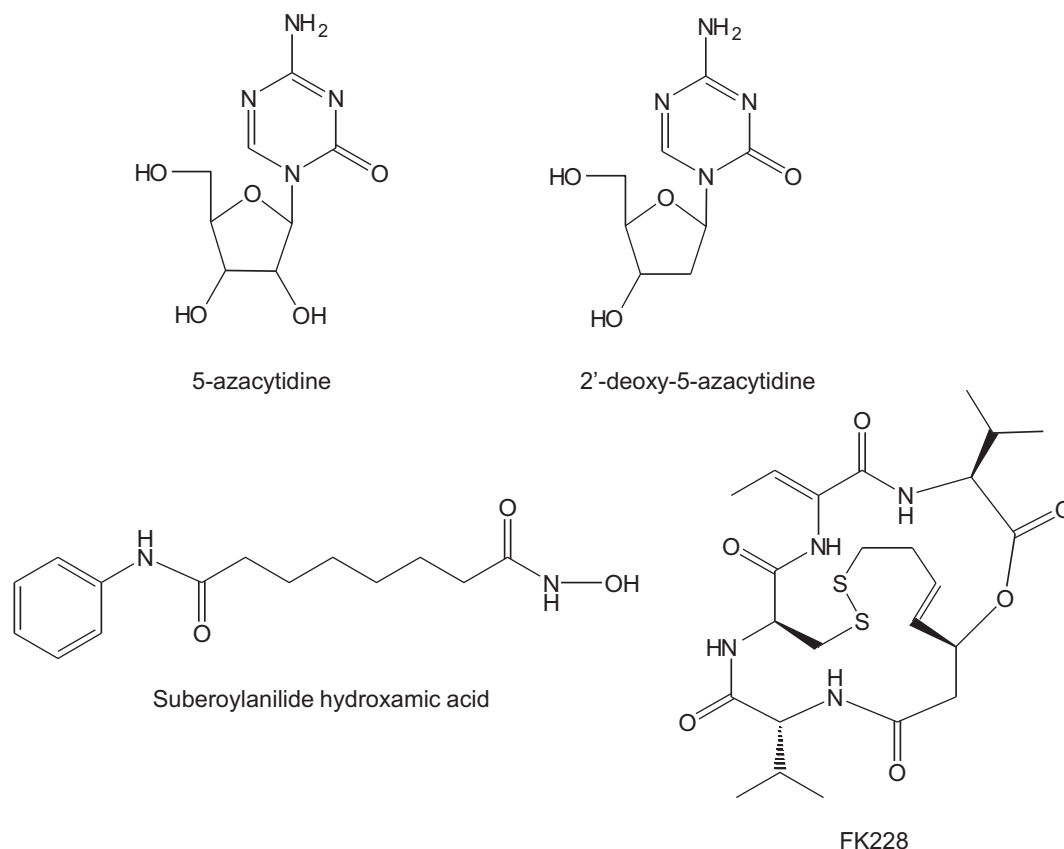


Fig. 2. Chemical structures of FDA-approved DNMT and HDAC inhibitors.

induce strong and nonspecific cytotoxicity *via* unclear mechanisms, which are not linked to DNA demethylation but are probably due to their incorporation into nucleic acids.

There are some major pitfalls in using azanucleosides as DNA demethylating agents. Indeed, their incorporation into nucleic acids limits their specificity of action and is probably the main cause of their hematologic toxicity and other side effects. Moreover, their half-life in aqueous solution is very short (around 1.5 and 20 h for AZA and DAC, respectively) [16]. Therefore, there is increasing interest in new CMAs that are able to catalytically inhibit DNMTs, to display more stability and less toxicity.

Within the class of nucleoside analogs, molecules have been developed to overcome these disadvantages, especially the low stability in aqueous solution. 5,6-dihydro-5-azacytidine (DHAC) presents higher stability compared to AZA but has not been further developed after initial clinical trial due to its cardiac toxicity and low response rates [18]. 2'-deoxy-5,6-di-hydro-5-azacytidine (DHDAC, KP-1212) has been already used in clinical trials against HIV. This molecule is more stable than DAC, and its DNA-demethylating activity has been confirmed in cellular models [19].

Another recently developed compound in the same class is zebularine. This nucleoside targets both DNMTs and cytidine deaminase, it can be administered orally because of its high stability, and its low toxicity allows its use for long-term treatment. Mammary tumors of mice treated with this compound were efficiently reduced [20,21].

Other pyrimidine nucleosides targeting DNA methylation were reported, including FdCyd (5-Fluoro-2'-deoxycytidine) [22] and 2'-Deoxy-N4-[2-(4-nitrophenyl) ethoxycarbonyl]-5-azacytidine (NPEOC-DAC) [23]. SGI-110 [24] has recently reached the recruiting step of a phase I clinical trial for MDS, chronic

myelomonocytic leukemia (CMML) and acute myeloid leukemia (AML) (<http://www.clinicaltrial.gov/>).

Many non-nucleoside molecules inhibit DNMTs, and some of them have shown promising effects in cellular cancer models. The lack of incorporation into nucleic acids seems to offer a safer way to target DNA methylation; however, the potency of these CMAs is much lower than that of nucleoside inhibitors, and for this reason, they have not yet been used in clinics. Nevertheless, the natural compounds in this list indicate the possibility of their use as chemopreventive rather than chemotherapeutic agents [5,232].

One example within this class is (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the major polyphenol of green tea, which inhibits DNMT1 *in vitro* at low micromolar concentrations and reverses the methylation of different TSGs in various cell lines [26–28]. However, it seems ineffective in other cell models at the epigenetic level [29,30], and its well-recognized anti-cancer effect may be due to its other numerous biological activities [31]. Green tea extracts containing EGCG are currently in trials for small-cell lung cancer as well as prostate and breast cancers. Some chemoprevention studies are assessing the potential of green tea extracts in lowering the risk of head and neck, breast, cervical, lung and esophageal cancers.

Procaine and procainamide, two compounds that belong to the classes of local anesthetic and anti-arrhythmic drugs, respectively, also exhibited DNMT inhibitory activity. The first reversed methylation of RARβ2 in breast cancer cells [32], whereas the second reactivates GSTP1 in prostate cancer cells [33]; both actions led to reduced cell proliferation.

Hydralazine is a molecule already used as an anti-arrhythmic that demonstrated efficacy in demethylating cervical cancer cell lines [34]. Controversial data were also reported for this compound;

the cell line- and time-dependency of its effect still requires clear definition [29,30].

RG108, a tryptophan derivative rationally designed based on the structure of DNMT1, can demethylate different TSGs in colon cancer cells without affecting their viability [30,35]. SGI-1027, a quinoline-based pan-DNMT inhibitor was recently reported to decrease the methylation of TSGs in cell lines [36]. Finally, MG98, an antisense oligonucleotide that prevents DNMT1 translation, is the only non-nucleotide agent to be used in clinical trials, but it has demonstrated little clinical benefit [37–39].

In Table 1, a broader list of CMAs that act on DNMTs *in vitro* and/or induce DNA demethylation is reported. Further studies are necessary to validate the effect of these compounds in cancer models.

2.2. DNA demethylating agents in the clinic

Clinical use of CMAs started approximately a decade ago with the inclusion of the first demethylating agent in cancer therapy. Presently, only two DNA demethylating molecules belonging to the nucleoside analog drug class, AZA and DAC, are clinically used for cancer treatment. As described above, non-nucleoside molecules show promising results in preclinical studies but require better characterizations and improvements in potency to be efficiently applied to anti-cancer therapy.

AZA and DAC have both been approved by the FDA for MDS treatment. They are currently distributed in injectable forms under the names Vidaza® (Celgene) and Dacogen® (Eisai), respectively. Clinical trials that supported their approval demonstrated significant response rates. The overall survival rate of patients with this pathology is increased by the treatment with AZA compared to conventional care, whereas for DAC, no clear positive result has been provided on this parameter. However, other parameters including hematological improvement and an improvement in the quality of life have led to the approval of a DAC regimen for MDS [40–43]. Currently, therapies using low doses of one of these hypomethylating agents is a common intervention for high-risk MDS.

These two CMAs cause side effects including neutropenia, thrombocytopenia, cytopenia-related infections, anemia, leukopenia, pyrexia, hyperbilirubinemia and pneumonia [41,44]. Currently, ongoing clinical trials for MDS involving these drugs aim to find the best schedule to maximize anti-cancer effects, increase response rates and minimize side effects to maintain good patient compliance. Avoiding drug resistance and relapse after the cessation of the therapy is another point that requires improvement [45].

Various trials have been completed or are ongoing against other types of blood cancer, primarily AML, chronic myeloid leukemia (CML) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). For solid tumors, these agents are mainly used as part of combined therapy trials, to improve the poor efficacy of the single agent therapy. We will summarize and discuss here the most recent results and the trials in progress with these two agents in the clinic.

Investigation of the effect of AZA on elderly patients (>75 years old) with high-risk MDS was recently reported. AZA induced higher response rates than the conventional care regimen, increasing the survival rate at 2 years from 15% to 55% [46]. Lubbert *et al.* reported the results of a comparative study between low dose DAC and the best supportive care in elderly MDS patients ineligible for chemotherapy, revealing an advantage for DAC-treated patients in terms of quality of life but no statistically significant increase in the overall survival of the patients [47]. The same group reported the results of a phase II trial involving AML patients who were over 60 years old and ineligible for chemotherapy. The study had promising results—the infusion of DAC over 72 h was well tolerated by this group of patients [48]. Moreover, a phase III trial involving older AML patients, the results of which were presented at the last American Society of Clinical Oncology meeting (2011), demonstrated an increased overall survival period (from 5 to 7.7 months) in DAC-treated patients (trial NCT00260832, <http://www.clinicaltrials.gov/>). These results suggest that DAC therapy could be effective in elderly AML patients.

A recently concluded trial involving CMML patients with advanced myeloproliferative or myelodysplastic features confirmed the efficacy of DAC in this class of patients as well, with a response

Table 1

DNA demethylating agents for anti-cancer therapy. Investigated molecules are listed with the corresponding stage of development for anti-cancer therapy. The website <http://www.clinicaltrials.gov/> has been used as a source of data about clinical trials.

Class	Compound	Origin	Stage of development	References
Nucleoside analogs	5-aza-2'-deoxycytidine	Synthetic	Approved for MDS. Clinical trials for AML, CML, CMML	[41]
	5-Fluoro-2'-deoxycytidine	Synthetic	Pre-clinical	[22]
	Azacytidine	Synthetic	Approved for MDS. Clinical trials for AML, CML, MM, CMML	[40]
	DHDAC	Synthetic	Pre-clinical	[19]
	NPEOC-DAC	Synthetic	Pre-clinical	[23]
	SGI-110	Synthetic	Clinical trials for MDS, CMML, AML	[149]
DNMT1 antisense	Zebularine	Synthetic	Pre-clinical	[20]
	MG98	Synthetic	Clinical trials for MDS, AML, solid tumors	[38,39]
Natural compounds	Caffeic acid	Coffea	Pre-clinical	[150]
	Curcumin	<i>Curcuma longa</i>	Clinical trials for colon and pancreatic cancer, Cutaneous T-cell Lymphoma, MDS	[151]
	Daizidein	Soy	Pre-clinical	[150]
	EGCG	Green tea	Clinical trials for solid tumors (in the form of green tea extract)	[26,27]
	Genistein	Soy	Clinical trials for prostate, breast, kidney, pancreas cancer and melanoma	[152]
	Mahanine	<i>Murraya koenigi</i>	Pre-clinical	[153]
	Nanaomycin A	<i>Streptomyces OS-3966</i>	Pre-clinical	[154]
	Parthenolide	Feverfew	Pre-clinical	[151]
	Psammoplins	<i>Pseudoceratina purpurea</i>	Pre-clinical	[155]
	Other	Disulfiram	Synthetic	Pre-clinical
Hydralazine		Synthetic	Clinical trials for MDS (with magnesium valproate)	[157,158]
Procainamide		Synthetic	Pre-clinical	[159]
Procaine		Synthetic	Pre-clinical	[32]
RG108		Synthetic	Pre-clinical	[35]
SGI-1027		Synthetic	Pre-clinical	[36]

AML: acute myeloid leukemia, CML: chronic myeloid leukemia, CMML: chronic myelomonocytic leukemia, DHDAC: 2'-deoxy-5,6-di-hydro-5-azacytidine, EGCG: (–)-epi-gallocatechin-3-gallate, MDS: myelodysplastic syndrome, MM: multiple myeloma.

rate of approximately 40%. Importantly, this study investigated some outcome markers. In particular, the hypermethylation status of the *Tif-1 γ* (transcriptional intermediary factor 1 gamma) promoter was not predictive of the outcome, whereas the expression levels of the proto-oncogenes *c-Jun* and *c-Myb* were inversely correlated with survival [49].

Some studies assessed the benefits of alternative dosage, modality and timing of administration of the two nucleoside analog drugs. A phase III comparative study between AZA and conventional care was conducted with a schedule of 75 mg/m² per day for 7 days, every 28 days [50]. The survival rate at two years of the AZA-treated group was approximately twice as high compared to the conventional care group. Although the 7-day schedule was approved by the FDA, other regimens have been designed and evaluated to avoid treatment of patients over weekends [51,52]. Oral administration with less constraints for the patients, was also investigated: a phase I study employing oral administration of AZA demonstrated clinical activity and demethylation in blood cells in patients with MDS, CMML and AML [53].

The FDA-approved schedule for DAC consists of intravenous administration of 15 mg/m² every 8 h for 3 days, every 6 weeks. A schedule of the intravenous administration of 20 mg/m² for 5 consecutive days every 4 weeks demonstrated efficiency comparable to the approved protocol [54]. A previous study also selected a 5-day intravenous administration of 20 mg/m² as the optimal schedule for DAC, compared to a 10-day protocol with the lower dose and a 5-day subcutaneous administration schedule [55].

It is critical to establish the molecular features that differentiate responding patients from non-responders and to clarify whether the level of TSG demethylation correlates with the patient's survival. The molecular features of patients treated with the two CMAs have been analyzed to achieve this aim. AZA treatment resulted in an efficient demethylation of many hypermethylated tumor markers in some MDS patients within a small treated group. Genomic methylation was decreased by up to 50% in the patient's peripheral blood mononuclear cells, although the methylation reappeared soon after the cessation of the treatment and even between treatment cycles. This event could explain the occurrence of relapses after treatment cessation. However, the degree of demethylation in this study did not correlate with the response, so the authors concluded that DNA demethylation was not required to achieve clinical improvement [56].

Most studies conducted thus far with AZA and DAC concern blood cancers. Some additional studies of the two nucleoside analog CMAs against solid tumors are ongoing. AZA has been used alone or in combination with other chemotherapeutics in trials against refractory breast cancer, non-small cell lung cancer, squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colon cancer. DAC has been used in a clinical trial involving patients with advanced refractory solid tumor or lymphoma [57] and as a part of a combination therapy administered in trials against resistant recurrent ovarian cancer, thyroid cancer, peritoneal cancer, melanoma, neuroblastoma and pulmonary and pleural malignancies [58]. Interestingly, a recent study on a newly diagnosed 78-year-old AML patient supports the idea of using very low dose AZA after remission as maintenance therapy. In this case study, AZA was well tolerated and beneficial over a period longer than 4 years [59].

No direct comparison between the two CMAs has been performed in the clinic. However, according to the results of non-clinical studies, their mechanisms of action and molecular outcomes differ to some extent. Indeed, the incorporation of AZA into RNA molecules causes alterations in the processing of tRNAs and rRNAs leading to inhibition of protein synthesis, which is not elicited by DAC. Moreover, the two drugs exert different effects on gene expression in leukemia cell lines [60,61]. The differential

effects of these two molecules are supported by a study using DAC after AZA failure, which resulted in a response rate of 28% [62]. However, these data were not confirmed in more recent studies. Indeed, high-risk MDS and secondary AML patients who do not respond properly to AZA have a very poor outcome [63,64]. Furthermore, the use of DAC in high-risk MDS patients after AZA failure was not able to improve the prognosis [63]. The prognosis of MDS patients after DAC failure is also poor, but no data are available about further treatment with AZA in these patients [65,66].

Therefore, it would be important to establish how DAC and AZA, in terms of their mechanisms of action, affect clinical outcomes and which of the two CMAs would be better to use for each cancer subtype, and whether patients resistant to one of the two CMAs could be sensitive to the other.

3. Histone deacetylase inhibitors

3.1. HDAC as a promising target in anti-cancer therapy

Histone deacetylases (HDACs) are a class of enzymes responsible for the removal of acetyl groups from the lysine residues of target proteins. Initially, this class of enzymes was thought to target only histones; however, a wide range of non-histone proteins including nuclear transcription factors (e.g., NF- κ B, STAT) and cytoplasmic proteins (e.g., α -tubulin, HSP90) are also substrates of these enzymes. Therefore, it would be more appropriate to call HDACs lysine deacetylases (KDACs). HDACs are divided into four classes based on sequence similarity, cellular localization and activity. Classes I, II and IV possess a zinc-dependent catalytic mechanism, whereas class III isoforms, or sirtuins, depend on the cofactor NAD⁺ for their catalytic activity [67].

Alterations of the normal acetylation pattern are known to contribute to tumorigenesis. This disruption of the functional acetylation profile can be triggered by different mechanisms. Overexpression of HDACs, leading to a general hypoacetylation, is generally observed in cancers. For instance, the HDAC1 and 3 isoforms were overexpressed in some ovarian cancers, while the HDAC5 and 9 isoforms were overexpressed in medulloblastoma, and HDAC6 was overexpressed in AML [68–71]. Alternatively, mutations in the sequences encoding HDAC isoforms were observed in various cancer subtypes leading to a loss of function of the mutated isoform or a disruption of its cellular localization [71]. A third mechanism involves fusion proteins frequently found in leukemia such as PML-RAR (promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha) and PLZF-RAR (promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor alpha). These chimeric proteins are responsible for an aberrant recruitment of HDACs to target gene promoters, promoting tumorigenesis *via* an abnormal silencing of the gene and the arrest of normal hematopoietic cell differentiation [5].

This class of enzymes represents an interesting target for anti-cancer therapy considering the important effects of HDACs in tumorigenesis. Moreover, as HDACs display differential expression or activity in tumor cells compared to healthy cells, the inhibition of selected HDACs can more specifically target cancer cells and could have fewer side effects compared to conventional chemotherapy [72]. Consequently, a large number of CMAs able to modulate HDAC activities, especially Zn⁺-dependent HDAC inhibitors (HDACi), have been developed in recent years for anti-cancer therapy.

3.2. HDACi in the clinic

Many HDACi have been discovered in recent decades as a result of intense research. These CMAs are currently grouped into five classes based on their chemical structure: benzamides, cyclic peptides, depsipeptides, hydroxamates and short fatty

Table 2

HDACi for anti-cancer therapy. The alternative names of compounds are indicated between brackets. Clinical trial phases indicated for anti-cancer therapy were found on the following web sites: <http://clinicaltrials.gov/>, <http://cancer.gov/clinicaltrials>. We cited only terminated or completed phases and cancer subtypes are specified between brackets. Pre-clinical means that compounds possess an effect on cancer cell proliferation and/or cancer cell death. No clinical trials means that compounds were only tested on HDAC activity and potential anti-tumor activity remains untested. References are related to the HDAC inhibitory activity of compounds. *Source: <http://www.hdacis.com>.

Chemical classes	Compounds	Origin	Targeted HDACs	Comments	References
Benzamides	Chidamide	Synthetic	HDAC1, 2, 3 and 10	Pre-clinical	[160]
	CI-994 (Tacedinaline, N-acetylinaline)	Synthetic	HDAC1 and 2	Clinical phase II (Myeloma)	[161]
	M344	Synthetic	ND	Pre-clinical	[162]
	MGCD0103 (Mocetinostat)	Synthetic	HDAC1, 2, 3 and 11	Clinical phase II (Lymphoma, leukemia, solid tumor)	[163]
	MS-275 (Entinostat, SNDX-275)	Synthetic	HDAC1, 2, 3 and 9	Clinical phase II (metastatic melanoma)	[164]
Cyclic peptides	PABAs class	Synthetic	ND	No clinical trials	[165]
	Apicidin D	<i>Fusarium</i> spp.	Class I and II	Pre-clinical	[166]
	Azumamide E	<i>Mycale izuensis</i>	Class I	No clinical trials	[167]
	Chlamydocin	<i>Diheterospora chlamydospora</i>	Class I	Pre-clinical	[168]
	HC-toxin	<i>Cochliobolus carbonum</i>	ND	No clinical trials	[169]
Depsipeptides	FR235222	<i>Acremonium</i> spsp.	Class I	Pre-clinical	[79]
	Trapoxin A and B	<i>Corollospora intermedia</i>	Class I	Pre-clinical	[170]
	WF-3161	<i>Petriella guttulata</i>	ND	Pre-clinical	[171]
	FK228 (Romidepsin, FR901228)	<i>Chromobacterium violaceum</i>	HDAC1, 2, 4 and 6	Approved by the FDA for CTCL	[172]
	Largazole	<i>Symploca</i> sp.	Class I	Pre-clinical	[173]
Hydroxamates	Spiruchostatin A	<i>Pseudomonas</i>	Class I	Pre-clinical	[174]
	A-161906	Synthetic	ND	Pre-clinical	[175]
	AAHA	Synthetic	ND	Pre-clinical	[176]
	ABHA	Synthetic	ND	Pre-clinical	[176]
	Amamistatin	<i>Nocardia asteroides</i>	ND	Pre-clinical	[177]
	CBHA	Synthetic	ND	Pre-clinical	[178]
	CHAP31	Synthetic	ND	Pre-clinical	[179]
	CHR-3996	Synthetic	Class I	Clinical phase I (solid tumors)	[180]
	dPAHAs class	Synthetic	Class IIa	No clinical trials	[181]
	ITF2357 (Givinostat)	Synthetic	Class I and II	Clinical phase II (chronic myeloproliferative neoplasms, multiple myeloma)	[182]
	JNJ-16241199 (R306465)	Synthetic	Class I	Clinical phase I (solid malignancies)	[183]
	KBH-A42	Synthetic	Class I and II	Pre-clinical	[184]
	LBH-589 (Panobinostat)	Synthetic	Class I, II and IV	Clinical phase III (CTCL, CML)	[185]
	NVP-LAQ824 (Dacinostat)	Synthetic	Class I and II	Clinical phase I (solid and hematologic malignancies)*	[186]
	Short-chain fatty acids	Oxamflatin	Synthetic	Class I, II and IV	Pre-clinical
PAHAs class		Synthetic	ND	No clinical trials	[165]
PCI-24781 (CRA-024781)		Synthetic	Class I and IIb	Clinical phase I (solid or hematologic tumor)	[187]
PCI-34051		Synthetic	HDAC8	Pre-clinical	[105]
PXD101 (Belinostat)		Synthetic	Class I, II and IV	Clinical phase II (malignant pleural mesothelioma, multiple myeloid, AML)	[188]
Pyroxamide		Synthetic	ND	Pre-clinical	[189]
SAHA (Vorinostat)		Synthetic	Class I, II and IV	Approved by the FDA for CTCL	[178]
SB207		Synthetic	Class I and II	Pre-clinical	[190]
SB939		Synthetic	Class I, II and IV	Clinical phase I (solid tumor)	[191]
SBHA		Synthetic	ND	Pre-clinical	[178]
Scriptaid		Synthetic	Class I, II and IV	Pre-clinical	[192]
SK7031		Synthetic	Class I	No clinical trials	[193]
SK7041		Synthetic	Class I	Pre-clinical	[193]
SK7045		Synthetic	Class I	No clinical trials	[193]
SK7068		Synthetic	Class I	Pre-clinical	[193]
SK7080	Synthetic	Class I	No clinical trials	[193]	
TSA	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Class I and II	Instability and low retention	[194]	
Short-chain fatty acids	Tubacin	Synthetic	HDAC6	Pre-clinical	[104]
	Tubastatin A	Synthetic	HDAC6 and 8	Pre-clinical	[195]
	AN-1 (butyroyloxymethyl butyrate)	Synthetic	ND	Pre-clinical	[196]
	AN-9 (Pivanex, pivaloyloxymethyl butyrate)	Synthetic	Class I, IIa and IV	Clinical phase II (CLL, melanoma)	[196]
	AR-42 (S-HDAC-42)	Synthetic	ND	Pre-clinical	[197]
	Sodium 4-phenylbutyrate	Synthetic	ND	Clinical phase II (brain tumor)	[198]
	Sodium butyrate	Fermentation of dietary fibers	Class I, IIa and IV	Instability and low retention	[199]
	VPA	Synthetic	Class I and IIa	Clinical phase I (solid tumor)	[200]

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Chemical classes	Compounds	Origin	Targeted HDACs	Comments	References
Other	AGK2	Synthetic	SIRT1, 2 and 3	Pre-clinical	[201]
	AM	<i>Allium sativum</i>	HDAC8	Pre-clinical	[202]
	APHAS class	Synthetic	Classes I and II	Pre-clinical	[203]
	Aurothioglucose	Synthetic	Classes I and IIa	No clinical trials	[204]
	bis (4-hydroxybenzyl) sulfide	<i>Pleuropterus ciliinervis</i>	Class I	Pre-clinical	[205]
	BML-210	Synthetic	ND	Pre-clinical	[206]
	Bromoacetamide	Synthetic	ND	No clinical trials	[207]
	Caffeine	<i>Coffea arabica</i>	HDAC5	Pre-clinical	[208]
	Cambinol	Synthetic	SIRT1 and 2	Pre-clinical	[209]
	CUDC-101	Synthetic	ND	Clinical phase I (solid tumors)	[103]
	Cyclostelletamines	<i>Haliclona</i>	Class I	Pre-clinical	[210]
	DADS	Garlic	ND	Pre-clinical	[211]
	Depudecin	<i>Alternaria brassicicola</i>	ND	Instability and low retention	[212]
	DIM	Cauliflower and broccoli	Classes I and III	Clinical phase II (prostate cancer)	[147]
	Ebselen	Synthetic	Classes I and IIa	No clinical trials	[204]
	EX-527	Synthetic	SIRT1, 2 and 3	Pre-clinical	[213]
	Genistein	<i>Flemingia vestita</i>	ND	Clinical phase III (prostate cancer)	[214]
	GNTI ditrifluoroacetate	Synthetic	HDAC5	Pre-clinical	[204]
	GW5074	Synthetic	SIRT1, 2 and 3	No clinical trials	[215]
	Histacin	Synthetic	ND	No clinical trials	[216]
	KD5150	Synthetic	pan-HDAC	Pre-clinical	[217]
	MCP30	<i>Bitter melon seeds</i>	Class I	Pre-clinical	[218]
	Menadione (Vitamin K3)	Synthetic	HDAC6 and HDAC8	Pre-clinical	[204]
	NBM-HD-1	Tree buds and sap flows	ND	Pre-clinical	[25]
	Nicotinamide	Endogenous	SIRT1 and 2	Pre-clinical	[219]
	NQN-1	Synthetic	HDAC6	Pre-clinical	[204]
	NQN-2	Synthetic	HDAC6	Pre-clinical	[204]
	NSC-95397	Synthetic	HDAC6 and class IIa	Pre-clinical	[204]
	Osajin	<i>Maclura pomifera</i>	Class I	Pre-clinical	[220]
	Pomiferin	<i>Maclura pomifera</i>	ND	Pre-clinical	[220]
	Phenethyl isothiocyanate	Cauliflower and broccoli	ND	Clinical phase I (lung cancer)	[221]
	Psammalin A	<i>Aplysinella rhax</i>	Class I	Pre-clinical	[222]
	Ro31-8220	Synthetic	SIRT1 and 2	No clinical trials	[215]
	Salermide	Synthetic	SIRT1, 2 and 3	Pre-clinical	[223]
	SeLSA	Synthetic	ND	Pre-clinical	[224]
	Sirtinol	Synthetic	SIRT1, 2 and 3	Pre-clinical	[225]
	Splitomicins	Synthetic	SIRT1 and 2	Pre-clinical	[226]
	Sulforaphane	Broccoli	ND	Pre-clinical	[227]
	Suramin	Synthetic	SIRT1, 2 and 5	Clinical phase III (prostate cancer)	[228]
	Tanikolide dimers	<i>Lyngbya majuscula</i>	SIRT1 and 2	No clinical trials	[229]
Tenovins	Synthetic	SIRT1 and 2	Pre-clinical	[230]	
Thiol-based SAHA analogs	Synthetic	ND	No clinical trials	[207]	
Trifluoromethyl ketone	Synthetic	ND	Pre-clinical	[207]	
Tryptamides	Synthetic	SIRT1 and 2	Pre-clinical	[231]	
U-73122	Synthetic	HDAC3	Pre-clinical	[204]	

ABHA: azelaic bishydroxamic acid, ALL: acute lymphocytic leukemia, AM: allyl mercaptan, AML: acute myeloid leukemia, CBHA: m-carboxycinnamic acid bishydroxamide, APHA: aroyl-pyrrolyl-hydroxy-amides, CHAP31: cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, CI-994: N-acetyl-dinaline, CML: chronic myeloid leukemia, CTCL: cutaneous T-cell lymphoma, DADS: diallyl disulfide, DIM: 3,3'-diindolylmethane, dPAHA: diphenyl acetic hydroxamic acid, FDA: Food and Drug Administration, GNTI ditrifluoroacetate: guanidinyl-naltrindole ditrifluoroacetate, HC-toxin: *Helminthosporium carbonum*, HDAC: histone deacetylase, MDS: myelodysplastic syndrome, ND: not determined, PABAs: polyaminobenzamides, PAHAs: polyaminohydroxamic acids, SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid, SBHA: suberic bishydroxamic acid, SeLSA: selenium-containing analogues of SAHA, SIRT: sirtuin, TSA: trichostatin A, VPA: valproic acid.

acids (Table 2). Moreover, many other compounds with different types of chemical structure were also found to be HDAC inhibitors. Among these CMAs, a considerable number were discovered in nature; synthetic derivatives have been synthesized by rational design or the modification of natural compounds [73,74] (Table 2).

The prototypical pharmacophore model for an HDACi consists of a metal-binding moiety that chelates the catalytic Zn⁺ ion, a linker region that mimics the substrate's lysine chain and a cap that blocks the access of the substrate to the active site. However, some molecules with a different chemical organization are also able to inhibit HDAC activity [75]. Some HDACi target all HDACs (pan-HDACi), whereas other CMAs are selective for one class or even for single isoforms.

The inhibition of HDAC enzymes in cancer cells modifies the proliferation and differentiation states of the tumor cells (Fig. 1). For example, some HDACi modulate cell-cycle progression through an increase in p21 expression [76,77], whereas others induce apoptotic

cell death [78,79] or modulate the commitment of cancer cells to differentiation [80,81].

Two HDACi, SAHA and FK228, received FDA approval for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) (Fig. 2). Currently, Celgene distributes FK228 (Istodax[®]) in an injectable form and Merck distributes SAHA (Zolinza[®]) in an oral capsule form. Moreover, several completed clinical trials and many other ongoing trials employ an HDACi as a single agent or in combination for anti-cancer therapy. Here, we will present and discuss the recent clinical trials with HDACi as single agents for the treatment of various types of cancer.

Two benzamides, MGCD0103 (Mocetinostat) and MS-275 (Entinostat), were evaluated in two clinical phase II trials for the treatment of patients with refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) and metastatic melanoma, respectively. MGCD0103 alone showed a limited efficacy against CLL, stabilizing the disease without improvement after a prolonged administration. Moreover, several side effects were observed, including anemia or infection.

The inhibition of HDAC activity was observed in the peripheral white blood cells of six of nine patients, but this inhibition did not correlate with disease improvement. MGCD0103 has a long half-life, which allows less frequent drug administration but prevents dose escalation or re-treatment. The authors recommend using this CMA in combination with other agents, such as conventional chemotherapeutic agents, to improve efficacy and limit toxicity [82]. One advantage of MGCD0103, beyond its long half-life, is its oral mode of administration (<http://methylgene.com/>). Treatment with MS-275 did not achieve any objective responses. However, this HDACi was well tolerated by patients and 25% of the patients showed disease stabilization. Therefore, MS-275 could be evaluated as part of a combination therapy to enhance its efficacy [83].

The depsipeptide FK228 (Romidepsin) was approved in 2009 for the treatment of CTCL. The two studies supporting its approval were sponsored by Gloucester Pharmaceuticals Incorporated (GPI) and the National Cancer Institute (NCI) and involved 96 and 71 patients, respectively. Both studies reported a response rate of approximately 35%, with the response time shorter in the NCI study (336 days compared to 454 days in the GPI study). Moreover, these studies reported a positive effect of FK228 in terms of pruritus relief, the number of Sézary cells, and the diameter of the lymph nodes, pustular lesions and erythematous plaques. The duration of the response and the low and reversible toxicity are other advantages of FK228 [84,85]. Currently, FK228 is undergoing phase II clinical trials for metastatic renal cell carcinoma, prostate cancer, metastatic breast cancer, ovarian epithelial or peritoneal cavity cancer and small cell lung cancer (SCLC).

Several hydroxamate-related HDACi are also being tested in clinical trials. SAHA (Vorinostat) was approved by the FDA in 2006 for the treatment of CTCL. Its approval was mainly based on a partial response of 24% of the patients, a clinical improvement in 58% and the complete resolution of pruritus in 9% of the patients [86]. Moreover, in a phase II clinical trial of SAHA against AML, breast cancer, non-small cell lung cancer, ovarian epithelial cancer, primary peritoneal cavity cancer and thyroid cancer, it induced a partial response or stabilized the disease [87–90].

ITF2357 (Givinostat) is undergoing a phase II evaluation for the treatment of chronic myeloproliferative neoplasms and multiple myeloma. ITF2357 was tested in patients with chronic myeloproliferative neoplasms carrying the mutation JAK2V617F, which constitutively activates the JAK/STAT signaling pathway. This CMA was well tolerated, and a partial or complete response along with decreased pruritus and levels of mutated JAK2 expression was observed after 6 months of treatment (58% of the patients had polycythemia vera/essential thrombocythemia, and 21% of the patients had myelofibrosis). Longer exposures as well as treatment in combination with other agents could provide better results [91]. A phase I study of ITF2357 in patients with multiple myeloma demonstrated a stabilization of the disease for 32% of patients after treatment. Nevertheless, the myeloma progressed in 42% of the patients, and several adverse events occurred, including thrombocytopenia, neutropenia or gastro-intestinal toxicity [92]. Additionally, a clinical phase II trial with ITF2357 against refractory Hodgkin's lymphoma was halted because of the drug's low efficacy, despite the fact that this HDACi seems to be well tolerated by patients (<http://clinicaltrials.gov/>).

NVP-LAQ824 (Dacinostat) entered into phase I trials against solid and hematologic malignancies; thus far, only stabilization of the disease has been observed. However, this HDACi is still promising because of its long half-life, which ranges between 6 and 15 h. Independent of the disease response, treatment of patients with the CMA NVP-LAQ824 induces the acetylation of histone H3 and HSP90, depletion of CRAF and expression of HSP72 [93]. Moreover, an analog of NVP-LAQ824, LBH-589 (Panobinostat), had completed

several phase I and II clinical trials for the treatment of solid and non-solid tumors, as well as phase III clinical trials against CTCL and CML. Two phase I clinical trials showed promising results using LBH-589 in an oral and intravenous form against CTCL [94] and hematologic malignancies [95], respectively. In both studies, patients presented an increase of histone acetylation in tumor cells associated with transcriptional repression and apoptotic cell death in CTCL and hematological malignancies, respectively. In addition, complete and partial responses were observed, but in the case of intravenous delivery a transient response was observed. Thus, it seems more interesting to use this CMA in its oral form. LBH-589 completed also several phase III clinical trials against CTCL and leukemia in its oral form and represents a promising anti-cancer molecule for the treatment of non-solid tumors.

PXD101 (Belinostat) has undergone phase II trials for the treatment of multiple myeloma, AML and malignant mesothelioma. Injection of PXD101 did not lead to an improvement of malignant mesothelioma, and the authors suggested this HDACi to be used in combination with classical chemotherapeutic agents [96].

SB939 underwent a phase I trial for solid tumors, in which it achieved a stabilization of the disease in 32% of the patients. Increased histone acetylation was observed in treated patients without a correlation to the dose used or the anti-tumor activity achieved. Despite the absence of an objective response, SB939 is well tolerated by patients. This CMA is orally administered, rapidly absorbed and has a long half-life [97].

Notably, other hydroxamate-related HDACi, CHR-3996, JNJ-16241199 and PCI-24781, are being used in phase I trials against solid or hematologic tumors.

Within the class of short-chain fatty acids, the two most characterized HDACi are sodium 4-phenylbutyrate and valproic acid (VPA). The first underwent a phase II trial for the treatment of pediatric brain tumors, and the latter was tested in a phase I trial for the treatment of solid tumors and central nervous system tumors. VPA led to minor responses in children with solid tumors, where only one patient presented a partial response associated to an increase in histone acetylation [98].

Among compounds with a chemical structure different from "classical" HDACi, some are under evaluation in clinical trials, including CUDC-101 for solid tumors (phase I), phenethyl isothiocyanate for lung cancer (phase I), and DIM (3,3'-diindolylmethane) and genistein for prostate cancer (phases II and III). However, it is also important to mention that the anti-tumor effects of HDACi are due to targeting not only HDAC activities, but also through other mechanisms. For example, PTEN pathway is activated by genistein and may account for its anti-tumor properties [99]. Similarly, in leukemia and prostate cancer cells DIM and phenethyl isothiocyanate exhibit anti-tumor activities, respectively, through Akt inactivation and JNK activation [100,101]. Phenethyl isothiocyanate inhibits also the complex III in mitochondria leading to ROS-mediated cell death in prostate cancer [102]. Finally, CUDC-101 displayed potent antiproliferative and proapoptotic activities by inhibiting synergistically HDAC activity and the receptor kinases epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancer cells [103].

As shown in Table 2, different chemical classes of HDACi of natural or synthetic origin are potential anti-cancer agents. Indeed, research and development of new HDACi is expanding to improve the clinical outcomes with the use of this class of drugs. The knowledge of the structures of the active sites and the mechanisms of action of the HDAC enzymes allowed rational design of the second generation of HDACi including SAHA, LAQ824 and MGCD0103 [75]. Moreover, the development of class- or isoform-specific inhibitors is progressing to decrease toxicity and side effects. Tubacin and PCI-34051, which inhibit HDAC6 and HDAC8,

respectively, are examples within this category [104,105]. Finally, the combination of HDACi with other agents is a promising way to improve cancer therapy and decrease toxicity and adverse events.

4. Anti-cancer therapy combining CMAs

The activity of CMAs used as single agents in clinical trials is very valuable but limited to some type of cancers and to a relatively small subset of responding patients. HDACi in particular have low response rates when used alone. The combination of CMAs with classical anti-cancer therapies including chemotherapeutic agents (idarubicin or cisplatin), phototherapy or radiotherapy is currently in clinical trials [106,107] (<http://www.clinicaltrial.gov/>). A particularly promising strategy, especially for the hematologic diseases, is to combine CMAs that target different epigenetic mechanisms, such as HDACi with DNA-demethylating agents. The synergy of the epigenetic events in the modulation of gene expression has been well established at the molecular level, even if the exact hierarchy and timing of the modifications remain unclear [108,109]. However, preliminary results demonstrating the sequence of events indicated that DNMTi should be administered before HDACi to achieve a higher degree of demethylation [110]. Such combination therapy would allow the cumulative effect of the two types of drug on tumor regression, possibly with lower doses of each drug. Targeting different mechanisms would also reduce the resistance to therapy. Reduced side effects, a broader responder population, and the possibility of a more stable regression are the desired clinical outcomes of such an anti-cancer strategy.

The combination of AZA and MS-275 in various phase I trials against MDS, CML or AML resulted in a complete response in 7%, a partial response in 13% and hematologic improvement in 23% of the treated patients. This study reported that both responders and non-responders exhibited reversal of the methylation of four TSGs (*CDKN2B* ($p15^{INK4B}$), *CDH1*, *DAPK1* and *SOCS1*) after only one cycle of AZA but did not exhibit an increase in their mRNA expression. The response to AZA treatment was associated with neither the basal level of methylation nor the degree of demethylation induced by the drug; furthermore, the demethylation was transient, as previously reported [111].

AZA and sodium 4-phenylbutyrate were tested together in a phase I study for metastatic solid tumors; 50% of the patients exhibited a partial response or stabilized disease, along with a good tolerance of the drugs and an increase in histone acetylation [112].

AZA and VPA were tested in combination in a phase I trial involving patients with advanced cancers. The combination induced global DNA hypomethylation and histone hyperacetylation. Moreover, 25% of the patients exhibited disease stabilization, which was correlated with an increase in histone acetylation, but not with DNA methylation status [113]. The same two CMAs plus all-trans retinoic acid (ATRA) were tested in two trials in AML and MDS patients. In the first trial, this combination led to a complete response in 38% of the patients, whereas 6% had partial response, 41% exhibited disease stabilization and 15% exhibited disease progression. A study of promoter methylation status revealed a correlation between the DNA demethylation levels of four TSGs (*FZD9*, *ALOX12*, *HPN*, *CALCA*) and the patient response rate [114]. The second trial reported a response rate of 42% of the patients. Furthermore, a decrease in global methylation, an increase in histone acetylation and the increased expression of *CDKN2B* ($p15^{INK4B}$) and *CDKN1A* (*p21*) were observed in several treated patients; nevertheless, no correlation with the response was established [115].

DAC was used together with VPA in a phase I/II trial against AML and MDS as well as in phase I trials against CLL and non-Hodgkin lymphoma. In the first study, 22% of the patients responded, with

an increase in mean survival time. Moreover, an increase in histone acetylation and a decrease of LINE (long interspersed nuclear element) and *CDKN2B* ($p15^{INK4B}$) methylation were observed in the absence of a relationship with the response [116]. In the second study, the best response was the stabilization of the disease (achieved in 40% of the patients); no significant reduction of global DNA methylation was observed [117]. For an update on the latest current clinical trials, we recommend the reader to refer to <http://www.clinicaltrial.gov/>.

Although incomplete, this list suggests that the clinical research in the field of epigenetic drugs is progressing very rapidly, and new results are expected soon. However, the mechanisms by which these CMAs achieve a benefit for the patients are far from clear, as are the reasons for a lack of response in many patients.

5. Recurrent mutations of epigenetically active proteins: clinical implications

DNMT3A mutations are recurrent in AML and MDS, and seem to be correlated to poorer prognosis [118]. Recent studies highlighted that loss of DNMT3A blocks differentiation in hematopoietic stem cells, pointing out a possible role for DNMT3A mutations in the establishment of leukemia, through impaired differentiation and maintenance of the stem cell program [119]. However, the exact outcome of each DNMT3A mutations in terms of DNA methylation has still to be established.

Interestingly, the results of a small clinical study suggest that AML patients with low DNMT3A activity in their leukemic blast could have stronger benefit from DAC treatment than normal DNMT3A expressing patients [120]. Moreover, high levels of mir-29b, which downregulates DNMT3A/B [121], resulted in favorable prognosis in patients treated with DAC [122]. The presence of DNMT3A mutations has been proposed as a stratification and minimal residual disease marker, due to their high stability throughout the disease [123].

Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations have been found in 70% of patients with low-grade brain tumors, and with lower incidence in AML and other tumors. The mutated proteins lack the original enzymatic activity of converting isocitrate into α -ketoglutarate and acquire the new function of converting α -ketoglutarate into 2-hydroxyglutarate. IDH mutations have been correlated with a high DNA methylation phenotype in patients. Interestingly, glioma patients bearing IDH mutations have a better prognosis [124]. Mutated IDH1 is able to modulate the epigenome not only causing a general increase in DNA methylation, but also altering specific histone lysine methylation [125]. These effects are possibly induced by inhibition of TET-mediated demethylation and impairment of Jumonji-C domain histone demethylase function through depletion of α -ketoglutarate [125–127].

Recurrent mutations occur also in the TET2 protein. Recently, the emerging epigenetic role of TET proteins (TET1–3) has gained the attention of the scientific community because a large amount of data has been generated about the mechanism by which these proteins contribute to activate the DNA demethylation processes [128,129]. Many studies have tried to establish the relevance of TET2 mutations in cancer prognosis, with controversial results [130–132]. Recently, an analysis of TET2 mutations in an AML patients cohort reveal that the presence of this genetic feature did not affect the response to induction therapy and the overall survival [133]. One study in a small cohort of MDS patients treated with AZA and VPA revealed no differences in duration of response and survival in mutated TET2 bearing patients [134]. Similarly, Itzykson *et al.* reported no survival improvement and a low blast count in MDS and AML patients with TET2 mutations, respectively [135].

More insight into the mechanism of the function of TET proteins and their partners is required to predict whether their modulation would have beneficial outcomes. Interestingly, TET2 and IDH mutations are mutually exclusive, suggesting a common mechanism of action [126]. One attractive opportunity in the activation of TET-mediated demethylation to treat cancer could be the reversal of TSG hypermethylation; on the other hand, a decrease in the activity of this enzyme may be helpful in preventing a loss of global genomic methylation to preserve genomic stability.

Besides mutations affecting proteins involved in DNA methylation, mutations in the coding sequence of various HDACs were also reported in various cancer subtypes. These mutations have been linked to tumor development since they induce the aberrant transcription of key genes regulating important cellular functions such as cell proliferation, cell-cycle regulation and apoptosis. Somatic mutations of HDAC2 were detected in sporadic tumors with microsatellite instability and in 21% of colon tumors from hereditary non-polyposis colorectal carcinoma patients. Remarkably, these mutations are associated with the loss of HDAC2 expression conferring to tumor cell lines a resistance to the anti-proliferative and proapoptotic effects of TSA [136,137]. HDAC4 mutations were found in breast cancer patient samples at significant frequency using a genome-wide sequencing approach [138]. These findings suggest that the mutational status of HDAC isoforms can predict the efficacy of HDACi and therefore may be useful for the pharmacogenomics selection of cancer patients treated with CMAs.

6. Conclusions and perspectives

Epigenetic modifications, including DNA methylation and histone deacetylation, are common in malignant diseases. CMAs have emerged as a novel therapeutic class of molecules with anti-cancer potential. The opportunity to reverse epigenetic marks opened the door to an intensive investigation of epigenetic drugs in the last decades. The CMAs currently available in the clinic constitute the first members of an alternative class of chemotherapeutic molecules. Drug discovery in this field is occurring at a fast pace, producing new candidate drugs with the aim not only to improve the existing CMAs but to also broaden the panel of available targets.

CMAs are well tolerated by patients and can be used in combination with each other or with conventional chemotherapeutic agents to limit adverse health effects and promote tumor regression. Nevertheless, correlation between tumor response and the underlying molecular mechanisms are not always well established. Consequently, more thorough studies must be performed to elucidate their exact mode of action in order to improve the efficacy of treatments.

In the future, the targeting of histone modifications other than deacetylation will join the existing strategies. Indeed, histone acetyltransferases (HATs), the enzymatic counterpart to HDACs, as well as the enzymes responsible for the control of histone methylation (i.e., histone methyltransferases (HMTs) and histone demethylases (HDMs)) have been studied in recent years as alternative targets for epigenetic therapy [5,67]. The data collected thus far *in vitro* suggest that the specific inhibition of many members of these families could be beneficial in cancer therapy [139,140]. Many molecules have been brought to light in the past few years by screening both natural compounds and synthetic derivatives. Natural HAT inhibitors include anacardic acid, garcinol and curcumin. Among synthetic compounds, several isothiazolone and quinoline derivatives, and well as the pyrazolone-furan C646 and Coenzyme A derivatives, have demonstrated HAT inhibitory activities and some of them displayed anti-cancer properties [141,142].

Targeting histone methylation is a more complicated task, due to the large number of enzymes catalyzing this modification. Nevertheless, many molecules have demonstrated specificity toward different HMTs and HDMs. For instance, among HMTs, SUV39h is inhibited by the fungal alkaloid chaetocin, and G9a is inhibited by the diazepin-quinazolin-amine derivative BIX-01249. Moreover, EPZ00477 as well as a group of *S*-adenosyl-homocysteine analogs have been recently found as DOT1L specific inhibitors [143,144]. Inhibitors of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and Jumonji-C domain proteins have also been discovered recently. Among all the emerging CMAs, some have been already tested on cancer cell lines demonstrating promising anti-cancer activities [5,143,145,146]. Combining these agents with the ones already in use will be another promising step for epigenetic anti-cancer therapies.

Furthermore, CMAs can be used as cancer chemoprevention agents. Indeed, because of the differential expression of some HDAC and DNMT isoforms in cancer cells, the inhibition of these enzymes can prevent aberrant gene expression and the inhibition of TSGs [147,148].

The complex world of epigenetic regulation has not been completely unwound, and it is likely that a better understanding of these processes will bring to light other possible therapeutic targets.

Some major open questions regarding the approved CMAs must be addressed. For example, the poor sensitivity of certain types of tumors (namely solid tumors) compared to other types still requires an explanation. Moreover, to achieve a long-term remission, avoiding relapse and resistance, a deeper understanding of the underlying molecular mechanism is necessary. To uncover these answers, the relevance of each different epigenetic change in determining the clinical response must be established.

Another important goal of epigenetic anti-cancer therapy is to establish epigenetic markers that could predict and define the clinical response to CMAs in cancer patients. The recent development of high-throughput sequencing techniques able to decipher the “methylome” of tumor cells is a first step toward the definition of these markers. Extensive and instructive data are expected from the genomic-scale analysis of the patients treated with CMAs in past and future clinical trials. Taken as a whole, the epigenetic interventions with current and future CMAs offer an attractive approach to treat cancer and other diseases associated with epigenetic alterations as an alternative as well as a support to conventional therapy.

Acknowledgments

CS is recipient of a Télévie Luxembourg fellowship. CF is supported by an AFR fellowship from the Ministry of Research, Luxembourg. MS is supported by a “Waxweiler grant for cancer prevention research” from the Action Lions “Vaincre le Cancer”. This work was supported by the “Recherche Cancer et Sang” foundation, the “Recherches Scientifiques Luxembourg” association, by the “Een Häerz fir kriebeskrank Kanner” association, by the Action LIONS “Vaincre le Cancer” association and by Télévie Luxembourg. Editing and print costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

References

- [1] T. Kouzarides, Chromatin modifications and their function, *Cell* 128 (2007) 693–705.
- [2] S.L. Berger, The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature* 447 (2007) 407–412.
- [3] T. Karius, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, MicroRNAs in cancer management and their modulation by dietary agents, *Biochem. Pharmacology* 83 (12) (2012) 1591–1601.

- [4] M. Schnekenburger, M. Diederich, Epigenetics offer new Horizons for colorectal cancer prevention, current colorectal cancer report (2012).
- [5] C. Florean, M. Schnekenburger, C. Grandjettette, M. Dicato, M. Diederich, Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications, *Epigenomics* 3 (2011) 581–609.
- [6] A. Portela, M. Esteller, Epigenetic modifications and human disease, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 1057–1068.
- [7] B.O. Van Emburgh, K.D. Robertson, Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants, *Nucleic Acids Research* 39 (2011) 4984–5002.
- [8] S.K. Ooi, A.H. O'Donnell, T.H. Bestor, Mammalian cytosine methylation at a glance, *J. Cell Science* 122 (2009) 2787–2791.
- [9] E.L. Walton, C. Francastel, G. Velasco, Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance, *Epigenetics* 6 (2011).
- [10] K.D. Robertson, DNA methylation and human disease, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 597–610.
- [11] Y. Kanai, S. Hirohashi, Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state, *Carcinogenesis* 28 (2007) 2434–2442.
- [12] S. Mizuno, T. Chijiwa, T. Okamura, K. Akashi, Y. Fukumaki, Y. Niho, H. Sasaki, Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia, *Blood* 97 (2001) 1172–1179.
- [13] M.J. Hoffmann, R. Engers, A.R. Florl, A.P. Otte, M. Muller, W.A. Schulz, Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B are associated with DNA methylation changes in prostate cancer, *Cancer Biol. Ther.* 6 (2007) 1403–1412.
- [14] T. Karius, M. Schnekenburger, J. Ghelfi, J. Walter, M. Dicato, M. Diederich, Reversible epigenetic fingerprint-mediated glutathione-S-transferase P1 gene silencing in human leukemia cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 1329–1342.
- [15] J. Ren, B.N. Singh, Q. Huang, Z. Li, Y. Gao, P. Mishra, Y.L. Hwa, J. Li, S.C. Dowdy, S.W. Jiang, DNA hypermethylation as a chemotherapy target, *Cell. Signalling* 23 (2011) 1082–1093.
- [16] S. Amatori, I. Bagaloni, D. Viti, M. Fanelli, Premature senescence induced by DNA demethylating agent (Decitabine) as therapeutic option for malignant pleural mesothelioma, *Lung Cancer* 71 (2011) 113–115.
- [17] M. Schnekenburger, C. Grandjettette, J. Ghelfi, T. Karius, B. Foliguet, M. Dicato, M. Diederich, Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence, and autophagy, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 364–378.
- [18] N.J. Yogelzang, J.E. Herndon 2nd, C. Cirrincione, D.C. Harmon, K.H. Antman, J.M. Corson, Y. Suzuki, M.L. Citron, M.R. Green, Dihydro-5-azacytidine in malignant mesothelioma. A phase II trial demonstrating activity accompanied by cardiac toxicity. Cancer and Leukemia Group B, *Cancer* 79 (1997) 2237–2242.
- [19] M. Matousova, I. Votruba, M. Otmar, E. Tloustova, J. Gunterova, H. Mertlikova-Kaiserova, 2'-deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine - a less toxic alternative of 2'-deoxy-5-azacytidine: a comparative study of hypomethylating potential, *Epigenetics* 6 (2011) 769–776.
- [20] C. Champion, D. Guianvarc'h, C. Senamaud-Beaufort, R.Z. Jurkowski, A. Jeltsch, L. Ponger, P.B. Arimondo, A.L. Guieysse-Peugeot, Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine, *PLoS One* 5 (2010) e12388.
- [21] M. Chen, D. Shabashvili, A. Nawab, S.X. Yang, L. Dyer, K.D. Brown, M. Hollingshead, K.W. Hunter, F.J. Kaye, S.N. Hochwald, V.E. Marquez, P.S. Steeg, M. Zajac-Kaye, DNA methyltransferase inhibitor, zebularine, delays tumor growth and induces apoptosis in a genetically engineered mouse model of breast cancer, *Mol. Cancer Ther.* (2011).
- [22] J.H. Beumer, J.L. Eisman, R.A. Parise, E. Joseph, J.L. Holleran, J.M. Covey, M.J. Egorin, Pharmacokinetics, metabolism, and oral bioavailability of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine in mice, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 7483–7491.
- [23] H.M. Byun, S.H. Choi, P.W. Laird, B. Trinh, M.A. Siddiqui, V.E. Marquez, A.S. Yang, 2'-Deoxy-N4-[2-(4-nitrophenyl)ethoxycarbonyl]-5-azacytidine: a novel inhibitor of DNA methyltransferase that requires activation by human carboxylesterase 1, *Cancer Letters* 266 (2008) 238–248.
- [24] J.C. Chuang, S.L. Warner, D. Vollmer, H. Vankayalapati, S. Redkar, D.J. Bearss, X. Qiu, C.B. Yoo, P.A. Jones, S110, a 5-Aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2010) 1443–1450.
- [25] W.J. Huang, Y.C. Liang, S.E. Chuang, L.L. Chi, C.Y. Lee, C.W. Lin, A.L. Chen, J.S. Huang, C.J. Chiu, C.F. Lee, C.Y. Huang, C.N. Chen, NBH-HD-1: a novel histone deacetylase inhibitor with anticancer activity, *Evid Based. Complement. Alternat. Med.: ECAM* 2012 (2012) 781417.
- [26] M.Z. Fang, Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh, C.S. Yang, Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines, *Cancer Res.* 63 (2003) 7563–7570.
- [27] M. Pandey, S. Shukla, S. Gupta, Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells, *International Du Cancer, Int. J. Cancer* 126 (2010) 2520–2533.
- [28] V. Nandakumar, M. Vaid, S.K. Katiyar, (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells, *Carcinogenesis* 32 (2011) 537–544.
- [29] J.C. Chuang, C.B. Yoo, J.M. Kwan, T.W. Li, G. Liang, A.S. Yang, P.A. Jones, Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 1515–1520.
- [30] C. Stresmann, B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper, F. Lyko, Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines, *Cancer Res.* 66 (2006) 2794–2800.
- [31] C.S. Yang, H. Wang, G.X. Li, Z. Yang, F. Guan, H. Jin, Cancer prevention by tea: evidence from laboratory studies, *Pharmacol. Res.: Official J. Italian Pharmacol. Soc.* 64 (2011) 113–122.
- [32] A. Villar-Garea, M.F. Fraga, J. Espada, M. Esteller, Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells, *Cancer Res.* 63 (2003) 4984–4989.
- [33] X. Lin, K. Asgari, M.J. Putzi, W.R. Gage, X. Yu, B.S. Cornblatt, A. Kumar, S. Piantadosi, T.L. DeWeese, A.M. De Marzo, W.G. Nelson, Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide, *Cancer Res.* 61 (2001) 8611–8616.
- [34] P. Zambrano, B. Segura-Pacheco, E. Perez-Cardenas, L. Cetina, A. Revilla-Vazquez, L. Taja-Chayeb, A. Chavez-Blanco, E. Angeles, G. Cabrera, K. Sandoval, C. Trejo-Becerril, J. Chanona-Vilchis, A. Duenas-Gonzalez, A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes, *BMC Cancer* 5 (2005) 44.
- [35] B. Brueckner, R. Garcia Boy, P. Siedlecki, T. Musch, H.C. Kliem, P. Zielonkiewicz, S. Suhai, M. Wiessler, F. Lyko, Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases, *Cancer Res.* 65 (2005) 6305–6311.
- [36] J. Datta, K. Ghoshal, W.A. Denny, S.A. Gamage, D.G. Brooke, P. Phiasivongsa, S. Redkar, S.T. Jacob, A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation, *Cancer Res.* 69 (2009) 4277–4285.
- [37] E. Winquist, J. Knox, J.P. Ayoub, L. Wood, N. Wainman, G.K. Reid, L. Pearce, A. Shah, E. Eisenhauer, Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group investigational new drug study, *Investig. New Drugs* 24 (2006) 159–167.
- [38] R.B. Klisovic, W. Stock, S. Cataland, M.I. Klisovic, S. Liu, W. Blum, M. Green, O. Odenike, L. Godley, J.V. Burgt, E. Van Laar, M. Cullen, A.R. Macleod, J.M. Besterman, G.K. Reid, J.C. Byrd, G. Marcucci, A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 2444–2449.
- [39] R. Plummer, L. Vidal, M. Griffin, M. Lesley, J. de Bono, S. Coulthard, J. Sludden, L.L. Siu, E.X. Chen, A.M. Oza, G.K. Reid, A.R. McLeod, J.M. Besterman, C. Lee, I. Judson, H. Calvert, A.V. Boddy, Phase I study of MG98, an oligonucleotide antisense inhibitor of human DNA methyltransferase 1, given as a 7-day infusion in patients with advanced solid tumors, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 3177–3183.
- [40] A.B. Kornblith, J.E. Herndon 2nd, L.R. Silverman, E.P. Demakos, R. Odchimar-Reissig, J.F. Holland, B.L. Powell, C. DeCastro, J. Ellerton, R.A. Larson, C.A. Schiffer, J.C. Holland, Impact of azacitidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 2441–2452.
- [41] H. Kantarjian, J.P. Issa, C.S. Rosenfeld, J.M. Bennett, M. Albitar, J. DiPersio, V. Klimek, J. Slack, C. de Castro, F. Ravandi, R. Helmer 3rd, L. Shen, S.D. Nimer, R. Leavitt, A. Raza, H. Saba, Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study, *Cancer* 106 (2006) 1794–1803.
- [42] L.R. Silverman, D.R. McKenzie, B.L. Peterson, J.F. Holland, J.T. Backstrom, C.L. Beach, R.A. Larson, Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 3895–3903.
- [43] L.R. Silverman, E.P. Demakos, B.L. Peterson, A.B. Kornblith, J.C. Holland, R. Odchimar-Reissig, R.M. Stone, D. Nelson, B.L. Powell, C.M. DeCastro, J. Ellerton, R.A. Larson, C.A. Schiffer, J.F. Holland, Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 2429–2440.
- [44] J.H. Lee, K.H. Lee, D.Y. Kim, S.H. Kim, S.N. Lim, S.D. Kim, Y. Choi, S.M. Lee, W.S. Lee, M.Y. Choi, Y.D. Joo, Decreased incidence of febrile episodes with antibiotic prophylaxis in the treatment of decitabine for myelodysplastic syndrome, *Leuk. Res.* 35 (2011) 499–503.
- [45] T. Qin, R. Castoro, S. El Ahdab, J. Jelinek, X. Wang, J. Si, J. Shu, R. He, N. Zhang, W. Chung, H.M. Kantarjian, J.P. Issa, Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome, *PLoS One* 6 (2011) e23372.
- [46] J.F. Seymour, P. Fenaux, L.R. Silverman, G.J. Muftic, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, A.F. List, S.D. Gore, J. Backstrom, D. McKenzie, C.L. Beach, Effects of azacitidine compared with conventional care regimens in elderly (>= 75 years) patients with higher-risk myelodysplastic syndromes, *Crit. Rev. Hematol.* 76 (2010) 218–227.

- [47] M. Lubbert, S. Suci, L. Baila, B.H. Ruter, U. Platzbecker, A. Giagounidis, D. Selleslag, B. Labar, U. Germing, H.R. Salih, F. Beeldens, P. Muus, K.H. Pfluger, C. Coens, A. Hagemeijer, H. Eckart Schaefer, A. Ganser, C. Aul, T. de Witte, P.W. Wijermans, Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group, *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 1987–1996.
- [48] M. Lubbert, B. Ruter, R. Claus, C. Schmoor, M. Schmid, U. Germing, A. Kundgen, V. Rethwisch, A. Ganser, U. Platzbecker, O. Galm, W. Brugger, G. Heil, B. Hackanson, B. Deschler, K. Dohner, A. Hagemeijer, P. Wijermans, H. Dohner, A multicenter phase II trial of Decitabine as first-line treatment of older AML patients judged unfit for induction chemotherapy, *Haematologica* (2011).
- [49] T. Braun, R. Itzykson, A. Renneville, B. de Renzis, F. Dreyfus, K. Laribi, K. Bouabdallah, N. Vey, A. Toma, C. Recher, B. Royer, B. Joly, A. Vekhoff, I. Lafon, L. Sanhes, G. Meurice, C. Olear, C. Preudhomme, C. Gardin, L. Ades, M. Fontenay, P. Fenaux, N. Droin, E. Solary, Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial, *Blood* 118 (2011) 3824–3831.
- [50] P. Fenaux, G.J. Mufti, E. Hellstrom-Lindberg, V. Santini, C. Finelli, A. Giagounidis, R. Schoch, N. Gattermann, G. Sanz, A. List, S.D. Gore, J.F. Seymour, J.M. Bennett, J. Byrd, J. Backstrom, L. Zimmerman, D. McKenzie, C. Beach, L.R. Silverman, Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study, *Lancet Oncol.* 10 (2009) 223–232.
- [51] R.M. Lyons, T.M. Cosgriff, S.S. Modi, R.H. Gersh, J.D. Hainsworth, A.L. Cohn, H.J. McIntyre, I.J. Fernando, J.T. Backstrom, C.L. Beach, Hematologic response to three alternative dosing schedules of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 1850–1856.
- [52] M.G. Martin, R.A. Walgren, E. Procknow, G.L. Uy, K. Stockerl-Goldstein, A.F. Cashen, P. Westervelt, C.N. Abboud, F. Kreisel, K. Augustin, J.F. Dipersio, R. Vij, A phase II study of 5-day intravenous azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes, *Am. J. Hematol.* 84 (2009) 560–564.
- [53] G. Garcia-Manero, S.D. Gore, C. Cogle, R. Ward, T. Shi, K.J. Macbeth, E. Laille, H. Giordano, S. Sakoian, E. Jabbour, H. Kantarjian, B. Skikne, Phase I study of oral azacitidine in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia, *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 2521–2527.
- [54] D.P. Steensma, M.R. Baer, J.L. Slack, R. Buckstein, L.A. Godley, G. Garcia-Manero, M. Albitar, J.S. Larsen, S. Arora, M.T. Cullen, H. Kantarjian, Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 3842–3848.
- [55] H. Kantarjian, Y. Oki, G. Garcia-Manero, X. Huang, S. O'Brien, J. Cortes, S. Faderl, C. Bueso-Ramos, F. Ravandi, Z. Estrov, A. Ferrajoli, W. Wierda, J. Shan, J. Davis, F. Giles, H.I. Saba, J.P. Issa, Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia, *Blood* 109 (2007) 52–57.
- [56] C. Stressemann, I. Bokelmann, U. Mahlknecht, F. Lyko, Azacitidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2998–3005.
- [57] D.J. Stewart, J.P. Issa, R. Kurzrock, M.I. Nunez, J. Jelinek, D. Hong, Y. Oki, Z. Guo, S. Gupta, Wistuba II, Decitabine effect on tumor global DNA methylation and other parameters in a phase I trial in refractory solid tumors and lymphomas, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 3881–3888.
- [58] A. Stathis, S.J. Hotte, E.X. Chen, H.W. Hirte, A.M. Oza, P. Moretto, S. Webster, A. Laughlin, L.A. Stayner, S. McGill, L. Wang, W.J. Zhang, I. Espinoza-Delgado, J.L. Holleran, M.J. Egorin, L.L. Siu, Phase I study of decitabine in combination with vorinostat in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 1582–1590.
- [59] V. Pappa, K. Girkas, C. Sambani, S. Pagageorgiou, P. Tsirogiotis, K. Karvounis, E. Stathopoulou, T. Economopoulos, G. Dimitriadis, I. Dervenoulas, Azacitidine in a patient with newly diagnosed acute myeloid leukemia and poor risk cytogenetics: outcomes of prolonged therapy, *Leuk. Res.* 36 (2012) e78–e80.
- [60] C. Flotho, R. Claus, C. Batz, M. Schneider, I. Sandrock, S. Ihde, C. Plass, C.M. Niemeyer, M. Lubbert, The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells, *Leukemia* 23 (2009) 1019–1028.
- [61] P.W. Hollenbach, A.N. Nguyen, H. Brady, M. Williams, Y. Ning, N. Richard, L. Krushel, S.L. Aukerman, C. Heise, K.J. MacBeth, A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines, *PLoS One* 5 (2010) e9001.
- [62] G. Borthakur, S.E. Ahdab, F. Ravandi, S. Faderl, A. Ferrajoli, B. Newman, J.P. Issa, H. Kantarjian, Activity of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome previously treated with azacitidine, *Leuk. Lymphoma* 49 (2008) 690–695.
- [63] T. Prebet, S.D. Gore, B. Esterni, C. Gardin, R. Itzykson, S. Thepot, F. Dreyfus, O.B. Rauzy, C. Recher, L. Ades, B. Quesnel, C.L. Beach, P. Fenaux, N. Vey, Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure, *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 3322–3327.
- [64] T. Prebet, S.D. Gore, S. Thepot, B. Esterni, B. Quesnel, O.B. Rauzy, F. Dreyfus, C. Gardin, P. Fenaux, N. Vey, Outcome of acute myeloid leukaemia following myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure, *Br. J. Haematol.* (2012).
- [65] E. Jabbour, G. Garcia-Manero, N. Batty, J. Shan, S. O'Brien, J. Cortes, F. Ravandi, J.P. Issa, H. Kantarjian, Outcome of patients with myelodysplastic syndrome after failure of decitabine therapy, *Cancer* 116 (2010) 3830–3834.
- [66] T.M. Kadia, E. Jabbour, H. Kantarjian, Failure of hypomethylating agent-based therapy in myelodysplastic syndromes, *Semin. Oncol.* 38 (2011) 682–692.
- [67] F. Folmer, B. Orlikova, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, Naturally occurring regulators of histone acetylation/deacetylation, *Curr. Nutr. Food Sci.* 6 (2010) 78–99.
- [68] H. Ozdag, A.E. Teschendorff, A.A. Ahmed, S.J. Hyland, C. Blenkiron, L. Bobrow, A. Veerakumarasivam, G. Burt, T. Subkhankulova, M.J. Arends, V.P. Collins, D. Bowtell, T. Kouzarides, J.D. Brenton, C. Caldas, Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers, *BMC Genomics* 7 (2006) 90.
- [69] C.A. Bradbury, F.L. Khanim, R. Hayden, C.M. Bunce, D.A. White, M.T. Drayson, C. Craddock, B.M. Turner, Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors, *Leukemia* 19 (2005) 1751–1759.
- [70] D. Khabele, D.S. Son, A.K. Parl, G.L. Goldberg, L.H. Augenlicht, J.M. Mariadason, V.M. Rice, Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy, *Cancer Biol. Ther.* 6 (2007) 795–801.
- [71] A. Clocchiatti, C. Florean, C. Brancolini, Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumorigenesis, *J. Cell. Mol. Med.* 15 (2011) 1833–1846.
- [72] P.A. Marks, R. Breslow, Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 84–90.
- [73] C. Seidel, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature, *Genes and Nutrition* (In press).
- [74] C. Monneret, Histone deacetylase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 1–13.
- [75] A.V. Bieliasuk, M.K. Pflum, Isoform-selective histone deacetylase inhibitors, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1402–1413.
- [76] T. Kumagai, N. Wakimoto, D. Yin, S. Gery, N. Kawamata, N. Takai, N. Komatsu, A. Chumakov, Y. Imai, H.P. Koeffler, Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells, *International Journal of Cancer*, Int. J. Cancer 121 (2007) 656–665.
- [77] Y.B. Kim, K.H. Lee, K. Sugita, M. Yoshida, S. Horinouchi, Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase, *Oncogene* 18 (1999) 2461–2470.
- [78] S. Liu, H. Cheng, W. Kwan, J.M. Lubieniecka, T.O. Nielsen, Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 1751–1761.
- [79] A. Petrella, C.W. D'Acunto, M. Rodriguez, M. Festa, A. Tosco, I. Bruno, S. Terracciano, M. Taddei, L.G. Paloma, L. Parente, Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, on proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1, *Eur. J. Cancer* 44 (2008) 740–749.
- [80] S. Chateauevieux, S. Eifes, F. Morceau, C. Grigorakaki, M. Schnekenburger, E. Henry, M. Dicato, M. Diederich, Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway, *Biochem. Pharmacol.* 81 (2011) 498–509.
- [81] M. Schnekenburger, F. Morceau, E. Henry, R. Blasius, M. Dicato, C. Trentesaux, M. Diederich, Transcriptional and post-transcriptional regulation of glutathione S-transferase P1 expression during butyric acid-induced differentiation of K562 cells, *Leuk. Res.* 30 (2006) 561–568.
- [82] K.A. Blum, A. Advani, L. Fernandez, R. Van Der Jagt, J. Brandwein, S. Kambhampati, J. Kassis, M. Davis, C. Bonfilis, M. Dubay, J. Dumouchel, M. Drouin, J.H. Lucas, R.E. Martell, J.C. Byrd, Phase II study of the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia, *Br. J. Haematol.* 147 (2009) 507–514.
- [83] A. Hauschild, U. Trefzer, C. Garbe, K.C. Kaehler, S. Ugurel, F. Kiecker, T. Eigentler, H. Krissel, A. Schott, D. Schadendorf, Multicenter phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-[4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl]-carbamate in pretreated metastatic melanoma, *Melanoma Res.* 18 (2008) 274–278.
- [84] R.L. Piekarz, R. Frye, M. Turner, J.J. Wright, S.L. Allen, M.H. Kirschbaum, J. Zain, H.M. Prince, J.P. Leonard, L.J. Geskin, C. Reeder, D. Joske, W.D. Figg, E.R. Gardner, S.M. Steinberg, E.S. Jaffe, M. Stetler-Stevenson, S. Lade, A.T. Fojo, S.E. Bates, Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 5410–5417.
- [85] S.J. Whittaker, M.F. Demierre, E.J. Kim, A.H. Rook, A. Lerner, M. Duvic, J. Scarisbrick, S. Reddy, T. Robak, J.C. Becker, A. Samtsov, W. McCulloch, Y.H. Kim, Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 4485–4491.
- [86] M. Duvic, R. Talpur, X. Ni, C. Zhang, P. Hazarika, C. Kelly, J.H. Chiao, J.F. Reilly, J.L. Ricker, V.M. Richon, S.R. Frankel, Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), *Blood* 109 (2007) 31–39.
- [87] T.H. Luu, R.J. Morgan, L. Leong, D. Lim, M. McNamara, J. Portnow, P. Frankel, D.D. Smith, J.H. Doroshow, C. Wong, A. Aparicio, D.R. Gandara, G. Somlo, A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic

- breast cancer: a California Cancer Consortium study, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 7138–7142.
- [88] A.M. Traynor, S. Dubey, J.C. Eickhoff, J.M. Kolesar, K. Schell, M.S. Huie, D.L. Groteluschen, S.M. Marcotte, C.M. Hallahan, H.R. Weeks, G. Wilding, I. Espinoza-Delgado, J.H. Schiller, Vorinostat (NSC# 701852) in patients with relapsed non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network phase II study, *J. Thoracic Oncol.: Official Publication Int. Assoc. Study Lung Cancer* 4 (2009) 522–526.
- [89] S.C. Modesitt, M. Sill, J.S. Hoffman, D.P. Bender, A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study, *Gynecol. Oncol.* 109 (2008) 182–186.
- [90] J.A. Woyach, R.T. Kloos, M.D. Ringel, D. Arbogast, M. Collamore, J.A. Zwiebel, M. Grever, M. Villalona-Calero, M.H. Shah, Lack of therapeutic effect of the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with metastatic radioiodine-refractory thyroid carcinoma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 164–170.
- [91] A. Rambaldi, C.M. Dellacasa, G. Finazzi, A. Carobbio, M.L. Ferrari, P. Guglielmelli, E. Gattoni, S. Salmoiraghi, M.C. Finazzi, S. Di Tollo, C. D'Urzo, A.M. Vannucchi, G. Barosi, T. Barbui, A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms, *Br. J. Haematol.* 150 (2010) 446–455.
- [92] M. Galli, S. Salmoiraghi, J. Golay, A. Gozzini, C. Crippa, N. Pescosta, A. Rambaldi, A phase II multiple dose clinical trial of histone deacetylase inhibitor ITF2357 in patients with relapsed or progressive multiple myeloma, *Ann. Hematology* 89 (2010) 185–190.
- [93] J.S. de Bono, R. Kristeleit, A. Tolcher, P. Fong, S. Pacey, V. Karavasilis, M. Mita, H. Shaw, P. Workman, S. Kaye, E.K. Rowinsky, W. Aherne, P. Atadja, J.W. Scott, A. Patnaik, Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of LAQ824, a hydroxamate histone deacetylase inhibitor with a heat shock protein-90 inhibitory profile, in patients with advanced solid tumours, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 6663–6673.
- [94] L. Ellis, M. Bots, R.K. Lindemann, J.E. Bolden, A. Newbold, L.A. Cluse, C.L. Scott, A. Strasser, P. Atadja, S.W. Lowe, R.W. Johnstone, The histone deacetylase inhibitors LAQ824 and LBH589 do not require death receptor signaling or a functional apoptosome to mediate tumor cell death or therapeutic efficacy, *Blood* 114 (2009) 380–393.
- [95] F. Giles, T. Fischer, J. Cortes, G. Garcia-Manero, J. Beck, F. Ravandi, E. Masson, P. Rae, G. Laird, S. Sharma, H. Kantarjian, M. Dugan, M. Albitar, K. Bhalla, A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 4628–4635.
- [96] S.S. Ramalingam, C.P. Belani, C. Ruel, P. Frankel, B. Gitlitz, M. Koczywas, I. Espinoza-Delgado, D. Gandara, Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma, *J. Thoracic Oncol.: Official Publication Int. Assoc. Study Lung Cancer* 4 (2009) 97–101.
- [97] A.R. Razak, S.J. Hotte, L.L. Siu, E.X. Chen, H.W. Hirte, J. Powers, W. Walsh, L.A. Stayner, A. Laughlin, V. Novotny-Diermayr, J. Zhu, E.A. Eisenhauer, Phase I clinical, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of SB939, an oral histone deacetylase (HDAC) inhibitor, in patients with advanced solid tumours, *Br. J. Cancer* 104 (2011) 756–762.
- [98] J.M. Su, X.N. Li, P. Thompson, C.N. Ou, A.M. Ingle, H. Russell, C.C. Lau, P.C. Adamson, S.M. Blaney, Phase 1 study of valproic acid in pediatric patients with refractory solid or CNS tumors: a children's oncology group report, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 589–597.
- [99] O.M. Rahal, R.C. Simmen, PTEN and p53 cross-regulation induced by soy isoflavone genistein promotes mammary epithelial cell cycle arrest and lobuloalveolar differentiation, *Carcinogenesis* 31 (2010) 1491–1500.
- [100] N. Gao, S. Cheng, A. Budhraj, E.H. Liu, J. Chen, D. Chen, Z. Yang, J. Luo, X. Shi, Z. Zhang, 3,3'-Diindolylmethane exhibits antileukemic activity in vitro and in vivo through a Akt-dependent process, *PLoS One* 7 (2012) e31783.
- [101] N. Gao, A. Budhraj, S. Cheng, E.H. Liu, J. Chen, Z. Yang, D. Chen, Z. Zhang, X. Shi, Phenethyl isothiocyanate exhibits antileukemic activity in vitro and in vivo by inactivation of Akt and activation of JNK pathways, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e140.
- [102] D. Xiao, A.A. Powolny, M.B. Moura, E.E. Kelley, A. Bommareddy, S.H. Kim, E.R. Hahm, D. Normolle, B. Van Houten, S.V. Singh, Phenethyl isothiocyanate inhibits oxidative phosphorylation to trigger reactive oxygen species-mediated death of human prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 26558–26569.
- [103] C.J. Lai, R. Bao, X. Tao, J. Wang, R. Atoyan, H. Qu, D.G. Wang, L. Yin, M. Samson, J. Forrester, B. Zifcak, G.X. Xu, S. DellaRocca, H.X. Zhai, X. Cai, W.E. Munger, M. Keegan, C.V. Pepicelli, C. Qian, CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity, *Cancer Res.* 70 (2010) 3647–3656.
- [104] M. Namdar, G. Perez, L. Ngo, P.A. Marks, Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 20003–20008.
- [105] S. Balasubramanian, J. Ramos, W. Luo, M. Sirisawad, E. Verner, J.J. Buggy, A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas, *Leukemia* 22 (2008) 1026–1034.
- [106] T.M. Kadia, H. Yang, A. Ferrajoli, S. Maddipotti, C. Schroeder, T.L. Madden, J.L. Holleran, M.J. Egorin, F. Ravandi, D.A. Thomas, W. Newsome, B. Sanchez-Gonzalez, J.A. Zwiebel, I. Espinoza-Delgado, H.M. Kantarjian, G. Garcia-Manero, A phase I study of vorinostat in combination with idarubicin in relapsed or refractory leukaemia, *Br. J. Haematol.* 150 (2010) 72–82.
- [107] C.P. Miller, M.M. Singh, N. Rivera-Del Valle, C.A. Manton, J. Chandra, Therapeutic strategies to enhance the anticancer efficacy of histone deacetylase inhibitors, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 514261.
- [108] T. Vaissiere, C. Sawan, Z. Herceg, Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing, *Mutat. Res.* 659 (2008) 40–48.
- [109] R.L. Mompalmer, *Cancer epigenetics*, *Oncogene* 22 (2003) 6479–6483.
- [110] S. Stintzing, R. Kemmerling, T. Kiesslich, B. Alinger, M. Ocker, D. Neureiter, Myelodysplastic syndrome and histone deacetylase inhibitors: "to be or not to be acetylated"? *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 214143.
- [111] T.E. Fandy, J.G. Herman, P. Kerns, A. Jiemjit, E.A. Sugar, S.H. Choi, A.S. Yang, T. Aucutt, T. Dausers, R. Odchimar-Reissig, J. Licht, M.J. McConnell, C. Nasrallah, M.K. Kim, W. Zhang, Y. Sun, A. Murgo, I. Espinoza-Delgado, K. Oteiza, I. Owwoeye, L.R. Silverman, S.D. Gore, H.E. Carraway, Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies, *Blood* 114 (2009) 2764–2773.
- [112] P. Maslak, S. Chanel, L.H. Camacho, S. Soignet, P.P. Pandolfi, I. Guernah, R. Warrell, S. Nimer, Pilot study of combination transcriptional modulation therapy with sodium phenylbutyrate and 5-azacytidine in patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome, *Leukemia* 20 (2006) 212–217.
- [113] F. Braitheh, A.O. Soriano, G. Garcia-Manero, D. Hong, M.M. Johnson, P. Silva Lde, H. Yang, S. Alexander, J. Wolff, R. Kurzrock, Phase I study of epigenetic modulation with 5-azacytidine and valproic acid in patients with advanced cancers, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 6296–6301.
- [114] E. Raffoux, A. Cras, C. Recher, P.Y. Boelle, A. de Labarthe, P. Turlure, J.P. Marolleau, O. Reman, C. Gardin, M. Victor, S. Maury, P. Rousselot, J.V. Malfuson, O. Maarek, M.T. Daniel, P. Fenaux, L. Degos, C. Chomienne, S. Chevret, H. Dombret, Phase 2 clinical trial of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome, *Oncotarget* 1 (2010) 34–42.
- [115] A.O. Soriano, H. Yang, S. Faderl, Z. Estrov, F. Giles, F. Ravandi, J. Cortes, W.G. Wierda, S. Ouzounian, A. Quezada, S. Pierce, E.H. Estey, J.P. Issa, H.M. Kantarjian, G. Garcia-Manero, Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome, *Blood* 110 (2007) 2302–2308.
- [116] G. Garcia-Manero, H.M. Kantarjian, B. Sanchez-Gonzalez, H. Yang, G. Rosner, S. Verstovsek, M. Rytting, W.G. Wierda, F. Ravandi, C. Koller, L. Xiao, S. Faderl, Z. Estrov, J. Cortes, S. O'Brien, E. Estey, C. Bueso-Ramos, J. Fiorentino, E. Jabbour, J.P. Issa, Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia, *Blood* 108 (2006) 3271–3279.
- [117] K.A. Blum, Z. Liu, D.M. Lucas, P. Chen, Z. Xie, R. Baiocchi, D.M. Benson, S.M. Devine, J. Jones, L. Andritsos, J. Flynn, C. Plass, G. Marcucci, K.K. Chan, M.R. Grever, J.C. Byrd, Phase I trial of low dose decitabine targeting DNA hypermethylation in patients with chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma: dose-limiting myelosuppression without evidence of DNA hypomethylation, *Br. J. Haematol.* 150 (2010) 189–195.
- [118] T.J. Ley, L. Ding, M.J. Walter, M.D. McLellan, T. Lamprecht, D.E. Larson, C. Kandoth, J.E. Payton, J. Baty, J. Welch, C.C. Harris, C.F. Licht, R.R. Townsend, R.S. Fulton, D.J. Dooling, D.C. Koboldt, H. Schmidt, Q. Zhang, J.R. Osborne, L. Lin, M. O'Laughlin, J.F. McMichael, K.D. Delehaunty, S.D. McGrath, L.A. Fulton, V.J. Magrini, T.L. Vickery, J. Hundal, L.L. Cook, J.J. Conyers, G.W. Swift, J.P. Reed, P.A. Alldredge, T. Wylie, J. Walker, J. Kalicki, M.A. Watson, S. Heath, W.D. Shannon, N. Varghese, R. Nagarajan, P. Westervelt, M.H. Tomasson, D.C. Link, T.A. Graubert, J.F. DiPersio, E.R. Mardis, R.K. Wilson, DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 2424–2433.
- [119] G.A. Challen, D. Sun, M. Jeong, M. Luo, J. Jelinek, J.S. Berg, C. Bock, A. Vasanthakumar, H. Gu, Y. Xi, S. Liang, Y. Lu, G.J. Darlington, A. Meissner, J.P. Issa, L.A. Godley, W. Li, M.A. Goodell, Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation, *Nat. Genet.* 44 (2012) 23–31.
- [120] K.H. Metzeler, A. Walker, S. Geyer, R. Garzon, R.B. Klisovic, C.D. Bloomfield, W. Blum, G. Marcucci, DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia, *Leukemia* (2011).
- [121] R. Garzon, S. Liu, M. Fabbri, Z. Liu, C.E. Heaphy, E. Callegari, S. Schwind, J. Pang, J. Yu, N. Muthusamy, W. Havelange, S. Volinia, W. Blum, L.J. Rush, D. Perrotti, M. Andreeff, C.D. Bloomfield, J.C. Byrd, K. Chan, L.C. Wu, C.M. Croce, G. Marcucci, MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1, *Blood* 113 (2009) 6411–6418.
- [122] W. Blum, R. Garzon, R.B. Klisovic, S. Schwind, A. Walker, S. Geyer, S. Liu, V. Havelange, H. Becker, L. Schaaf, J. Mickle, H. Devine, C. Kefauver, S.M. Devine, K.K. Chan, N.A. Heerema, C.D. Bloomfield, M.R. Grever, J.C. Byrd, M. Villalona-Calero, C.M. Croce, G. Marcucci, Clinical response and miR-29b

- predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 7473–7478.
- [123] H.A. Hou, Y.Y. Kuo, C.Y. Liu, W.C. Chou, M.C. Lee, C.Y. Chen, L.I. Lin, M.H. Tseng, C.F. Huang, Y.C. Chiang, F.Y. Lee, M.C. Liu, C.W. Liu, J.L. Tang, M. Yao, S.Y. Huang, B.S. Ko, S.C. Hsu, S.J. Wu, W. Tsay, Y.C. Chen, H.F. Tien, DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications, *Blood* 119 (2012) 559–568.
- [124] M. Sanson, Y. Marie, S. Paris, A. Idbaih, J. Laffaire, F. Ducray, S. El Hallani, B. Boisselier, K. Mokhtari, K. Hoang-Xuan, J.Y. Delattre, Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 4150–4154.
- [125] C. Lu, P.S. Ward, G.S. Kapoor, D. Rohle, S. Turcan, O. Abdel-Wahab, C.R. Edwards, R. Khanin, M.E. Figueroa, A. Melnick, K.E. Wellen, D.M. O'Rourke, S.L. Berger, T.A. Chan, R.L. Levine, I.K. Mellingshoff, C.B. Thompson, IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation, *Nature* 483 (2012) 474–478.
- [126] M.E. Figueroa, O. Abdel-Wahab, C. Lu, P.S. Ward, J. Patel, A. Shih, Y. Li, N. Bhagwat, A. Vasanthakumar, H.F. Fernandez, M.S. Tallman, Z. Sun, K. Wolniak, J.K. Peeters, W. Liu, S.E. Choe, V.R. Fantin, E. Paietta, B. Lowenberg, J.D. Licht, L.A. Godley, R. Delwel, P.J. Valk, C.B. Thompson, R.L. Levine, A. Melnick, Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation, *Cancer Cell* 18 (2010) 553–567.
- [127] S. Turcan, D. Rohle, A. Goenka, L.A. Walsh, F. Fang, E. Yilmaz, C. Campos, A.W. Fabius, C. Lu, P.S. Ward, C.B. Thompson, A. Kaufman, O. Guryanova, R. Levine, A. Heguy, A. Viale, L.G. Morris, J.T. Huse, I.K. Mellingshoff, T.A. Chan, IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype, *Nature* 483 (2012) 479–483.
- [128] K. Williams, J. Christensen, K. Helin, DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Reports* 13 (2011) 28–35.
- [129] N. Carey, C.J. Marques, W. Reik, DNA demethylases: a new epigenetic frontier in drug discovery, *Drug Discovery Today* 16 (2011) 683–690.
- [130] O. Kosmider, V. Gelsi-Boyer, M. Cheok, S. Grabar, V. Della-Valle, F. Picard, F. Viguie, B. Quesnel, O. Beyne-Rauzy, E. Solary, N. Vey, M. Hunault-Berger, P. Fenaux, V. Mansat-De Mas, E. Delabesse, P. Guardiola, C. Lacombe, W. Vainchenker, C. Preudhomme, F. Dreyfus, O.A. Bernard, D. Birnbaum, M. Fontenay, TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs), *Blood* 114 (2009) 3285–3291.
- [131] A.E. Smith, A.M. Mohamedali, A. Kulasekararaj, Z. Lim, J. Gaken, N.C. Lea, B. Przychodzen, S.A. Mian, E.E. Nasser, C. Shooter, N.B. Westwood, C. Strupp, N. Gattermann, J.P. Maciejewski, U. Germing, G.J. Mufti, Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value, *Blood* 116 (2010) 3923–3932.
- [132] O. Nibourel, O. Kosmider, M. Cheok, N. Boissel, A. Renneville, N. Philippe, H. Dombret, F. Dreyfus, B. Quesnel, S. Geffroy, S. Quentin, C. Roche-Lestienne, J.M. Cayuela, C. Roumier, P. Fenaux, W. Vainchenker, O.A. Bernard, J. Soulier, M. Fontenay, C. Preudhomme, Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission, *Blood* 116 (2010) 1132–1135.
- [133] V.I. Gaidzik, P. Paschka, D. Spath, M. Habdank, C.H. Kohne, U. Germing, M. von Lilienfeld-Toal, G. Held, H.A. Horst, D. Haase, M. Bentz, K. Gotze, H. Dohner, R.F. Schlenk, L. Bullinger, K. Dohner, TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML Study Group, *J. Clin. Oncol.* (2012).
- [134] M.T. Voso, E. Fabiani, A. Piciocchi, C. Matteucci, L. Brandimarte, C. Finelli, E. Pogliani, E. Angelucci, G. Fioritoni, P. Musto, M. Greco, M. Crisuolo, L. Fianchi, M. Vignetti, V. Santini, S. Hohaus, C. Mecucci, G. Leone, Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic syndromes treated with 5-azacytidine, *Leukemia* 25 (2011) 1910–1913.
- [135] R. Itzykson, O. Kosmider, T. Cluzeau, V. Mansat-De Mas, F. Dreyfus, O. Beyne-Rauzy, B. Quesnel, N. Vey, V. Gelsi-Boyer, S. Raynaud, C. Preudhomme, L. ADES, P. Fenaux, M. Fontenay, Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias, *Leukemia* 25 (2011) 1147–1152.
- [136] S. Roperio, M.F. Fraga, E. Ballestar, R. Hamelin, H. Yamamoto, M. Boix-Chornet, R. Caballero, M. Alaminos, F. Setien, M.F. Paz, M. Herranz, J. Palacios, D. Arango, T.F. Orntoft, L.A. Aaltonen, S. Schwartz Jr., M. Esteller, A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition, *Nat. Genet.* 38 (2006) 566–569.
- [137] J.M. Mariadason, Making sense of HDAC2 mutations in colon cancer, *Gastroenterology* 135 (2008) 1457–1459.
- [138] T. Sjoblom, S. Jones, L.D. Wood, D.W. Parsons, J. Lin, T.D. Barber, D. Mandelker, R.J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S.D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J.K. Willson, A.F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B.H. Park, K.E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers, *Science* 314 (2006) 268–274.
- [139] A. Lakshminikuttyamma, S.A. Scott, J.F. DeCoteau, C.R. Geyer, Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition, *Oncogene* 29 (2010) 576–588.
- [140] W. Fiskus, Y. Wang, A. Sreekumar, K.M. Buckley, H. Shi, A. Jillella, C. Ustun, R. Rao, P. Fernandez, J. Chen, R. Balusu, S. Koul, P. Atadja, V.E. Marquez, K.N. Bhalla, Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells, *Blood* 114 (2009) 2733–2743.
- [141] S. Vernarecci, F. Tosi, P. Filetici, Tuning acetylated chromatin with HAT inhibitors: a novel tool for therapy, *Epigenetics* 5 (2010) 105–111.
- [142] F.H. Kwie, M. Briet, D. Soupaya, P. Hoffmann, M. Maturano, F. Rodriguez, C. Blonski, C. Lherbet, C. Baudoin-Dehoux, New potent bisubstrate inhibitors of histone acetyltransferase p300: design, synthesis and biological evaluation, *Chem. Biol. Drug Des.* 77 (2011) 86–92.
- [143] S.R. Daigle, E.J. Olhava, C.A. Therkelsen, C.R. Majer, C.J. Sneeringer, J. Song, L.D. Johnston, M.P. Scott, J.J. Smith, Y. Xiao, L. Jin, K.W. Kuntz, R. Chesworth, M.P. Moyer, K.M. Bernt, J.C. Tseng, A.L. Kung, S.A. Armstrong, R.A. Copeland, V.M. Richon, R.M. Pollock, Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor, *Cancer Cell* 20 (2011) 53–65.
- [144] Y. Yao, P. Chen, J. Diao, G. Cheng, L. Deng, J.L. Anglin, B.V. Prasad, Y. Song, Selective inhibitors of histone methyltransferase DOT1L: design, synthesis, and crystallographic studies, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 16746–16749.
- [145] J. Zhou, C. Bi, L.L. Cheong, S. Mahara, S.C. Liu, K.G. Tay, T.L. Koh, Q. Yu, W.J. Chng, The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML, *Blood* 118 (2011) 2830–2839.
- [146] T. Schenk, W.C. Chen, S. Gollner, L. Howell, L. Jin, K. Hebestreit, H.U. Klein, A.C. Popescu, A. Burnett, K. Mills, R.A. Casero Jr., L. Marton, P. Woster, M.D. Minden, M. Dugas, J.C. Wang, J.E. Dick, C. Muller-Tidow, K. Petrie, A. Zelen, Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia, *Nat. Med.* (2012).
- [147] N. Bhatnagar, X. Li, Y. Chen, X. Zhou, S.H. Garrett, B. Guo, 3,3'-diindolylmethane enhances the efficacy of butyrate in colon cancer prevention through down-regulation of survivin, *Cancer Prevention Res.* 2 (2009) 581–589.
- [148] A.N. Khan, W.J. Magner, T.B. Tomasi, An epigenetic vaccine model active in the prevention and treatment of melanoma, *J. Transl. Med.* 5 (2007) 64.
- [149] J.M. Foulks, K.M. Parnell, R.N. Nix, S. Chau, K. Swierczek, M. Saunders, K. Wright, T.F. Hendrickson, K.K. Ho, M.V. McCullar, S.B. Kanner, Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases, *J. Biomol. Screen.* 17 (2012) 2–17.
- [150] A. Link, F. Balaguer, A. Goel, Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: balancing role for epigenetics, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1771–1792.
- [151] Z. Liu, Z. Xie, W. Jones, R.E. Pavlovicz, S. Liu, J. Yu, P.K. Li, J. Lin, J.R. Fuchs, G. Marcucci, C. Li, K.K. Chan, Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 706–709.
- [152] M. Adjakly, R. Bosviel, N. Rabiau, J.P. Boiteux, Y.J. Bignon, L. Guy, D. Bernard-Gallon, DNA methylation and soy phytoestrogens: quantitative study in DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines, *Epigenomics* 3 (2011) 795–803.
- [153] S. Jagadeesh, S. Sinha, B.C. Pal, S. Bhattacharya, P.P. Banerjee, Mahanine reverses an epigenetically silenced tumor suppressor gene RASSF1A in human prostate cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 212–217.
- [154] D. Kuck, T. Caulfield, F. Lyko, J.L. Medina-Franco, Nanaomycin A selectively inhibits DNMT3B and reactivates silenced tumor suppressor genes in human cancer cells, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2010) 3015–3023.
- [155] I.C. Pina, J.T. Gautschi, G.Y. Wang, M.L. Sanders, F.J. Schmitz, D. France, S. Cornell-Kennon, L.C. Sambucetti, S.W. Remiszewski, L.B. Perez, K.W. Bair, P. Crews, Psammoplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 3866–3873.
- [156] J. Lin, M.C. Haffner, Y. Zhang, B.H. Lee, W.N. Brennen, J. Britton, S.K. Kachhap, J.S. Shim, J.O. Liu, W.G. Nelson, S. Yegnasubramanian, M.A. Carducci, Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth, *The Prostate* 71 (2011) 333–343.
- [157] J. Coronel, L. Cetina, I. Pacheco, C. Trejo-Becerril, A. Gonzalez-Fierro, E. de la Cruz-Hernandez, E. Perez-Cardenas, L. Taja-Chayeb, D. Arias-Bofill, M. Candelaria, S. Vidal, A. Duenas-Gonzalez, A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results, *Med. Oncol.* 28 (Suppl. 1) (2011) 540–546.
- [158] M. Candelaria, A. Herrera, J. Labardini, A. Gonzalez-Fierro, C. Trejo-Becerril, L. Taja-Chayeb, E. Perez-Cardenas, E. de la Cruz-Hernandez, D. Arias-Bofill, S. Vidal, E. Cervera, A. Duenas-Gonzalez, Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial, *Ann. Hematol.* 90 (2011) 379–387.
- [159] B.H. Lee, S. Yegnasubramanian, X. Lin, W.G. Nelson, Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 40749–40756.
- [160] Z.Q. Ning, Z.B. Li, M.J. Newman, S. Shan, X.H. Wang, D.S. Pan, J. Zhang, M. Dong, X. Du, X.P. Lu, Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity, *Cancer Chemotherapy Pharmacol.* (2011).
- [161] A.J. Kraker, C.A. Mizzen, B.G. Hartl, J. Miin, C.D. Allis, R.L. Merriman, Modulation of histone acetylation by [4-(acetylamino)-N-(2-amino-phenyl) benzamide] in HCT-8 colon carcinoma, *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 401–408.
- [162] N. Takai, T. Ueda, M. Nishida, K. Nasu, H. Narahara, M344 is a novel synthesized histone deacetylase inhibitor that induces growth inhibition,

- cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells, *Gynecol. Oncol.* 101 (2006) 108–113.
- [163] M. Fournel, C. Bonfils, Y. Hou, P.T. Yan, M.C. Trachy-Bourget, A. Kalita, J. Liu, A.H. Lu, N.Z. Zhou, M.F. Robert, J. Gillespie, J.J. Wang, H. Ste-Croix, J. Rahil, S. Lefebvre, O. Moradei, D. Delorme, A.R. Macleod, J.M. Besterman, Z. Li, MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 759–768.
- [164] A. Saito, T. Yamashita, Y. Mariko, Y. Nosaka, K. Tsuchiya, T. Ando, T. Suzuki, T. Tsuruo, O. Nakanishi, A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 4592–4597.
- [165] S. Varghese, T. Senanayake, T. Murray-Stewart, K. Doering, A. Fraser, R.A. Casero Jr., P.M. Woster, Polyaminohydroxamic acids and polyaminobenzamides as isoform selective histone deacetylase inhibitors, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2447–2456.
- [166] J.W. Han, S.H. Ahn, S.H. Park, S.Y. Wang, G.U. Bae, D.W. Seo, H.K. Kwon, S. Hong, H.Y. Lee, Y.W. Lee, H.W. Lee, Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin, *Cancer Res.* 60 (2000) 6068–6074.
- [167] N. Maulucci, M.G. Chini, S.D. Micco, I. Izzo, E. Cafaro, A. Russo, P. Gallinari, C. Paolini, M.C. Nardi, A. Casapullo, R. Riccio, G. Bifulco, F.D. Riccardis, Molecular insights into azumamide e histone deacetylases inhibitory activity, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 3007–3012.
- [168] S. De Schepper, H. Bruwiere, T. Verhulst, U. Steller, L. Andries, W. Wouters, M. Janicot, J. Arts, J. Van Heusden, Inhibition of histone deacetylases by chlamydocin induces apoptosis and proteasome-mediated degradation of survivin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 (2003) 881–888.
- [169] G. Brosch, R. Ransom, T. Lechner, J.D. Walton, P. Loidl, Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*, *The Plant Cell* 7 (1995) 1941–1950.
- [170] R. Furumai, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, M. Yoshida, S. Horinouchi, Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 87–92.
- [171] K. Umehara, K. Nakahara, S. Kiyoto, M. Iwami, M. Okamoto, H. Tanaka, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka, Studies on WF-3161, a new antitumor antibiotic, *J. Antibiotics* 36 (1983) 478–483.
- [172] R. Furumai, A. Matsuyama, N. Kobashi, K.H. Lee, M. Nishiyama, H. Nakajima, A. Tanaka, Y. Komatsu, N. Nishino, M. Yoshida, S. Horinouchi, FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases, *Cancer Res.* 62 (2002) 4916–4921.
- [173] Y. Ying, K. Taori, H. Kim, J. Hong, H. Luesch, Total synthesis and molecular target of largazole, a histone deacetylase inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 8455–8459.
- [174] S.J. Crabb, M. Howell, H. Rogers, M. Ishfaq, A. Yurek-George, K. Carey, B.M. Pickering, P. East, R. Mitter, S. Maeda, P.W. Johnson, P. Townsend, K. Shin-ya, M. Yoshida, A. Ganesan, G. Packham, Characterisation of the in vitro activity of the depsipeptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 463–475.
- [175] K.B. Glaser, J. Li, M.E. Aakre, D.W. Morgan, G. Sheppard, K.D. Stewart, J. Pollock, P. Lee, C.Z. O'Connor, S.N. Anderson, D.J. Mussatto, C.W. Wegner, H.L. Moses, Transforming growth factor beta mimetics: discovery of 7-[4-(4-cyanophenyl)phenoxy]-heptanohydroxamic acid, a biaryl hydroxamate inhibitor of histone deacetylase, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 759–768.
- [176] L. Qiu, M.J. Kelso, C. Hansen, M.L. West, D.P. Fairlie, P.G. Parsons, Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate, *Br. J. Cancer* 80 (1999) 1252–1258.
- [177] K.A. Fennell, M.J. Miller, Syntheses of amamistatin fragments and determination of their HDAC and antitumor activity, *Org. Letters* 9 (2007) 1683–1685.
- [178] V.M. Richon, S. Emiliani, E. Verdin, Y. Webb, R. Breslow, R.A. Rifkind, P.A. Marks, A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 3003–3007.
- [179] Y. Komatsu, K.Y. Tomizaki, M. Tsukamoto, T. Kato, N. Nishino, S. Sato, T. Yamori, T. Tsuruo, R. Furumai, M. Yoshida, S. Horinouchi, H. Hayashi, Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity, *Cancer Res.* 61 (2001) 4459–4466.
- [180] D. Moffat, S. Patel, F. Day, A. Belfield, A. Donald, M. Rowlands, J. Wibawa, D. Brotherton, L. Stimson, V. Clark, J. Owen, L. Bawden, G. Box, E. Bone, P. Mortenson, A. Hardcastle, S. van Meurs, S. Eccles, F. Raynaud, W. Aherne, Discovery of 2-(6-((6-fluoroquinolin-2-yl)methyl)amino)bicyclo[3.1.0]hex-3-yl)-N-hydro xyprymidine-5-carboxamide (CHR-3996), a class I selective orally active histone deacetylase inhibitor, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 8663–8678.
- [181] P. Tessier, D.V. Smil, A. Wahhab, S. Leit, J. Rahil, Z. Li, R. Deziel, J.M. Besterman, Diphenylmethane hydroxamic acids as selective class IIa histone deacetylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 5684–5688.
- [182] F. Leoni, G. Fossati, E.C. Lewis, J.K. Lee, G. Porro, P. Pagani, D. Modena, M.L. Moras, P. Pozzi, L.L. Reznikov, B. Siegmund, G. Fantuzzi, C.A. Dinarello, P. Mascagni, The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo, *Mol. Med.* 11 (2005) 1–15.
- [183] W.G. Tong, Y. Wei, W. Stevenson, S.Q. Kuang, Z. Fang, M. Zhang, J. Arts, G. Garcia-Manero, Preclinical antileukemia activity of JNJ-26481585, a potent second-generation histone deacetylase inhibitor, *Leuk. Res.* 34 (2010) 221–228.
- [184] M.R. Kang, J.S. Kang, S.B. Han, J.H. Kim, D.M. Kim, K. Lee, C.W. Lee, K.H. Lee, C.H. Lee, G. Han, H.M. Kim, S.K. Park, A novel delta-lactam-based histone deacetylase inhibitor, KBH-A42, induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 486–494.
- [185] D.Z. Qian, Y. Kato, S. Shabbeer, Y. Wei, H.M. Verheul, B. Salumbides, T. Sanni, P. Atadja, R. Pili, Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 634–642.
- [186] L. Catley, E. Weisberg, Y.T. Tai, P. Atadja, S. Remiszewski, T. Hideshima, N. Mitsiades, R. Shringarpure, R. LeBlanc, D. Chauhan, N.C. Munshi, R. Schlossman, P. Richardson, J. Griffin, K.C. Anderson, NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma, *Blood* 102 (2003) 2615–2622.
- [187] J.J. Buggy, Z.A. Cao, K.E. Bass, E. Verner, S. Balasubramanian, L. Liu, B.E. Schultz, P.R. Young, S.A. Dalrymple, CRA-024781: a novel synthetic inhibitor of histone deacetylase enzymes with antitumor activity in vitro and in vivo, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1309–1317.
- [188] J.A. Plumb, P.W. Finn, R.J. Williams, M.J. Bandara, M.R. Romero, C.J. Watkins, N.B. La Thangue, R. Brown, Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101, *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 721–728.
- [189] L.M. Butler, Y. Webb, D.B. Agus, B. Higgins, T.R. Tolentino, M.C. Kutko, M.P. LaQuaglia, M. Drobnjak, C. Cordon-Cardo, H.I. Scher, R. Breslow, V.M. Richon, R.A. Rifkind, P.A. Marks, Inhibition of transformed cell growth and induction of cellular differentiation by pyroxamide, an inhibitor of histone deacetylase, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 962–970.
- [190] H. Wang, Z.Y. Lim, Y. Zhou, M. Ng, T. Lu, K. Lee, K. Sangthongpitag, K.C. Goh, X. Wang, X. Wu, H.H. Khng, S.K. Goh, W.C. Ong, Z. Bonday, E.T. Sun, Acylurea connected straight chain hydroxamates as novel histone deacetylase inhibitors: synthesis, SAR, and in vivo antitumor activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 3314–3321.
- [191] V. Novotny-Diermayr, K. Sangthongpitag, C.Y. Hu, X. Wu, N. Sausgruber, P. Yeo, G. Greicius, S. Pettersson, A.L. Liang, Y.K. Loh, Z. Bonday, K.C. Goh, H. Hentze, S. Hart, H. Wang, K. Ethirajulu, J.M. Wood, SB939, a novel potent and orally active histone deacetylase inhibitor with high tumor exposure and efficacy in mouse models of colorectal cancer, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2010) 642–652.
- [192] E.J. Lee, B.B. Lee, S.J. Kim, Y.D. Park, J. Park, D.H. Kim, Histone deacetylase inhibitor scriptaid induces cell cycle arrest and epigenetic change in colon cancer cells, *Int. J. Oncol.* 33 (2008) 767–776.
- [193] J.H. Park, Y. Jung, T.Y. Kim, S.G. Kim, H.S. Jong, J.W. Lee, D.K. Kim, J.S. Lee, N.K. Kim, Y.J. Bang, Class I histone deacetylase-selective novel synthetic inhibitors potentially inhibit human tumor proliferation, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 5271–5281.
- [194] H.J. Woo, S.J. Lee, B.T. Choi, Y.M. Park, Y.H. Choi, Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells, *Exp. Mol. Pathol.* 82 (2007) 77–84.
- [195] K.V. Butler, J. Kalin, C. Brochier, G. Vistoli, B. Langley, A.P. Kozikowski, Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 10842–10846.
- [196] M. Entin-Meer, A. Rephaeli, X. Yang, A. Nudelman, S.R. Vandenberg, D.A. Haas-Kogan, Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas, *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 1952–1961.
- [197] S.K. Kulp, C.S. Chen, D.S. Wang, C.Y. Chen, Antitumor effects of a novel phenylbutyrate-based histone deacetylase inhibitor, (S)-HDAC-42, in prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 5199–5206.
- [198] R.P. Warrell Jr., L.Z. He, V. Richon, E. Calleja, P.P. Pandolfi, Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 1621–1625.
- [199] J.R. Davie, Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate, *J. Nutrition* 133 (2003) 2485S–2493S.
- [200] N. Gurvich, O.M. Tsygankova, J.L. Meinkoth, P.S. Klein, Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation, *Cancer Res.* 64 (2004) 1079–1086.
- [201] T.F. Outeiro, E. Kontopoulos, S.M. Altmann, I. Kufareva, K.E. Strathearn, A.M. Amore, C.B. Volk, M.M. Maxwell, J.C. Rochet, P.J. McLean, A.B. Young, R. Abagyan, M.B. Feany, B.T. Hyman, A.G. Kazantsev, Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease, *Science* 317 (2007) 516–519.
- [202] H. Nian, B. Delage, J.T. Pinto, R.H. Dashwood, Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter, *Carcinogenesis* 29 (2008) 1816–1824.
- [203] A. Mai, S. Valente, A. Nebbioso, S. Simeoni, R. Ragno, S. Massa, G. Brosch, F. De Bellis, F. Manzo, L. Altucci, New pyrrole-based histone deacetylase inhibitors: binding mode, enzyme- and cell-based investigations, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 235–247.
- [204] E.S. Inks, B.J. Josey, S.R. Jesinkey, C.J. Chou, A novel class of small molecule inhibitors of HDAC6, *ACS Chemical Biology* (2011).

- [205] I.H. Son, S.I. Lee, H.D. Yang, H.I. Moon, Bis(4-hydroxybenzyl)sulfide: a sulfur compound inhibitor of histone deacetylase isolated from root extract of *Pleuropterus ciliinervis*, *Molecules* 12 (2007) 815–820.
- [206] J. Savickiene, V.V. Borutinskaite, G. Treigyte, K.E. Magnusson, R. Navakauskiene, The novel histone deacetylase inhibitor BML-210 exerts growth inhibitory, proapoptotic and differentiation stimulating effects on the human leukemia cell lines, *Eur. J. Pharmacol.* 549 (2006) 9–18.
- [207] T. Suzuki, A. Kouketsu, A. Matsuura, A. Kohara, S. Ninomiya, K. Kohda, N. Miyata, Thiol-based SAHA analogs as potent histone deacetylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 3313–3317.
- [208] E. Mukwewho, T.A. Kohn, D. Lang, E. Nyatia, J. Smith, E.O. Ojuka, Caffeine induces hyperacetylation of histones at the MEF2 site on the Glut4 promoter and increases MEF2A binding to the site via a CaMK-dependent mechanism, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294 (2008) E582–E588.
- [209] B. Heltweg, T. Gattbonton, A.D. Schuler, J. Posakony, H. Li, S. Goehle, R. Kollipara, R.A. Depinho, Y. Gu, J.A. Simon, A. Bedalov, Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes, *Cancer Res.* 66 (2006) 4368–4377.
- [210] N. Oku, K. Nagai, N. Shindoh, Y. Terada, R.W. van Soest, S. Matsunaga, N. Fusetani, Three new cyclostelletamines, which inhibit histone deacetylase, from a marine sponge of the genus *Xestospongia*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 2617–2620.
- [211] N. Druesne, A. Pagniez, C. Mayeur, M. Thomas, C. Cherbuy, P.H. Duee, P. Martel, C. Chaumontet, Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines, *Carcinogenesis* 25 (2004) 1227–1236.
- [212] H.J. Kwon, T. Owa, C.A. Hassig, J. Shimada, S.L. Schreiber, Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 3356–3361.
- [213] J.M. Solomon, R. Pasupuleti, L. Xu, T. McDonagh, R. Curtis, P.S. DiStefano, L.J. Huber, Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 28–38.
- [214] S. Basak, D. Pookot, E.J. Noonan, R. Dahiya, Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 3195–3202.
- [215] J. Trapp, A. Jochum, R. Meier, L. Saunders, B. Marshall, C. Kunick, E. Verdin, P. Goekjian, W. Sippl, M. Jung, Adenosine mimetics as inhibitors of NAD⁺-dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7307–7316.
- [216] S.J. Haggarty, K.M. Koeller, J.C. Wong, R.A. Butcher, S.L. Schreiber, Multidimensional chemical genetic analysis of diversity-oriented synthesis-derived deacetylase inhibitors using cell-based assays, *Chem. Biol.* 10 (2003) 383–396.
- [217] P.L. Wash, T.Z. Hoffman, B.M. Wiley, C. Bonnefous, N.D. Smith, M.S. Sertic, C.M. Lawrence, K.T. Symons, P.M. Nguyen, K.D. Lustig, X. Guo, T. Annable, S.A. Noble, J.H. Hager, C.A. Hassig, J.W. Malecha, Alpha-mercaptoketone based histone deacetylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 6482–6485.
- [218] S.D. Xiong, K. Yu, X.H. Liu, L.H. Yin, A. Kirschenbaum, S. Yao, G. Narla, A. DiFeo, J.B. Wu, Y. Yuan, S.M. Ho, Y.W. Lam, A.C. Levine, Ribosome-inactivating proteins isolated from dietary bitter melon induce apoptosis and inhibit histone deacetylase-1 selectively in premalignant and malignant prostate cancer cells], *International Du Cancer, Int. J. Cancer* 125 (2009) 774–782.
- [219] A.J. Tervo, S. Kyrlylenko, P. Niskanen, A. Salminen, J. Leppanen, T.H. Nyronen, T. Jarvinen, A. Poso, An in silico approach to discovering novel inhibitors of human sirtuin type 2, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 6292–6298.
- [220] I.H. Son, I.M. Chung, S.I. Lee, H.D. Yang, H.I. Moon, Pomiferin, histone deacetylase inhibitor isolated from the fruits of *Maclura pomifera*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 4753–4755.
- [221] L.G. Wang, X.M. Liu, Y. Fang, W. Dai, F.B. Chiao, G.M. Puccio, J. Feng, D. Liu, J.W. Chiao, De-repression of the p21 promoter in prostate cancer cells by an isothiocyanate via inhibition of HDACs and c-Myc, *Int. J. Oncol.* 33 (2008) 375–380.
- [222] D.H. Kim, J. Shin, H.J. Kwon, Psammaphin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase, *Exp. Mol. Med.* 39 (2007) 47–55.
- [223] E. Lara, A. Mai, V. Calvanese, L. Altucci, P. Lopez-Nieva, M.L. Martinez-Chantar, M. Varela-Rey, D. Rotili, A. Nebbioso, S. Roperio, G. Montoya, J. Oyarzabal, S. Velasco, M. Serrano, M. Witt, A. Villar-Garea, A. Imhof, J.M. Mato, M. Esteller, M.F. Fraga, Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect, *Oncogene* 28 (2009) 781–791.
- [224] D. Desai, U. Salli, K.E. Vrana, S. Amin, SelSA, selenium analogs of SAHA as potent histone deacetylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 2044–2047.
- [225] C.M. Grozinger, E.D. Chao, H.E. Blackwell, D. Moazed, S.L. Schreiber, Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38837–38843.
- [226] R.C. Neugebauer, U. Uchiechowska, R. Meier, H. Hraby, V. Valkov, E. Verdin, W. Sippl, M. Jung, Structure–activity studies on splitomicin derivatives as sirtuin inhibitors and computational prediction of binding mode, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1203–1213.
- [227] M.C. Myzak, P.A. Karplus, F.L. Chung, R.H. Dashwood, A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase, *Cancer Res.* 64 (2004) 5767–5774.
- [228] A. Schuetz, J. Min, T. Antoshenko, C.L. Wang, A. Allali-Hassani, A. Dong, P. Loppnau, M. Vedadi, A. Bochkarev, R. Sternglanz, A.N. Plotnikov, Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin, *Structure* 15 (2007) 377–389.
- [229] M. Gutierrez, E.H. Andrianasolo, W.K. Shin, D.E. Goeger, A. Yokochi, J. Schemies, M. Jung, D. France, S. Cornell-Kennon, E. Lee, W.H. Gerwick, Structural and synthetic investigations of tanikolide dimer, a SIRT2 selective inhibitor, and tanikolide seco-acid from the Madagascar marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 5267–5275.
- [230] S. Lain, J.J. Hollick, J. Campbell, O.D. Staples, M. Higgins, M. Aoubala, A. McCarthy, V. Appleyard, K.E. Murray, L. Baker, A. Thompson, J. Mathers, S.J. Holland, M.J. Stark, G. Pass, J. Woods, D.P. Lane, N.J. Westwood, Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator, *Cancer Cell* 13 (2008) 454–463.
- [231] P.H. Kiviranta, J. Leppanen, V.M. Rinne, T. Suuronen, O. Kyrlylenko, S. Kyrlylenko, E. Kuusisto, A.J. Tervo, T. Jarvinen, A. Salminen, A. Poso, E.A. Wallen, N-(3-(4-Hydroxyphenyl)-propenoyl)-amino acid tryptamides as SIRT2 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 2448–2451.
- [232] J. Huang, C. Glass, C. Gerhauser, Cancer Chemoprevention by targeting the epigenome, *Curr Drug Targets* 12 (13) (2011) 1925–1956.

Etude pré-clinique d'une série d'acides 4-hydroxybenzoïques comme inhibiteurs de désacétylases d'histones

L'acétylation des lysines est une modification post-traductionnelle des protéines dont l'ajout et l'élimination sont catalysés respectivement par les histones acétyltransférases (HAT) et les désacétylases d'histones (HDAC). Cette modification joue un rôle majeur dans la régulation de processus cellulaires tels que l'expression génique, la mobilité cellulaire et le métabolisme. Il est maintenant bien établi qu'une altération de l'activité des désacétylases, entraînant ainsi une dérégulation de l'acétylome, est associée au développement tumoral. Par conséquent, les HDAC sont considérées comme des cibles prometteuses en thérapie anti-cancéreuse ce qui a conduit au développement de nombreux inhibiteurs de HDAC. Cependant, la recherche de nouvelles molécules avec un potentiel anti-cancéreux accru et moins d'effets secondaires est indispensable. Nous avons identifié cinq acides 4-hydroxybenzoïques comme nouveaux inhibiteurs de HDAC, trois inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC et deux inhibiteurs spécifiques de HDAC6. Les inhibiteurs qui ciblent plusieurs HDAC induisent l'acétylation de certaines lysines des histones H3 et H4 dans les cellules de leucémie myéloïde chronique humaine K-562. Le traitement des cellules induit un arrêt de la progression du cycle cellulaire associé à la modulation de l'expression des cyclines et l'activation de la transcription du gène codant p21. Enfin, les trois composés qui inhibent plusieurs HDAC induisent une mort par apoptose qui est confirmée par l'observation du clivage et de l'activation des caspases. Les inhibiteurs spécifiques de HDAC6 induisent une hyperacétylation importante de la tubuline- α corrélée à une condensation des microtubules dans les cellules cancéreuses adhérentes de prostate (cellules PC-3 et LNCaP). Ces composés induisent une mort par apoptose des cellules cancéreuses en suspension K-562 accompagnée du clivage des caspases et de l'activation de la protéine pro-apoptotique BAX. Enfin, les molécules altèrent la fonction de la protéine chaperonne HSP90 α observée par une forte diminution de l'expression de ses protéines clientes: Bcr-Abl et le récepteur aux androgènes. Par ailleurs, les cinq composés n'affectent pas la viabilité des cellules saines. L'ensemble de ce travail révèle que les acides 4-hydroxybenzoïques sont des molécules prometteuses pour le développement de nouveaux composés ayant des propriétés anti-tumorales intéressantes.

Mots clés: Cancer, inhibiteurs de désacétylases d'histones, acides 4-hydroxybenzoïques, arrêt du cycle cellulaire, mort cellulaire.

Preclinical investigation of a series of 4-hydroxybenzoic acids as histone deacetylase inhibitors

Lysine acetylation is a post-translational modification characterized by addition and removal acetyl group by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), respectively. This modification plays a crucial role in multiple cellular processes including gene expression, cell motility and metabolism. It is now well established that disruption of deacetylase activity, leading to a pathological acetylation profile, is associated to cancer development. Consequently, HDACs are considered as promising targets for anticancer therapy, which led to the development of novel HDAC inhibitors. However, discovery and synthesis of new molecules is essential to increase anticancer potential and decrease adverse health effects of already known compounds. We identified five 4-hydroxybenzoic acids as new HDAC inhibitors: three pan-HDAC inhibitors and two HDAC6-specific inhibitors. Pan-HDAC inhibitors induce acetylation of selected lysines within histones H3 and H4 in human chronic myeloid leukemia K-562 cells. Treatment of cells induces cell cycle arrest associated with increased cyclin expression and the transcriptional activation of p21. Finally, these pan-HDAC inhibitors induce apoptotic cell death further confirmed by the cleavage and activation of caspases. HDAC6-specific inhibitors induce hyperacetylation of α -tubulin in correlation with microtubule condensation in adherent prostate cancer cells (PC-3 and LNCaP cells). These compounds induce apoptotic cell death in K-562 cells accompanied by caspase cleavage and the activation of the pro-apoptotic protein BAX. Furthermore, these molecules alter the chaperon function of HSP90 α , which is observed through the robust decrease of the expression of its client proteins (*i.e.* Bcr-Abl and androgen receptor). Noteworthy, the five compounds did not affect healthy cell viability. Taken together these results revealed that 4-hydroxybenzoic acids are attractive molecules for the development of new compounds with promising anticancer properties.

Keywords: Cancer, histone deacetylase inhibitors, 4-hydroxybenzoic acids, cell cycle arrest, cell death.