

Les histone désacétylases : de nouvelles cibles en chimiothérapie ?

La structure chromatinienne est une des composantes essentielles de l'expression génique dans les cellules eucaryotes. L'unité fondamentale est le nucléosome constitué d'un brin d'ADN de 146 pb qui forme deux boucles autour d'un octamère protéique contenant deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Cette organisation compactée réprime la transcription *in vitro* et *in vivo* tout en ayant un potentiel dynamique. En effet, les histones qui la composent sont susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles telles que ubiquitinylation, ADP-ribosylation, méthylation, phosphorylation ou encore acétylation [1]. Cette dernière modification est particulièrement étudiée car étroitement corrélée avec l'activité génique [2]. L'acétylation des lysines atténue la charge positive des histones provoquant ainsi une baisse de leur affinité pour l'ADN. Cette déstabilisation du nucléosome permet alors une accessibilité plus grande des facteurs généraux de transcription.

L'état d'acétylation des histones dépend de deux groupes d'enzymes aux activités opposées en équilibre permanent : les histone acétyltransférases (HAT) et les histone désacétylases (HD). L'étude et la caractérisation de ces enzymes ont permis de mieux appréhender le phénomène transcriptionnel. En effet, il s'est avéré que certains co-activateurs transcriptionnels, tels que GCN5, p/CAF, CBP, ou encore la sous-unité TAFII250 du complexe transcriptionnel TFIID, présentaient une activité HAT. A l'inverse, les protéines Rpd3p et Hda1p chez la levure ou leurs homologues humains (HDAC1-3 et HDAC4-6) ont des activités HD [3].

Les HD sont des co-régulateurs négatifs de la transcription qui peuvent être impliqués dans des régulations transitoires de l'expression génique (pour revue voir *m/s* 1997, n° 10, p. 1205), ou dans des phénomènes de répression stable tel que celui associé à la méthylation de l'ADN [4].

Les inhibiteurs d'histone désacétylases

Le contrôle du niveau d'acétylation des histones par les HAT et les HD constitue donc une étape essentielle dans la régulation de l'expression génique et l'obtention de produits capables de moduler ces activités présente un intérêt évident, tant sur le plan cognitif qu'appliqué. A ce jour, il n'existe pas de molécules capables d'agir sur les HAT. En revanche, différents composés peuvent inhiber des activités histone désacétylases (IHD). Le sodium butyrate a été la première de ces molécules inhibitrices décrite, mais ses effets sont obtenus pour des concentrations très élevées qui entraînent d'autres effets moléculaires. Par la suite, différents composés naturels, en particulier des antibiotiques antifongiques, se sont révélés exercer une puissante action IHD.

L'exemple le plus connu est celui de la trichostatine A (TSA), un acide organique hydroxamique chiral qui est un antifongique naturel provenant de la souche *Streptomyces hygroscopicus* (figure 1) (pour revue voir [5]). La cible d'action de la TSA a été identifiée fortuitement par l'analyse des modifications post-traductionnelles des histones, révélant ainsi que, dans les lignées prétraitées par la TSA, les histones étaient dans un état d'hyperacétylation résultant d'un blocage de leur désacétylation.

D'autres produits tels que l'oxamflatine [6], la molécule MS-27-275 [7] ou différents composés polaires hybrides [8], de structure proche de celle la TSA, sont aussi des inhibiteurs des HD.

Un autre métabolite fongique, la trapoxine A (ou TPX), a été isolé pour son caractère d'agent d'inversion morphologique des cellules NIH3T3 transformées par *v-sis*. La TPX n'appartient pas au groupe des trichostatines ; c'est un térapeptide cyclique qui contient, dans sa chaîne acyclique, un groupe époxyde (2-amino-8-oxo-9, 10-époxy décanoyl ou AOE) qui constitue son site actif [5]. D'autres molécules, comme l'apicidine, la chlamydocine, le cly-2, l'HC-toxine ou bien encore le WF-3161 forment une famille qui s'apparente structurellement à la TPX [9]. Enfin, il existe deux autres IHD de structure atypique : la dépudécine, constituée d'une chaîne totalement acyclique et d'un groupe époxyde, et le composé FR901228 qui est un depsipeptide bicyclique sans AOE (figure 1) [10, 11]. Les IHD agissent vraisemblablement par l'intermédiaire de leurs parties acycliques, mimant la chaîne latérale ϵ -N acétylée des lysines et inactivant le site catalytique des HD par les différents groupements réactifs terminaux (époxyde, hydroxymate...). Ce blocage de l'acétylation peut être irréversible comme dans le cas de la TPX qui forme une liaison covalente entre son groupe époxyde et les HD, ou réversible, ce qui est le cas de l'apicidine ou de la TSA.

Activités biologiques *in vitro*

Toutes ces molécules, bien que structurellement différentes, ont des effets cellulaires très semblables, ce

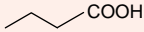
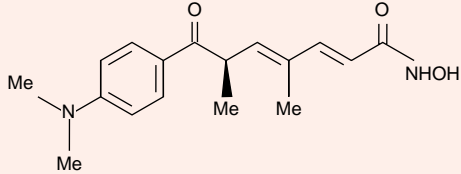
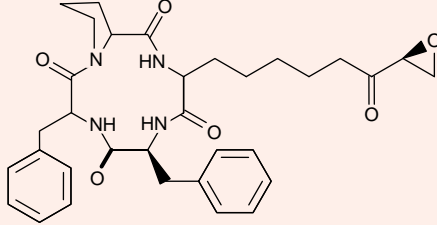
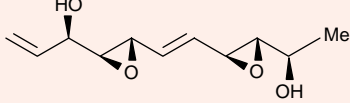
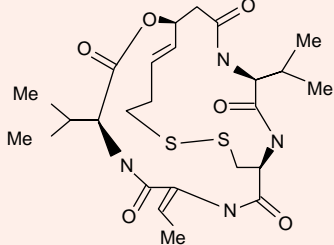
Nom (origine)	Structure
Butyrate de sodium	
Trichostatine A (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)	
Trapoxine A (<i>Helicoma ambiens</i>)	
Depudecine (<i>Alternaria brassicicola</i>)	
FR901228 (<i>Chromobacterium violaceum</i>)	

Figure 1. **Structure des principaux inhibiteurs d'histone désacétylases (IHD).** Les micro-organismes à partir desquels les composés ont été isolés sont également indiqués.

qu'explique vraisemblablement leur capacité commune à inhiber les HD (figure 2). La prolifération et la différenciation cellulaire sont parmi les paramètres les plus affectés. En effet, des cellules de mammifères normales ou tumorales traitées par de faibles doses de TSA, TPX ou de FR901228 (de l'ordre du nanomolaire), ralentissent, voire arrêtent leur prolifération et restent bloquées en phase G1 et G2/M du cycle cellulaire [5, 12]. Les mêmes concentrations de TSA induisent la différenciation des

lignées MEL (*murine erythroleukemia*) et T24 [5], ou l'apoptose de la lignée adénocarcinomateuse VACO-5 [13]. Un changement morphologique est très souvent associé à l'inhibition des HD. Par exemple, lorsque la lignée tumorale NIH3T3 transformée par l'oncogène *v-sis* est traitée par de faibles doses de TPX, de dépudécine ou du composé FR901228 [5, 10, 12], on observe une inversion du phénotype transformé, associée à une réorganisation du cytosquelette. Le développement du réseau de fibres

d'actine est provoqué par la dépudécine dans les cellules NIH3T3 et MG63 (ostéosarcome) et par la TSA dans les cellules HeLa et T24 qui deviennent alors filamenteuses. Cependant, l'ajout simultané à ces cellules de cycloheximide ou d'actinomycine D s'oppose à cette inversion morphologique, suggérant fortement la nécessité d'une synthèse d'ARNm et de protéines.

Dans les cellules HeLa et T24, la TSA est responsable d'une augmentation de l'expression intracellulaire de la gelsoline (12 fois et 7 fois respectivement) [14] qui interagit avec l'actine (*actin binding protein*) en présence de calcium et est impliquée à la fois dans la régulation des microfilaments d'actine et dans le processus apoptotique. La TSA a le même type d'effets sur l'expression d'autres gènes tels que celui de la P-glycoprotéine, *MDR1* [15], le gène *endoA* codant pour la cytokératine A murine dans les cellules F9 [16], ou encore le gène de la globine dans les cellules Ba/F3 [17]. A des concentrations suffisantes pour arrêter la prolifération cellulaire en phases G1 et G2/M dans des lignées d'ostéosarcomes humains, la TSA induit le gène *p21^{WAF/Cip1}* par le biais de deux sites Sp1 [18]. En outre, l'expression de gènes codant pour les HD sont eux-mêmes induits après traitement par les IHD [19]. La TSA potentialise également les effets d'autres molécules telle que l'induction par la triiodotyronine (T3) et l'acide rétinolique de l'expression de l'ARNm de la GH (*growth hormone*) dans les cellules GH4C1 [20].

Histone désacétylases et cancer

De nombreux travaux récents impliquent les HD dans le processus de cancérogenèse (*m/s*, 1998, n° 4, p. 455). L'exemple le plus démonstratif est celui des protéines de fusion oncogéniques exprimées dans différentes leucémies aiguës à promyélocytes. Ces protéines chimères sont dues à des translocations chromosomiques impliquant en particulier *RAR α* , le gène du récepteur de l'acide rétinolique (PML-*RAR α* ou PLZF-*RAR α*). Dans le cas de PML-*RAR α* , on obtient une rémission de la maladie en traitant les patients

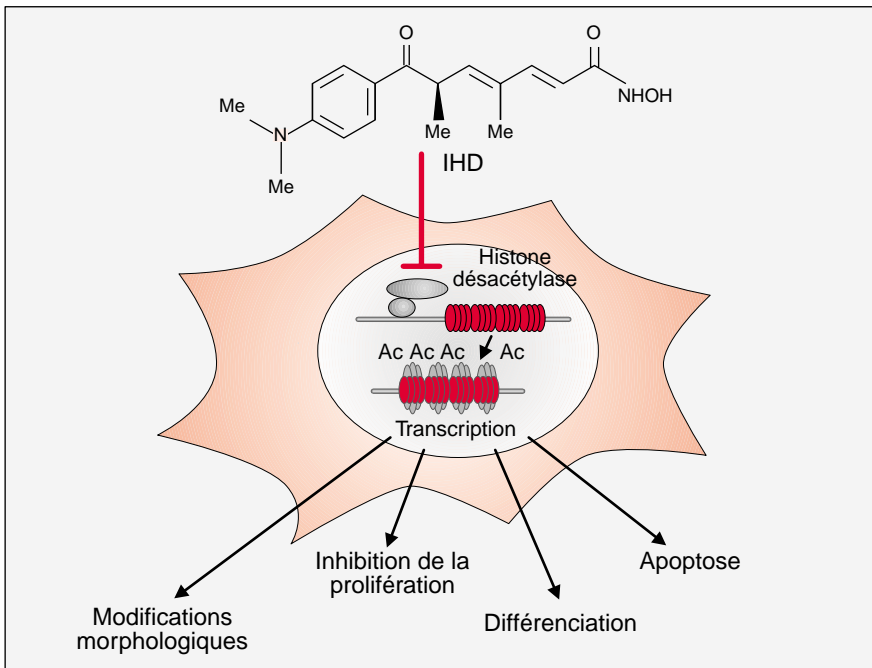


Figure 2. **Principaux effets des IHD sur les lignées cellulaires en culture.** En réponse aux IHD, l'hyperacétylation des histones modifie la structure chromatinienne et conduit à l'expression de certains gènes. Selon les cellules, on peut observer des modifications morphologiques, une diminution de la prolifération et une augmentation de la différenciation cellulaire et du phénomène apoptotique.

avec de fortes doses d'acide rétinolique [21]. En revanche, les leucémies engendrant une protéine de fusion avec la protéine PLZF sont résistantes à ce traitement car, dans ce cas, la liaison de la protéine chimère au complexe co-répresseurs/histone désacétylases persiste même en présence d'acide rétinolique. La réponse à l'acide rétinolique peut cependant être restaurée dans ces lignées résistantes en les traitant simultanément avec de la TSA (pour revue voir [22]). Ces résultats ont commencé à être appliqués en clinique par le groupe de Pandolfi (New York, USA) : une patiente atteinte d'une forme de leucémie résistante à l'acide rétinolique a pu être mise en rémission en associant au traitement du phénylbutyrate de sodium [23]. En outre, un article récent paru dans *Cancer Research* suggère que les IHD pourraient également être efficaces dans certains cas de leucémies aiguës myéloblastiques exprimant la protéine de fusion AML1-ETO [24].

D'autres études suggèrent également un rôle protecteur des IHD dans le traitement des cancers. Plusieurs publications indiquent en effet que le butyrate, produit après fermentation de certaines fibres contenues dans l'alimentation, pourrait rendre compte de leur rôle protecteur contre le cancer du côlon (pour revue voir [25]). Par ailleurs, le développement de tumeurs humaines transplantées chez la souris athymique est inhibé en traitant les animaux par les composés MS-27-275 [7] ou FR901228 [11]. L'intérêt thérapeutique de cette dernière molécule en tant qu'agent antitumoral est actuellement testé en clinique aux États-Unis (phase I). Enfin, d'autres maladies humaines pourraient également bénéficier d'une chimiothérapie incluant des IHD. C'est le cas de la malaria qui est responsable de la mort de près de deux millions d'individus par an dans le monde. Les parasites de la famille Apicomplexan qui en sont responsables développent peu à peu une multirésistance aux médica-

ments actuels, ce qui pose un problème majeur de santé publique. Une étude récente a montré que chez la souris, l'apicidine ou d'autres IHD sont capables de provoquer l'hyperacétylation des histones des parasites ayant infecté les globules rouges et de diminuer leur prolifération après administration de l'IHD par voie orale ou parentérale [9]. En conclusion, il est maintenant clairement établi que la dérégulation du niveau d'acétylation des histones (ou d'autres substrats) et la modification de la structure chromatinienne sont des étapes critiques pouvant participer au processus de cancérogenèse. La modulation de l'activité des différentes enzymes (HAT et HD) contrôlant le degré d'acétylation apparaît donc comme un nouveau moyen d'action thérapeutique en cancérologie. De nombreux progrès restent cependant à accomplir au niveau de la caractérisation des activités enzymatiques HAT et HD en termes de spécificité de substrats, d'interaction avec d'autres facteurs transcriptionnels ou au niveau de leur propre régulation ■

Sandrine Thénot
Raphaël Margueron
Vincent Cavallès

Inserm U. 148, Hormones et Cancer, 60, rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France.

RÉFÉRENCES

1. Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 711-20.
2. Struhl K, Moqtaderi Z. The TAFs in the HAT. *Cell* 1998; 94: 1-4.
3. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast hda1p. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4868-73.
4. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-9.
5. Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* 1995; 17: 423-30.

RÉFÉRENCES

6. Kim YB, Lee KH, Sugita K, Yoshida M, Horinouchi S. Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene* 1999; 18: 2461-70.
7. Saito A, Yamashita T, Mariko, *et al.* A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked *in vivo* antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4592-7.
8. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, *et al.* A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3003-7.
9. Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Myers RW, *et al.* Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13143-7.
10. Kwon HJ, Owa T, Hassig CA, Shimada J, Schreiber SL. Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3356-61.
11. Ueda H, Manda T, Matsumoto S, *et al.* FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. *J Antibiot (Tokyo)* 1994; 47: 315-23.
12. Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp Cell Res* 1998; 241: 126-33.
13. McBain JA, Eastman A, Nobel CS, Mueller GC. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1357-68.
14. Hoshikawa Y, Kwon HJ, Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 1994; 214: 189-97.
15. Jin S, Scotto KW. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 4377-84.
16. Miyashita T, Yamamoto H, Nishimune Y, Nozaki M, Morita T, Matsushiro A. Activation of the mouse cytokeratin A (endo A) gene in teratocarcinoma F9 cells by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *FEBS Lett* 1994; 353: 225-9.
17. Ishiguro K, Sartorelli AC. Coinduction of embryonic and adult-type globin mRNAs by sodium butyrate and trichostatin A in two murine interleukin-3-dependent bone marrow-derived cell lines. *Blood* 1998; 92: 4383-93.
18. Sowa Y, Orita T, Minamikawa S, *et al.* Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 142-50.
19. Dangond F, Gullans SR. Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 833-7.
20. Garcia-Villalba P, Jimenez-Lara AM, Castillo AI, Aranda A. Histone acetylation influences thyroid hormone and retinoic acid-mediated gene expression. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 421-31.
21. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque: le paradoxe. *Med Sci* 1994; 10: 817-24.
22. Fenrick R, Hiebert SW. Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J Cell Biochem* 1998; 30-31 (suppl): 194-202, 194-202.
23. Warrell RPJ, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1621-5.
24. Wang J, Sauntharajah Y, Redner RL, Liu JM. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2766-9.
25. Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 171-4.

TIRÉS À PART

V. Cavaillès.

BRÈVES

■■■■ **L'inactivation de MYC entraîne une régression tumorale.** La transformation maligne d'une cellule résulte de l'accumulation successive d'anomalies génétiques (*m/s* 1999, 8/9, p. 1061). Cela rend théoriquement inefficace l'inactivation d'un oncogène unique dans un objectif thérapeutique. La réalisation de souris exprimant le transgène MYC au niveau des cellules hématopoïétiques, transgène dont la transcription est placée sous le contrôle d'un promoteur sensible à la tétracycline (système *tet-off*), a permis de poser le problème de la régression tumorale par l'inactivation de cet oncogène impliqué dans plusieurs affections malignes chez l'homme [1]. Cent pour cent des souris transgéniques meurent dans les 5 premiers mois de tumeurs hématopoïétiques, en majo-

rité des lymphomes T avec une atteinte thymique, splénique et gastro-intestinale. Ces tumeurs sont extrêmement agressives, transplantables, constituées de cellules T ayant un phénotype immature, aneuploïdes, clonales et expriment MYC. Chez 90 % des souris ayant développé une tumeur, un traitement par tétracycline entraîne une régression tumorale notable dès le 3^e jour de traitement. Cette régression tumorale est associée à l'inactivation de la transcription de MYC. Le traitement est également efficace chez les souris greffées avec du tissu tumoral provenant de souris transgéniques. La régression tumorale est totale et persiste plus de 60 semaines après le traitement. Celle-ci s'accompagne *in vivo* d'une différenciation des cellules blastiques en lympho-

cytes T mûrs, avec réapparition de follicules primaires au niveau de la rate et du tissu lymphoïde digestif. Une partie des cellules tumorales meurt par apoptose *in vivo*. Dans 10 % des cas, les souris traitées par tétracyclines ont une rémission de courte durée avec une réapparition de la tumeur n'exprimant pas MYC après traitement par tétracyclines suggérant l'apparition d'événements génétiques secondaires mimant l'action du transgène. Ces résultats suggèrent que la correction d'un événement génétique unique peut permettre d'obtenir une différenciation des cellules tumorales et une perte de leur potentiel malin malgré l'accumulation d'événements génétiques secondaires. [1. Felsher DW, Bishop JM. *Mol Cell* 1999; 4: 199-207.]