



UNIVERSITE DE LIEGE
Faculté de Médecine

Laboratoire de Recherche
sur les Métastases
Co-Promoteurs :
Pr V. Castronovo
Dr D. Waltregny

Contribution à l'étude du rôle
des déacétylases d'histones HDAC4 et HDAC8
dans la biologie des cellules de phénotype musculaire lisse

Wendy Glénisson

Licenciée en Biologie

Thèse présentée en vue de l'obtention
du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales Expérimentales

2007

Remerciements

Au moment de déposer ce mémoire, je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les nombreuses personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Vincent Castronovo de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Pour reprendre ses propres mots, il a « su mettre en place autour de moi un environnement fertile qui fut propice au développement de mes qualités ».

Je désire ensuite faire part de ma plus profonde gratitude au Docteur David Waltregny. J'ai eu la chance de bénéficier de son encadrement dynamique, de sa grande rigueur scientifique et de son sens du travail bien fait. Qu'il soit remercié du temps et de la confiance qu'il m'a accordés.

Ma profonde reconnaissance va au Professeur Agnès Noël, Présidente du Jury, ainsi qu'aux membres du Comité de Lecture, pour leurs judicieuses remarques au cours de ce travail et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce mémoire.

Je souhaite remercier vivement les membres du Laboratoire de Recherche sur les Métastases de leur gentillesse. Et plus particulièrement Siv Ly, Sandrine, Pascale et Sophie. Leurs encouragements et leur amitié m'ont été une aide précieuse.

Je remercie également le Télévie, le Fonds National de la Recherche Scientifique et le Centre Anticancéreux près l'Université de Liège pour leur confiance et leur aide financière.

Enfin, ce travail n'aurait pu voir le jour sans le soutien indéfectible et l'amour de mes proches. Je remercie mes parents de m'avoir encouragée à toujours chercher à donner le meilleur de moi-même. Qu'ils soient assurés de mon affectueuse reconnaissance.

Roseline, merci d'être ce que tu es : cousine jumelle, amie, et bien plus...

Mino, merci pour ton soutien orthographique !

Andy, you were there when I needed you : thank you so much !

Olivier, mon Amour, merci d'être à mes côtés. Ta force rayonnante est source de paix et d'équilibre dans ma vie.

*Je cherche quand je veux,
Je trouve quand je peux.*

Albert Einstein

*Point n'est besoin d'espérer pour entreprendre,
ni de réussir pour persévérer.*

Guillaume le Taciturne

En persévérant on arrive à tout.

Théocrite

1. Introduction	1
1.1. Les mécanismes de contrôle épigénétique de l'expression des gènes	1
1.2. L'ADN et les histones	2
1.3. Les déacétylases d'histones (HDACs)	5
1.3.1. La découverte de la première HDAC	6
1.3.2. Les trois classes d'HDACs	7
1.3.2.1. Les HDACs de classe I	10
1.3.2.1.1. La déacétylase d'histones HDAC8	11
1.3.2.1.2. Travaux préliminaires réalisés dans le laboratoire	15
1.3.2.2. Les HDACs de classe II	15
1.3.2.2.1. La déacétylase d'histones HDAC4	17
1.3.2.3. Les HDACs de classe III	23
1.4. La déacétylation de protéines non histoniques	24
1.4.1. Dans le noyau	26
1.4.2. Dans le cytoplasme	26
1.4.3. Dans les mitochondries	27
1.4.4. A la membrane cytoplasmique	27
1.5. HDACs et cancer	28
1.5.1. Les inhibiteurs d'HDACs	29
1.5.1.1. La TSA	32
1.5.2. Mode d'action des inhibiteurs d'HDACs	32
2. Buts et plan du travail	35
3. Résultats	37
3.1. Expression et rôle de HDAC8 dans les cellules de phénotype musculaire lisse	37
3.1.1. L'expression de HDAC8 est restreinte aux cellules présentant une différenciation musculaire lisse dans les tissus humains normaux	37
3.1.2. HDAC8 co-localise avec l' α -SMA dans le cytoplasme	45
3.1.3. HDAC8 s'associe à l' α -SMA	49
3.1.4. HDAC8 contribue à la capacité des cellules musculaires lisses de contracter des lattices de collagène	53
3.1.5. Altération de l'expression de HDAC8 au niveau de la paroi musculaire de segments intestinaux atteints de troubles sévères de la motilité	59
3.1.6. Discussion	61

3.2. Rôle des HDACs dans le processus de différenciation myofibroblastique	67
3.2.1. La Trichostatine A empêche la différenciation myofibroblastique médiée par le TGFβ1	70
3.2.2. Influence de la réduction spécifique de l'expression des différentes HDACs sur l'induction de l'α-SMA médiée par le TGFβ1	75
3.2.3. HDAC4 est nécessaire à la différenciation myofibroblastique induite par le TGFβ1	77
3.2.4. La diminution d'HDAC4 induit l'expression de TGIF et de TGIF2	81
3.2.5. Discussion	83
4. Conclusions et Perspectives	87
5. Références	91
6. Annexes	115
6.1. Annexe 1 : Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues, (<i>American Journal of Pathology</i>)	
6.2. Annexe 2 : Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle α-actin and is essential for smooth muscle cell contractility, (<i>FASEB Journal</i>)	
6.3. Annexe 3 : Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal musculature in severe colorectal motility disorders, (<i>Neurogastroenterology and motility</i>)	
6.4. Annexe 4 : Histone deacetylase 4 is required for TGFβ-induced myofibroblastic differentiation, (<i>BBA Molecular Cell Research</i>)	

Abréviations utilisées

α -SMA	« <i>α-smooth muscle actin</i> »
AA	Acides aminés
Actine-F	Actine filamenteuse
Actine-G	Actine globulaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
bp	« <i>base pair</i> »
CaMKII	« <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i> »
Cbf- β	« <i>Core-binding factor β</i> »
CGNs	« <i>Cerebellar granule neurons</i> »
CMC	Couche musculaire circulaire
CML	Couche musculaire longitudinale
C-terminal	Carboxy-terminal
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HAT	« <i>Histone acetyl transferase</i> »
HB	« <i>High stringency Buffer</i> »
Hda1	« <i>Histone deacetylase-A</i> »
HDAC	« <i>Histone deacetylase</i> »
Hela	Lignée cancéreuse humaine dérivée de kératinocytes de col utérin
HSMC	« <i>Human smooth muscle cells</i> »
IC ₅₀	« <i>Inhibitor Concentration giving 50% of inhibition</i> »
IgG	Immunoglobulines G
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
LB	« <i>Low stringency buffer</i> »
LDH	Lactate déshydrogénase
M	Molaire
MEF2	« <i>Myocyte Enhancer Factor 2</i> »
NAD	Nicotinamide-adénine dinucléotide
N-CoR	« <i>Nuclear Receptor Corepressor</i> »
NIH-3T3	Lignée de fibroblastes murins transformés
N-terminal	Amino-terminal
NuRD	« <i>Nucleosome remodeling and deacetylation</i> »
p53	Protéine p53
p53BP1	« <i>p53-binding protein 1</i> »
PBS	« <i>Phosphate buffered saline</i> »
Rpd3	« <i>Reduced potassium dependency 3</i> »
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne après rétrotranscription
Runx2	« <i>Runt-related transcription factor 2</i> »
Sir2	« <i>Silent information regulator-2</i> »
siRNA	« <i>Small interfering RNA</i> »
SIRT	Sirtuine
SMMHC	« <i>Smooth muscle myosin heavy chain</i> »
SMRT	« <i>Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor</i> »
TGF- β	« <i>Transforming growth factor-beta</i> »
TGIF	« <i>5'-TG-3'-interacting factor</i> »
TGIF2	« <i>5'-TG-3'-interacting factor 2</i> »
TPX	Trapoxine
TRAIL	« <i>Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand</i> »
TSA	Trichostatine A

1. Introduction

1.1. Les mécanismes de contrôle épigénétique de l'expression des gènes

Dans les pays industrialisés, le cancer est devenu un problème de santé publique majeur. L'Agence de Recherche sur le Cancer de l'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'en 2006, il y a eu 3.2 millions de nouveaux cas de cancer (par rapport à 2.9 millions en 2004) et 1.7 million de décès liés au cancer dans la totalité de l'Europe (Centre International de Recherche sur le Cancer 2007). L'augmentation de l'incidence du cancer s'explique en partie par le vieillissement des populations et par la mise en place de différentes modalités de dépistage. A cela s'ajoutent de nombreux facteurs de risque liés au mode de vie, tels qu'une alimentation déséquilibrée, l'exposition à des produits toxiques (tabagisme, ...) ou à des radiations et certaines infections bactériennes ou virales, ainsi que des facteurs dits « favorisants », comme l'hérédité.

L'étude des causes biologiques du cancer s'est longtemps concentrée sur l'identification des altérations génétiques qui peuvent en être la source. Mais, au cours de ces dernières années, il est devenu évident que l'initiation et la progression du cancer peuvent également dépendre de modifications de l'expression des gènes qui ne s'accompagnent pas de changements des séquences nucléotidiques et qui sont donc dites « épigénétiques ». Ces modifications épigénétiques de l'expression des gènes sont transmissibles et réversibles. Elles peuvent cibler l'ADN, l'ARN ou les protéines et agir au niveau du noyau ou du cytoplasme.

Ainsi, les modifications épigénétiques de l'expression des gènes peuvent se traduire par une modification de l'ADN lui-même, telle que la méthylation de résidus cytosine, ou par des modifications post-traductionnelles d'autres molécules associées à l'ADN, comme les histones. L'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones constitue le «code des histones» (Rice *et al.* 2001). Le décryptage de ce code n'en est qu'à ses prémices et permet progressivement d'associer à chaque combinaison de modifications un état particulier de la chromatine, et ainsi de l'expression génique (Jenuwein *et al.* 2001). De par son importance cruciale dans le développement embryonnaire, dans la plasticité des cellules souches et dans l'apparition et la progression de maladies humaines telles que le cancer, il est probable que l'étude des événements épigénétiques nous conduise, dans les années à venir, à une révolution

de la connaissance du vivant, et fasse entrer la biologie dans une nouvelle ère de son développement.

Dans cette introduction, nous rappellerons la manière dont s'organisent l'ADN et les histones, nous expliquerons le rôle des déacétylases d'histones (HDACs) dans cet agencement ainsi que la manière dont cette famille d'enzymes est répartie en trois classes. Nous examinerons plus en détail les déacétylases d'histones HDAC8 et HDAC4, car nos travaux se sont penchés plus particulièrement sur ces deux enzymes. Ensuite, nous examinerons les différents substrats et localisations décrits pour les HDACs et nous évoquerons l'utilisation d'inhibiteurs d'HDACs dans le traitement du cancer en nous attardant un peu plus longuement sur l'un d'entre eux, la Trichostatine A (TSA).

1.2. L'ADN et les histones

Afin de pouvoir être contenu dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN, cette longue macromolécule contenant l'information génétique, doit être très fortement compacté. Dans chaque cellule, environ deux mètres d'ADN sont condensés sous forme de chromatine qui, lors de la division cellulaire, se replie et s'enroule en chromosomes n'occupant plus que quelques microns d'espace. La chromatine a une structure en forme de collier de perles, comme représenté dans la **Figure 1**. Chaque perle, appelée nucléosome (Kornberg *et al.* 1974), est composée d'un octamère de protéines appelées les histones, autour duquel le brin d'ADN fait deux tours de spire (146 bp « *base pair* ») (Luger *et al.* 1998; Hayes *et al.* 2001; Woodcock *et al.* 2001). Un octamère est composé de quatre dimères de chacun des histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 permet quant à lui la compaction des nucléosomes et rigidifie la structure hélicoïdale ainsi obtenue.

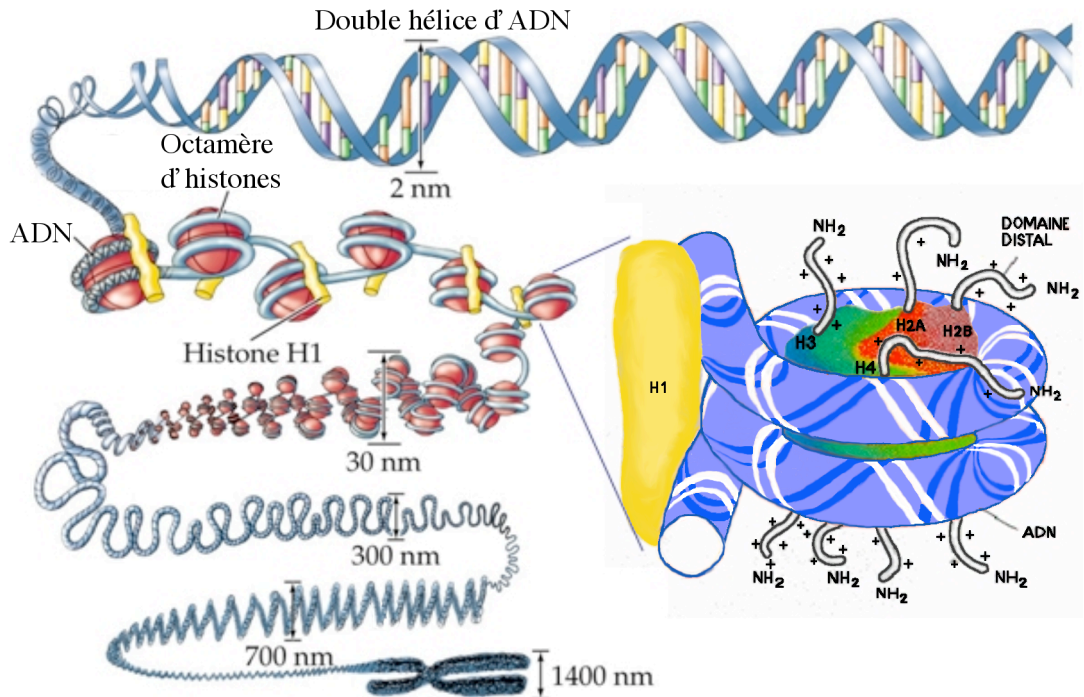


Figure 1 : Diagramme illustrant les différents niveaux d'organisation du matériel génétique.

L'ADN s'enroule en 2 tours de spire autour d'un octamère d'histones pour former un nucléosome (voir agrandissement). Les nucléosomes sont compactés en fibres de chromatine qui forment un chromosome.

Les histones sont de petites protéines basiques, composées d'un domaine globulaire et d'une queue amino-terminale qui dépasse du nucléosome. Ils comptent parmi les protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Par exemple, les histones H4 de la tomate et de l'être humain sont identiques, à l'exception de trois substitutions hautement conservées (Urnov *et al.* 2001). Par contre les histones sont parmi les protéines les plus variables en termes de modifications post-traductionnelles (Thiagalingam *et al.* 2003).

Ces modifications post-traductionnelles, covalentes et réversibles, incluent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation (Althaus *et al.* 1994; Strahl *et al.* 2000; Fischle *et al.* 2003; Nicholson *et al.* 2004). Elles sont catalysées par des enzymes spécifiques qui ciblent certains acides aminés spécifiques de la queue N-terminale des histones (Allfrey *et al.* 1964; Strahl *et al.* 2000). Ces modifications post-traductionnelles régulent le degré de condensation de la chromatine *in vivo* soit en modifiant directement la compaction de l'ADN autour des nucléosomes, soit indirectement, en constituant des « marques » permettant le recrutement de protéines capables de modifier la structure de la chromatine. L'agencement des modifications covalentes des histones agirait selon Strahl et Allis (Strahl *et al.* 2000) comme un code, le « code des histones ». Remarquons que ce code

serait cependant loin d'être universel, mais plutôt relativement spécifique d'un gène à l'autre (Linggi *et al.* 2005) et d'un type cellulaire à l'autre (Fish *et al.* 2005).

Puisque le degré de compaction de l'ADN autour des nucléosomes conditionne son accessibilité à la machinerie transcriptionnelle, il est apparu que les modifications des histones interviennent dans la régulation de l'expression des gènes (Mizzen *et al.* 2000; Eberharter *et al.* 2002). Parmi les modifications citées ci-dessus, l'acétylation du groupe ϵ -NH₂ des résidus lysine est probablement la plus étudiée car il existe une forte corrélation entre le niveau d'acétylation d'un locus du génome et son degré de transcription (Hebbes *et al.* 1988; Braunstein *et al.* 1993; Jeppesen *et al.* 1993; Kuo *et al.* 1998; Parekh *et al.* 1999). Le niveau d'acétylation des histones (**Figure 2**) est dépendant de l'action antagoniste de deux familles d'enzymes: les acétyl-transférases d'histones (« *Histone Acetyl-Transferases* » ; HATs) et les déacétylases d'histones (« *Histone DeAcetylases* » ; HDACs). C'est plus particulièrement aux HDACs que nos travaux se sont intéressés.

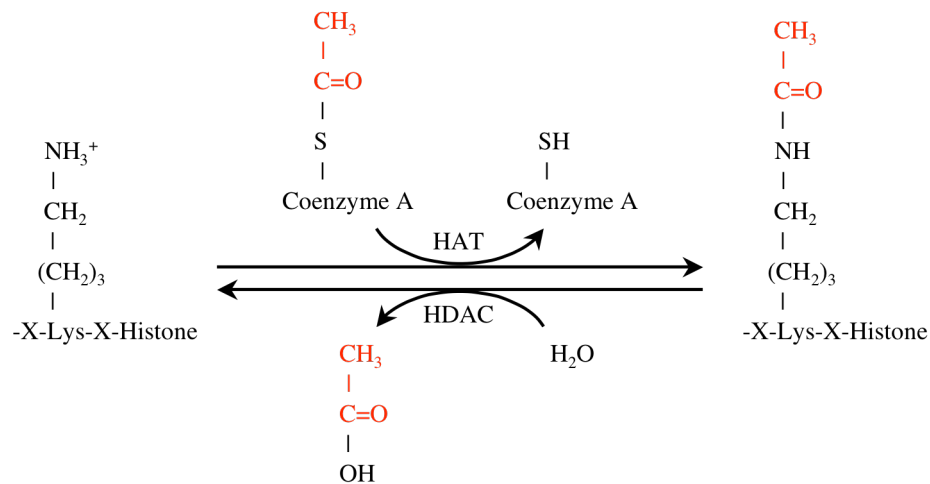


Figure 2 : Représentation schématique de l'équilibre entre l'acétylation et la déacétylation d'un résidu lysine d'un histone.

1.3. Les déacétylases d'histones (HDACs)

Les histones contiennent une forte proportion de résidus lysine et arginine. Ces acides aminés sont chargés positivement et permettent donc aux histones de se lier très fortement à l'ADN, ce dernier ayant une charge globale négative que lui confèrent ses groupements phosphate.

L'ajout, par les HATs, de groupements acétyl, chargés négativement, sur les résidus lysine des queues N-terminales des histones induit une répulsion entre ces charges et celles de l'ADN. Cela a pour effet de déplier les queues N-terminales des histones et de décondenser les fibres de chromatine (Tse *et al.* 1998). Celles-ci deviennent donc plus accessibles aux facteurs de transcription. Inversement, la diminution du niveau d'acétylation des queues N-terminales des histones, suite à une activité HDAC, reconstitue la charge positive du résidu lysine. Cela renforce l'interaction entre les queues N-terminales des histones et l'ADN, qui sera donc sous forme de chromatine plus compacte et moins transcrite (**Figure 3**) (Protacio *et al.* 2000).

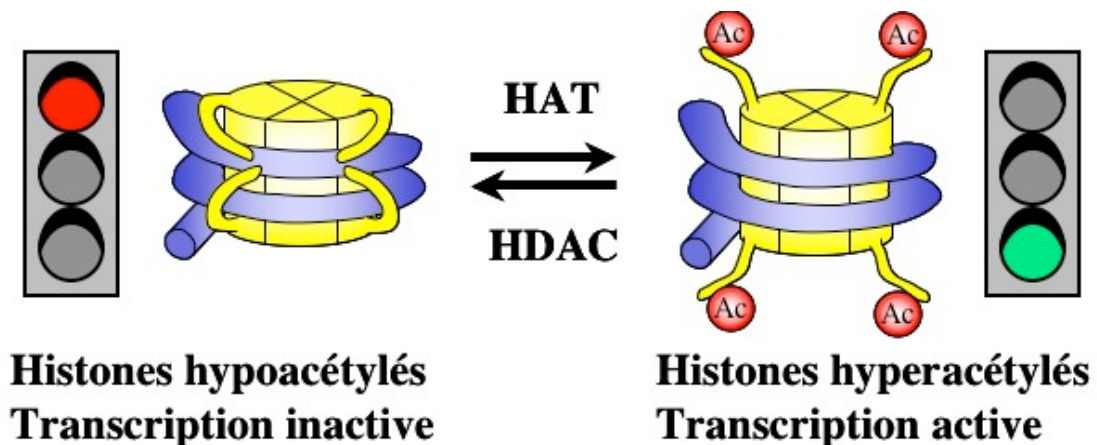


Figure 3 : Représentation schématique de l'accessibilité de l'ADN (en bleu) en fonction de l'acétylation (en rouge) des queues amino-terminales des histones (en jaune).

Les HDACs entrent dans la composition d'un grand nombre de complexes co-répresseurs de la transcription comme par exemple N-coR (« *Nuclear Receptor Corepressor* »), SMRT (« *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor* »), et sin3A (« *SIN3 homolog A* »). Ces complexes recrutent des HDACs aux promoteurs de gènes, tels que des suppresseurs de tumeurs, dont ils bloquent la transcription (Ng *et al.* 2000). Par exemple, HDAC1 et HDAC2 sont recrutées dans un complexe NuRD (« *Nucleosome Remodeling and Deacetylation* ») qui joue un rôle dans la méthylation par recrutement de la DNMT1 (« *DNA*

MethylTransferase 1 ») et dans le remodelage de la chromatine par le recrutement de membres de la famille hélicase/ATPases (Zhang *et al.* 1999).

Parfois la déacétylation des histones prépare le terrain pour la méthylation des lysines. Ainsi, l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 empêche sa méthylation, dont l'effet est suppressif vis-à-vis de la transcription. Les histones méthylés fournissent l'interface pour le recrutement de protéines spécifiques, comme HP1 (« *Heterochromatin Protein 1* »), impliquées dans la régulation de la chromatine en favorisant le recrutement d'autres enzymes capables de modifier les histones ou l'ADN (**Figure 4**) (Nielsen *et al.* 2001; Nielsen *et al.* 2002). Remarquons enfin que les HDACs ont un potentiel d'homo- ou d'hétéro-dimérisation (Fischle *et al.* 2001).

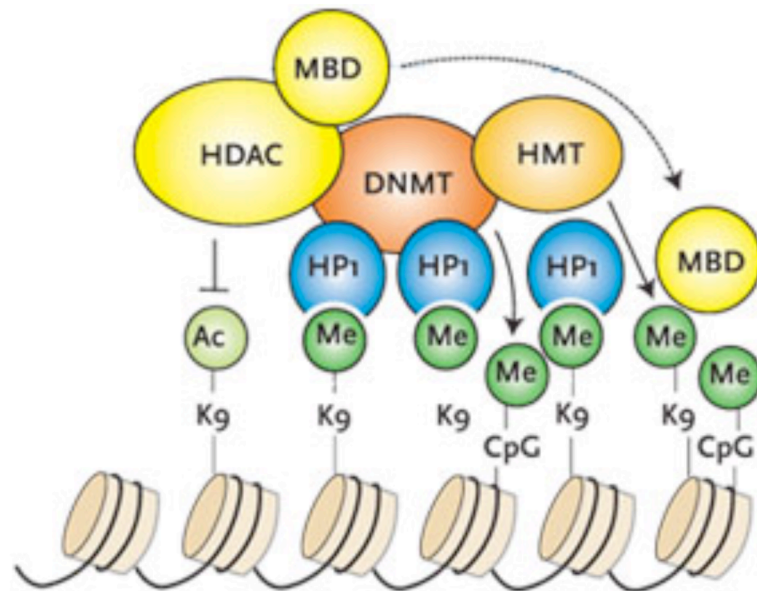


Figure 4 : Représentation schématique de l'agencement d'un grand complexe de protéines responsables de la modification des histones et de l'ADN. La méthylation des histones par les HMTs (« *Histone MethylTransferase* ») permet la liaison de MBDs (« *Methyl-Binding Domain protein* ») qui bloquent l'accès aux facteurs de transcription, ou de HP1 (« *Heterochromatin Protein 1* »). Cette dernière recrute des DNMTs (« *DNA MethylTransferase* ») et des HDACs qui en méthylant les îlots CpG de l'ADN et en déacétylant les queues des histones vont participer à la répression de la transcription.

1.3.1. La découverte de la première HDAC

La trapoxine (TPX) est un tétrapeptide cyclique d'origine microbienne qui inhibe, de manière irréversible, la déacétylation des histones *in vivo* et qui induit l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules de mammifères. Sa structure moléculaire ressemble à celle du substrat des HDACs et lui permet de former un lien covalent avec un résidu nucléophile de leur site actif. C'est pourquoi Taunton *et al.* ont utilisé une matrice contenant un analogue de

la TPX afin de purifier les premières HDACs de mammifères. Deux protéines bovines et une humaine furent ainsi retenues par affinité sur cette matrice. Taunton *et al.* nommèrent la première déacétylase d'histones humaine HD1, elle deviendrait plus tard HDAC1. Cette enzyme présentait bien une capacité de liaison à la TPX, ainsi qu'une activité de déacétylation d'histones qui peut être inhibée non seulement par la TPX mais également par un autre inhibiteur de la déacétylation des histones, réversible celui-ci : la trichostatine A (TSA) (Taunton *et al.* 1996).

1.3.2. Les trois classes d'HDACs

Des protéines responsables de la déacétylation des histones ont été identifiées chez les levures (Rundlett *et al.* 1996), les plantes (Lusser *et al.* 1997) et les mammifères (Taunton *et al.* 1996; Fischle *et al.* 1999; Grozinger *et al.* 1999).

A ce jour, 18 HDACs humaines ont été identifiées. Elles sont réparties en trois classes sur base de leur homologie de séquence à différentes HDACs de la levure, ainsi qu'en fonction de leur poids moléculaire et de leur localisation intracellulaire.

Les HDACs de classe I et de classe II font partie de la famille des HDACs classiques. Ces amido-hydrolases ont une activité de déacétylation dépendante du zinc. Pratiquement tous les inhibiteurs d'HDACs de classe I et II connus ciblent le domaine catalytique contenant l'ion Zn^{2+} (Lin *et al.* 2006). Ces HDACs sont dotées d'un domaine catalytique conservé, mais présentent des différences de taille, de structure et de distribution d'expression tissulaire. Les HDACs de classe III, aussi appelées sirtuines (SIRT), constituent une famille à part puisque non seulement leurs séquences sont distinctes des classes I et II, mais aussi leur mécanisme catalytique est différent puisqu'il est dépendant du NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et non du Zn^{2+} .

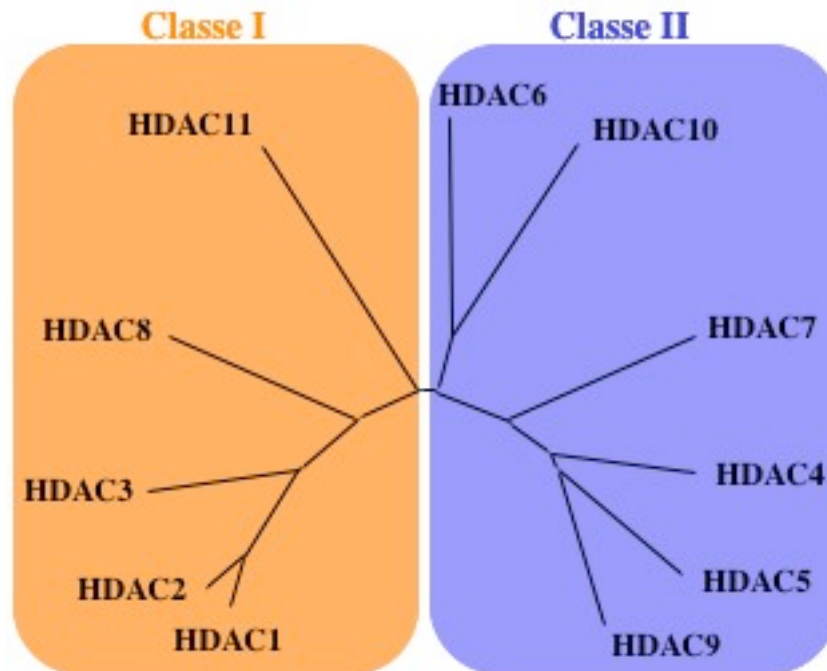


Figure 5 : Arbre phylogénétique « sans racines » des HDACs de classe I et II (réalisé sur les séquences protéiques alignées par clustal W (<http://align.genome.jp>) option « *unrooted tree* »).

L'arbre phylogénétique « sans racines » ci-dessus (**Figure 5**) a été réalisé par alignement des séquences protéiques des 11 premières HDACs avec clustal W (<http://align.genome.jp>). Il illustre bien les similarités de séquences des membres de la classe I entre eux et des membres de la classe II entre eux. Il permet également de traduire graphiquement les divergences qui existent dans la manière de classer les HDACs.

Pour commencer, HDAC11, la dernière HDAC humaine à avoir été identifiée, partage une homologie de séquence avec les domaines catalytiques des classes I et II (Gao *et al.* 2002). C'est pourquoi, dans un premier temps, il a été admis qu'elle ne pouvait être rangée ni dans la première ni dans la seconde classe sans un certain degré d'ambiguïté (de Ruijter *et al.* 2003). Puis, certains auteurs ont proposé la création d'une quatrième classe dont l'unique membre serait HDAC11 (Yang *et al.* 2005; Adcock 2006). Néanmoins, la majorité des auteurs considèrent HDAC11 comme faisant partie de la classe I en raison de son homologie à la protéine de levure Rpd3 (« *Reduced potassium dependency 3* »).

D'autre part, les HDACs de classe II pourraient être subdivisées en deux sous-classes : IIA (HDAC 4, 5, 7, 9) et IIB (HDAC 6 and 10) sur base de leurs homologies de séquences et de l'organisation de leurs domaines (Verdin *et al.* 2003) (**Figures 5 et 6**). Les HDACs de la classe IIA (HDAC9 mis à part) contiennent un domaine catalytique homologue à Hda1 (« *Histone deacetylase-A1* ») hautement conservé en C-terminal (d'environ 420 acides

aminés), mais leur portion N-terminale ne présente pas de similarité avec les autres HDACs. Les HDACs de classe IIB sont caractérisées par un domaine déacétylase additionnel. La duplication de ce domaine n'est que partielle pour HDAC10 (Verdin *et al.* 2003). L'analyse par mutagenèse dirigée de l'activité catalytique des deux domaines catalytiques distincts de HDAC6 a indiqué qu'ils pourraient fonctionner de manière indépendante (Grozinger *et al.* 1999).

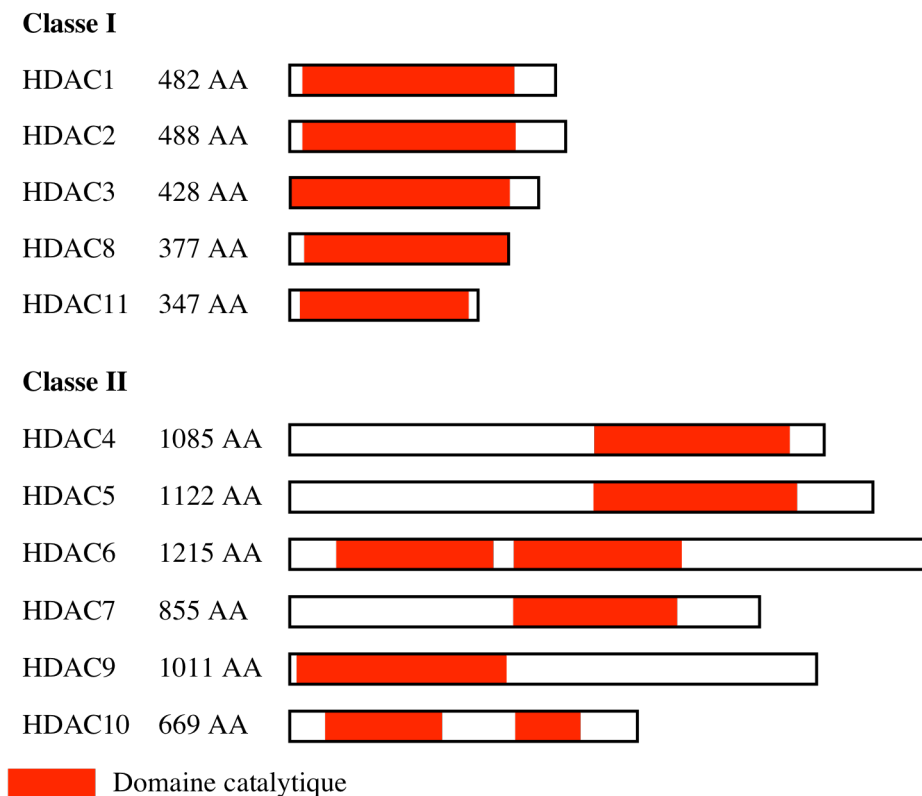


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des HDACs humaines de classes I et II (figure modifiée à partir de (Lin *et al.* 2006)).

Bien que le rôle des HDACs dans la régulation de l'expression de multiples gènes ait été abondamment étudié, les mécanismes qui régulent l'expression de ces enzymes sont moins bien connus. Il a été décrit que l'expression des HDACs est influencée par la densité cellulaire et par les inhibiteurs d'HDACs (Dangond *et al.* 1998; Dangond *et al.* 2001). L'analyse par SAGE (« *Serial Analysis of Gene Expression* ») a démontré que les transcrits de HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC10 sont généralement exprimés dans tous les tissus. Il a été suggéré que l'ARNm de HDAC4, HDAC8 et HDAC9 est exprimé à

des niveaux plus élevés dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux correspondants (Caron *et al.* 2001; de Ruijter *et al.* 2003).

A ce jour, bien que le niveau de connaissance des 18 HDACs humaines augmente régulièrement, leur(s) fonction(s) et substrat(s) spécifiques restent mal connus. L'acétylation et la déacétylation des histones sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, la sénescence et la mort programmée (apoptose) (Kouzarides 1999; Guarente 2000).

La suite de cette introduction évoquera plus en détail chacune des trois classes d'HDACs. Leurs principales caractéristiques sont néanmoins déjà résumées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Résumé des principales caractéristiques des trois classes d'HDACs.

	Classe I	Classe II	Classe III
Gène homologue de la levure	Rpd3	Hda1	Sir2
Contient	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, HDAC11	HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7
Masse moléculaire	De 40 à 70 kDa +/- 350 à 500 AA	100kDa +/- 1000 AA	De 40 à 80kDa +/- 300 à 550AA
Localisation cellulaire	Noyau (sauf HDAC3)	Trafic nucléocytoplasmique	Noyau, cytoplasme et mitochondrie
Substrats	Histones, facteurs de transcription, suppresseurs de tumeurs, protéines anti-apoptotiques	Histones, facteurs de transcription, protéines anti-apoptotiques, tubuline- α	Histones, facteurs de transcription, suppresseurs de tumeurs, protéines anti-apoptotiques, tubuline- α
Activité de déacétylation	Inhibée par la TSA	Inhibée par la TSA	Non inhibée par la TSA ; dépendante du NAD ⁺

1.3.2.1. Les HDACs de classe I

Comme indiqué dans le **Tableau 1**, la classe I comprend HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, et HDAC11. Ces enzymes sont homologues de la protéine Rpd3 de la levure. L'activité de ces enzymes est inhibée par la TPX et la TSA. Parmi les membres de la classe I, HDAC1 et HDAC2 sont localisées exclusivement dans le noyau (Emiliani *et al.* 1998) tandis que HDAC3 peut être détectée dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique (Yang *et al.* 2002). Ces enzymes déacétylent les histones, des facteurs de transcription, des suppresseurs de tumeurs et des protéines anti-apoptotiques (Adcock 2006). Les HDACs de

classe I ont approximativement 350-500 acides aminés (40 à 70 kDa) et l'expression de leur transcrit est considérée comme ubiquitaire (Emiliani *et al.* 1998).

Etant donné que nos travaux se sont attachés plus particulièrement à l'étude de HDAC8, nous détaillerons ici cette enzyme.

1.3.2.1.1. La déacétylase d'histones HDAC8

La huitième déacétylase d'histones humaine a été identifiée en 2000 par trois groupes indépendants (Buggy *et al.* 2000; Hu *et al.* 2000; Van den Wyngaert *et al.* 2000). Des recherches dans des bases de données, sur des fragments de séquences présentant un haut degré de similarité avec les 3 premières HDACs (toutes de classe I), ont permis de cloner l'ADN complémentaire (ADNc) de HDAC8 qui devint ainsi la quatrième HDAC de classe I (Buggy *et al.* 2000; Hu *et al.* 2000; Van den Wyngaert *et al.* 2000).

Le gène *HDAC8* est localisé sur le bras long du chromosome X à la position q 13.1. Il est organisé en 11 exons pour une longueur totale de 242.7 kb (Van den Wyngaert *et al.* 2000).

Selon les auteurs, l'ARNm de HDAC8 existerait sous deux formes différentes soit de 2 et 2.4 kb (Hu *et al.* 2000), soit de 2 et 2.2kb (Van den Wyngaert *et al.* 2000), soit de 1.7 et 2.4 kb (Buggy *et al.* 2000). L'hypothèse selon laquelle ces deux formes pourraient être issues d'un épissage alternatif n'a pas été clarifiée à ce jour. Leur abondance relative varie dans les tissus humains normaux et dans les lignées cellulaires cancéreuses (Buggy *et al.* 2000; Hu *et al.* 2000; Van den Wyngaert *et al.* 2000). L'analyse de la séquence du transcrit de 2.4 kb démontre qu'il pourrait coder pour une protéine résultant de la fusion de 22 acides aminés additionnels suivis d'un codon stop après le résidu Gly-234 de HDAC8 (Buggy *et al.* 2000). Cependant, dans la mesure où rien ne prouve que ce transcrit soit réellement traduit en une protéine tronquée, et puisque le raccourcissement de la protéine lui enlèverait de nombreux résidus qui semblent importants pour son activité enzymatique de déacétylase, il n'est pas certain que ce transcrit ait réellement un rôle dans la biologie des cellules (Buggy *et al.* 2000).

Les premières études ont montré que l'ARNm d'HDAC8 est détectable dans la plupart des organes humains. Mais les niveaux d'expression observés sont relativement discordants entre les différentes études. Ainsi, certains auteurs ont détecté par Northern blot une expression de l'ARNm de HDAC8 plus importante dans le cerveau et le pancréas (Hu *et al.* 2000), d'autres dans le cerveau, les reins et la prostate (Van den Wyngaert *et al.* 2000), tandis que la troisième étude combinait l'utilisation de Northern blot et de RT-PCR (Réaction de

polymérisation en chaîne après rétrotranscription) et observait l'expression du transcrit d'HDAC8 la plus forte dans le foie (Buggy *et al.* 2000). Le niveau d'expression de l'ARNm de HDAC8 dans différents tissus serait environ dix fois moindre que celui de HDAC3 (Hu *et al.* 2000).

En dehors des tissus humains normaux, l'expression de l'ARNm d'HDAC8 a été détectée dans plusieurs lignées cancéreuses (Hu *et al.* 2000; Van den Wyngaert *et al.* 2000).

Bien que l'ARNm d'HDAC8 puisse exister sous deux formes différentes, une seule forme protéique a été détectée à ce jour. La protéine HDAC8 comprend 377 acides aminés et sa masse moléculaire prédite est de 45,240 Da (Hu *et al.* 2000). De par sa séquence protéique, HDAC8 est la plus similaire à HDAC3 avec 34% d'identité et 54% de similarité (pour seulement 30% et 31% d'identité avec HDAC1 et HDAC2, respectivement) (Buggy *et al.* 2000).

Les 34 premiers acides aminés d'HDAC8 et ses 30 derniers acides aminés sont très différents de ceux d'HDAC1, HDAC2 et HDAC3 (Van den Wyngaert *et al.* 2000). Mais la caractéristique structurale principale qui distingue HDAC8 des autres HDACs de classe I est l'absence des 50 à 111 acides aminés de la partie C-terminale qui s'étend après le domaine catalytique (Buggy *et al.* 2000; Somoza *et al.* 2004). Ce domaine C-terminal réduit fait de HDAC8 la 2^{ème} HDAC la plus courte, après HDAC11 qui ne compte que 347 acides aminés (de Ruijter *et al.* 2003) (**Figure 6**). Pour les HDACs 1 à 3, le domaine C-terminal sert à recruter des complexes de protéines qui vont moduler l'activité enzymatique et la localisation de ces enzymes (Ayer 1999; Yang *et al.* 2002). De plus, l'activité des trois premières HDACs de classe I est régulée par des modifications post-traductionnelles de ce domaine C-terminal, telles que la phosphorylation (Pflum *et al.* 2001) (Tsai *et al.* 2002) et la sumoylation (David *et al.* 2002). Vu les différences entre HDAC8 et les autres enzymes de classe I, il est probable que HDAC8 n'ait pas besoin de recruter de complexes protéiques pour fonctionner, ou que ce recrutement s'opère par des régions totalement différentes de la protéine (Somoza *et al.* 2004). A ce sujet, les acides aminés 83 à 95 de HDAC8 sont principalement acides et ils n'existent pas chez HDAC1, HDAC2 et HDAC3. Cette région de la protéine pourrait être impliquée dans les interactions avec d'autres protéines (Van den Wyngaert *et al.* 2000).

La conservation de séquence entre HDAC8 et les autres HDACs est bien meilleure en ce qui concerne le domaine catalytique. En effet, tout comme la plupart des HDACs (Finnin *et al.* 1999), HDAC8 présente neuf blocs conservés ainsi que deux résidus histidine adjacents (les histidines 142 et 143) qui sont très importants pour son activité catalytique. En effet,

lorsque ces deux histidines sont mutées en alanine, cela induit la perte de 80% des capacités de déacétylation de HDAC8 (Buggy *et al.* 2000).

HDAC8 ne contient pas de séquence signal hydrophobe, mais présente plusieurs sites de modifications post-traductionnelles : l'asparagine 136 est un site potentiel de N-glycosylation ; la sérine 39 est un site potentiel de phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'AMP-cyclique (PKA) (« *cAMP-dependent protein kinase A* ») ; il y a deux sites potentiels de phosphorylation par la kinase de caséine II (CK2) (sérine 63 et sérine 83) et un segment de résidus basiques (de l'arginine 164 à la lysine 168 : RLRRK) qui pourrait servir de signal de localisation nucléaire (Hu *et al.* 2000).

Bien que les autres membres de la classe I soient phosphorylés par CK2, ce n'est pas le cas de HDAC8 (Tsai *et al.* 2002). HDAC8 est phosphorylée au niveau de la sérine 39 par la PKA, ce qui a pour conséquence de diminuer son activité de déacétylation (Lee *et al.* 2004). La mutation de cette sérine 39 en alanine augmente l'activité de déacétylation d'HDAC8. Par contre la mutation de cette sérine 39 en acide glutamique ou sa phosphorylation par la forskoline diminue l'activité de déacétylation d'HDAC8, ce qui induit une hyperacétylation des histones H3 et H4. Remarquons que cette sérine 39 qui est phosphorylée chez HDAC8 n'est pas conservée parmi les autres HDACs de classe I, ce qui suggère que la phosphorylation de HDAC8 pourrait avoir des conséquences différentes de la phosphorylation des autres HDACs de classe I (Lee *et al.* 2004). En effet, la phosphorylation de HDAC1 et HDAC2 augmente leur activité de déacétylation (Pflum *et al.* 2001; Galasinski *et al.* 2002; Tsai *et al.* 2002), alors que la phosphorylation d'HDAC8 a l'effet inverse (Lee *et al.* 2004). Il a récemment été démontré que HDAC8 phosphorylée se lie spécifiquement à l'orthologue humain de la protéine de levure EST 1B (« *Ever-Shorter Telomeres 1B* ») et le protège ainsi de la dégradation médiée par l'ubiquitination (Lee *et al.* 2006). A ce jour, aucune phosphatase n'a été démontrée être responsable de la déphosphorylation d'HDAC8.

Des expériences de transfection de plasmide contenant l'ADNc (ADN complémentaire) complet de HDAC8 humaine dans différents types cellulaires, suivies d'une analyse en microscopie par fluorescence, ont permis de détecter la protéine dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules (Hu *et al.* 2000; Van den Wyngaert *et al.* 2000).

En ce qui concerne la structure de HDAC8, il a été montré que l'enzyme se replie en un unique domaine α/β (Vannini *et al.* 2004) qui inclut 8 feuillets β parallèles pris en sandwich entre 13 hélices α (**Figure 7**) (Somoza *et al.* 2004).

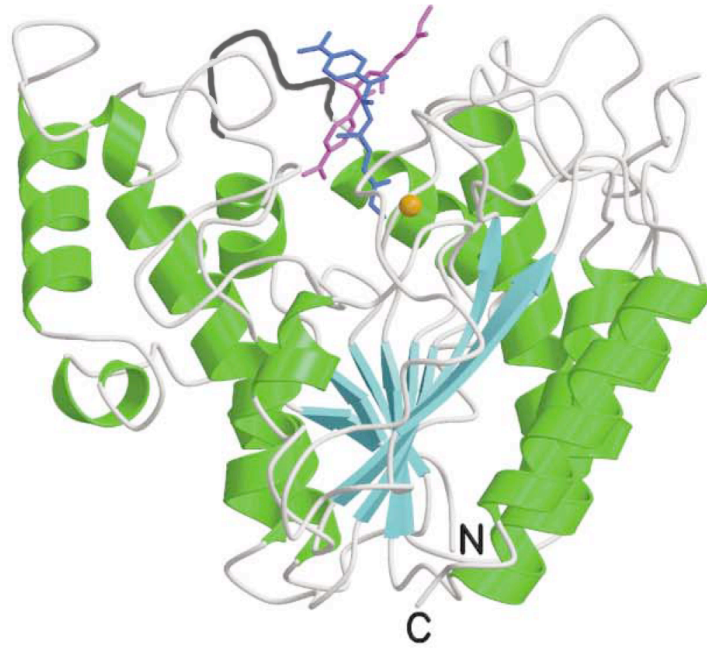


Figure 7 : Structure de HDAC8 contenant la TSA (en bleu et rose) dans sa poche catalytique et l'ion zinc en orange. La boucle L1 qui borde une face de la cavité catalytique est représentée en gris foncé (Modifié à partir de (Somoza *et al.* 2004)).

Une différence de structure importante entre HDAC8 et les autres HDACs de classe I est la taille et la composition de la boucle L1 (**Figure 7**). Cette boucle est localisée en N-terminal (résidus 30 à 36) et délimite une face de la poche catalytique. Pour HDAC8, la boucle L1 peut prendre, en présence de différents inhibiteurs, des configurations structurales très différentes. Cela suggère que son site actif pourrait accepter divers ligands, comme des lysines acétylées présentes dans des environnements protéiques variables. Par comparaison d'alignements de séquences, il semble que les sites actifs des HDACs de 1 à 3 soient nettement moins malléables que celui de HDAC8 (Somoza *et al.* 2004).

Au moment où nous avons initié nos travaux, la fonction d'HDAC8 n'était pas connue et les premières études de co-immunoprécipitation n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre HDAC8 et YY1 (« *Yin Yang 1* »), Sin3a (« *SIN3 homolog A* ») ou RbAp48 (« *Retinoblastoma Associated protein 48* »), trois co-facteurs transcriptionnels capables d'interagir avec les HDACs de classe I (Buggy *et al.* 2000).

En 2003, Durst *et al.* ont démontré que la protéine de fusion résultant de l'inversion (16) s'associe spécifiquement à HDAC8 (Durst *et al.* 2003). Cette inversion (16) est une translocation chromosomique survenant fréquemment dans la leucémie myéloïde aigue. Elle entraîne la fusion des 165 premiers acides aminés du « *Core Binding Factor- β* » (CBF- β) à la région terminale de la chaîne lourde de la myosine musculaire lisse (SMMHC ; « *Smooth*

Muscle Myosin Heavy Chain »). L'interaction de cette protéine de fusion avec HDAC8 se fait via un domaine de la partie C-terminale de la SMMHC. En outre, il avait précédemment été montré que, dans des cellules NIH-3T3 transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc complet correspondant à la protéine de fusion CBF- β -SMMHC, cette protéine de fusion est distribuée en filaments semblables aux fibres de stress dans le cytoplasme et co-localise avec les filaments d'actine (Wijmenga *et al.* 1996). Néanmoins, l'existence d'une association entre HDAC8 et la protéine cytosquelettique SMMHC n'avait pas été examinée.

1.3.2.1.2. Travaux préliminaires réalisés dans le laboratoire

En 2003, notre Laboratoire a cherché à déterminer les profils d'expression de plusieurs membres de la famille des HDACs dans des échantillons de prostatites humaines normales et cancéreuses (Waltregny *et al.* 2004). Il a ainsi été démontré que le niveau d'expression de l'ARNm de HDAC8, étudié par la technique de la RT-PCR en temps réel, est diminué dans les échantillons de tumeurs prostatiques par rapport aux tissus normaux correspondants. Des expériences immunohistochimiques ont ensuite démontré que, dans la prostate humaine, la protéine HDAC8 est principalement exprimée dans le cytoplasme de certaines cellules stromales et dans les cellules musculaires lisses des parois vasculaires. Cette observation originale a été le point de départ de notre travail personnel.

1.3.2.2. Les HDACs de classe II

La classe II contient HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 et HDAC10. Ces enzymes sont homologues à la protéine Hda1 de la levure. Cependant, les homologies entre Hda1 et les HDACs humaines de classe II se limitent aux régions catalytiques. Elles ne s'étendent pas aux domaines N-terminaux (Grozinger *et al.* 1999).

Les HDACs de classe II sont des protéines beaucoup plus grandes que les HDACs de classe I avec environ 1000 acides aminés (>100kDa) ; la distribution de leur ARNm est plus restreinte et elles sont impliquées dans le développement et la différenciation des muscles cardiaques et squelettiques (Bertos *et al.* 2001). Les enzymes de la classe II peuvent entrer et sortir du noyau suite à certains signaux cellulaires (McKinsey *et al.* 2001). Elles sont inhibées par la TPX et la TSA, à l'exception de HDAC6 qui est inhibée uniquement par la TSA (Adcock 2006). Elles déacétylent des histones, des facteurs de transcription, des protéines anti-apoptotiques et la tubuline- α (Adcock 2006).

HDAC4, HDAC5, et HDAC7 fonctionnent en tant que co-répresseurs transcriptionnels qui interagissent avec le facteur de transcription MEF2 (« *Myocyte Enhancer Factor 2* ») et les co-répresseurs N-CoR, BcoR (« *B-cell lymphoma 6 (BCL6) corepressor* »), et CtBP (« *C-terminal Binding Protein* ») (Bertos *et al.* 2001).

Comme les HDACs de classes I, les HDACs de classe II possèdent des domaines de déacétylation bien conservés d'environ 400 acides aminés et leur activité catalytique est dépendante du Zn^{2+} (Somoza *et al.* 2004).

HDAC4, HDAC5 et HDAC6 peuvent toutes les trois déacétyler les histones nucléosomiques *in vitro*. Cependant, puisque HDAC4 et HDAC5 s'associent *in vivo* à HDAC3, il n'est pas démontré que ces enzymes contribuent réellement à l'activité de déacétylation (Grozinger *et al.* 1999). Des études ultérieures ont démontré que les HDACs de classe II régulent la transcription en servant de lien entre le complexe enzymatiquement actif SMRT/N-CoR-HDAC3 et certains facteurs de transcription indépendamment de leur activité HDAC intrinsèque (Fischle *et al.* 2002).

Les HDACs de classe II sont impliquées dans de multiples processus biologiques tels que la myogenèse, la sélection négative des thymocytes, la régulation du Virus Epstein-Barr et la survie neuronale (Verdin *et al.* 2003).

Une des caractéristiques importantes des HDACs de classe II est qu'elles peuvent circuler entre le noyau et le cytoplasme. Cela suggère qu'elles pourraient avoir des fonctions de modulation du niveau d'acétylation de protéines non histoniques en dehors du noyau. Par exemple, le second domaine de déacétylation de HDAC6 est capable de déacétyler la tubuline- α et Hsp90 (Hubbert *et al.* 2002; Matsuyama *et al.* 2002; Haggarty *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003; Kovacs *et al.* 2005). Il a également été décrit que dans les cellules cardiaques, HDAC5 sort du noyau en réponse à l'endothéline-1 d'une manière qui implique l'activation de la CaMKII (« *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* ») nucléaire (Wu *et al.* 2006).

De manière intéressante, l'activité de déacétylation des histones de HDAC4, HDAC5, et probablement HDAC7 est régulée par la localisation cellulaire de ces enzymes, qui est contrôlée par la phosphorylation de celles-ci au niveau de sites spécifiques et par la liaison de protéines 14-3-3. La régulation de ces HDACs est donc directement liée au réseau de signalisation intracellulaire (Bertos *et al.* 2001).

Etant donné que nos travaux se sont en partie focalisés sur HDAC4, nous nous attacherons à décrire cette enzyme plus en détail dans la suite de cette introduction.

1.3.2.2.1. La déacétylase d'histones HDAC4

C'est en cherchant dans des banques de données des séquences similaires à la déacétylase de levure Hda1, qu'en 1999, Grozinger *et al.* ont identifié les ADNc codant pour les trois premières HDACs de la classe II : HDAC4, HDAC5 et HDAC6 (Grozinger *et al.* 1999). La même année, Fishle *et al.* identifièrent une partie de l'ADNc codant pour HDAC4, qu'ils appelèrent HDAC-A (Fischle *et al.* 1999).

Le gène *HDAC4* est localisé à l'extrémité du bras long du chromosome 2, à la position 2q37.2 (Wang *et al.* 1999). Ce gène, long de 352.2 kb, comporte 27 exons. L'étude du promoteur de HDAC4 a montré que son activité est augmentée par la TSA mais réprimée par la mithramycine (un agent qui se lie aux séquences riches en GC). De plus, l'expression d'HDAC4 est modulée par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (« *Specificity Protein 1* » et « *Specificity Protein 3* ») qui contribuent à la distribution de son expression dépendante d'un tissu à l'autre ou d'une lignée cellulaire à l'autre (Liu *et al.* 2006).

Des analyses par Northern blot ont permis à Grozinger *et al.* de détecter un transcrit HDAC4 de 9.6 kb dont l'expression semblait restreinte au cerveau, au cœur et au muscle squelettique (Grozinger *et al.* 1999), tandis que Fishle *et al.* détectaient un transcrit de 8.4 kb présent dans tous les tissus testés, avec un niveau d'expression le plus élevé dans le muscle squelettique (Fischle *et al.* 1999). A notre connaissance, il n'existe pas d'épissage alternatif décrit pour le transcrit d'HDAC4, et l'origine de cette différence de taille observée pour le transcrit HDAC4 n'a pas été expliquée.

La protéine HDAC4, en immunoblot, a une masse moléculaire apparente de 119 kDa (Grozinger *et al.* 1999). L'analyse de sa séquence nucléotidique permet de prédire que HDAC4 contient 1085 acides aminés, et que sa région catalytique commence au résidu 802 (Grozinger *et al.* 1999). HDAC4 présente 63% de similarité à HDAC5 (Grozinger *et al.* 1999) (**Figure 5**) : toutes deux ont leur domaine catalytique dans la partie C-terminale (**Figure 6**) et leur signal de localisation nucléaire dans la partie N-terminale. Les deux histidines 802 et 803 seraient indispensables à l'activité de déacétylation de HDAC4 (Wang *et al.* 1999). Bien que les 100 premiers acides aminés de HDAC4 ne soient pas requis pour l'activité HDAC *in vitro* (**Figure 6**), cette région pourrait contribuer à des interactions protéine-protéine ou enzyme-substrat (Grozinger *et al.* 1999).

HDAC4 interagit avec de nombreuses protéines. Elle co-immunoprécipite entre autres avec HDAC3 (Grozinger *et al.* 1999), RbAp48 (« *Retinoblastoma Associated protein 48* ») (Grozinger *et al.* 1999), les protéines 14-3-3 (Grozinger *et al.* 2000), ARR19 (« *Androgen*

Receptor coRepressor-19 kDa) (Jeong *et al.* 2004), PLZF (« *Promyelocytic Leukaemia Zinc-Finger protein* ») (Chauchereau *et al.* 2004), p65 (Kumar *et al.* 2005), p53 (Basile *et al.* 2006), GATA3 (« *GATA-binding protein 3* ») et YY1 (« *Yin Yang 1* ») (Han *et al.* 2006). HDAC4 interagit avec la famille des facteurs de transcription MEF2 et avec le SRF (« *Serum Response Factor* ») grâce à sa région N-terminale (Miska *et al.* 1999; Youn *et al.* 2000; Davis *et al.* 2003). De plus, sa région N-terminale est aussi impliquée dans la liaison avec deux répresseurs transcriptionnels : CtBP (« *C-terminal Binding Protein* ») et BCL6 (« *B-cell lymphoma 6* ») (Zhang *et al.* 2001; Lemercier *et al.* 2002; Verdin *et al.* 2003). Par sa région C-terminale, domaine HDAC compris, HDAC4 interagit avec deux co-répresseurs : SMRT et N-CoR (Huang *et al.* 2000). HDAC4 s'associe également avec HP1 (« *Heterochromatin Protein 1* »), une protéine adaptatrice qui reconnaît les lysines méthylées dans les queues histoniques et qui participe à la répression transcriptionnelle en recrutant des méthyltransférases d'histones (Zhang *et al.* 2002), ainsi qu'avec la protéine p53BP1 (« *p53-Binding Protein 1* ») lors de cassures double brin de l'ADN (Kao *et al.* 2003). De plus, les résidus 118 à 326 de HDAC4 permettent sa dimérisation *in vitro* (Wang *et al.* 2001).

Grozinger *et al.* ont décrit que HDAC4-FLAG, immunoprécipitée à partir de cellules Jurkat, est capable de déacétyler, *in vitro*, des histones nucléosomiques radio-marqués (Grozinger *et al.* 1999). Cependant, selon Fischle *et al.*, HDAC4 est inactive sur le plan enzymatique (Fischle *et al.* 2002). Une activité HDAC ne serait détectée que quand le domaine catalytique de HDAC4 interagit avec HDAC3 via le co-répresseur transcriptionnel N-CoR. Toutes les conditions expérimentales menant à la suppression de la liaison de HDAC4 à N-CoR2 et à HDAC3 ont pour conséquence la perte de l'activité enzymatique associée à HDAC4. Ces observations suggèrent que HDAC4 régule la transcription en reliant le complexe N-CoR2-HDAC3 à certains facteurs de transcription (Fischle *et al.* 1999).

La protéine HDAC4 a été détectée par immunohistochimie dans les cellules germinales spermatogéniques, ainsi que dans les cellules glandulaires de la prostate, et dans de nombreux autres tissus tels que le muscle cardiaque, le sein, le pancréas et les ovaires (Liu *et al.* 2006). Elle est présente à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme des neurones pyramidaux du cortex cérébral (Liu *et al.* 2006).

La protéine HDAC4 possède un signal de localisation nucléaire qui s'étend des résidus 244 à 279. Mais les 118 résidus N-terminaux de HDAC4 modulent également sa localisation nucléaire (Wang *et al.* 2001). Inversement, un domaine hydrophobe (MXXLXVXV) localisé dans le domaine C-terminal de HDAC4 lui sert de signal d'exportation nucléaire et est

nécessaire à sa rétention cytoplasmique (CRS ; « *Cytoplasmic Retention Signal* »). Ce motif est requis pour l'exportation de HDAC4 hors du noyau par un mécanisme dépendant du récepteur d'exportation nucléaire CRM1 (« *Chromosome Region Maintenance 1* ») (Wang *et al.* 2001). Comme d'autres HDACs de classe II, HDAC4 voyage entre le noyau et le cytoplasme d'une manière bien contrôlée. Sa phosphorylation lui permet d'interagir avec des protéines 14-3-3 ce qui favorise sa localisation cytoplasmique à la fois en inhibant son import nucléaire et en stimulant son export nucléaire (Grozinger *et al.* 2000; McKinsey *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000; Miska *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001; Zhao *et al.* 2001).

Le trafic nucléocytoplasmique de HDAC4 est impliqué dans de multiples phénomènes physiologiques (**Figure 8**) incluant la contraction des muscles striés (Liu *et al.* 2005; Shen *et al.* 2006) et la myogenèse. En effet, au cours de la myogenèse, HDAC4 est cytoplasmique, mais elle réintègre le noyau après que la fusion des myoblastes en un myotube plurinucléé a eu lieu (Miska *et al.* 2001). Une entrée inappropriée d'HDAC4 dans le noyau (par exemple suite à sa sur-expression) supprime le programme myogénique ainsi que la transcription dépendante de la famille des facteurs de transcription MEF2 (Miska *et al.* 2001). Ces facteurs de transcription MEF2 régulent la transcription de gènes musculaires spécifiques dans les muscles squelettique, cardiaque et lisse (Ellis *et al.* 2003). Dans le noyau, HDAC4 s'associe à MEF2A par l'intermédiaire d'une petite région localisée dans son domaine N-terminal (Wang *et al.* 1999). Cela induit la répression de l'activation transcriptionnelle de MEF2A par un mécanisme qui requiert le domaine de déacétylation de HDAC4 (Miska *et al.* 1999). Le fait que MEF2A ne puisse plus jouer son rôle de facteur de transcription bloque donc la différenciation des cellules musculaires. Cette observation identifie MEF2A comme une cible nucléaire de la répression médiée par HDAC4 (Miska *et al.* 1999). A l'opposé, l'activation de la voie de signalisation Ca^{2+} /calmoduline via une CaMKIV (« *Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase IV* ») constitutivement active empêche l'entrée d'HDAC4 dans le noyau et l'inhibition de la différenciation médiée par HDAC4 (Miska *et al.* 2001). Dans le cytoplasme, HDAC4 se lie aux protéines 14-3-3 d'une manière dépendante de la phosphorylation (Miska *et al.* 2001). MEF2 est ainsi libre d'induire la transcription (Ellis *et al.* 2003). Collectivement, ces données ont indiqué que la compartimentalisation est un mécanisme de contrôle de l'activité nucléaire des HDACs (Miska *et al.* 1999), et que HDAC4 joue un rôle important dans la différenciation musculaire (Miska *et al.* 2001).

Récemment, HDAC5 a aussi été impliquée dans la différenciation musculaire. Cependant, en dépit des similitudes entre HDAC4 et HDAC5, leurs localisations intracellulaires sont

opposées (HDAC5 passe du noyau au cytoplasme lorsque les myoblastes se différencient (McKinsey *et al.* 2000)), ce qui suggère des rôles distincts pour ces deux HDACs durant la différenciation musculaire (Miska *et al.* 2001).

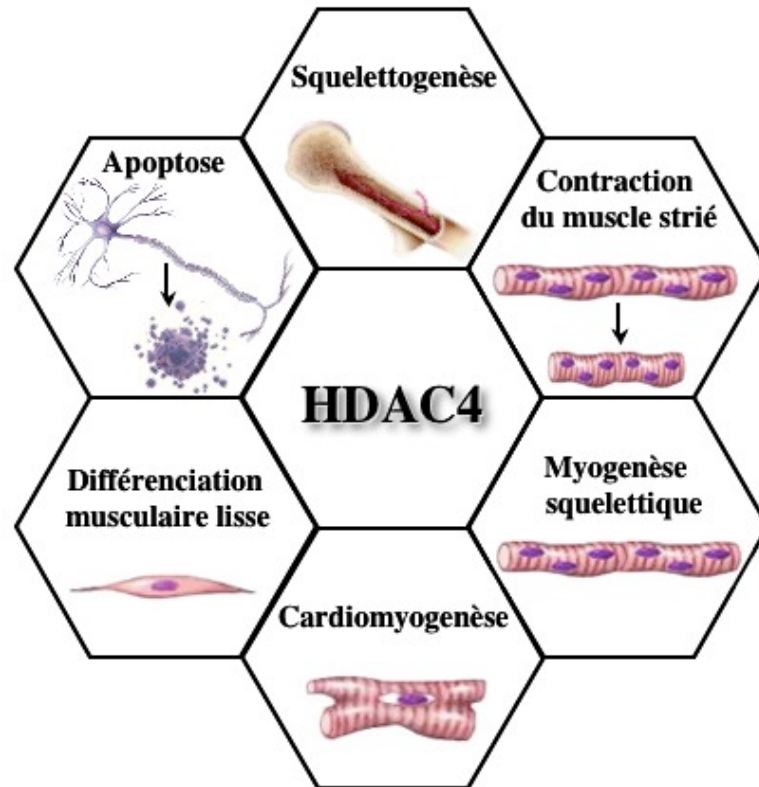


Figure 8 : Les fonctions connues et présumées d'HDAC4 sont reliées à différents processus physiologiques incluant la différenciation musculaire, l'ossification, et l'apoptose.

Le rôle d'HDAC4 ne se limite pas à la différenciation musculaire squelettique. Ainsi, la sur-expression de HDAC4 inhibe l'expression de gènes du muscle cardiaque et donc la cardiomyogenèse tandis que le traitement de cellules mésodermiques par la TSA induit leur entrée dans la lignée musculaire cardiaque ainsi que l'expression de gènes spécifiques tels que MEF2C, GATA4 (« *GATA-binding protein 4* ») et l'actine- α cardiaque (Karamboulas *et al.* 2006). La CaMKII se lie spécifiquement à HDAC4 en utilisant un site qui est absent dans les autres HDACs de classe II. La phosphorylation d'HDAC4 par la CaMKII induit son export nucléaire et empêche son import nucléaire, ce qui a pour conséquence de lever la répression des gènes cibles de HDAC4. Dans les cardiomyocytes, la phosphorylation d'HDAC4 par la CaMKII cause une croissance hypertrophique (Backs *et al.* 2006). Et il a été décrit que la CaMKII δ B (« *delta B isoform of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* »), connue pour favoriser l'hypertrophie cardiaque, transmet son signal spécifiquement à HDAC4 et à aucune autre HDAC de classe II (Little *et al.* 2007).

Tandis que l'implication des HDACs de classe II, et en particulier de HDAC4, dans la différenciation des muscles striés a été démontrée, peu de choses sont connues quant à une éventuelle implication des HDACs de classe I ou de classe II dans la différenciation musculaire lisse. Dans le muscle lisse, la CaMKII δ C (« *delta C isoform of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* ») éteint l'expression de gènes dépendant de MEF2 par la phosphorylation de 14-3-3 β , ce qui permet à HDAC4 de retourner dans le noyau pour reformer un complexe avec MEF2 et ainsi d'empêcher l'induction de gènes spécifiques du phénotype musculaire lisse dont le promoteur contient une boîte CarG (CC(A/T)6GG), tel que le gène de l' α -SMA (Ellis *et al.* 2003).

HDAC4 semble donc jouer un rôle dans les deux types de différenciation musculaire : striée et lisse. De plus, il existe un troisième type de différenciation mésenchymateuse dans laquelle elle est impliquée : l'ossification endochondrale. En effet, Vega *et al.* ont démontré que HDAC4, qui est exprimée dans les chondrocytes préhypertrophiques, régule l'hypertrophie des chondrocytes et la formation des os endochondraux (c.-à-d. les os formés à partir d'une ébauche cartilagineuse) en interagissant avec Runx2 (« *RUNT-related transcription factor 2* ») via son domaine Runt et en inhibant sa fonction de transactivation (Vega *et al.* 2004). Les souris déplétées en HDAC4 (HDAC4^{-/-}) souffrent d'une ossification prématurée des os en cours de développement : l'hypertrophie des chondrocytes commence trop tôt, ce qui donne un phénotype similaire à celui résultant de l'expression constitutive de Runx2 dans les chondrocytes. Inversement, la sur-expression d'HDAC4 *in vivo* dans les chondrocytes prolifératifs inhibe l'hypertrophie et la différenciation des chondrocytes, de la même manière que la perte d'expression de Runx2 (Vega *et al.* 2004). Plus récemment, il a aussi été montré que HDAC4 est capable de déacétyler directement Runx2, rendant ainsi possible son ubiquitination et sa dégradation médiée par Smurf1 (« *SMAD Ubiquitination Regulatory Factor 1* »), tandis que son acétylation par p300 le protège de la dégradation (Jeon *et al.* 2006). Ces résultats démontrent le rôle central que HDAC4 joue dans la régulation de l'hypertrophie des chondrocytes et la squelettogénèse. Notons enfin que l'ossification endochondrale est extrêmement sensible à l'équilibre entre MEF2C et son co-répresseur HDAC4, de sorte qu'une mutation d'HDAC4 peut pallier la déficience osseuse observée chez les souris mutantes MEF2C et que l'ossification ectopique observée chez les souris HDAC4^{-/-} peut être diminuée par une mutation hétérozygote de MEF2C (Arnold *et al.* 2007). Ces observations révèlent ainsi l'existence de points communs dans les mécanismes qui

gouvernent le développement des os, des muscles et du système cardiovasculaire, en ce qui concerne leur régulation par MEF2 et les HDACs de classe II (Arnold *et al.* 2007).

A notre connaissance, il n'existe pas d'isoforme de la protéine HDAC4 décrite à ce jour. Par contre, il a été montré qu'HDAC4 est particulièrement instable avec une demi-vie de la protéine de moins de 8h et une demi-vie du transcrit de moins de 4h (Liu *et al.* 2004). La dégradation de HDAC4 est accélérée par l'irradiation aux ultraviolets et n'est pas dépendante du protéasome mais des caspases telles que la caspase 2 (Paroni *et al.* 2004) et la caspase 3 (Liu *et al.* 2004). HDAC4 est clivée à un site (Asp-289) qui n'est pas conservé chez d'autres membres des HDACs de classe II (Liu *et al.* 2004). L'expression, dans des cellules HeLa, d'une HDAC4 mutée, qui ne peut être clivée, est associée à une diminution de l'apoptose en comparaison avec les cellules exprimant HDAC4 non mutée et clivable (Liu *et al.* 2004). Lors de son clivage au résidu 289, HDAC4 se sépare en un fragment C-terminal localisé dans le cytoplasme et un fragment N-terminal qui s'accumule dans le noyau (Paroni *et al.* 2004). Dans le noyau, le fragment d'HDAC4 généré par les caspases est capable de générer le relargage du cytochrome C hors des mitochondries et la mort cellulaire d'une manière dépendante de la caspase 9 (Paroni *et al.* 2004). Le fragment N-terminal de HDAC4 réprime fortement le facteur de transcription MEF2C d'une manière indépendante du domaine HDAC (Paroni *et al.* 2004).

Le trafic nucléocytoplasmique de HDAC4 serait aussi important dans la régulation de la mort cellulaire neuronale (Bolger *et al.* 2005). HDAC4 est normalement localisée dans le cytoplasme des neurones CGNs (« *Cerebellar Granule Neurons* ») cultivés. Cependant, en réponse à des stimuli qui induisent la mort cellulaire des neurones, HDAC4 est rapidement relocalisée dans le noyau des CGNs cultivés. Un traitement avec le facteur de survie neuronal BDNF (« *Brain-Derived Neurotrophic Factor* ») supprime la translocation nucléaire de HDAC4, tandis qu'un inhibiteur de la CaMK pro-apoptotique stimule l'accumulation de HDAC4 dans le noyau. De plus, l'inactivation de HDAC4 par des siRNAs (« *Small interfering RNA* » ; petits ARN interférants) supprime la mort cellulaire des neurones. Enfin, on observe également une augmentation de HDAC4 nucléaire dans les CGNs chez les souris qui présentent une mutation favorisant l'apoptose de ces mêmes CGNs. Ces observations ont suggéré que des inhibiteurs spécifiques d'HDAC4 pourraient être utiles dans différentes maladies associées à la mort neuronale (Bolger *et al.* 2005).

1.3.2.3. Les HDACs de classe III

La classe III contient sept sirtuines (SIRT1 à SIRT7). Ces enzymes sont homologues de la protéine Sir2 (« *Silent information regulator 2* ») de la levure (Blander *et al.* 2004). Leur localisation intracellulaire est variable (noyau, cytoplasme, mitochondrie) (Adcock 2006) et certaines d'entre elles, comme SIRT1, peuvent voyager entre le noyau et le cytoplasme (Tanno *et al.* 2007). Comme mentionné ci-dessus, leur activité de déacétylation n'est pas dépendante du Zn^{2+} , comme pour les HDACs de classe I et II, mais du NAD^+ (Imai *et al.* 2000; Imai *et al.* 2000; Marmorstein 2004).

De plus, le rôle des sirtuines ne se limite pas à la déacétylation : il a également été décrit que SIRT4 et SIRT6 peuvent participer à l'ADP ribosylation de multiples protéines (Frye 1999; Saunders *et al.* 2007). Cette modification post-traductionnelle participe à la régulation de l'activité d'enzymes telles que la glutamate déshydrogénase (Haigis *et al.* 2006).

L'étude d'organismes unicellulaires et multicellulaires indique que les sirtuines ont évolué afin de transmettre le signal initié par des conditions de stress dans le but de générer une adaptation et d'augmenter la survie de l'organisme (Guarente *et al.* 2005). Un plus grand nombre de copies des gènes de la famille des sirtuines augmente la survie d'organismes tels que les levures (Lin *et al.* 2000), les mouches (Rogina *et al.* 2004) et les vers, ce qui étaye cette thèse. De plus, les sirtuines médient dans ces organismes les effets d'un régime pauvre en calories sur la longévité (Kaeberlein *et al.* 1999; Tissenbaum *et al.* 2001; Wood *et al.* 2004; Wang *et al.* 2006).

Les substrats des sirtuines sont multiples. Ils incluent les histones, des facteurs de transcription, des suppresseurs de tumeurs, des protéines anti-apoptotiques et la tubuline- α (Adcock 2006). Ainsi, par exemple, les substrats de SIRT1 sont impliqués dans la régulation de l'apoptose (Jin *et al.* 2007) et de la survie cellulaire (Chong *et al.* 2005), dans la signalisation endocrine (Yang *et al.* 2006), la différenciation (Backesjo *et al.* 2006), le remodelage de la chromatine et la transcription. SIRT1 formerait un lien moléculaire entre la disponibilité des nutriments et les réponses transcriptionnelles adaptatives (Anastasiou *et al.* 2006).

Les sirtuines peuvent moduler la durée de vie des vers et des mouches, c'est pourquoi elles pourraient se révéler des cibles intéressantes pour traiter les maladies associées au vieillissement (Michan *et al.* 2007; Yamamoto *et al.* 2007) comme par exemple certaines maladies neuro-dégénératives (Tang *et al.* 2007).

1.4. La déacétylation de protéines non histoniques

Comme leur nom l'indique, les HDACs catalysent la réaction qui enlève un groupement acétyl des queues amino-terminales des histones. Cette réaction reconstitue la charge positive sur les résidus lysine, ce qui diminue l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription (Strahl *et al.* 2000; Gray *et al.* 2001).

Les HDACs forment une famille d'enzymes identifiées à l'origine en tant que régulateurs du niveau d'acétylation des histones nucléosomiques, et jouant donc un rôle clef dans le contrôle de la transcription des gènes (Megee *et al.* 1990; Grunstein 1997). La plupart des HDACs peuvent en effet fonctionner comme co-répresseurs de la transcription et sont souvent présentes dans de grands complexes faits de plusieurs sous-unités, comme le complexe Sin3-HDAC et le complexe Mi-2/NuRD-HDAC (Alland *et al.* 1997; Khochbin *et al.* 1997; Nagy *et al.* 1997; Johnson *et al.* 1999; Knoepfler *et al.* 1999; Koipally *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1999). Cependant, l'hypothèse selon laquelle l'activité HDAC aurait pour seule conséquence de diminuer la transcription génique est largement dépassée depuis que plusieurs études ont montré qu'il y a autant de gènes qui sont induits que de gènes dont l'expression est réduite suite à l'utilisation d'inhibiteurs d'HDACs (Nair *et al.* 2001; Tong *et al.* 2004).

De manière intéressante, les résultats d'une étude phylogénétique des HDACs « parentales » bactériennes ont indiqué que les HDACs existaient sans doute déjà avant l'apparition des protéines histoniques. Cette observation suggère que le substrat originel des HDACs pourrait être des protéines non histoniques (Gregorette *et al.* 2004). Corroborant cette hypothèse, de nombreuses études ont démontré qu'en dépit de leur nom, les déacétylases d'histones peuvent déacétyler des substrats autres que les histones.

Aujourd'hui, il est clairement établi que les HDACs sont capables de déacétyler de nombreuses protéines non histoniques. C'est pourquoi elles devraient plutôt être appelées des « déacétylases de lysines » (Xu *et al.* 2007). Le tableau suivant présente quelques-uns des substrats décrits pour les HDACs, mais cette liste est loin d'être exhaustive et de nombreux autres substrats non histoniques des HDACs restent probablement à découvrir.

Tableau 2 : Quelques exemples de substrats non-histoniques des HDACs

HDAC	Substrat	Fonction intracellulaire	Références
HDAC3, SIRT1	NFκB	Facteur de transcription	(Chen <i>et al.</i> 2004; Greene <i>et al.</i> 2004; Quivy <i>et al.</i> 2004; Yeung <i>et al.</i> 2004; Chen <i>et al.</i> 2005)
SIRT1	FOXO1 (« <i>Forkhead box O1</i> »)	Facteur de transcription	(Motta <i>et al.</i> 2004; Yang <i>et al.</i> 2005)
SIRT1	FOXO3 (« <i>Forkhead box O3</i> »)	Facteur de transcription	(Brunet <i>et al.</i> 2004; Giannakou <i>et al.</i> 2004)
SIRT1	FOXO4 (« <i>Forkhead box O4</i> »)	Facteur de transcription	(van der Horst <i>et al.</i> 2004; Kobayashi <i>et al.</i> 2005)
HDAC1, HDAC3, HDAC6	Smad7	Facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation du TGFβ	(Simonsson <i>et al.</i> 2005)
HDAC1, HDAC2, HDAC3	STAT3	Facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation des cytokines	(O'Shea <i>et al.</i> 2005; Yuan <i>et al.</i> 2005)
HDAC1, HDAC2, HDAC3	YY1 « <i>Yin yang 1</i> »	Facteur de transcription	(Yang <i>et al.</i> 1996; Yang <i>et al.</i> 1997; Yao <i>et al.</i> 2001)
HDAC5	GATA1 (« <i>GATA-binding protein 1</i> »)	Facteur de transcription	(Watanamoto <i>et al.</i> 2003)
SIRT1, HDACs sensibles à la TSA	Ku70	Anti-apoptose	(Cohen <i>et al.</i> 2004; Cohen <i>et al.</i> 2004; Subramanian <i>et al.</i> 2005)
HDAC1, SIRT1	p53	Suppresseur de tumeur	(Juan <i>et al.</i> 2000; Luo <i>et al.</i> 2000; Luo <i>et al.</i> 2001; Vaziri <i>et al.</i> 2001; Ito <i>et al.</i> 2002; Langley <i>et al.</i> 2002; Cheng <i>et al.</i> 2003; Gu <i>et al.</i> 2004; Kim <i>et al.</i> 2004; Solomon <i>et al.</i> 2006)
SIRT1	p300	Co-activateur transcriptionnel	(Bouras <i>et al.</i> 2005)
HDAC1	Récepteur androgènes	aux Récepteur hormonal	(Gaughan <i>et al.</i> 2002; Fu <i>et al.</i> 2003; Gaughan <i>et al.</i> 2005)
HDAC2	Récepteur glucocorticoïdes	aux Récepteur hormonal	(Ito <i>et al.</i> 2006)
HDAC6, SIRT2	Tubuline-α	Composant des microtubules	(Hubbert <i>et al.</i> 2002; Matsuyama <i>et al.</i> 2002; North <i>et al.</i> 2003; Zhang <i>et al.</i> 2003)
HDAC6	Hsp90	Protéine chaperonne	(Atadja <i>et al.</i> 2004; Kovacs <i>et al.</i> 2005)
HDAC3	SRY	Facteur de transcription encodé par le chromosome Y	(Thevenet <i>et al.</i> 2004)

L'acétylation de résidus lysine de protéines non histoniques peut être complétée par d'autres modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination, la sumoylation et la phosphorylation (Li *et al.* 2002; Cui *et al.* 2004; Kaiser *et al.* 2004; Simonsson *et al.* 2005). L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles peuvent influencer leur stabilité, leur localisation, leur capacité de dimérisation ou d'interaction avec d'autres protéines (Wang *et al.* 2001; Gronroos *et al.* 2002; Bali *et al.* 2004; Levy *et al.* 2004; Caron *et al.* 2005; Kovacs *et al.* 2005). Il est intéressant de remarquer que tandis que les processus d'acétylation de nombreuses protéines ont été décrits, les déacétylases spécifiques qui régulent le phénomène

inverse n'ont pas été identifiées (Munshi *et al.* 1998; Martinez-Balbas *et al.* 2000; Wolf *et al.* 2002; Cui *et al.* 2004; Levy *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005).

La multiplicité des substrats des HDACs s'accompagne d'une diversité de leur localisation cellulaire et de leur fonction, que nous allons évoquer ci-dessous.

1.4.1. Dans le noyau

De nombreuses observations ont indiqué que certaines HDACs peuvent déacétyler des protéines nucléaires non histoniques, telles que le suppresseur de tumeurs p53 (Luo *et al.* 2000; Luo *et al.* 2001; Vaziri *et al.* 2001; Avalos *et al.* 2002; Langley *et al.* 2002; Smith 2002; Zeng *et al.* 2003), ce qui régule leur activité.

En 2000, il a été démontré que le suppresseur de tumeurs p53 interagit avec HDAC1 tant *in vitro* qu'*in vivo* (Juan *et al.* 2000), et que HDAC1 est responsable de la déacétylation de p53 (Luo *et al.* 2000). Il a été suggéré que l'une des fonctions majeures de l'acétylation de p53 est probablement de le stabiliser, tandis que sa déacétylation par le complexe MTA2 (« *Metastasis-Associated Protein 2* ») recrutant HDAC1 induirait sa dégradation (Ito *et al.* 2002). En effet, des inhibiteurs d'HDACs stabilisent p53 (Roy *et al.* 2005). Cependant la localisation précise du site d'acétylation de p53 pourrait influencer les conséquences fonctionnelles. Ainsi, il semble que l'acétylation de p53 à la lysine 373 soit nécessaire pour l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, tandis que l'acétylation de p53 à la lysine 382 induirait uniquement l'arrêt du cycle cellulaire (Roy *et al.* 2005). D'autres travaux ont aussi montré que Sir2alpha, une HDAC dépendante du NAD⁺, interagit physiquement avec p53 et atténue son activité transcriptionnelle en le déacétylant (Luo *et al.* 2001).

Outre p53, les HDACs sont aussi capables de déacétyler d'autres protéines nucléaires non histoniques comme le récepteur aux androgènes (Gaughan *et al.* 2002; Fu *et al.* 2003; Gaughan *et al.* 2005) et le récepteur aux œstrogènes (Mao *et al.* 2000; Kawai *et al.* 2003) entre autres.

1.4.2. Dans le cytoplasme

Certaines HDACs ont non seulement des substrats non histoniques mais aussi une localisation principalement cytoplasmique, comme HDAC6 et SIRT2 qui sont responsables

de la déacétylation de la tubuline- α (Hubbert *et al.* 2002; Haggarty *et al.* 2003; North *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003) et déstabilisent ainsi les microtubules (Matsuyama *et al.* 2002).

La sur-expression de HDAC6 favorise les mouvements chémotactiques. Cela laisse penser que la déacétylation de la tubuline- α par HDAC6 régule la motricité cellulaire dépendante des microtubules (Hubbert *et al.* 2002). En déacétylant la tubuline, HDAC6 module également l'adhésion cellulaire (Tran *et al.* 2007). De plus, l'expression d'HDAC6 semble être corrélée à l'agressivité des carcinomes squameux (Sakuma *et al.* 2006).

1.4.3. Dans les mitochondries

Ces dernières années, une nouvelle localisation cellulaire a été identifiée, où aucune HDAC n'avait été détectée précédemment. Il a en effet été démontré que SIRT3, une des homologues humaines de SIR2, est transportée du noyau vers les mitochondries suite à une exposition aux ultraviolets (Scher *et al.* 2007). Ce n'est que dans la matrice mitochondriale qu'elle fait l'objet d'une protéolyse, ce qui lui permet d'acquérir son activité enzymatique (Onyango *et al.* 2002; Schwer *et al.* 2002). Cette observation a bien entendu immédiatement suggéré que cette sirtuine puisse déacétyler un substrat non histonique localisé dans cette organelle (Onyango *et al.* 2002; Schwer *et al.* 2002). Très récemment, il a été décrit que SIRT3 contrôle l'activité de l'acétyl-coA synthétase 2 (AceCS2) humaine par le biais de la déacétylation de la lysine 642 conservée dans le site actif de cette enzyme (Schwer *et al.* 2006).

1.4.4. A la membrane cytoplasmique

L'an dernier, une autre nouvelle localisation cellulaire a été décrite pour HDAC3 : la membrane plasmique, où elle forme un complexe avec l'oncogène c-Src qui la phosphoryle (Longworth *et al.* 2006).

Parmi les HDACs de classe I, seule HDAC3 a été décrite comme ayant la capacité de voyager entre le noyau et le cytoplasme. Cette protéine contient un signal d'export nucléaire dans sa portion centrale tandis que sa portion C-terminale contribue à sa localisation nucléaire (Yang *et al.* 2002). Ces deux localisations sont associées à des fonctions différentes puisque la translocation nucléaire de HDAC3 est responsable de l'inhibition de PPARgamma (« *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* ») par le TNF- α (« *Tumor Necrosis*

Factor- α ») (Gao *et al.* 2006) et la relocalisation cytoplasmique de HDAC3 est importante durant l'apoptose (Escaffit *et al.* 2007).

En conclusion, bien que la fonction précise de chacune des HDACs soit encore mal connue, de nombreuses études indiquent que leur spectre d'activités s'étend bien au-delà de la simple déacétylation des histones. L'identification d'un nombre croissant de substrats dans des localisations multiples indique que les HDACs participent à la régulation de phénomènes aussi importants que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la sénescence cellulaire. C'est pourquoi les inhibiteurs d'HDACs ont rapidement été désignés en tant que drogues anti-cancéreuses potentielles (Johnstone 2002; Somech *et al.* 2004; Garcia-Manero *et al.* 2005; Bolden *et al.* 2006).

1.5. HDACs et cancer

Il apparaît de plus en plus clairement qu'une mauvaise régulation des processus épigénétiques cause la répression transcriptionnelle de certains gènes et que cela soit la source de plusieurs pathologies humaines (Lin *et al.* 2006). Ces dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des relations entre aberrations épigénétiques et tumorigenèse. Cela a conduit à étudier l'effet clinique (en phases I et II) des inhibiteurs d'HDACs (Marks *et al.* 2003; Miller *et al.* 2003; Egger *et al.* 2004; Marks *et al.* 2004; Mei *et al.* 2004; Bhalla 2005; Drummond *et al.* 2005) (et dans une moins grande mesure les effets des inhibiteurs de méthyltransférases d'ADN (Das *et al.* 2004)) sur les tumeurs solides et hématologiques.

Il a été démontré que la TSA, ainsi que d'autres inhibiteurs d'HDACs comme le butyrate de sodium, présentent une large gamme d'effets sur les cellules en culture et dans des modèles animaux. Ces effets incluent l'activation spécifique de l'expression de certains gènes (Wolffe 1996; Hassig *et al.* 1997; Kuo *et al.* 1998), la régulation du cycle cellulaire (Kouzarides 1999), ainsi que l'induction de la différenciation (Yoshida *et al.* 1995; Minucci *et al.* 1997; Lin *et al.* 1998). Par ailleurs, plusieurs inhibiteurs d'HDACs, comme le MS-27-275 (Saito *et al.* 1999), le FR901228 (Nakajima *et al.* 1998) et le CRA-024781 (Buggy *et al.* 2006), présentent une activité suppressive de tumeurs *in vivo*. La TSA compte parmi les inhibiteurs d'HDACs les plus étudiés : elle présente une activité supprimeur de tumeur dans le cancer du

sein (Vigushin *et al.* 2001), induit l'apoptose des cellules du cancer du poumon (Kim *et al.* 2006), dans des lignées cellulaires de cancer de prostate (Taghiyev *et al.* 2006), dans des lignées de gliome (Wetzel *et al.* 2005), dans deux lignées cellulaires de tumeur neuroendocrine gastro-intestinale (Baradari *et al.* 2006), dans des cellules de carcinome rénal (Touma *et al.* 2005), dans plusieurs lignées cellulaires de mélanome (Peltonen *et al.* 2005), et dans des cellules de carcinome de côlon (Chen *et al.* 2002). Et cette liste n'est pas exhaustive. De plus, les inhibiteurs d'HDACs modifient la différenciation des cellules circulantes leucémiques (Puccetti *et al.* 2005), ou érythroïdes (Fujieda *et al.* 2005).

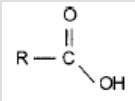
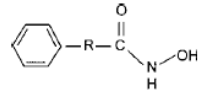
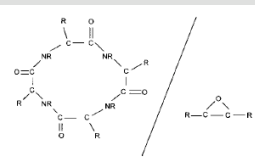
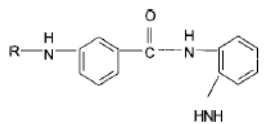
Cependant le mécanisme exact par lequel les inhibiteurs d'HDACs exercent leurs effets anti-prolifératifs reste nébuleux (Lin *et al.* 2006). Au moins deux mécanismes différents ont été étudiés. D'une part, les HDACs peuvent être recrutées de manière aberrante, ce qui entraîne la répression de la transcription et favorise donc la genèse d'un cancer (Peixoto *et al.* 2006). C'est ce qu'on observe dans le cas de la leucémie aiguë myélocytaire, la protéine de fusion AML1-ETO (« *Acute Myeloid Leukemia 1* » et « *Eight Twenty-One protein* ») recrute N-coR et des HDACs qui interfèrent alors avec les fonctions des acides rétinoïques et la différenciation myéloïde (Minucci *et al.* 2001).

D'autre part, de nouveaux indices font penser que la modification épigénétique des histones pourrait ne pas être le mécanisme fondamental par lequel les inhibiteurs d'HDACs inhibent la croissance et induisent l'apoptose des cellules cancéreuses (Brinkmann *et al.* 2001; Johnstone *et al.* 2003). Bien que les histones soient le substrat primaire des HDACs, la découverte de nombreux substrats non histoniques permet d'envisager que l'effet anti-tumoral des inhibiteurs d'HDACs soit attribuable à des mécanismes qui sont indépendants de la transcription mais dépendants du niveau d'acétylation de protéines non histoniques (Lin *et al.* 2006). La déacétylation de p53, par exemple, module ses effets sur la croissance cellulaire et l'apoptose (Luo *et al.* 2000).

1.5.1. Les inhibiteurs d'HDACs

Les groupes de molécules inhibitrices de l'activité des HDACs qui ont été décrits sont aussi nombreux que leurs structures sont diverses (voir **Tableau 3**) (Richon *et al.* 1998; Bouchain *et al.* 2003; Curtin *et al.* 2003; Johnstone *et al.* 2003; Marks *et al.* 2003; Remiszewski 2003; Yoshida *et al.* 2003; Yoshida *et al.* 2003).

Tableau 3 : Différents groupes d'inhibiteurs d'HDACs (tableau modifié à partir de (de Ruijter *et al.* 2003)) ; IC₅₀ : « Inhibitor Concentration giving 50% of inhibition ».

Groupe et structure	Composés	IC ₅₀ <i>in vitro</i>
Acides gras à chaînes courtes 	Butyrate Phénylbutyrate Acide valproïque	mM mM mM
Acides hydroxamiques 	TSA Acide Hydroxamique Suberoyl-Anilide (SAHA) Acide M-Carboxycinnamique Bishydroxamique (CBHA) Scriptaid Pyroxamide Oxamflatine	nM μM μM μM μM nM
Tétrapeptides cycliques /époxydes 	Trapoxine (TPX) HC-toxine Chlamydocine Depudesine Apicidine Depsipeptide (FK228)	nM nM nM μM nM-μM nM
Benzamides 	N-acétyldinaline (CI-944) MS-275	μM μM

L'efficacité des inhibiteurs d'HDACs dépend largement de leur stabilité *in vivo*. La plupart des inhibiteurs d'HDACs ne sont pas très stables en raison de leur structure et ils sont rapidement détruits par le métabolisme du foie (Yoshida *et al.* 2001). C'est pourquoi beaucoup d'efforts ont été réalisés afin de développer des inhibiteurs d'HDACs à la fois stables et efficaces (Woo *et al.* 2002)

Les essais cliniques menés avec plusieurs de ces agents ont démontré que certains inhibiteurs d'HDACs ont une activité anti-tumorale à l'encontre de divers cancers, et ce, à des doses qui sont relativement bien tolérées par les patients (Gottlicher *et al.* 2001; Piekarz *et al.* 2001; Kelly *et al.* 2002). A ce jour au moins 14 inhibiteurs d'HDACs sont en cours d'essais cliniques soit en monothérapie soit en combinaison avec d'autres traitements (Xu *et al.* 2007).

La plupart des inhibiteurs d'HDACs fonctionnent en bloquant de manière réversible l'accès du site actif. Deux exceptions notables sont la TPX et la dépudésine dont l'action inhibitrice est irréversible et qui fonctionnent via un mécanisme différent qui est la liaison covalente au groupe époxykétone (Furumai *et al.* 2001; Kramer *et al.* 2001; Marks *et al.*

2001) Les premiers inhibiteurs d'HDACs à avoir été découverts sont les acides gras à chaînes courtes tels que le butyrate de sodium (Candido *et al.* 1978; Prasad 1980) et le phénylbutyrate (Newmark *et al.* 1994). Les premiers essais cliniques ont révélé que leur efficacité est limitée et qu'ils présentent une certaine toxicité pour le système nerveux et induisent de la fatigue (Newmark *et al.* 1995). De plus, ces composés ont une courte demi-vie dans le plasma suite à leur métabolisation rapide, leur mode d'action n'est pas spécifique et ils doivent être utilisés à haute dose (mM) pour avoir un effet thérapeutique (Lin *et al.* 2006). Des essais cliniques de phase II sont actuellement en cours (Monneret 2007).

Les acides hydroxamiques (TSA, SAHA...) sont efficaces sur les HDACs de classe I et II à des doses relativement faibles (n- μ M). La TSA est le premier hydroxamate « naturel » identifié mais n'est pas utilisé en clinique à cause de sa toxicité (Lin *et al.* 2006). Par ailleurs, la production de TSA est très peu efficace et très coûteuse (20 étapes résultant en un rendement de 2%), ce qui explique en partie les efforts déployés dans la recherche de nouveaux inhibiteurs d'HDACs à partir de la structure de la TSA (Furumai *et al.* 2001). L'Acide Hydroxamique Suberoyl-Anilide (SAHA) est une molécule synthétique (Richon *et al.* 1996) capable d'inhiber HDAC1 et HDAC3 (Richon *et al.* 1998), ainsi que la croissance de cellules de cancer prostatique aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Butler *et al.* 2000). Des études cliniques de phase I et II sur le SAHA sont actuellement en cours sur des patients avec des tumeurs hématologiques (Monneret 2007).

Les peptides cycliques constituent la classe d'inhibiteurs d'HDACs dont la structure est la plus complexe. Ils incluent la TPX, l'apicidine-A et le depsipeptide (FK-228). Le depsipeptide (FK228) a été testé en phases I et II d'essais cliniques. Il induit l'apoptose dans les leucémies lymphoïdes chroniques et aiguës mais son utilisation est limitée à cause de la fatigue et des nausées qu'il provoque (Byrd *et al.* 2005).

Les benzamides et leurs dérivés ne présentent pas de similarités structurales avec les autres inhibiteurs d'HDACs. Leur capacité d'inhibition des HDACs aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* a été décrite en 1999 (Suzuki *et al.* 1999). Les benzamides sont actifs à des concentrations de l'ordre du μ M (Lin *et al.* 2006). Le MS-275 est parmi les dérivés les plus actifs. Il est en phase I et II d'études cliniques sur des patients souffrant de cancer colorectal ou pulmonaire (Ryan *et al.* 2005). Une étude récente a démontré qu'une seule injection de MS-275, sept jours après l'implantation de cellules de glioblastomes chez des rats, suffit à diminuer la croissance tumorale (Eyupoglu *et al.* 2006).

1.5.1.1. La TSA

En 1990, Yoshida *et al.* ont découvert que la trichostatine A (TSA ou 7-(4-(diméthylamino)phényl) -N -hydroxy -4,6 -diméthyl -7 -ortho -2,4 -heptadiénamide), qui était auparavant connue comme étant un anti-fongique (Tsuji *et al.* 1976) et un inhibiteur du cycle cellulaire (Yoshida *et al.* 1988), est aussi un inhibiteur spécifique de la déacétylation des histones tant *in vitro* qu'*in vivo* chez les mammifères (Yoshida *et al.* 1990).

Bien que ce soit improbable, il ne peut pas être entièrement exclu que la TSA ait des effets biologiques autres que l'inhibition des HDACs. En effet, les lignées cellulaires tumorales qui ont des HDACs mutantes sont résistantes à l'effet antiprolifératif de la TSA ; si la TSA avait d'autres effets, ceux-ci devraient apparaître dans ces lignées mutantes, ce qui n'est pas le cas (Yoshida *et al.* 1990).

Une étude, utilisant la technique de « *differential mRNA display analysis* », a montré que, dans des lignées cellulaires lymphoïdes humaines, la TSA n'influence l'expression que de 2% des gènes analysés. Cela suggère que le degré d'acétylation des histones régule la transcription uniquement d'un petit nombre de gènes (Van Lint *et al.* 1996).

1.5.2. Mode d'action des inhibiteurs d'HDACs

L'étude aux rayons X de la structure cristalline de la TSA liée à HDLP (« *High Density LipoProtein* »), un homologue arché-bactérien des HDACs, démontre que cet acide hydroxamique coordine l'ion Zinc (Finnin *et al.* 1999). A ce stade, il apparaît clairement que la TSA, le SAHA et la TPX possèdent tous une fonction capable de lier un ion métallique (Monneret 2007). La structure cristalline de HDAC8, complexée avec quatre acides hydroxamiques différents (TSA, SAHA, CRA-A et MS344) confirme l'importance de l'ion Zinc dans le mécanisme catalytique (Somoza *et al.* 2004; Vannini *et al.* 2004).

Le mécanisme exact par lequel les inhibiteurs d'HDACs induisent sélectivement l'arrêt de la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose des cellules cancéreuses n'est pas encore bien compris. Plusieurs phénomènes différents pourraient expliquer pourquoi les cellules normales sont moins sensibles que les cellules transformées aux effets anti-prolifératifs des inhibiteurs d'HDACs (Lin *et al.* 2006). Une étude récente attribue cette différence de sensibilité à l'induction de la thiorédoxine par les inhibiteurs d'HDACs dans les cellules normales mais pas dans les cellules transformées (Ungerstedt *et al.* 2005). La thiorédoxine est une protéine réductrice majeure requise pour l'activité de la ribonucléotide réductase, elle sert à la dégradation des espèces d'oxygène réactif. Et indépendamment de la

voie de signalisation de l'apoptose par les caspases, la thiorédoxine est un facteur important de résistance des cellules à la mort cellulaire induite par les inhibiteurs d'HDACs (Ungerstedt *et al.* 2005).

D'autre part, la protéine transmembranaire TRAIL (« *Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand* ») a suscité beaucoup d'intérêt car elle induit sélectivement l'apoptose de nombreuses cellules transformées mais pas de la plupart des cellules normales (Bucur *et al.* 2006). La co-exposition de lignées de cancer de poumon et de prostate, à la fois à TRAIL et à un inhibiteur d'HDAC (TSA, butyrate de sodium ou acide hydroxamique) induit une activation synergique de la caspase-3, la fragmentation de l'ADN internucléosomal et une réponse apoptotique importante (Sonnemann *et al.* 2005). De la même manière, le co-traitement avec TRAIL et le bishydroxamate subérique à des doses non toxiques induit une augmentation marquée de l'apoptose dans des cellules de mélanome sans montrer de toxicité envers les mélanocytes (Zhang *et al.* 2003). Une étude réalisée avec plusieurs inhibiteurs d'HDACs montre que la TSA et le butyrate de sodium augmentent les niveaux de transcrit et l'expression membranaire de TRAIL-R2 (« *TRAIL-Receptor 2* ») dans des cellules de carcinome rénal d'une manière dépendante du facteur de transcription Sp1. Cela rend donc les cellules sensibles à l'apoptose induite par TRAIL et indique qu'il serait intéressant de mettre au point une thérapie associant des inhibiteurs d'HDACs à TRAIL (VanOosten *et al.* 2005). Récemment, une étude utilisant des siRNAs a démontré que HDAC1 et HDAC2, mais pas HDAC3, HDAC6 ou HDAC8, sont responsables de la sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL (Inoue *et al.* 2006).

La réponse cellulaire aux inhibiteurs d'HDACs implique également les polyamines. L'ODC (« *Ornithine DeCarboxylase* ») est une enzyme clef dans la régulation de la biosynthèse des polyamines, et les polyamines régulent la progression du cycle cellulaire. Une déplétion en polyamines augmente la résistance à l'apoptose induite par les inhibiteurs d'HDACs. De plus, il existe une corrélation, dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales, entre le niveau d'activité de l'ODC et la sensibilité aux inhibiteurs d'HDAC. Donc un haut niveau de polyamines dans une tumeur pourrait servir de bio-marqueur servant à prédire la sensibilité aux inhibiteurs d'HDACs (Saunders *et al.* 2006).

Il semble également que les inhibiteurs d'HDACs puissent activer la réponse immunitaire de l'hôte et inhiber l'angiogenèse par des processus multifactoriels (Marks *et al.* 2004; Marks *et al.* 2005). Ainsi, la TSA et le SAHA réduisent la formation de néovaisseaux, induite par l'hypoxie, par la régulation d'HIF-1 α (« *Hypoxia-inducible factor 1alpha* »), du VEGF

(« *Vascular Endothelial Growth Factor* »), du récepteur du VEGF et d'HoxA9 (« *Homeobox A9* ») (Kim *et al.* 2001; Williams 2001; Deroanne *et al.* 2002; Rossig *et al.* 2005). L'angiogenèse joue un rôle clef dans la progression tumorale (Condon 2005). Ce phénomène fait partie de la réaction stromale associée aux cancers, processus par lequel de nombreux cancers génèrent autour d'eux un environnement favorable à leur progression (Tuxhorn *et al.* 2001; Tuxhorn *et al.* 2002).

2. Buts et plan du travail

Le point de départ de ce travail a consisté en l'observation initiale, faite au sein de notre laboratoire, que dans la prostate humaine seules certaines cellules stromales expriment HDAC8. Afin de déterminer si cette distribution intratissulaire sélective de HDAC8 est limitée à la glande prostatique ou s'il s'agit d'un phénomène plus général, nous avons étudié l'expression de cette enzyme dans les organes et tissus du corps humain. Dans la première partie de notre travail, nous démontrons que l'expression d'HDAC8 est majoritairement cytoplasmique et restreinte aux cellules présentant une différenciation musculaire lisse chez l'homme (**Chapitre 3.1.1**).

Sur base de ces résultats, nous avons entrepris d'étudier le rôle potentiel de HDAC8 dans la biologie musculaire lisse. Nous avons ainsi utilisé des cellules musculaires lisses humaines cultivées *in vitro* et observé que HDAC8 présente, dans ces cellules, une distribution intracellulaire semblable à celle des filaments d'actine. Nous avons alors examiné la possibilité selon laquelle HDAC8 pourrait co-localiser avec certains éléments du cytosquelette musculaire lisse (**Chapitre 3.1.2**) et s'associer à ceux-ci (**Chapitre 3.1.3**). En outre, nous avons utilisé des petits ARN interférants ciblant le transcrite d'HDAC8 afin de déterminer l'impact d'une réduction forcée de l'abondance de la protéine sur la capacité de cellules musculaires lisses de contracter des lattices de collagène (**Chapitre 3.1.4**). L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous a conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle HDAC8 pourrait participer à la régulation de l'appareil contractile musculaire lisse. Afin de corroborer cette hypothèse en pathologie humaine, en collaboration avec des collègues de l'Université Libre de Bruxelles, de l'Université de Lübeck et de l'Université de Maastricht, nous avons souhaité étudier l'expression de HDAC8 au niveau de segments intestinaux atteints de troubles sévères de la motilité (**Chapitre 3.1.5**).

Nos observations démontrant qu'HDAC8 est un nouveau marqueur de différenciation musculaire lisse nous ont aussi menés à examiner la possibilité selon laquelle cette enzyme pourrait jouer un rôle dans ce processus. Etant donné l'absence de modèle disponible de différenciation musculaire lisse *in vitro*, nous nous sommes orientés vers un modèle 'alternatif', celui de la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1.

Nous avons d'abord testé l'hypothèse selon laquelle une inhibition de l'activité des HDACs de classes I et II pourrait empêcher cette différenciation. Nous avons ensuite voulu

identifier, parmi ces HDACs de classes I et II, celle(s) qui participe(nt) à la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1 (**Chapitre 3.2**).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de notre travail a conduit à quatre publications qui sont jointes en annexe à cet ouvrage. Chaque publication contient la description détaillée des « matériels et méthodes » utilisés. Nous présentons nos résultats et les discutons dans deux chapitres séparés (**Chapitres 3.1.6 et 3.2.5**). Pour finir, nous tenterons de dégager les perspectives ouvertes par nos travaux.

3. Résultats

3.1. Expression et rôle de HDAC8 dans les cellules de phénotype musculaire lisse

Au moment où nous avons initié nos travaux, très peu de choses étaient connues de l'expression des HDACs dans les tissus humains normaux et cancéreux. Une étude, réalisée dans notre laboratoire, du profil d'expression des HDACs de classe I dans des tissus de prostate humaine avait permis de mettre en évidence que HDAC8, au lieu d'être détectée dans toutes les cellules, est exclusivement exprimée par certaines cellules stromales de la prostate ainsi que par des cellules contenues dans la paroi des vaisseaux sanguins (Waltregny *et al.* 2004). Nous avons ainsi initialement souhaité explorer de manière exhaustive la distribution d'expression d'HDAC8 chez l'homme.

3.1.1. L'expression de HDAC8 est restreinte aux cellules présentant une différenciation musculaire lisse dans les tissus humains normaux

Dans cette première partie de notre travail, l'expression de HDAC8 a été évaluée par immunohistochimie dans de nombreux types de tissus et d'organes humains normaux à l'aide d'un anticorps anti-HDAC8 spécifique.

Les **Figures 9** et **10** présentent des photos représentatives de l'immunoréactivité anti-HDAC8. Une coloration au trichrome de Masson a été réalisée afin de distinguer les fibres de collagène ainsi que les fibres musculaires lisses présentes dans les parois de petites artères (**Figure 9A**).

Comme le montre la **Figure 9C**, HDAC8 n'est détectée que dans les cellules musculaires lisses des parois vasculaires. Comme contrôle négatif de cet immunomarquage, l'anticorps anti-HDAC8 a été pré-incubé avec un excès molaire du peptide correspondant, ce qui a aboli complètement le marquage (**Figure 9D**). De même, aucun marquage spécifique n'a été observé lorsque l'on a remplacé l'anticorps primaire par du PBS (« *Phosphate Buffered Saline* ») (**Figure 9B**).

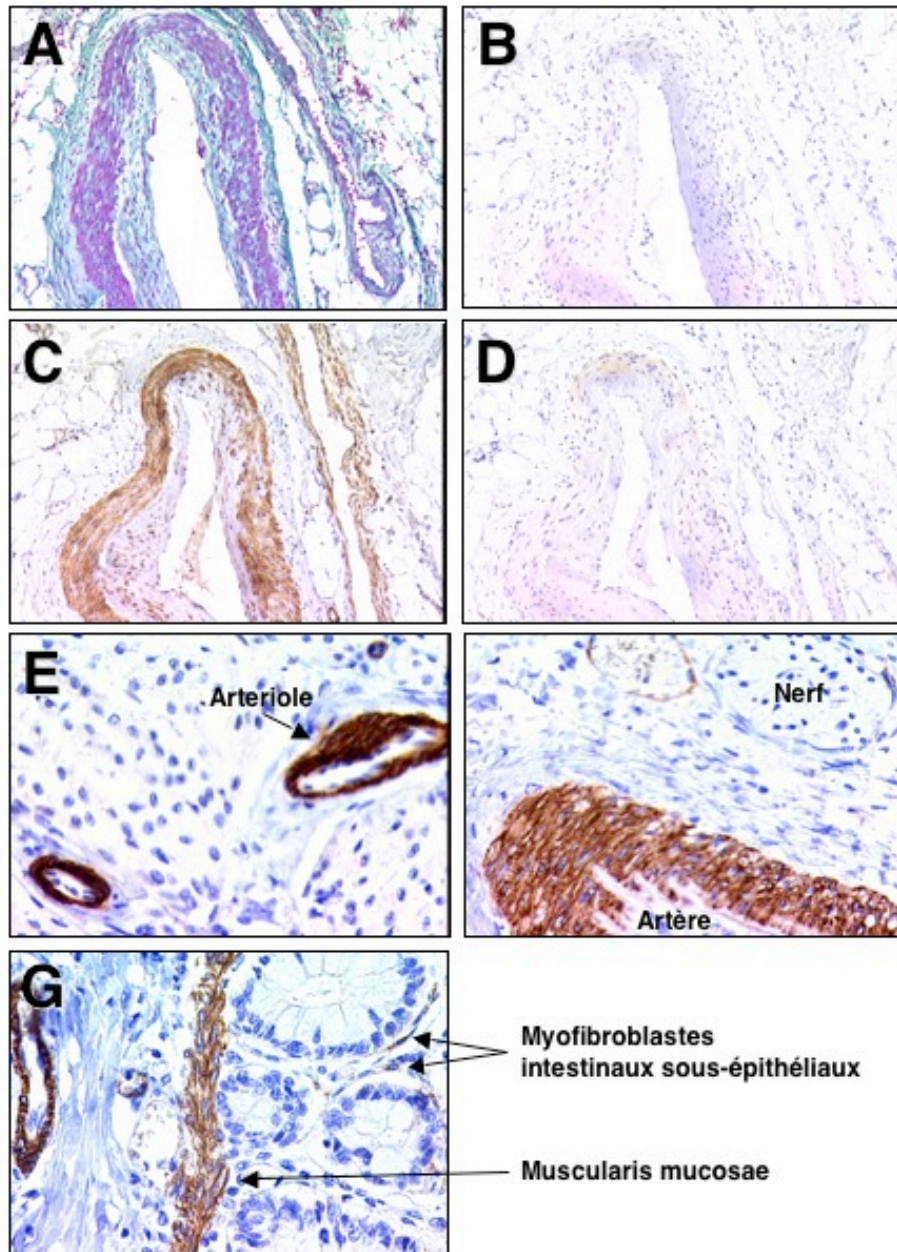


Figure 9 : **A :** Coloration au trichrome de Masson de la paroi d'une artère localisée dans la graisse périprostatique. Les fibres musculaires lisses sont colorées en violet et les fibres de collagène apparaissent en vert. L'expression de HDAC8 a été analysée au niveau de coupes sériées de la même artère qu'en A en utilisant une technique d'immunoperoxydase. **B :** Immunomarquage contrôle dans lequel l'anticorps anti-HDAC8 a été remplacé par du PBS. **C :** L'incubation de la section avec l'anticorps anti-HDAC8 génère un intense marquage dans le cytoplasme des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle. **D :** Immunomarquage contrôle dans lequel l'anticorps anti-HDAC8 a été pré-incubé avec un excès du peptide qui a servi à générer l'anticorps. **E :** Immunodétection de HDAC8 dans le myocarde. Ni les cardiomyocytes, ni les cellules endothéliales des petites artères ne montrent d'expression de HDAC8 à un niveau détectable. Les cellules musculaires lisses vasculaires montrent une forte immunoréactivité anti-HDAC8. **F :** Dans un espace porte hépatique, les cellules musculaires lisses de la paroi d'une petite artère montrent une forte expression cytoplasmique de HDAC8. Remarquons l'absence de marquage dans le nerf adjacent. **G :** Les cellules musculaires lisses de la muscularis mucosae du côlon, ainsi que des parois des artères et des capillaires montrent un intense marquage cytoplasmique et diffus. Remarquons l'expression de HDAC8 dans des cellules interstitielles au sein de la lamina propria. Ces cellules sont les myofibroblastes intestinaux sous-épithéliaux. Grossissement original : **A-D** 100x ; **E, F** 200x et **G** 400x.

Le marquage anti-HDAC8, caractérisé par une coloration intense et diffuse dans le cytoplasme, est exclusivement détecté *in vivo* dans les cellules humaines présentant une différenciation musculaire lisse, incluant les cellules musculaires lisses viscérales et vasculaires, les cellules myoépithéliales, et certains myofibroblastes, comme détaillé dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Localisation de l'expression de HDAC8 dans différents tissus et organes humains

Structure anatomique	Distribution de l'expression de HDAC8
Tractus respiratoire	
Trachée, bronches et bronchioles	Cellules myoépithéliales des glandes muqueuses † Couche musculaire *
Poumon	Myofibroblastes des septa alvéolaires ‡
Tractus urogénital	
Rein	Couche musculaire du pyélon * Capsule *
Urètre	Couche musculaire*
Vessie	Couche musculaire *
Prostate	Cellules stromales ‡
Canal déférent et épидидyme	Couche périductale *
Testicule	Cellules myoïdes pérítubulaires ‡
Utérus	Myomètre *
	Stroma du col *
Trompe de Fallope	Couche musculaire *
Ovaire	Cellules de la thèque externe ‡
Tractus gastro-intestinal	
Intestin grêle et colon	Muscularis mucosae * Muscularis propria * Myofibroblastes sous-épithéliaux ‡
Estomac	NE
Oesophage	NE
Vésicule biliaire	NE
Pancréas	NR
Foie	Capsule *
Organes lymphoïdes	
Rate	Capsule* Cellules réticulaires ‡
Thymus	NR
Glandes endocrines	
Glandes salivaires	Cellules myoépithéliales ‡
Glande thyroïde et parathyroïdes	NR
Glandes surrénales	Capsule *
Système nerveux	
Moelle épinière	NR
Nerfs périphériques	NR
Cerveau	NR
Muscles	
Myocarde	NR
Muscles squelettiques	NR
Autres tissus et organes	
Os	NR
Peau	Muscle érecteur * Cellules myoépithéliales des glandes sudoripares †
Glandes mammaires	Cellules myoépithéliales des lobules et des canaux †

NE, Non évalué ; NR, Non réactif à l'exception de l'immunoréactivité observée dans les cellules musculaires lisses des artères, artérioles, veines et veinules ainsi que dans les péricytes de tous les organes étudiés.

*, cellules musculaires lisses ; †, cellules myoépithéliales ; ‡, myofibroblastes

Comme montré dans les **Figures 9 et 10**, l'expression de HDAC8 a été détectée dans les cellules musculaires lisses vasculaires, tant des grands vaisseaux (artères et veines) que des micro-vaisseaux (artérioles, veinules, et capillaires). Un immunomarquage anti-HDAC8 a également été observé dans les cellules musculaires lisses de tous les organes contenant des cellules musculaires lisses, comme l'intestin (**Figure 9G**), les poumons (**Figure 10H**), les trompes de Fallope (**Figure 10K**), et la vessie (**Figure 10L**).

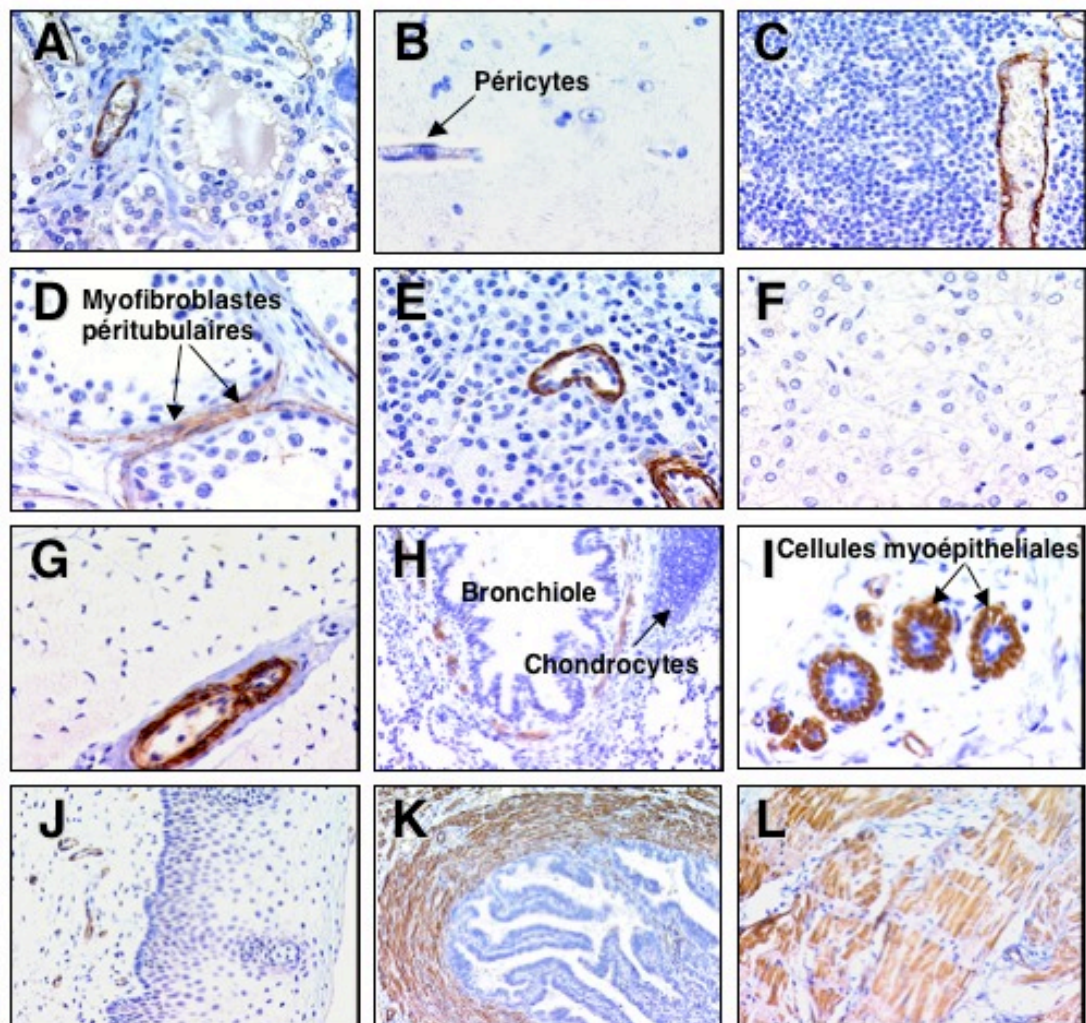


Figure 10 : Immunodétection de HDAC8 dans différents organes et tissus normaux du corps humain. Des sections de différents tissus ont été fixées à la formaline, incluses dans la paraffine, puis soumises à l'immunodétection par l'anticorps anti-HDAC8 et enfin contre-colorées à l'hématoxyline : **A** : thyroïde, **B** : cerveau, **C** : thymus, **D** : testicule, **E** : pancréas, **F** : foie, **G** : muscle squelettique, **H** : poumon, **I** : sein, **J** : col utérin, **K** : trompe de Fallope et, **L** : vessie. Grossissement original : **C, H** 100x ; **J, K, L** 200x, **A, B, E, G** 400x, et **D, F, I** 630x.

L'expression de HDAC8 a également été recherchée dans des glandes contenant des cellules myoépithéliales, y compris dans les acini et canaux de la glande mammaire, dans les glandes muqueuses du tractus respiratoire, dans les glandes salivaires et dans les glandes eccrines de la peau. HDAC8 a été détectée dans les cellules myoépithéliales de toutes ces structures glandulaires (**Figures 10I et 11**).

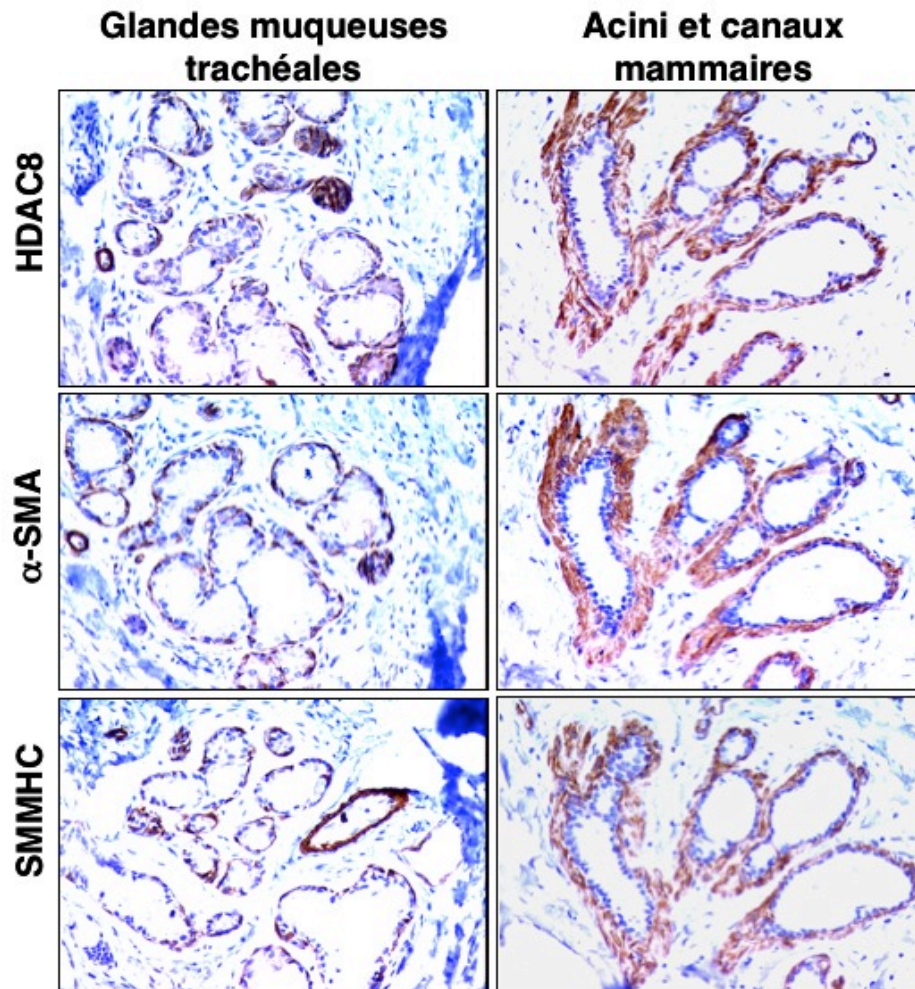


Figure 11 : Immunodétection de HDAC8, de l' α -SMA et de la SMMHC dans des coupes sériées de glandes muqueuses de la trachée humaine normale et d'acini et canaux mammaires. Les cellules myoépithéliales présentent un marquage sous forme de coloration brunâtre. Grossissement original : 400x.

La possibilité d'une co-localisation de HDAC8 avec deux protéines spécifiques du cytosquelette des cellules musculaires lisses, l' α -SMA et la SMMHC (Longtine *et al.* 1985; Schurch *et al.* 1987; Skalli *et al.* 1986), a été étudiée dans des coupes sériées de glande mammaire, trachée, glandes salivaires, et peau humaines normales. L'analyse

immunohistochimique a permis de démontrer que ces trois protéines, HDAC8, l' α -SMA et la SMMHC, sont co-exprimées dans les cellules myoépithéliales des acini et des canaux mammaires, dans les glandes muqueuses de la trachée, dans les glandes salivaires et dans les glandes eccrines de la peau (exemple montré dans la **Figure 11** pour la trachée et le sein).

Une expression de HDAC8 a également été détectée dans divers tissus contenant des myofibroblastes. Les **Figures 9H** et **10D** représentent des coupes de tissus intestinal et testiculaire normaux, respectivement. Ces sections ont été immunomarquées avec l'anticorps anti-HDAC8. Comme observé dans la **Figure 9H**, l'expression de HDAC8 est détectée dans les cellules musculaires lisses des parois vasculaires, dans les cellules musculaires lisses de la muscularis mucosae, ainsi que dans les myofibroblastes intestinaux sous-épithéliaux présents dans la lamina propria et s'étendant depuis la muscularis mucosae jusqu'à la couche sous-épithéliale. Dans le testicule, HDAC8 est détectée dans une mince couche de myofibroblastes, les cellules myoïdes pérítubulaires, situées autour des tubules séminifères. Parmi tous les autres organes contenant des myofibroblastes que nous avons étudiés, plusieurs, mais pas tous, présentaient une expression détectable de HDAC8. En effet, en plus de sa détection dans les cellules myoïdes pérítubulaires et dans les myofibroblastes sous-épithéliaux de l'intestin, HDAC8 a aussi été détectée dans les myofibroblastes des septa alvéolaires pulmonaires, dans les cellules stromales de la prostate, dans les cellules réticulaires de la rate et dans les cellules de la thèque externe de l'ovaire (**Figure 12**). Tout comme les cellules myoépithéliales, toutes ces cellules myofibroblastiques co-expriment HDAC8, l' α -SMA, et la SMMHC (**Figure 12**).

Nous n'avons détecté aucun immunomarquage spécifique anti-HDAC8 dans plusieurs autres types de cellules myofibroblastiques, telles que les cellules réticulaires thymiques (**Figure 10C**), les cellules stromales du sein (**Figures 10I** et **11**), les cellules stellaires périacinaires du pancréas (**Figure 10E**), les cellules stellaires pérísinosoïdales (d'Ito) du foie (**Figure 10F**) et les cellules mésangiales du rein. La protéine HDAC8 n'a pas été détectée dans des cellules autres que musculaires lisses. En particulier, aucun immunomarquage anti-HDAC8 n'a été détecté dans les muscles striés (**Figures 9F** et **10G**), les neurones (**Figures 9G** et **10B**), les cellules endothéliales (**Figures 9F**, **10E** et **10G**), et les cellules épithéliales (**Figures 9H**, **10A**, **10E**, **10F**, **10H**, **10I**, **10J**, **10K** et **12**) ainsi que les ostéocytes, les chondrocytes (**Figure 10H**), les lymphocytes (**Figure 10C** et **12**), et les fibrocytes (**Figures 9**, **10** et **11**).

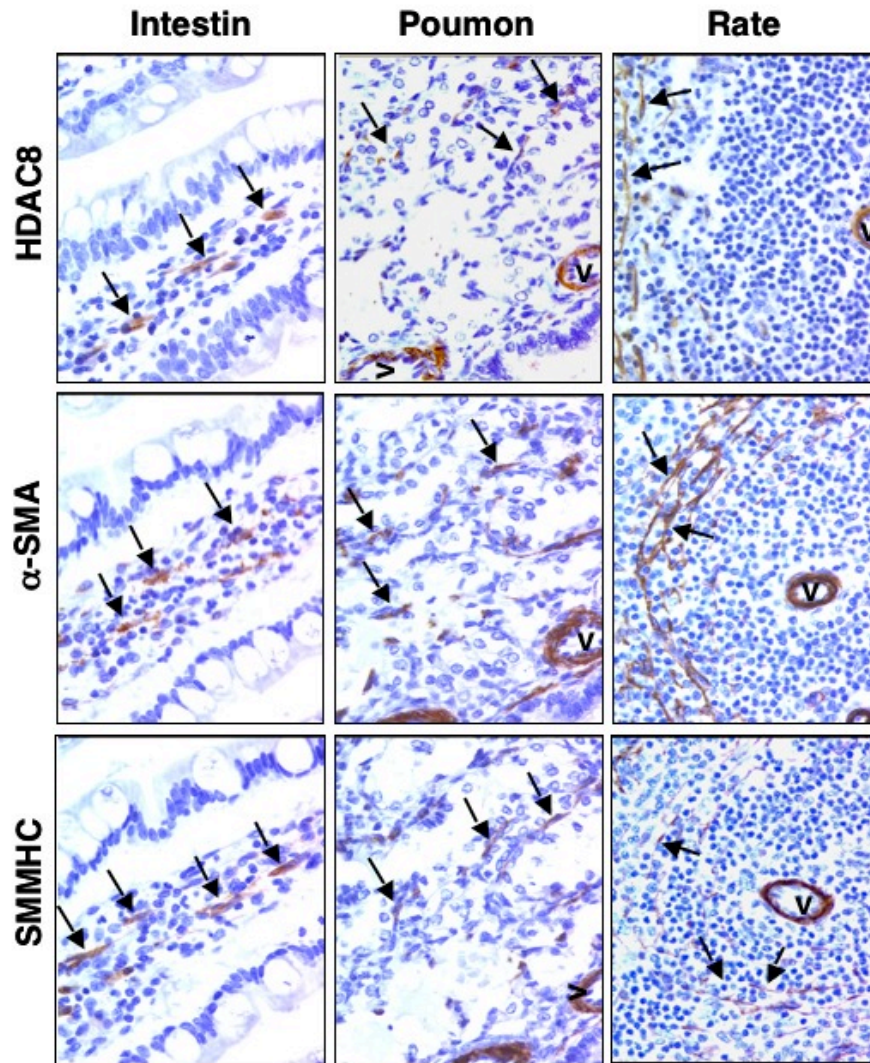


Figure 12 : Immunodétection de HDAC8, de l' α -SMA et de la SMMHC dans des coupes sériées d'intestin, de poumon et de rate humains normaux. Les myofibroblastes localisés sous l'épithélium intestinal, les myofibroblastes des septa alvéolaires des poumons et les cellules réticulaires de la rate co-expriment HDAC8, l' α -SMA et la SMMHC. Grossissement original : 400x. Les flèches indiquent les myofibroblastes et v = vaisseau.

Nous avons ensuite recherché l'expression de HDAC8 par immunoblot au niveau de HSMCs (« *Human Smooth Muscle Cells* »), de fibroblastes primaires de peau humaine, et cellules HeLa (lignée cancéreuse épithéliale humaine dérivée de kératinocytes issus de col utérin) cultivés *in vitro*. Parmi ces trois lignées, l'abondance de HDAC8 était la plus importante dans les HSMCs, et le niveau le plus faible a été observé dans les fibroblastes humains (**Figure 13A**). Nous n'avons détecté HDAC8 ni dans les kératinocytes de col utérin humain normal évalués par immunoperoxydase (**Figure 10J**), ni dans les cellules de la lignée cancéreuse HeLa étudiées par immunoblot (**Figure 13A**).

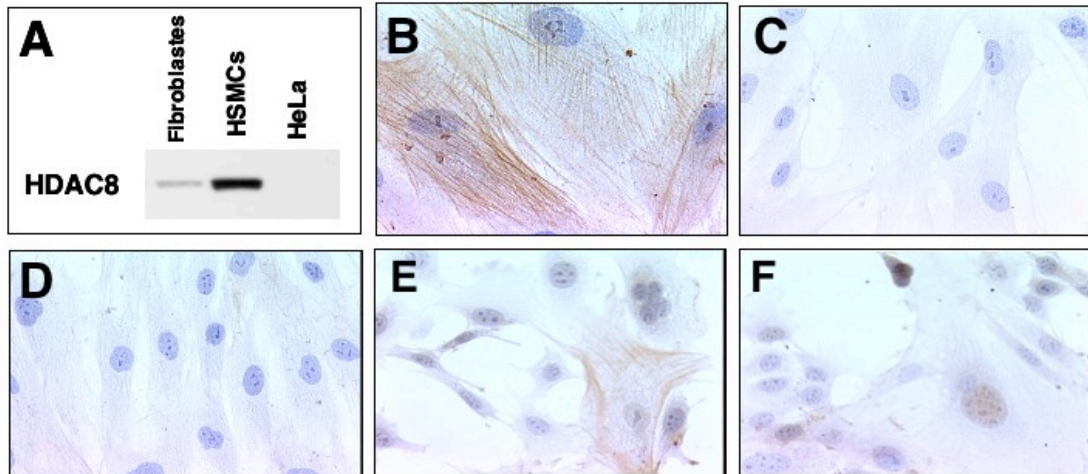


Figure 13 : **A** : Evaluation de l'expression de HDAC8 par immunoblot dans des fibroblastes primaires de peau humaine, des cellules musculaires lisses vasculaires de cordons ombilicaux humains (HSMCs) et des cellules HeLa. **B** : La distribution de l'expression de HDAC8 dans les HSMCs suggère une association avec le cytosquelette. **C** : Dans les HSMCs, l'immunoréactivité de HDAC8 est abolie lorsque l'anticorps anti-HDAC8 est préincubé avec un excès molaire du peptide correspondant. **D** : Les fibroblastes primaires de peau humaine ne présentent la plupart du temps aucun niveau détectable d'immunoréactivité anti-HDAC8. **E** et **F** : Détection de HDAC8 dans le cytoplasme (**E**) ou le noyau (**F**) de fibroblastes murins NIH-3T3. Grossissement original : **B** 630x ; **C**, **D** 400x et **E**, **F** 200x.

3.1.2. HDAC8 co-localise avec l' α -SMA dans le cytoplasme

Dans tous les tissus humains au sein desquels HDAC8 a été détectée, l'enzyme a été principalement observée dans le compartiment cytoplasmique (**Figures 9 à 12**). Des expériences d'immunocytochimie ont également montré la localisation principalement cytoplasmique de HDAC8 dans les HSMCs, avec une distribution d'expression suggérant une association avec les fibres du cytosquelette (**Figure 13B**). Afin de vérifier la spécificité de l'immunoréactivité anti-HDAC8 obtenue dans des cultures primaires, l'anticorps a été pré-incubé avec un excès molaire du peptide correspondant. La pré-incubation de l'anticorps avec le peptide qui a servi à le générer a conduit à une disparition complète du marquage (**Figure 13C**). Tout comme les fibroblastes résidant dans les tissus humains, les fibroblastes cultivés *in vitro* n'ont habituellement montré aucune expression discernable de HDAC8 (**Figure 13D**). Dans les fibroblastes murins NIH-3T3, un marquage a été retrouvé à la fois au niveau nucléaire et au niveau cytoplasmique (**Figure 13, E et F**). La distribution cytoplasmique de HDAC8 dans ces cellules était semblable à celle observée dans les HSMCs (**Figure 13, comparer B et E**).

En complément des expériences d'immunohistochimie, nous avons réalisé des fractionnements nucléocytoplasmiques sur des fibroblastes humains primaires, des HSMCs, et des NIH-3T3. Après étude des fractions nucléaires et cytoplasmiques par immunoblot, nous avons observé que la fraction cytoplasmique est enrichie en HDAC8. HDAC1 et la tubuline- α ont été respectivement observées exclusivement dans le noyau et dans le cytoplasme. HDAC3 est principalement localisée dans le compartiment nucléaire bien qu'elle ait été également détectée dans le cytoplasme (**Figure 14**).

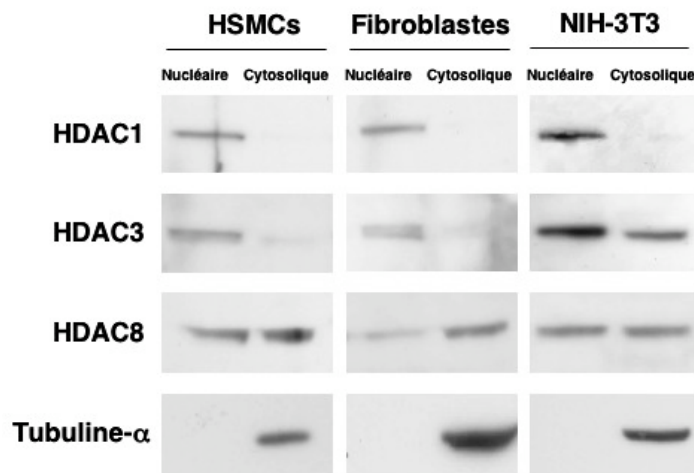


Figure 14 : Immunoblots évaluant l'expression de HDAC1, HDAC3 et HDAC8 et de la tubuline- α dans des fractionnements nucléaires et cytoplasmiques de fibroblastes primaires de peau humaine, HSMCs, et fibroblastes murins NIH-3T3.

Des expériences de transfection ont également indiqué que HDAC8 peut être localisée dans le cytoplasme. Une construction de HDAC8 taguée V5 a été transfectée de manière transitoire dans des cellules NIH-3T3. La surexpression de l'enzyme taguée a été vérifiée par immunoblot en utilisant un anticorps anti-V5 (**Figure 15A**). Par la technique d'immunofluorescence indirecte employant le même anticorps, nous avons visualisé HDAC8 exogène tant dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules transfectées (**Figure 15B**).

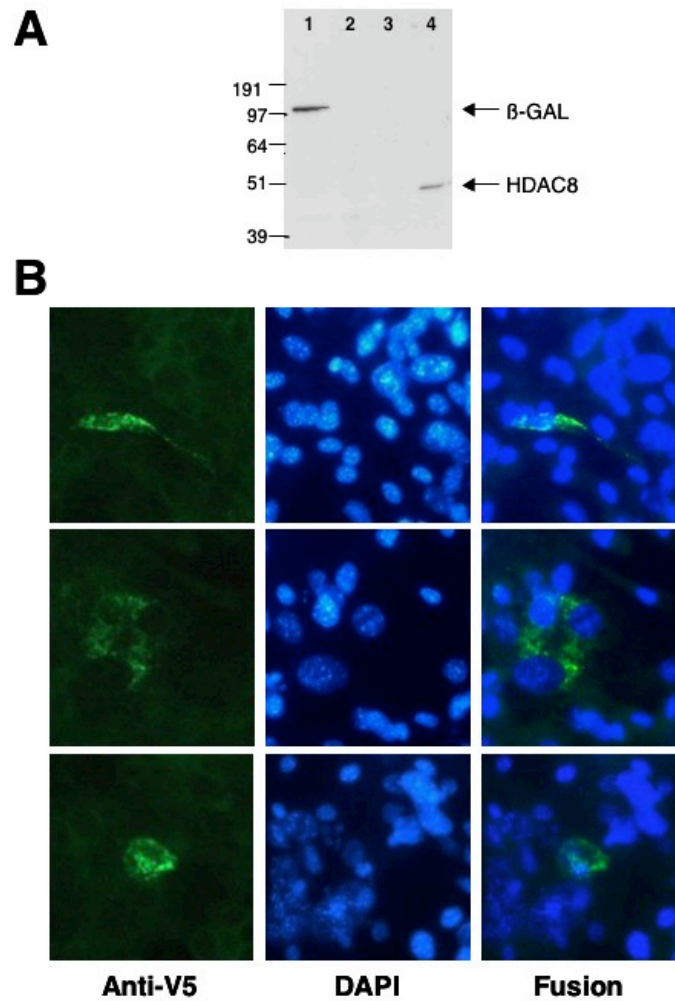


Figure 15 : **A :** Immunoblot évaluant l'expression de HDAC8 recombinante. Une transfection transitoire du vecteur pcDNA3.1D/HDAC8/V5-His a permis d'exprimer HDAC8 dans des fibroblastes murins NIH-3T3. Des extraits totaux de ces cellules ont été soumis à l'analyse par immunoblot utilisant un anticorps anti-V5 pour détecter la protéine recombinante. **Puits 1**, NIH-3T3 transfectées transitoirement avec pcDNA3.1D/lacZ/V5-His ; **puits 2**, NIH-3T3 transfectées transitoirement avec un vecteur sans insert ; **puits 3**, NIH-3T3 non transfectées ; **puits 4**, NIH-3T3 transfectées transitoirement avec pcDNA3.1D/HDAC8/V5-His. **B :** Localisation intracellulaire de l'HDAC8 taguée V5 dans les fibroblastes murins NIH-3T3 transfectés. **A gauche**, exemples représentatifs de l'immunofluorescence générée par l'anti-V5. **Au milieu**, marquage nucléaire par le DAPI (4, 6 -diamidino-2-phenylindole). **A droite**, fusion des deux photos précédentes.

Dans les HSMCs et NIH-3T3, la distribution de l'expression HDAC8 nous a semblé réminiscente de l'organisation des fibres de stress, suggérant une possible association de l'enzyme avec le cytosquelette musculaire lisse. Afin de déterminer si HDAC8 peut s'associer aux protéines du cytosquelette musculaire lisse, et en particulier à l' α -SMA, nous avons réalisé des expériences de double immuno-marquage couplées à l'analyse en microscopie confocale en fluorescence. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps anti- α -SMA et un anti-FLAG sur des cellules NIH-3T3 transfectées avec des cDNAs codant respectivement pour HDAC3, HDAC6, ou HDAC8 (taguées FLAG en C-terminal). Comme le montre la

Figure 16, HDAC8 exogène, détectée à l'aide d'un anticorps anti-FLAG, est présente à la fois dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique. Ainsi, l'expression de HDAC8 exogène est retrouvée dans les mêmes compartiments intracellulaires qu'HDAC8 endogène dans les NIH-3T3 (**Figure 13, E et F**). Dans le cytoplasme, HDAC8 taguée FLAG présente non seulement une distribution semblable à celle d'un réseau de fibres de stress, mais de plus, elle co-localise avec l' α -SMA (**Figure 16**). Ni HDAC3 taguée FLAG, qui est presque exclusivement nucléaire, ni HDAC6 taguée FLAG, qui a été décrite comme étant associée à la tubuline (Hubbert *et al.* 2002; Matsuyama *et al.* 2002; North *et al.* 2003), ne colocalisent avec l' α -SMA (**Figure 16**).

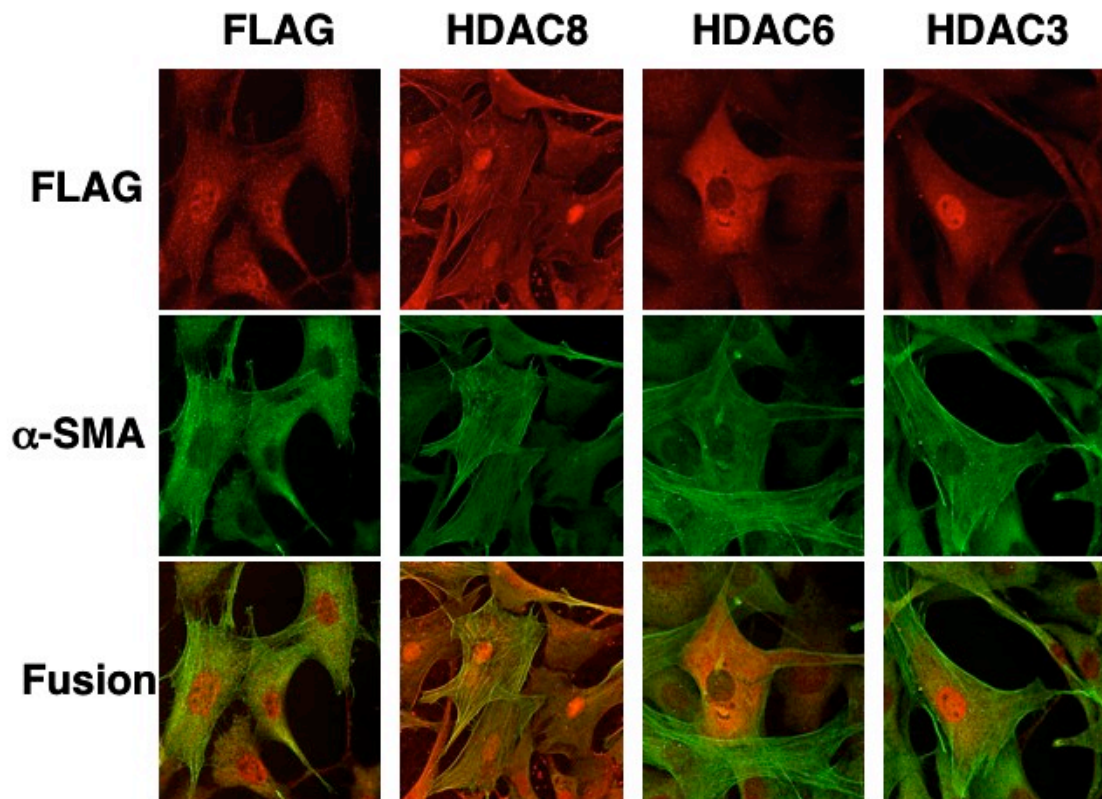


Figure 16 : Analyse en microscopie confocale d'un double immuno-marquage en immunofluorescence utilisant des anticorps anti- α -SMA et anti-FLAG sur des NIH-3T3 transfectés avec des cDNAs codant pour HDAC3, HDAC6 ou HDAC8 tagués en C-terminal par un FLAG. Des fibroblastes murins NIH-3T3 ont été déposés sur lames puis transfectés avec pcDNA3.1(+)/HDAC3/FLAG, pcDNA3.1(+)/HDAC6/FLAG, ou pcDNA3.1(+)/HDAC8/FLAG. Des cellules NIH-3T3 transfectées avec pcDNA3.1(+)/FLAG ont servi de contrôle négatif.

3.1.3. HDAC8 s'associe à l' α -SMA

Au vu des résultats que nous venons d'exposer, il nous est apparu intéressant de tester l'hypothèse selon laquelle HDAC8 pourrait être associée au cytosquelette des cellules musculaires lisses. Pour ce faire, deux approches ont été employées. Nous avons tout d'abord effectué des expériences de fractionnements cellulaires. L'utilisation successive de tampons d'extraction contenant différentes concentrations en détergents et en sels nous a permis d'obtenir trois fractions : une fraction contenant les protéines d'origine cytosolique (fraction "cytosolique"), une autre enrichie en composants d'origine cytosquelettique (fraction "liée au cytosquelette"), et une dernière contenant les protéines intracellulaires liées aux organites restants et aux membranes plasmiques (fraction "liée aux membranes"). Bien que cette procédure de fractionnement soit relativement grossière et qu'elle génère toujours un certain niveau de contamination croisée entre les différentes fractions, elle permet de déterminer si une fraction est, ou non, enrichie en une protéine particulière. Après cette procédure de co-purification, le culot insoluble restant a été soumis à une technique de dépolymérisation de l'actine F (actine filamenteuse) et le surnageant a été récolté en tant que "culot solubilisé".

Les extraits protéiques des trois différentes fractions ("cytosolique", "liée au cytosquelette", "liée aux membranes") et du "culot solubilisé" ont été analysés par immunoblot pour leur niveau d'expression de l' α -SMA, de HDAC8, de la β -actine, de HDAC1 et de HDAC3. Comme le montre la **Figure 17**, les deux isoformes d'actine, l' α -SMA et la β -actine, ont été détectées dans chacune des trois fractions avec un enrichissement attendu mais modeste dans la fraction « liée au cytosquelette ». HDAC8 a été retrouvée dans les mêmes fractions, avec aussi une légère augmentation du niveau observé dans la fraction « liée au cytosquelette ». En outre, HDAC8 est également présente, ainsi que les deux isoformes d'actine, dans le « culot solubilisé » obtenu par dépolymérisation de l'actine F. En revanche, HDAC1 et HDAC3, deux autres HDACs de classe I, n'ont pas été détectées dans les fractions « liées au cytosquelette » et le « culot solubilisé ». Elles ne sont discernables que dans les extraits « liés aux membranes ». Par conséquent, dans ces conditions expérimentales, HDAC8 semble être associée à certains composants du cytosquelette, ce qui n'est pas le cas de HDAC1 ou HDAC3.

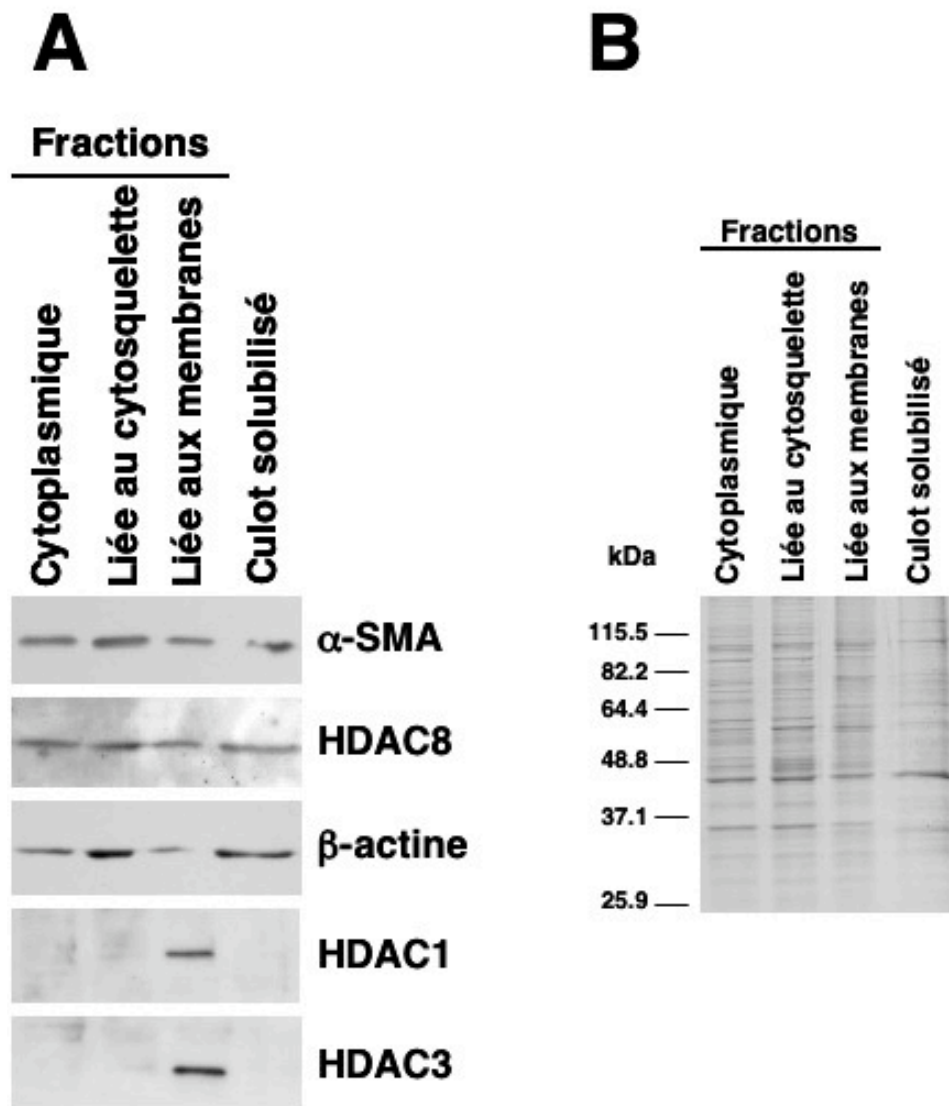


Figure 17 : Co-purification de HDAC8 avec la fraction « liée au cytosquelette » dans des HSMCs.

(A) Des cellules musculaires lisses primaires de veine de cordons ombilicaux humains (HSMCs) ont subi un fractionnement à l'aide de différentes concentrations en détergents et en sels. Cette technique a permis l'obtention de trois fractions : l'une d'origine cytosolique (fraction "cytosolique"), l'autre enrichie en composants d'origine cytosquelettique (fraction "liée au cytosquelette"), et la dernière contenant les protéines intracellulaires liées aux organites ou aux membranes plasmiques (fraction "liée aux membranes"). Le culot insoluble restant a été soumis à dépolymérisation de l'actine-F et le surnageant a été récolté (fraction "culot solubilisé"). L'abondance de l' α -SMA, de HDAC8, de la β -actine, de HDAC1 et de HDAC3 a été analysée par immunoblot dans les extraits protéiques des quatre fractions différentes. (B) Coloration au bleu de Coomassie d'un gel représentatif afin de vérifier la normalisation de la quantité chargée dans chaque puits. Les tailles sont exprimées en kDa, comme défini par le marqueur de poids moléculaire.

Nous avons alors voulu déterminer si HDAC8 peut s'associer, directement ou indirectement, avec l'une ou l'autre des isoformes d'actine ainsi qu'avec la SMMHC. Pour ce faire, nous avons employé l'approche de la co-immunoprécipitation de protéines, une technique qui a déjà été utilisée pour étudier l'interaction entre une protéine spécifique et une isoforme d'actine (Hazan *et al.* 1998; Ruzanov *et al.* 1999; Sadekova *et al.* 2000; Niessen *et*

al. 2004). L' α -SMA endogène a été immunoprécipitée à partir d'un extrait de protéines totales de HSMCs grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti- α -SMA qui reconnaît spécifiquement la séquence Ac-EEED de l'extrémité NH2-terminale de la protéine.

Les immunoprécipitats ont été analysés par immunoblot avec des anticorps dirigés contre l' α -SMA, HDAC8, HDAC1 et HDAC3. Comme représenté à la **Figure 17A**, HDAC8 co-immunoprécipite avec l' α -SMA alors que HDAC1 et HDAC3 n'ont pas été détectées dans les complexes immuns. Lorsque l'anticorps anti- α -SMA a été remplacé par une IgG (Immunoglobuline G) de souris du même isotype, qui sert de contrôle négatif à l'immunoprécipitation, les immunoprécipitats ne contiennent aucun niveau détectable d' α -SMA, d'HDAC8, d'HDAC1 ou d'HDAC3 (**Figure 18**).

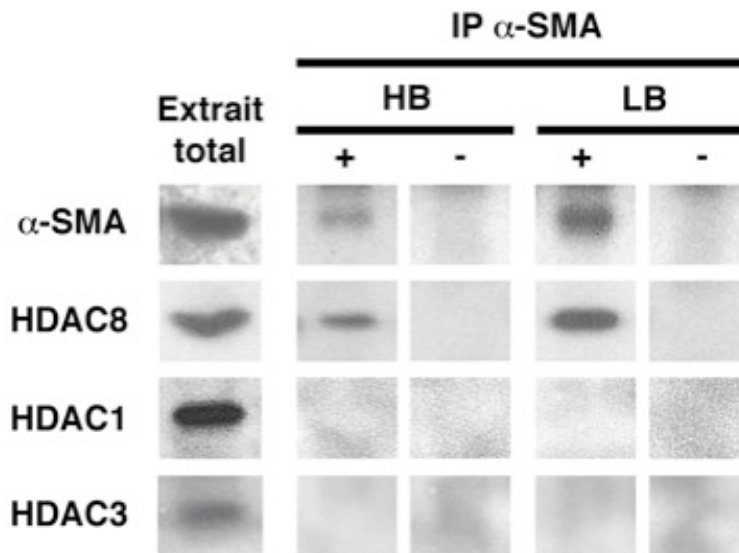


Figure 18 : HDAC8 s'associe à l' α -SMA dans les HSMCs.

Des HSMCs ont été lysées à froid dans du tampon de stringence faible (« *Low stringency Buffer* » ; LB) ou élevée (« *High stringency Buffer* » ; HB). Les extraits protéiques ont ensuite été immunoprécipités avec des anticorps monoclonaux dirigés contre l' α -SMA. Les immunoprécipitations avec des IgG2a ont servi de contrôles négatifs. Pour chaque expérience, 20 μ g d'extrait protéique total de départ ont été comparés aux complexes immunoprécipités à partir de 300 μ g d'extrait protéique total de départ au cours d'un immunoblot utilisant des anticorps dirigés contre l' α -SMA, HDAC8, HDAC1 et HDAC3.

La lyse des cellules dans des tampons de lyse de stringence faible ou élevée a généré des résultats similaires (**Figure 18**). Inversement, nos tentatives pour démontrer que l' α -SMA co-immunoprécipite avec HDAC8 endogène sont restées sans succès parce que, en dépit de l'utilisation de divers anticorps anti-HDAC8, nous n'avons pas réussi à immunoprécipiter HDAC8. Pour rechercher une éventuelle association entre HDAC8 et une isoforme différente d'actine, les mêmes expériences d'immunoprécipitation ont été effectuées à l'aide d'un

anticorps monoclonal contre la β -actine, une isoforme d'actine ubiquitaire. Comme le montre la **Figure 19**, aucune des protéines suivantes α -SMA, HDAC8 ou HDAC3 n'a été détectée dans les immunocomplexes contenant de la β -actine. Des expériences de co-immunoprécipitation ont également été réalisées sur des lysats de tissus prostatiques humains normaux, qui, comme nous l'avons montré plus haut dans le texte, sont fortement enrichis en myofibroblastes exprimant HDAC8. La **Figure 20** montre clairement que, comme dans les HSMCs, HDAC8 endogène est associée à l' α -SMA dans le tissu prostatique normal ainsi que dans les cellules NIH-3T3, ce qui n'est pas le cas ni de HDAC1 ni de HDAC3.

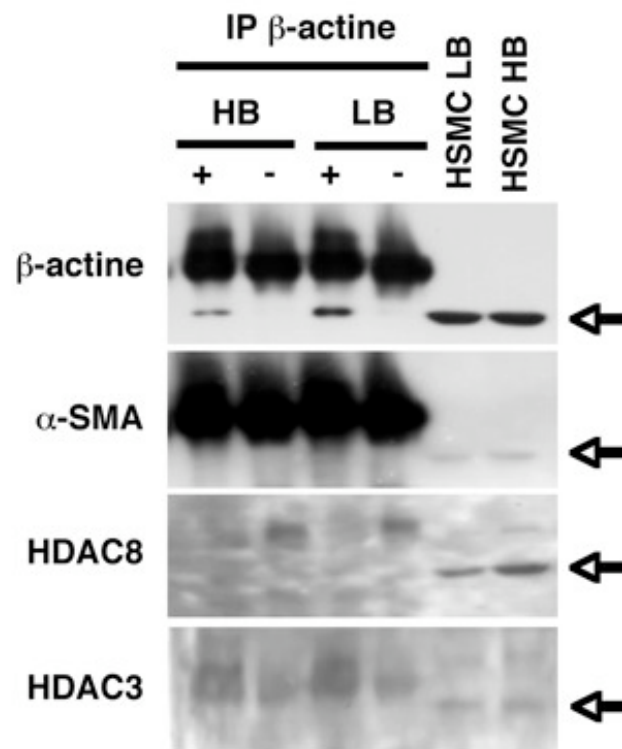


Figure 19 : HDAC8 ne s'associe pas à la β -actine dans les HSMCs.

Des HSMCs ont été lysées à froid dans du tampon de stringence faible (« *Low stringency Buffer* » ; LB) ou élevée (« *High stringency Buffer* » ; HB). Les extraits protéiques ont ensuite été immunoprécipités avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la β -actine. Les immunoprécipitations avec des IgG2a ont servi de contrôles négatifs. Pour chaque expérience, 20 μ g d'extrait protéique total de départ ont été comparés aux complexes immunoprécipités à partir de 300 μ g d'extrait protéique total de départ au cours d'un immunoblot utilisant des anticorps dirigés contre la β -actine, HDAC8 et HDAC3.

En outre, les immunocomplexes contenant l' α -SMA ne contiennent pas de niveau détectable de β -actine (**Figure 20**). Les expériences de co-immunoprécipitation réalisées avec l'anti- β -actine et les lysats de tissu de prostate n'ont permis de détecter ni HDAC8 ni l' α -SMA dans les immunoprécipitats (données non montrées). Enfin, les immunoprécipitations utilisant un anticorps monoclonal spécifique anti-SMMHC et des lysats soit de HSMCs soit de prostate humaine n'ont pas permis de détecter d'HDAC8 dans les immunocomplexes contenant de la SMMHC (données non montrées).

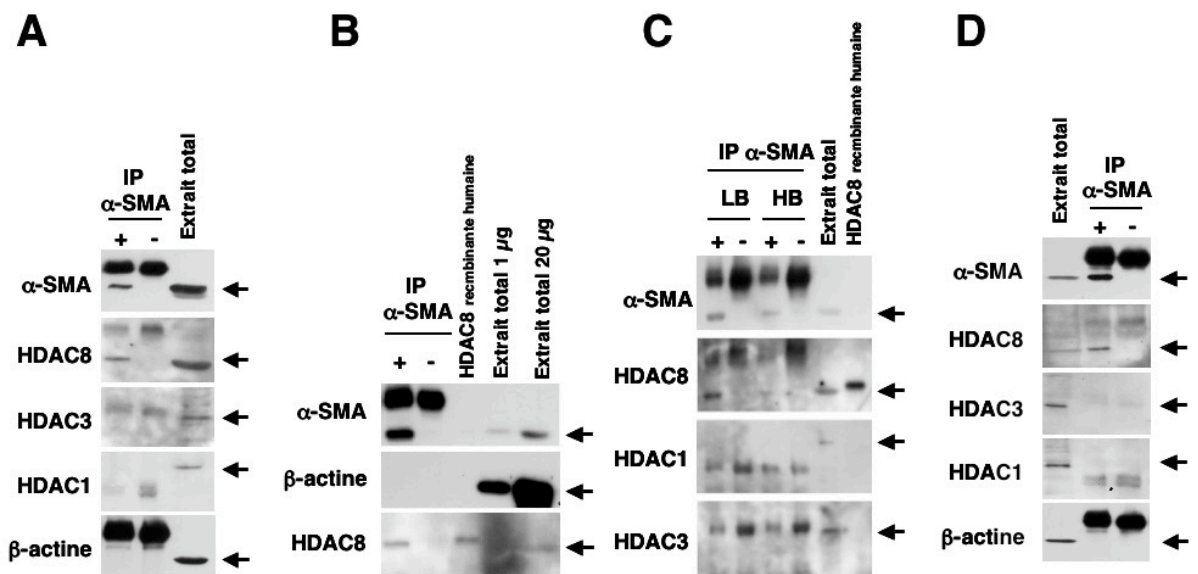


Figure 20 : HDAC8 s'associe avec l' α -SMA dans du tissu normal de prostate humaine et dans des NIH-3T3.

Des extraits protéiques de tissus de prostate humaine normale (trois exemples représentatifs sont montrés en **A**, **B** et **C**) et de NIH-3T3 (panneau **D**) ont subi une immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal anti- α -SMA ou IgG2a comme contrôle négatif. 20 μ g d'extraits totaux et les complexes immunoprécipités à partir de 300 μ g d'extraits totaux ont été analysés par immunoblot en utilisant des anticorps dirigés contre l' α -SMA, la β -actine, HDAC8, HDAC1 et HDAC3.

3.1.4. HDAC8 contribue à la capacité des cellules musculaires lisses de contracter des lattices de collagène

Notre démonstration d'une association entre HDAC8 et une protéine du cytosquelette du muscle lisse nous a menés à émettre l'hypothèse selon laquelle HDAC8 pourrait être impliquée dans la régulation de l'appareil contractile du muscle lisse. Pour explorer cette hypothèse, nous avons employé la technique des petits ARN interférents afin de déterminer l'impact d'une réduction de l'abondance HDAC8 sur la capacité des HSMCs de contracter des lattices de collagène de type I *in vitro*.

Des HSMCs primaires ont été transfectées avec deux siRNAs différents spécifiquement dirigés contre l'ARNm de HDAC8 : le siRNA HDAC8#1 a pour séquence cible une région 3' de l'ARNm d'HDAC8 en amont du codon stop, et le siRNA HDAC8#2, qui reconnaît une région 5' placée près du codon initiateur de la transcription. Pour déterminer la concentration efficace optimale de ces siRNAs, des HSMCs ont été transfectées avec les siRNAs HDAC8 aux concentrations finales de 0, 5, 20 ou 40 nM. Comme représenté à la **Figure 21A**, l'analyse par immunoblot de l'expression de HDAC8 dans ces cellules a indiqué que la réduction de l'abondance de HDAC8 dans les HSMCs par le siRNA HDAC8#1 est dépendante de la concentration en siRNAs, avec une réduction marquée à 20 nM et à 40 nM. La quantité de protéine β -actine n'a pas été affectée par les transfections aux diverses concentrations en siRNA HDAC8#1 (**Figure 21A**). Sur la base de ces résultats, toutes les transfections suivantes avec des siRNAs HDAC8 ont été exécutées à une concentration finale de 20 nM.

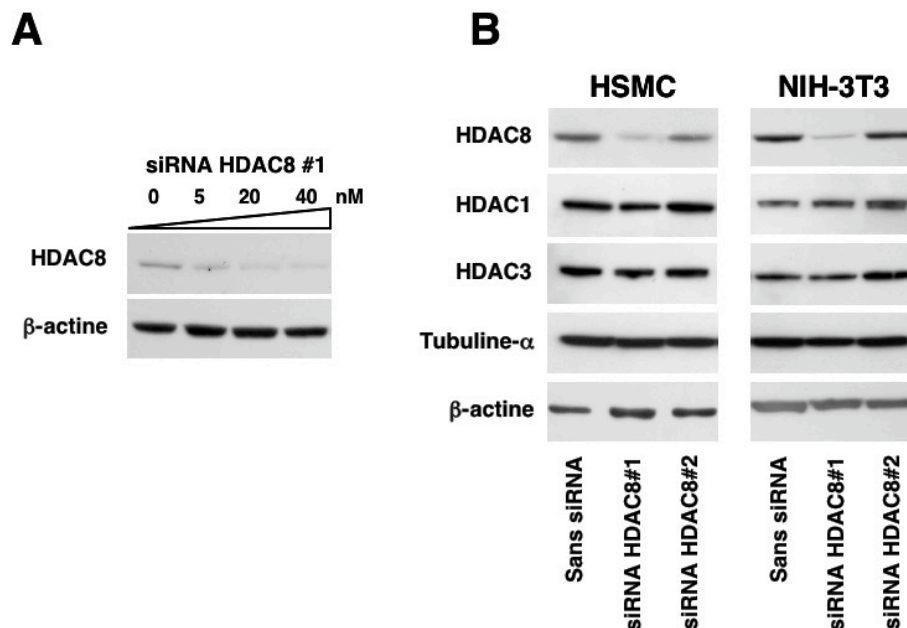


Figure 21 : Extinction spécifique et dépendante de la dose de l'expression de HDAC8 par interférence d'ARN.

(A) Des cellules musculaires lisses de veine de cordons ombilicaux humains (HSMCs) ont été transfectées durant 16h avec des siRNAs (#1) dirigés contre HDAC8 à des concentrations croissantes de 0, 5, 20 ou 40nM. Les cellules ont été lysées dans du tampon d'extraction protéique 48h après la fin de la transfection et l'expression de HDAC8 et de l' α -SMA a été analysée par immunoblot.

(B) Des HSMCs et des fibroblastes murins NIH-3T3 ont été transfectés trois fois sur une période de quatre jours sans siRNA (transfection avec le réactif de transfection mais le siRNA est remplacé par de l'eau), avec le siRNA HDAC8#1 ou avec le siRNA HDAC8#2. Les cellules ont été lysées dans du tampon d'extraction protéique 24h après la dernière transfection et leur expression en HDAC1, HDAC3, HDAC8, en tubuline- α et en β -actine a été analysée par immunoblot.

La transfection du siRNA HDAC8#1 est capable d'induire une diminution substantielle de l'expression de HDAC8 dans les HSMCs (**Figures 21A, 21B et 22B**) ainsi que dans les cellules NIH-3T3, qui expriment également HDAC8 (**Figure 21B**). Contrastant avec le siRNA HDAC8#1, les transfections avec le siRNA HDAC8#2 ne sont pas parvenues à réduire efficacement l'abondance d'HDAC8 dans ces lignées cellulaires (**Figures 21B et 22B**). Ainsi, parmi les deux siRNAs HDAC8 examinés, seul un d'entre eux a permis de diminuer de manière substantielle l'expression de la protéine HDAC8. Nous avons dès lors utilisé le siRNA HDAC8#2 comme un contrôle négatif additionnel en plus des transfections effectuées sans siRNA dans le milieu de transfection.

Afin de vérifier que les siRNAs HDAC8 induisent la dégradation spécifique des transcrits HDAC8, les cellules NIH-3T3 et HSMCs ont été transfectées avec le siRNA HDAC8#1 ou le siRNA HDAC8#2. Les niveaux d'expression d'autres HDACs de classe I (HDAC1 et HDAC3), qui partagent une forte homologie de séquence avec HDAC8, ont été évalués. Nous avons observé que, même après trois transfections sur une durée de quatre jours, les niveaux d'expression de HDAC1 et HDAC3 aussi bien que ceux des protéines cytosquelettiques β -actine et tubuline- α ne sont pas altérés par les transfections avec les siRNA HDAC8#1 ou #2 dans les cellules NIH-3T3 ou les HSMCs (**Figure 21B**).

Dans le but de déterminer si HDAC8 participe aux mécanismes qui confèrent une capacité contractile aux cellules musculaires lisses, des HSMCs ont été transfectées deux fois sur une période de 48 heures sans siRNA, avec les siRNAs HDAC8#1, HDAC8#2 ou avec un siRNA dirigé contre le transcrit de HDAC6. Quarante huit heures après la deuxième transfection, ces HSMCs ont été soit lysées dans du tampon d'extraction protéique pour analyse d'expression des protéines par immunoblot, soit incluses dans des lattices de collagène, ou encore déposées sur lames afin d'évaluer leur morphologie (**Figure 22A**).

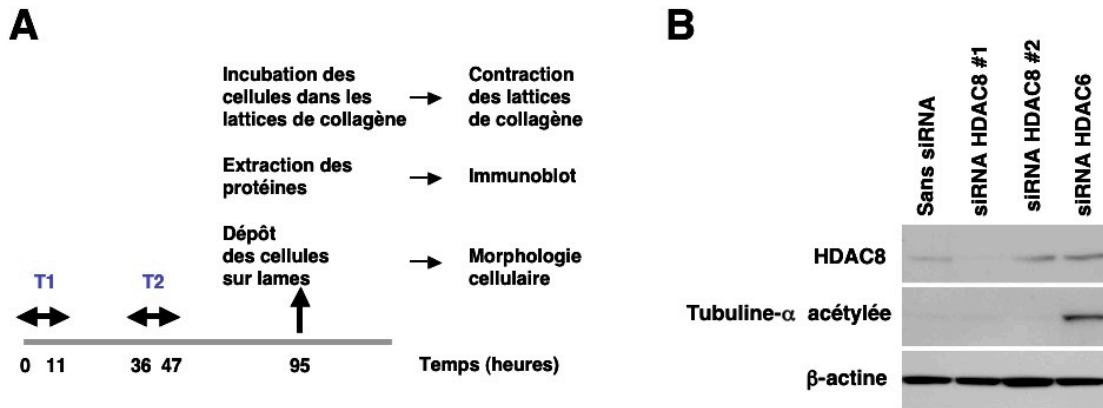


Figure 22 : (A) Représentation schématique du protocole utilisé pour évaluer l'impact de l'extinction de l'expression de HDAC8 (par interférence d'ARN) sur la morphologie et les capacités contractiles des HSMCs. Les HSMCs ont été transfectées deux fois (T1 et T2) sur une période de deux jours soit sans siRNA, soit avec les siRNAs HDAC8#1, HDAC8#2 ou HDAC6. Quarante-huit heures après la dernière transfection, les cellules ont été soit incubées dans des lattices de collagène afin de déterminer leur capacité de contracter les lattices, soit lysées dans du tampon d'extraction protéique et soumises à analyse par immunoblot (B) de leur contenu en HDAC8, tubuline- α acétylée et β -actine, soit déposées sur lames afin d'évaluer leur morphologie.

Nous avons analysé l'abondance en HDAC8 et le niveau d'acétylation de la tubuline- α dans les cellules par immunoblot. La lyse d'une partie des cellules pour l'analyse par immunoblot a été réalisée exactement au moment où une autre partie des cellules transfectées étaient incubées dans la solution de collagène, afin de vérifier que ces cellules présentaient une expression réduite des différents gènes ciblés par les siRNAs, au début de l'analyse de contraction des gels de collagène. La **Figure 21B** montre que la quantité de protéine HDAC8 a été diminuée seulement dans les cellules transfectées avec le siRNA HDAC8#1. Puisque HDAC6 est une déacétylase de la tubuline- α (Hubbert *et al.* 2002; Matsuyama *et al.* 2002; Haggarty *et al.* 2003; North *et al.* 2003) et puisqu'aucun des anticorps anti-HDAC6 disponibles dans notre laboratoire ne fonctionnait en immunoblot, l'efficacité de la diminution de HDAC6 par le siRNA HDAC6 a été indirectement déterminée en analysant la quantité de tubuline- α acétylée. Seules les HSMCs transfectées avec le siRNA spécifique de HDAC6 ont montré une augmentation du niveau de tubuline- α acétylée. Les niveaux de β -actine n'ont pas été influencés par les diverses transfections. Ces résultats indiquent que l'expression des HDACs ciblées était au moins partiellement éteinte au moment où les HSMCs ont été incubées dans les lattices de collagène. Nous avons alors comparé la capacité des cellules déplétées en HDAC8, déplétées en HDAC6, ou des cellules contrôle, de contracter les lattices de collagène dans lesquelles elles avaient été incubées.

La **Figure 23A** montre une image représentative de lattices de collagène photographiées 24 heures après le début de la rétraction. À ce moment, la surface moyenne des lattices contenant des HSMC transfectées avec le siRNA HDAC8#1 était 8 à 9 fois plus grande que la surface moyenne des lattices dans lesquelles avaient été incubées les HSMC transfectées sans siRNA ou avec le siRNA HDAC8#2 ; et 4.8 fois supérieure à la surface moyenne des lattices contenant des HSMC transfectées avec le siRNA HDAC6. Cette forte inhibition de la contraction obtenue avec les HSMCs transfectées avec le siRNA HDAC8 siRNA#1 a perduré sur une période de 6 jours (**Figure 23B**).

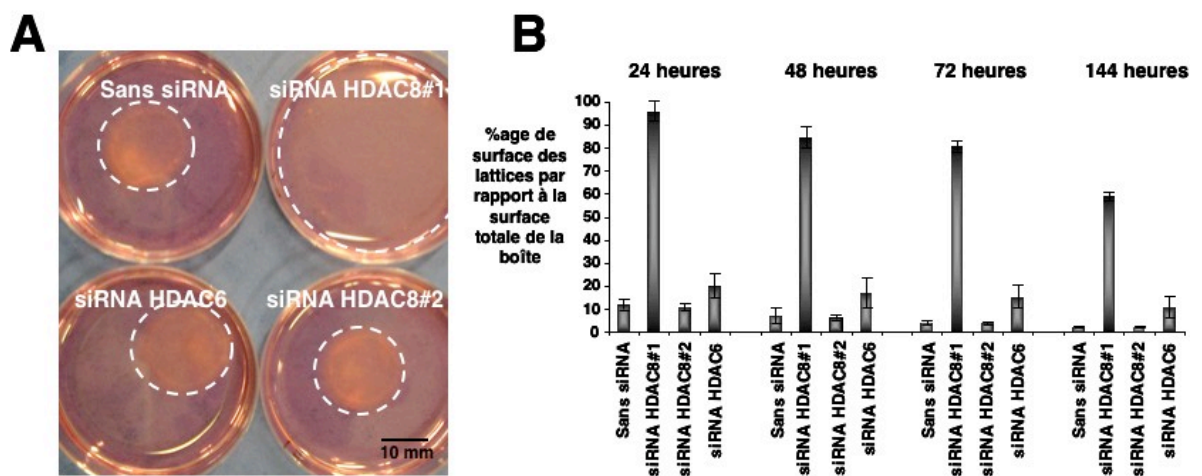


Figure 23 : L’extinction d’HDAC8 par interférence d’ARN altère la capacité des HSMCs de rétracter des lattices de collagène de type I.

Des HSMCs transfectées soit sans siRNA, soit avec les siRNAs HDAC8 ou HDAC6 ont été incubées dans une solution de collagène de type I, placées dans des boîtes de Pétri et incubées à 37°C, ce qui induit la polymérisation du collagène. Après une heure d’incubation, la lattice est détachée des bords de la boîte afin de permettre le début de sa rétraction par les cellules, cette rétraction a été observée pendant 144h. Pour chaque condition expérimentale, trois lattices ont été réalisées au minimum. (A) Photo représentative des lattices de collagène 24h après le début de la rétraction. (B) Surfaces des lattices exprimées en pourcentage de la surface totale de la boîte à différents temps. Les valeurs moyennes sont exprimées \pm l’écart type. Ces expériences ont été exécutées au moins trois fois et des résultats semblables ont été obtenus.

La morphologie des HSMC transfectées avec divers siRNAs a été évaluée avant et après leur dépôt sur lame, au moment de l’inclusion dans les lattices de collagène.

Avant de trypsiniser et de réinoculer les HSMCs, aucun changement évident de la morphologie cellulaire n'a été noté à l'examen microscopique. Les **Figures 24A** et **24B** montrent des microphotographies à faible et fort grossissement, respectivement, de HSMCs transfectées 48 heures après leur réinoculation. Les HSMCs transfectées sans siRNA, ou avec des siRNAs HDAC8#2 ou HDAC6 n’ont présenté à aucun moment après leur réinoculation

de modification évidente de forme ou de taille. Fait étonnant, les HSMCs transfectées avec le siRNA HDAC8#1 ont montré une nette réduction de taille et d'étalement.

Ces changements morphologiques ont été notés dès la première heure après la réinoculation et sont restés apparents durant approximativement une semaine. Ensuite, la morphologie cellulaire est redevenue semblable à celle des HSMCs transfectées sans siRNA (données non montrées). La survie des cellules a été étudiée en employant la technique de l'exclusion du bleu de trypan et n'a montré aucune différence dans le nombre de cellules vivantes ou mortes entre la condition sans siRNA et celle siRNA HDAC8#1, et ce, à différents temps avant et après la réinoculation (données non montrées).

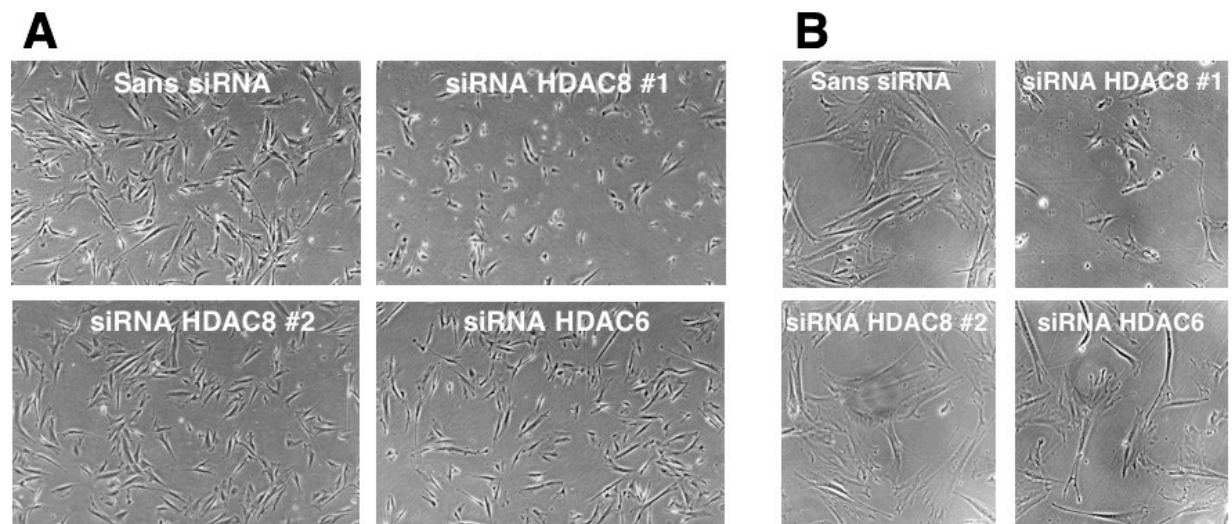


Figure 24 : Modification de la morphologie des HSMCs suite à l'extinction d'HDAC8 par interférence d'ARN.

Des HSMCs ont été transfectées deux fois sur une période de deux jours soit sans siRNA, soit avec les siRNAs HDAC8#1, HDAC8#2 ou HDAC6. Les cellules ont été trypsinisées 48h après la deuxième transfection et réinoculées dans des boîtes de culture en plastique afin d'évaluer leur morphologie cellulaire. Des photographies des cellules ont été prises à différents temps après leur ré-inoculation. Photos représentatives des HSMCs transfectées, comme indiqué, 48h après leur ré-inoculation : **(A)** à faible grossissement, **(B)** à fort grossissement.

3.1.5. Altération de l'expression de HDAC8 au niveau de la paroi musculaire de segments intestinaux atteints de troubles sévères de la motilité

A la lumière de nos résultats indiquant que HDAC8 pourrait participer à la biologie des cellules musculaires lisses et à la régulation de la dynamique du cytosquelette musculaire lisse, il nous a semblé intéressant d'étudier l'expression d'HDAC8 dans des pathologies caractérisées par des troubles affectant le fonctionnement du muscle lisse. C'est pourquoi, en collaboration avec des collègues de l'institut de Neurophysiologie de l'Université Libre de Bruxelles, de l'Université de Lübeck (Allemagne) et de l'Université de Maastricht (Pays-Bas), nous avons étudié par immunohistochimie la distribution d'expression de marqueurs musculaires lisses, incluant HDAC8, l' α -SMA et la SMMHC, dans des segments intestinaux présentant des troubles sévères de motilité (Wedel *et al.* 2006).

Les troubles de la motilité gastro-intestinale comprennent un large éventail de pathologies. Parmi les troubles de la motilité gastro-intestinale, les neuropathies entériques congénitales, dégénératives ou inflammatoires et les altérations des cellules interstitielles de Cajal ont été intensivement étudiées (Rumessen *et al.* 2003; De Giorgio *et al.* 2004; Schemann *et al.* 2004). Les cellules interstitielles de Cajal sont le « *pacemaker* » du tractus gastro-intestinal. Elles génèrent spontanément des influx électriques qui se transmettent aux cellules musculaires lisses, induisent leur contraction en vagues lentes et donc le péristaltisme (Sanders *et al.* 2006). A l'inverse, les anomalies de l'effecteur lui-même, c.-à-d. de la musculature entérique, ont rarement été considérées dans les dysfonctionnements moteurs du tractus gastro-intestinal (Gattuso *et al.* 1997; Smith *et al.* 1997; Knowles *et al.* 2004 4708).

Les échantillons utilisés dans notre étude ont été obtenus à partir de patients atteints de maladie de Hirschsprung (une maladie caractérisée par l'absence héréditaire de certaines cellules nerveuses du côlon, ce qui cause une constipation chronique (Worman *et al.* 1995)), de mégacôlon idiopathique et de constipation à transit lent. Ils nous ont permis de démontrer qu'en plus des altérations bien connues du système nerveux entérique et des cellules interstitielles de Cajal, ces désordres de la motilité colorectale sont aussi fréquemment associés à des altérations de l'appareil contractile musculaire lisse lui-même.

Ainsi, tandis que les cellules musculaires lisses de tous les échantillons malades (à l'exception d'un cas de mégacôlon idiopathique et deux cas de constipation à transit lent) ont montré un immunomarquage α -SMA normal, les autres marqueurs musculaires lisses ont

fréquemment présenté un niveau d'expression réduit. Le pourcentage des échantillons présentant un marquage anormal pour au moins un des deux marqueurs suivants, HDAC8 ou la SMMHC, était de 80% pour la maladie de Hirschsprung, de 75% pour le mégacôlon idiopathique et de 61% pour la constipation à transit lent (**Tableau 5**).

Tableau 5: Analyse histologique et immunohistochimique de l'expression de marqueurs musculaires lisses au niveau de segments colorectaux humains atteints de troubles sévères de motilité

Diagnostic	Cas	HE/TM du Muscle lisse	Marqueurs musculaires lisses		
			Immunoréactivité anti α -SMA	Immunoréactivité anti HDAC8	Immunoréactivité anti SMMHC
Maladie de Hirschsprung	1	Normale	Normale	Normale	Normale
	2	Normale	Normale	Normale	Normale
	3	Normale	Normale	Perte (CML)*	Normale
	4	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)	Perte (CMC+CML)
	5	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC)*
	6	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)	Perte (CMC+CML)*
	7	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)	Perte (CMC+CML)*
	8	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)	Perte (CMC+CML)*
	9	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)	Perte (CMC+CML)*
	10	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)	Perte (CMC+CML)*
Mégacôlon idiopathique	1	Normale	Normale	Normale	Normale
	2	Normale	Normale	Normale	Normale
	3	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)*
	4	Normale	Normale	Perte (CML)*	Perte (CMC+CML)*
	5	Normale	Normale	Perte (CML)*	Perte (CMC+CML)
	6	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)*
	7	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)
	8	Normale	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)*
Constipation à transit lent	1	Normale	Normale	Normale	Normale
	2	Normale	Normale	Normale	Normale
	3	Normale	Normale	Normale	Normale
	4	Normale	Normale	Normale	Normale
	5	Normale	Normale	Perte (CML)*	Normale
	6	Normale	Normale	Normale	Normale
	7	Normale	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)*
	8	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)
	9	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)	Perte (CMC+CML)
	10	Normale	Normale	Perte (CMC)	Perte (CMC)
	11	Normale	Normale	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)*
	12	Normale	Perte (CML)*	Perte (CMC+CML)*	Perte (CMC+CML)*
	13	Normale	Perte (CML)*	Perte (CML)*	Perte (CMC+CML)*

TM, Trichrome de Masson ; HE, Hématoxyline/éosine; CMC, couche musculaire circulaire ; CML, couche musculaire longitudinale ; *, perte focale

Dans la grande majorité des cas, la perte ou la réduction de l'immunoréactivité a été observée dans les deux couches de la paroi musculaire, tandis que de telles anomalies limitées à la couche musculaire circulaire ou à la couche musculaire longitudinale ont été moins fréquemment trouvées (**Tableau 5**).

Remarquons que, dans tous les échantillons, indépendamment du type de trouble de la motilité colorectale étudié et indépendamment du motif d'immunomarquage observé, les

vaisseaux sanguins présents dans la paroi intestinale ainsi que les fibres musculaires lisses de la muscularis mucosae exprimaient de manière uniforme l' α -SMA, la SMMHC et HDAC8. Cette observation élimine l'hypothèse selon laquelle les altérations de marquages que nous avons observées auraient pu être artéfactuelles, liées à une manipulation incorrecte des tissus ou à une mauvaise fixation de ceux-ci.

3.1.6. Discussion

Des études antérieures, portant sur l'analyse par Northern blot d'ARN totaux extraits à partir de tissus, ont suggéré que HDAC8 serait exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules humaines (Buggy *et al.* 2000; Hu *et al.* 2000; Van den Wyngaert *et al.* 2000), avec comme corollaire que l'activité de déacétylation de cette enzyme est nécessaire à tous les types cellulaires. Nos premiers travaux invalident, dans une certaine mesure, ces hypothèses. En effet, nous avons démontré que l'expression de la protéine HDAC8 est limitée à un type spécifique de cellules humaines qui partagent un phénotype commun : la différenciation musculaire lisse. Ce type de cellules spécialisées inclut les cellules musculaires lisses viscérales et vasculaires ainsi que les cellules myoépithéliales et certains myofibroblastes. Ainsi, nos données indiquent clairement que, pour l'étude de la distribution d'expression d'un gène particulier, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine pour lesquels il code, les techniques appliquées à des extraits totaux de tissus ou d'organes comportent de sérieuses limitations. Dans ce contexte, l'immunohistochimie reste probablement la seule stratégie définitive pour élucider la localisation précise de l'expression d'une protéine spécifique chez l'humain. Cette technique nous a permis de démontrer qu'au lieu d'être exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules humaines, HDAC8 est un nouveau marqueur de la différenciation musculaire lisse.

Il est connu depuis plus de 15 ans que les cellules myoépithéliales expriment, à l'instar des cellules musculaires lisses vasculaires et viscérales, l'isoforme α de la SMA et la SMMHC, deux protéines majeures des complexes d'actine-myosine du muscle lisse (Longtine *et al.* 1985; Skalli *et al.* 1986; Benzonana *et al.* 1988; Gugliotta *et al.* 1988). Nous avons démontré que les cellules myoépithéliales de toutes les glandes analysées contenant de telles cellules, en ce compris les glandes mammaires, trachéo-bronchiques, salivaires et sudoripares, co-expriment également HDAC8. En outre, nous avons constaté que HDAC8 est exprimée par des myofibroblastes résidant dans certains tissus humains normaux, mais pas dans tous.

En effet, nous avons observé que l'enzyme est présente dans les myofibroblastes des septa alvéolaires du poumon, les cellules stromales de la prostate, les cellules réticulaires de la rate, les cellules de la thèque externe de l'ovaire, les cellules myoïdes péri-tubulaires du testicule et les myofibroblastes intestinaux sous-épithéliaux. Fait intéressant, nous avons montré que ces cellules myofibroblastiques co-expriment l' α -SMA et la SMMHC. L'expression de ces deux dernières protéines avait été précédemment décrite (Amsterdam *et al.* 1977; Leslie *et al.* 1990; Walles *et al.* 1990; Schmitt-Graff *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1996; Jostarndt-Fogen *et al.* 1998; Powell *et al.* 1999). D'autre part, aucun niveau discernable d'expression de HDAC8 n'a été détecté dans les cellules réticulaires du thymus, dans les cellules stromales du sein, dans les cellules stellaires périacinaires du pancréas, dans les cellules stellaires péricinusoïdales (d'Ito) du foie ni dans les cellules mésangiales du rein. Ces myofibroblastes, n'exprimant pas HDAC8, n'expriment pas non plus l' α -SMA ou la SMMHC (Longtine *et al.* 1985; Skalli *et al.* 1986; Benzonana *et al.* 1988; Ramadori *et al.* 1990; Nouchi *et al.* 1991; Schmitt-Graff *et al.* 1991; Rockey *et al.* 1992; Elger *et al.* 1993; Lazard *et al.* 1993; Apte *et al.* 1998). Ainsi, collectivement, ces observations suggèrent que la co-expression de HDAC8, de l' α -SMA et de la SMMHC pourrait permettre d'identifier des sous-groupes de myofibroblastes résidant spécifiquement dans certains tissus humains normaux.

Nos observations originales incluent également que HDAC8, une HDAC de classe I, est principalement détectée dans le cytoplasme des cellules musculaires lisses plutôt que dans le noyau, et ce tant *in vivo* que *in vitro*. Notre observation d'une localisation principalement cytoplasmique de cette enzyme contraste avec les résultats d'une étude antérieure qui a montré qu'une construction HDAC8 humaine taguée par un épitope myc N-terminal et transfectée transitoirement dans des cellules NIH-3T3 n'est exprimée que dans le noyau des cellules (Hu *et al.* 2000). Ces différences de localisation intracellulaire pourraient s'expliquer par des modifications de conformation de la protéine taguée en N-terminal, empêchant ainsi sa localisation cytoplasmique. En effet, un autre groupe a trouvé qu'une construction HDAC8 taguée en C-terminal est observable tant dans le noyau que dans le cytoplasme de cellules HEK293 (Van den Wyngaert *et al.* 2000). Nos cellules NIH-3T3 transfectées avec une construction HDAC8 taguée par l'épitope V5 en C-terminal montrent une expression de la protéine exogène dans le cytoplasme et dans le noyau. Cette distribution intracellulaire de HDAC8 exogène dans ces cellules était semblable à celle de l'enzyme endogène, comme indiqué par les résultats de nos expériences de fractionnement nucléocytoplasmique et d'immunocytochimie. Nous concluons donc que HDAC8 est une HDAC principalement

cytoplasmique. Cette observation n'est pas sans précédent pour une HDAC de classe I puisque HDAC3 peut être également cytoplasmique et contient un signal d'exportation nucléaire dans sa portion centrale (Yang *et al.* 2002; Takami *et al.* 2000). Dans le cas de HDAC8, il n'a pas encore été déterminé si cette protéine possède également ou non un motif d'exportation nucléaire. Nous avons donc démontré pour la première fois que HDAC8, une HDAC principalement cytoplasmique, est un nouveau marqueur de la différenciation musculaire lisse.

Nous avons ensuite réalisé des expériences d'immunomarquage en fluorescence suivi d'une analyse en microscopie confocale, et montré que HDAC8 taguée d'un épitope et surexprimée dans des cellules NIH-3T3 a une distribution d'expression intracytosolique semblable à celle des fibres de stress et co-localise avec l' α -SMA. Suite à cette observation, nous avons voulu déterminer si HDAC8 s'associe au cytosquelette d'actine. Nos expériences initiales de fractionnement cellulaire ont montré que, par opposition à HDAC1 et à HDAC3, HDAC8 peut être co-purifiée avec l' α -SMA et la β -actine et qu'elle peut être libérée du culot non soluble dans les détergents après dépolymérisation de l'actine-F. Ces résultats suggèrent que HDAC8 pourrait s'associer au cytosquelette d'actine, et en particulier avec sa forme filamenteuse. L'actine-F est généralement associée à la fraction que les détergents non ioniques ne peuvent dissoudre, et son association avec d'autres protéines ne peut pas toujours être aisément détectée par co-immunoprécipitation. Cependant, la co-immunoprécipitation d'une protéine spécifique avec l'actine dans des extraits cellulaires lysés à l'aide du Triton X-100 ou du NP-40 n'exclut pas la possibilité que cette protéine puisse se lier efficacement à la forme filamenteuse de l'actine (Hazan *et al.* 1998; Ruzanov *et al.* 1999; Niessen *et al.* 2004). En effet, il a été montré que la fraction soluble dans les détergents non ioniques contient aussi bien de l'actine globulaire (actine-G) que de l'actine-F (Forte *et al.* 1998) et la co-immunoprécipitation à partir d'extraits contenant du NP-40 ou du Triton X-100 a été précédemment employée pour détecter l'interaction de protéines spécifiques avec l'actine-F (Hazan *et al.* 1998; Sadekova *et al.* 2000). Il est probable que de courts fragments d'actine-F, qui résultent soit d'un arrêt précoce de la polymérisation, soit de la dégradation mécanique de l'actine-F pendant l'extraction, se trouvent en solution et permettent la détection de complexes contenant de l'actine-F soluble (Pollard *et al.* 1982; Pollard *et al.* 1986; Hazan *et al.* 1998). Nos expériences de co-immunoprécipitation ont démontré que HDAC8 s'associe à l'isoforme musculaire lisse de l'actine- α dans des lysats protéiques de cellules musculaires lisses humaines primaires, de cellules NIH-3T3 et de tissus de prostate humaine. Aucune

association n'a été trouvée entre HDAC8 et la β -actine, une isoforme d'actine ubiquitaire. En outre, ni HDAC1 ni HDAC3, deux autres HDACs de classe I, n'ont été détectées dans les immunocomplexes contenant de l' α -SMA, ce qui fait supposer que HDAC8 interagit uniquement et spécifiquement avec le cytosquelette du muscle lisse.

Récemment, Durst *et al.* ont démontré que la protéine de fusion résultant de l'inversion (16) s'associe spécifiquement à HDAC8 (Durst *et al.* 2003). Cette inversion (16) est une translocation chromosomique fréquemment trouvée dans la leucémie myéloïde aiguë. Elle entraîne la fusion des 165 premiers acides aminés du CBF- β (« *Core Binding Factor β* ») à la région terminale de la SMMHC. L'interaction de cette protéine de fusion avec HDAC8 se fait via un domaine de la partie C-terminale de la SMMHC. En outre, il a précédemment été montré que, dans des cellules NIH-3T3 transfectées avec le plasmide contenant l'ADNc complet de la protéine de fusion CBF- β -SMMHC, cette protéine de fusion est distribuée dans le cytoplasme sous la forme de filaments semblables aux fibres de stress et que cette protéine co-localise avec les filaments d'actine (Wijmenga *et al.* 1996). Cependant, la possibilité d'une association entre HDAC8 et la protéine cytosquelettique SMMHC n'a pas été examinée. Nous avons voulu déterminer si HDAC8 pourrait co-immunoprécipiter avec la SMMHC. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu montrer une telle interaction. Cependant, la possibilité d'une association entre HDAC8 et la SMMHC ne peut pas être éliminée puisque, par exemple, l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation pourrait avoir entravé l'interaction entre ces deux protéines.

Afin d'étudier les fonctions potentielles de HDAC8 dans la biologie des cellules de phénotype musculaire lisse, nous avons utilisé des petits ARN interférents dirigés contre le transcrit HDAC8. Nous avons vérifié que ces siRNAs ne génèrent pas de réponse interféron (Scacheri *et al.* 2004) en observant par RT-PCR que le niveau du transcrit d'OAS1 (« *2'5'-oligoadenylate synthetase 1* ») n'est pas augmenté (données non montrées). Après réinoculation, les HSMCs déplétées en HDAC8 ont montré une réduction marquée de leur taille ainsi qu'un étalement diminué, tandis que la condition contrôle et les cellules transfectées avec un siRNA HDAC6 n'ont exhibé aucune modification évidente de leur forme ou de leur taille à aucun moment avant ou après réinoculation. Les changements induits par la diminution de HDAC8 dans les cellules musculaires lisses n'ont été détectables qu'après trypsinisation et ré-inoculation des cellules. Cette observation suggère que HDAC8 pourrait réguler, peut-être via son interaction avec la protéine cytosquelettique α -SMA, le remodelage dynamique plutôt que statique du cytosquelette du muscle lisse, et que HDAC8 pourrait être

impliquée dans les mécanismes responsables de l'étalement de ces cellules. Cette participation pourrait expliquer, au moins en partie, les capacités réduites des HSMCs déplétées en HDAC8 de rétracter des gels de collagène. Des études additionnelles seront nécessaires pour évaluer plus précisément à quel niveau HDAC8 intervient et si son activité de déacétylase est nécessaire au bon fonctionnement de ces complexes d'acto-myosine musculaire lisse. À cet égard, il est intéressant de remarquer que HDAC6, une HDAC de classe II, et SIRT2, une HDAC de classe III, ont été récemment décrites comme capable de déacétyler la tubuline- α acétylée et de favoriser les mouvements chimiotactiques des cellules (Hubbert *et al.* 2002; Matsuyama *et al.* 2002; Haggarty *et al.* 2003; North *et al.* 2003). En outre, des études récentes ont montré que la stabilité des microtubules affecte des phénomènes dépendant de l'actine comme la morphologie et la mobilité cellulaires, en activant les petites GTPases Rac-1 et Rho (Kaverina *et al.* 1999; Waterman-Storer *et al.* 1999). Ainsi, comme nous l'avons observé, il n'est pas étonnant que l'acétylation accrue de la tubuline- α , suite à une diminution de HDAC6 dans les HSMCs, puisse également altérer partiellement leur capacité de rétracter des gels de collagène.

L'idée qu'HDAC8 puisse être impliquée dans le remodelage du cytosquelette musculaire lisse est encore renforcée par l'observation d'altérations de son niveau d'expression dans les couches musculaires lisses de segments colorectaux présentant des troubles sévères de leur motilité. Nous avons en effet observé des anomalies importantes du profil d'expression des marqueurs musculaires lisses HDAC8 et SMMHC, dans les couches musculaires de ces segments intestinaux. Ces anomalies pourraient refléter une constitution anormale de l'appareil contractile des cellules musculaires lisses, qui seraient clairement distinctes des principaux processus dégénératifs précédemment décrits dans les myopathies viscérales (Schuffler *et al.* 1977; Mitros *et al.* 1982; Fitzgibbons *et al.* 1987; Alstead *et al.* 1988; Gattuso *et al.* 1997; Cheng *et al.* 2001; Moore *et al.* 2002) ou dans les lésions inflammatoires (Nezelof *et al.* 1985; Ginies *et al.* 1996; Ruuska *et al.* 2002).

Les mécanismes responsables de la perte ou de la réduction d'expression extensive ou focale d'HDAC8 et de la SMMHC dans les couches musculaires des segments colorectaux atteints dans la maladie de Hirschsprung, le mégacôlon idiopathique et la constipation à transit lent, restent à élucider. Il reste également à déterminer si la perte d'expression des marqueurs musculaires lisses HDAC8 et SMMHC est la cause ou la conséquence des troubles de la motilité intestinale.

Sur la base de tous les résultats que nous avons rapportés ci-dessus, nous proposons l'hypothèse selon laquelle HDAC8 pourrait exercer ses effets par une activité de déacétylation principalement cytosolique affectant probablement la fonction d'une ou de plusieurs protéines cytosquelettiques du muscle lisse. Néanmoins, à ce jour, il ne peut être exclu que HDAC8 puisse aussi avoir une activité de régulation épigénétique de l'expression des gènes. D'autres études seront nécessaires pour aborder cette question. A ce sujet, précisons que des résultats contradictoires ont été rapportés en ce qui concerne la capacité de HDAC8 à déacétyler les histones. Hu *et al.* ont montré que HDAC8 exprimée dans des cellules HEK293 présente une activité de déacétylase envers les histones acétylés, et que cette activité peut être inhibée par la TSA (Hu *et al.* 2000). De plus, ils ont observé dans des expériences de co-transfection que HDAC8 réprime l'activité du promoteur viral précoce SV40. Enfin, ils ont observé que la protéine HDAC8 recombinante humaine exprimée dans des bactéries puis purifiée est active envers les histones acétylés H3 et H4. Cela suggère que HDAC8 pourrait être active en l'absence de cofacteurs et sans aucune des modifications post-traductionnelles qui se produisent dans les cellules eucaryotes. Buggy *et al.* ont montré qu'une HDAC8 humaine taguée FLAG et purifiée à partir de cellules d'insectes Sf9 est capable de déacétyler un peptide radio-acétylé de l'histone H4 (Buggy *et al.* 2000). Cette déacétylation est empêchée tant par le butyrate de sodium que par la TSA. Van den Wyngaert *et al.* ont généré un clone de HEK293 qui exprime de manière stable HDAC8 à des niveaux cinq à six fois supérieurs à ceux de cellules non transfectées (Van den Wyngaert *et al.* 2000). Des extraits totaux de ce clone présentent une activité de déacétylation accrue en comparaison aux cellules contrôle transfectées avec le vecteur vide. Cependant, il n'a été observé aucune modification du niveau d'acétylation des histones entre les cellules transfectées avec le vecteur vide ou celles exprimant HDAC8. De plus, HDAC8 immunoprécipitée n'a montré aucune activité déacétylase significative. D'autre part, Hu *et al.* ont récemment synthétisé un inhibiteur spécifique d'HDAC8, le SB-379278-A. Ce composé n'est capable ni d'augmenter l'acétylation des histones de cellules traitées, ni d'induire l'activation d'un promoteur précoce SV40 (Hu *et al.* 2003). Sur la base de l'organisation particulière de la poche catalytique de HDAC8, une autre équipe a synthétisé un inhibiteur réputé spécifique de HDAC8. Ce composé n'induit pas non plus de modification des niveaux d'acétylation des histones (Krennhrubec *et al.* 2007). Collectivement, ces résultats suggèrent que le(s) substrat(s) physiologique(s) de HDAC8 pourraient être des protéines autres que des histones.

En conclusion, nos travaux ont démontré que (1) HDAC8 est exprimée spécifiquement dans les cellules de phénotype musculaire lisse, (2) l'enzyme co-purifie et s'associe avec l' α -SMA tant *in vitro* que *in vivo*, (3) l'extinction forcée de son expression par interférence d'ARN diminue fortement les capacités de cellules musculaires lisses humaines de contracter des lattices de collagène et (4) son expression est altérée au niveau des couches musculaires lisses de la paroi de segments intestinaux atteints de troubles sévères de motilité. Ensemble, ces observations nous ont permis de suggérer que HDAC8 pourrait être impliquée dans la régulation du cytosquelette musculaire lisse. De plus, nos résultats à la lumière de certaines données de la littérature indiquent que HDAC8 pourrait déacétyler un ou plusieurs substrats cytosoliques, potentiellement associés à l'appareil contractile musculaire lisse.

3.2. Rôle des HDACs dans le processus de différenciation myofibroblastique

Nos résultats démontrant que HDAC8 est un nouveau marqueur du phénotype musculaire lisse nous ont amenés à nous interroger sur la régulation de l'expression de cette enzyme au cours du processus de différenciation musculaire lisse. Dans ce contexte, nous avons recherché un modèle de différenciation musculaire lisse *in vitro* au cours duquel une cellule mésenchymateuse 'souche' peut être induite à se différencier en cellule musculaire lisse. Etant donné qu'un tel modèle n'est actuellement pas disponible, nous avons choisi d'utiliser un modèle alternatif, celui de la différenciation myofibroblastique induite *in vitro* par le TGF β 1 (« *Transforming Growth Factor β 1* »). Dans ce modèle alternatif, sous la pression du facteur de croissance, les fibroblastes se transforment en myofibroblastes qui acquièrent des caractéristiques phénotypiques de cellules musculaires lisses (Roberts *et al.* 1986; Desmouliere *et al.* 1993; Ronnov-Jessen *et al.* 1993).

Nos précédents travaux ont démontré que les fibroblastes humains normaux *in vivo* n'expriment pas de niveau détectable de HDAC8, tandis que l'enzyme est détectée dans certains myofibroblastes humains normaux. Ainsi, notre hypothèse était que le processus de différenciation myofibroblastique déclenché par le TGF β 1 pourrait être associé à une induction de l'expression d'HDAC8 dans les fibroblastes se transformant en myofibroblastes. A l'instar des fibroblastes humains *in vivo*, les fibroblastes primaires de peau humaine que nous avons utilisés *in vitro* n'expriment qu'un très faible niveau d'HDAC8 détectable par

immunoblot (**Figure 13A**), immunocyto marquage (**Figure 13D**) et RT-PCR en temps réel (**Figure 27A**). Dans les conditions expérimentales que nous avons employées, le TGF β 1 n'a pas induit d'augmentation de l'expression de la protéine HDAC8 détectable par immunoblot, immunocyto marquage (données non montrées) ou de son transcrite par RT-PCR en temps réel (**Figure 27A**). Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que HDAC8 est un marqueur « tardif » ou « terminal » du phénotype musculaire lisse, alors que, lors de l'induction du phénotype myofibroblastique *in vitro* par le TGF β 1, les caractéristiques musculaires lisses sont récemment acquises, incomplètes et réversibles (Desmouliere *et al.* 1993; Powell *et al.* 1999; Gabbiani 2003).

Malgré l'absence d'induction d'HDAC8 par le TGF β 1 dans les fibroblastes traités et parce que la différenciation myofibroblastique induite par cette molécule est cruciale dans de nombreux contextes physiologiques et pathologiques tels que l'inflammation (Smith *et al.* 2006), la cicatrisation (Lygoe *et al.* 2007), la fibrose (Liu 2004) et le cancer (Casey *et al.* 2007), nous avons décidé de nous intéresser à l'implication des HDACs dans ce processus.

Le TGF β 1 fait partie d'une grande famille de facteurs de croissance qui régulent un large éventail de processus biologiques. Ils exercent leurs fonctions aussi bien au cours de l'embryogenèse que chez l'adulte, en orchestrant des phénomènes complexes tels que l'inflammation, la réparation tissulaire et la transformation/progression néoplasique (Verrecchia *et al.* 2002). Les diverses activités du TGF β 1 incluent, entre autres, l'inhibition ou la stimulation, en fonction du contexte, de la prolifération cellulaire, le contrôle de la synthèse et de la dégradation de la matrice extracellulaire (« *ExtraCellular Matrix* »; ECM), le contrôle de la transition épithélio-mésenchymateuse, la médiation des réponses cellulaires et tissulaires lors d'une blessure, le contrôle de la carcinogenèse, et la régulation des fonctions immunitaires. Le TGF β 1 est suffisant pour induire la génération du tissu de granulation et l'angiogenèse *in vivo*, et, en stimulant la différenciation myofibroblastique, il contribue à la pathobiologie des maladies fibrotiques chroniques (Roberts *et al.* 1986; Desmouliere *et al.* 1993; Ronnov-Jessen *et al.* 1993).

Il est bien connu que les cellules mésenchymateuses sont capables de se transformer en myofibroblastes au cours de la réparation des tissus et dans plusieurs conditions pathologiques. C'est le cas dans les maladies fibrocontractiles (par exemple la maladie de Dupuytren ou la cicatrisation hypertrophique), la fibrose (par exemple la cirrhose), et la réaction stromale lors de la croissance et de l'invasion tumorale (Powell *et al.* 1999; Gabbiani 2003). Une des caractéristiques principales des myofibroblastes est de posséder un appareil

contractile important (Gabbiani *et al.* 1971), et en particulier de synthétiser *de novo* l' α -SMA (Skalli *et al.* 1986). Les myofibroblastes présentent en effet une morphologie et un fonctionnement biochimique intermédiaires entre les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Ils jouent un rôle central dans la fermeture des blessures tissulaires, grâce à leur importante capacité contractile (Grinnell 1994; Ronnov-Jessen *et al.* 1996; Powell *et al.* 1999) (Serini *et al.* 1999). En fait, en plus d'être un marqueur bien connu de la différenciation myofibroblastique, l' α -SMA s'est avérée suffisante pour augmenter les capacités contractiles des fibroblastes (Hinz *et al.* 2001; Hinz *et al.* 2002).

La différenciation myofibroblastique causée par le TGF β 1 s'accompagne de changements de l'expression de nombreuses protéines, y compris des protéines cytosquelettiques (par exemple l' α -SMA), des protéines de la matrice extracellulaire (par exemple les collagènes de type I et III, la fibronectine, et des protéoglycans tels que le versican), et des protéines empêchant la dégradation de la matrice extracellulaire (par exemple PAI-1 (« *Plasminogen Activator Inhibitor-1* »), Timp-1 (« *Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1* »)) (Powell *et al.* 1999; Gabbiani 2003). Le TGF β 1 exerce ses activités biologiques principalement par la régulation de la transcription de divers gènes. La liaison de ce facteur de croissance à ses récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase entraîne la phosphorylation des protéines corégulatrices Smad2 et Smad3 par ces récepteurs. Celles-ci forment alors des hétérodimères avec Smad4, et migrent vers le noyau. Là elles rejoignent d'autres facteurs de transcription dans de larges complexes régulateurs de la transcription génique (Heldin *et al.* 1997; Derynck *et al.* 1998; Wotton *et al.* 2001). Le TGF β 1 peut engendrer diverses réponses en raison de l'interaction, dans le noyau, des complexes Smad avec différentes protéines qui peuvent être spécifiques à un type cellulaire particulier et à un ensemble donné de conditions environnementales (Massague *et al.* 2000). Précédemment il a été suggéré que le niveau cellulaire total des facteurs co-activateurs et co-répresseurs transcriptionnels Smad joue un rôle critique dans le contrôle et la régulation fine des réponses biologiques au TGF β 1 (Wotton *et al.* 2001). Ces cofacteurs régulateurs peuvent fonctionner en recrutant des activités HAT et HDAC aux promoteurs cibles (Massague *et al.* 2000; Izutsu *et al.* 2001; Long *et al.* 2003). Ainsi, la modulation de l'expression de certains gènes associés à la différenciation myofibroblastique médiée par le TGF β 1 semble être régulée de manière épigénétique, par des modifications des niveaux d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN. Des données récentes ont également démontré que des HATs et des HDACs peuvent moduler les

niveaux d'acétylation de certaines protéines Smad, et par conséquent influencer leur activité transcriptionnelle (Kume *et al.* 2007).

Antérieurement, plusieurs études ont suggéré que la suppression globale des activités HDAC par des inhibiteurs ciblant à la fois les classes I et II, pourrait empêcher deux processus importants se produisant au cours de la cicatrisation : l'angiogenèse (Kim *et al.* 2001; Deroanne *et al.* 2002) et la fibrogenèse induite par le TGF β 1 (Rombouts *et al.* 2002; Rishikof *et al.* 2004; Ghosh *et al.* 2007). Nous avons souhaité déterminer l'influence de l'inhibition globale des HDAC sur la différenciation myofibroblastique médiée par le TGF β 1 et identifier la ou les HDAC(s) participant à ce processus.

3.2.1. La Trichostatine A empêche la différenciation myofibroblastique médiée par le TGF β 1

Nous avons commencé par examiner l'implication potentielle des HDACs de classe I et II dans le processus de différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1. Pour cela, nous avons exposé des fibroblastes de peau humaine au TGF β 1 et/ou à la TSA pendant 24 et 48 heures. Les changements morphologiques ont alors été évalués, ainsi que les quantités relatives de transcrit et de protéine α -SMA par immunocytochimie, par RT-PCR Taqman® en temps réel et par immunoblot. Comme l'illustre la **Figure 25A**, la détection par immunoblot montre que le traitement avec du TGF β 1 entraîne une augmentation attendue du niveau d' α -SMA. En revanche, la TSA diminue l'abondance de l' α -SMA, que les cellules soit exposées au TGF β 1 ou non, et elle supprime complètement la surexpression de cette protéine cytosquelettique médiée par le TGF β 1. L'efficacité de l'action inhibitrice de la TSA sur les HDACs a été vérifiée en analysant la quantité de tubuline- α acétylée. Suite à l'inhibition de l'activité enzymatique de HDAC6 par la TSA, le niveau d'acétylation de cette protéine cytosquelettique est nettement augmenté dans les cellules traitées par la TSA. Cette observation est en accord avec plusieurs études précédentes (Hubbert *et al.* 2002; Dequiedt *et al.* 2003; Hu *et al.* 2003; North *et al.* 2003).

Le TGF β 1 peut non seulement induire l'expression *de novo* de l' α -SMA, un des marqueurs principaux de la différenciation myofibroblastique, mais peut également changer la morphologie des cellules jusqu'à atteindre des caractéristiques qui sont intermédiaires entre celles décrites pour les fibroblastes et pour les cellules musculaires lisses. La détection de

l' α -SMA par immunocytochimie sur des fibroblastes cultivés en présence de TGF β 1 pendant 48 heures, nous a permis d'observer que la majorité des cellules présentent une morphologie hypertrophique typiquement myofibroblastique et expriment l' α -SMA. Celle-ci a, dans le cytoplasme, une organisation de type filamenteux (**Figure 25B**). En comparaison, seulement une très faible proportion des fibroblastes non exposés au TGF β 1 exogène montrent ces caractéristiques myofibroblastiques. D'autre part, le traitement par la TSA empêche entièrement les changements myofibroblastiques suscités par le TGF β 1 et dans la condition TSA sans TGF β 1, la petite sous-population myofibroblastique n'est plus observée. Nous avons donc conclu, à partir de ces observations morphologiques et biochimiques de l'abondance de l' α -SMA, que la TSA peut empêcher la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1 dans des fibroblastes de peau humaine *in vitro*.

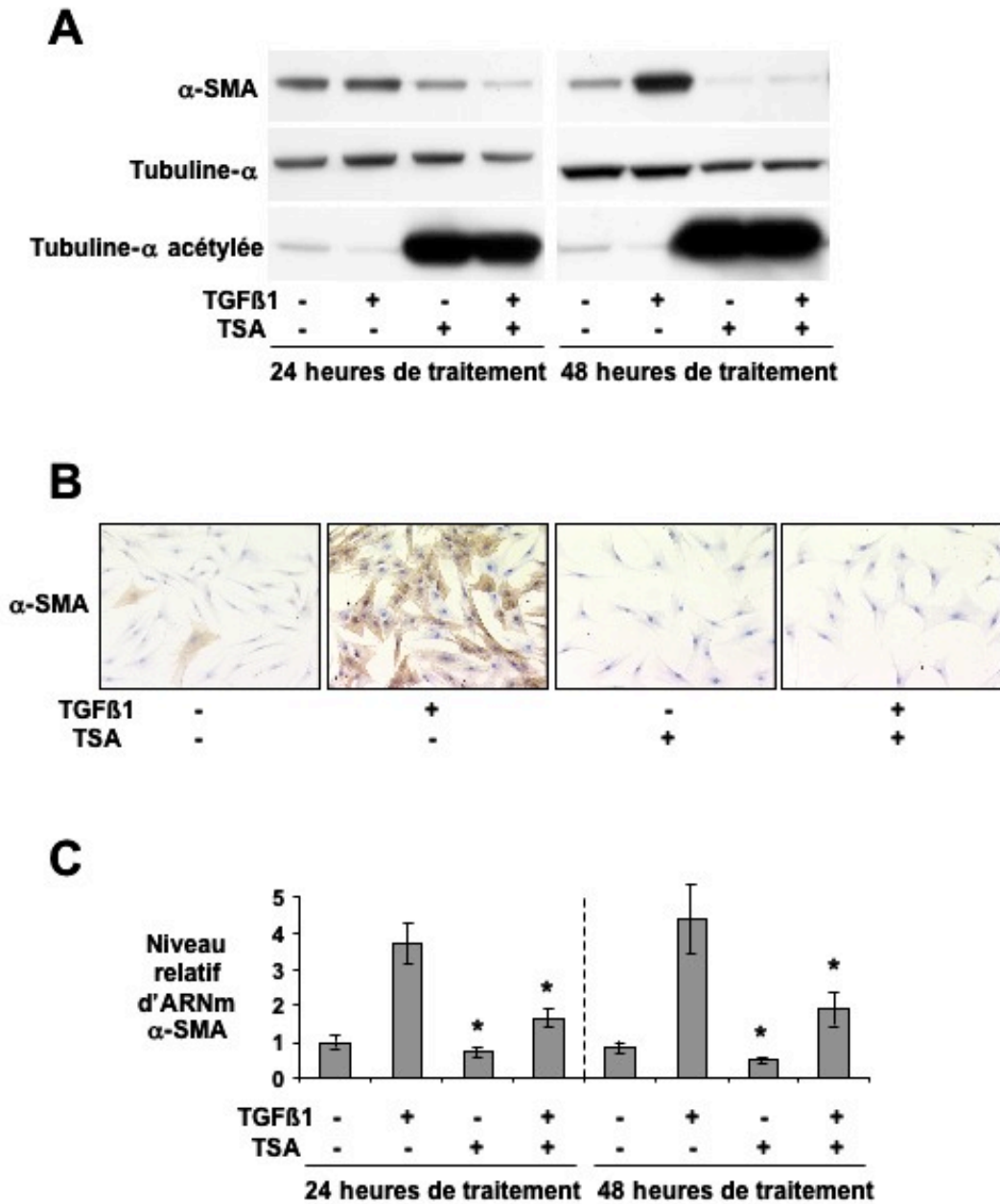


Figure 25 : La Trichostatine A (TSA), un inhibiteur global des HDACs de classes I et II, empêche la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1. Des fibroblastes primaires humains ont été traités pendant 24 ou 48h avec du TGF β 1 (2.5 ng/ml), de la TSA (500nM) ou leur véhicule respectif (PBS et DMSO). L'abondance relative des niveaux de transcrit et de protéine α -SMA a été évaluée par immunoblot (A), par immunocytochimie (B) et par RT-PCR en temps réel (C). Les réductions des niveaux relatifs de transcrit α -SMA entre les conditions traitées avec la TSA et non traitées, en l'absence ou en présence de TGF β 1, sont statistiquement significatives (test normal asymptotique, $p < 0.05$) et sont indiquées par un astérisque.

Puisque les HDACs jouent un rôle primordial dans la régulation de la transcription des gènes en modifiant le niveau d'acétylation des histones nucléosomiques, nous nous sommes ensuite demandé si la TSA pouvait influencer l'abondance de l'ARNm de l' α -SMA dans des fibroblastes cultivés ou non en présence de TGF β 1. Comme représenté à la **Figure 25C**, tandis que le TGF β 1 induit une augmentation de ± 3 à 4 fois des niveaux d'ARNm d' α -SMA (normalisés aux niveaux d'ARNm de la GAPDH), le traitement par la TSA a eu comme conséquence de diminuer significativement les niveaux de transcrite aussi bien à 24 qu'à 48 heures (diminution de 2 fois après 48 heures de traitement ; test normal asymptotique, $p < 0.05$). L'augmentation du niveau d'ARNm d' α -SMA induite par le TGF β 1 a été sensiblement moindre quand les cellules ont été simultanément exposées à la TSA (test normal asymptotique, $p < 0.05$). Des résultats semblables ont été obtenus lorsque d'autres gènes de référence (cyclophiline A, β -actine, et ARN 18S) ont été utilisés pour normaliser les niveaux de transcrite d' α -SMA dans les expériences de RT-PCR (données non montrées). Par conséquent, il a été démontré que l'inhibition globale de l'activité des HDACs de classe I et II réprime l'expression de l' α -SMA, et ce potentiellement au niveau transcriptionnel. Cette répression est proportionnelle à la concentration de TSA (**Figure 26B**) et n'est pas due à un effet cytotoxique de cette drogue sur les cellules. En effet, nous avons observé que lorsque les fibroblastes sont cultivés en présence de TSA pendant 48h, un traitement subséquent avec du TGF β 1 (sans TSA) peut encore induire l'expression du transcrite de l' α -SMA (**Figure 26B condition C2**). En outre, le traitement par la TSA n'a pas augmenté de manière significative le niveau d'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) détectable dans le milieu de culture (test normal asymptotique, $p > 0.05$) (**Figure 26C**).

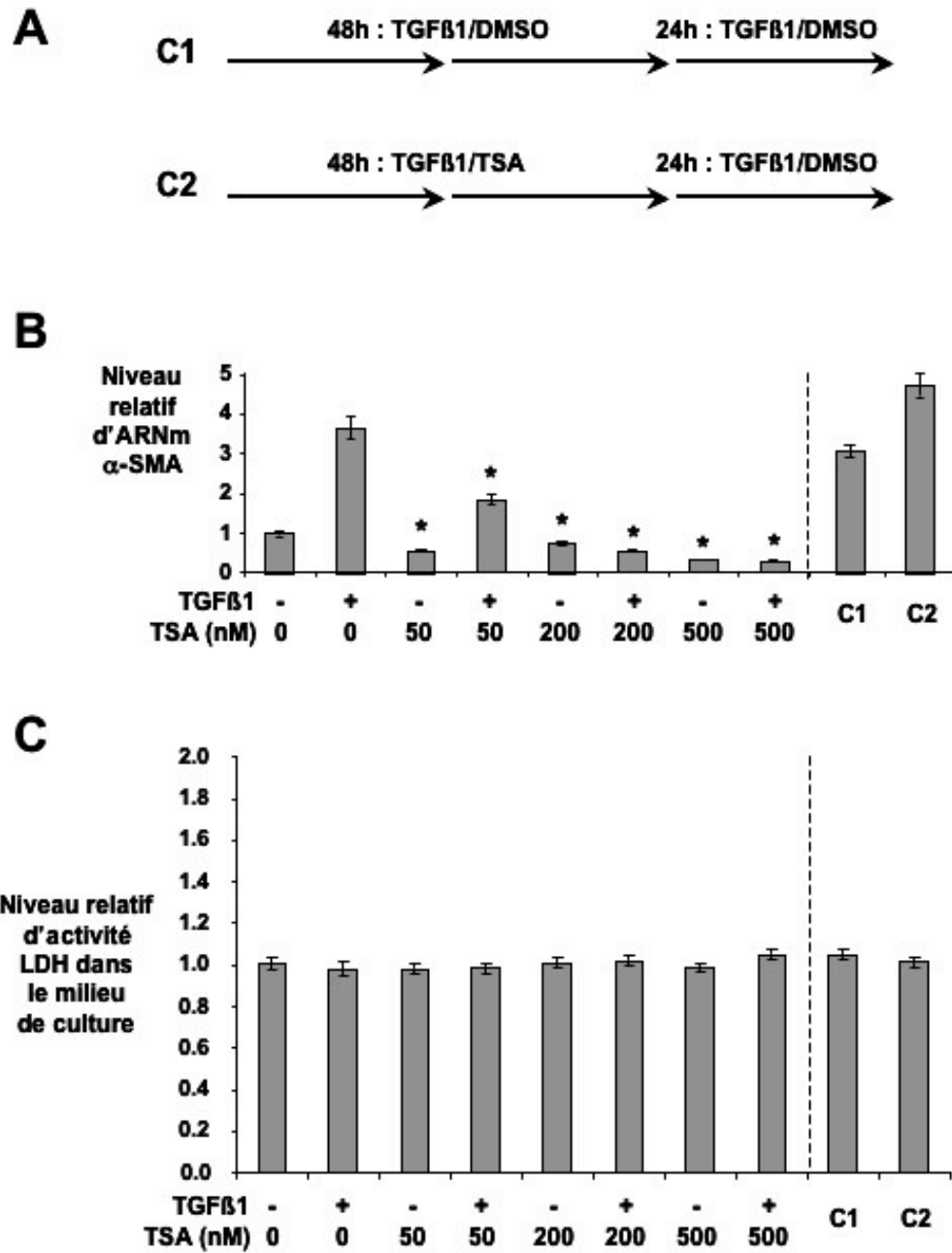


Figure 26 : La TSA diminue l'abondance du transcrit α -SMA dans les fibroblastes primaires humains d'une manière proportionnelle à sa concentration et sans engendrer de toxicité cellulaire significative. Des fibroblastes primaires humains ont été traités avec du TGFβ1 (2.5 ng/mL) et/ou de la TSA à des concentrations croissantes (0, 50, 200, et 500nM) durant 48h. (A) Des fibroblastes ont également été traités avec du TGFβ1 (2.5 ng/mL) et du DMSO (condition C1) ou avec du TGFβ1 (2.5 ng/ml) et de la TSA (500 nM) (condition C2) pendant 48h, ensuite le milieu a été changé, et ces deux conditions ont été traitées pendant 24h avec du TGFβ1 (2.5 ng/mL) et du DMSO (sans TSA). (B) L'abondance relative du transcrit α -SMA a été évaluée dans les différentes conditions expérimentales par RT-PCR en temps réel. (C) L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) a été déterminée dans les milieux de culture en utilisant une analyse fluorimétrique basée sur l'intégrité des membranes, afin d'évaluer la cytotoxicité potentiellement liée au traitement des cellules par la TSA. Les données sont exprimées en tant que moyenne de rapports \pm écart type. Les différences statistiquement significatives des niveaux de transcrit α -SMA et des niveaux d'activité de la LDH entre les conditions traitées par la TSA ou non, en l'absence ou en présence de TGFβ1, sont indiquées par un astérisque (test normal asymptotique, $p < 0.05$).

3.2.2. Influence de la réduction spécifique de l'expression des différentes HDACs sur l'induction de l' α -SMA médiée par le TGF β 1

Nous avons ensuite cherché à déterminer la (ou les) HDAC(s) qui pourrai(en)t être impliquée(s) dans le processus de différenciation myofibroblastique médiée par le TGF β 1. Pour ce faire, des fibroblastes primaires ont été transfectés avec des siRNAs dirigés contre la plupart des HDACs de classe I et II (HDAC1 à HDAC8) avec du phosphate calcique durant 16h et ont ensuite été traités avec du TGF β 1 pendant 48h. Plusieurs siRNAs dirigés contre chaque HDAC ont été testés et nous avons choisi d'utiliser ceux qui résultaient en la diminution la plus importante de l'HDAC ciblée. La capacité de chacun de ces siRNAs à réduire l'abondance de son HDAC cible a été vérifiée par analyse RT-PCR en temps réel. Chaque siRNA a réduit d'au moins 70% la quantité d'ARNm de l'HDAC correspondante, à l'exception du siRNA dirigé contre HDAC8 (**Figure 27A**). En outre, le traitement des cellules avec du TGF β 1 n'a pas sensiblement influencé le niveau d'ARNm des HDACs examinées (variation de moins de 20%) (**Figure 27A**).

Le degré d'induction du transcrite α -SMA par le TGF β 1 était semblable (3 à 4 fois) dans les fibroblastes transfectés sans siRNA (avec de l'eau à la place du siRNA), avec des siRNAs dirigés contre HDAC1, HDAC3, HDAC5, ou avec divers siRNAs contrôles négatifs (siRNA contrôle négatif de Eurogentec, siRNA dirigé contre la GL3 luciférase, ou siRNA dont la séquence nucléotidique est celle du siRNA HDAC4 mais a été inversée et mélangée (« *scrambled* »)) (test normal asymptotique, $p > 0.05$). L'induction de l' α -SMA par le TGF β 1 était plus faible (induction de ± 2 fois) dans les cellules transfectées par les siRNAs HDAC6 et HDAC8 ($p < 0.05$), et plus forte (induction de ± 6 à 7 fois) dans les cellules transfectées par les siRNAs HDAC2 et HDAC7 ($p < 0.05$) (**Figure 27B**). Parmi les HDACs étudiées, seule la diminution de HDAC4 a abrogé complètement la surexpression d' α -SMA induite par le TGF β 1. Ainsi, alors que l'inhibition globale des HDACs de classes I et II par la TSA mène à une inhibition de l'induction de l' α -SMA par le TGF β 1, la réduction spécifique de l'expression d'un certain nombre de ces HDACs cause divers effets sur l'induction de l' α -SMA (accrue, moindre, ou semblable). Puisqu'il est apparu que la diminution de HDAC4 génèrait le blocage le plus important de l'induction de l' α -SMA - un blocage semblable à celui obtenu quand les fibroblastes étaient traités avec la TSA - nous avons décidé de caractériser

plus précisément l'impact de HDAC4 dans la différenciation myofibroblastique induite par le TGFβ1.

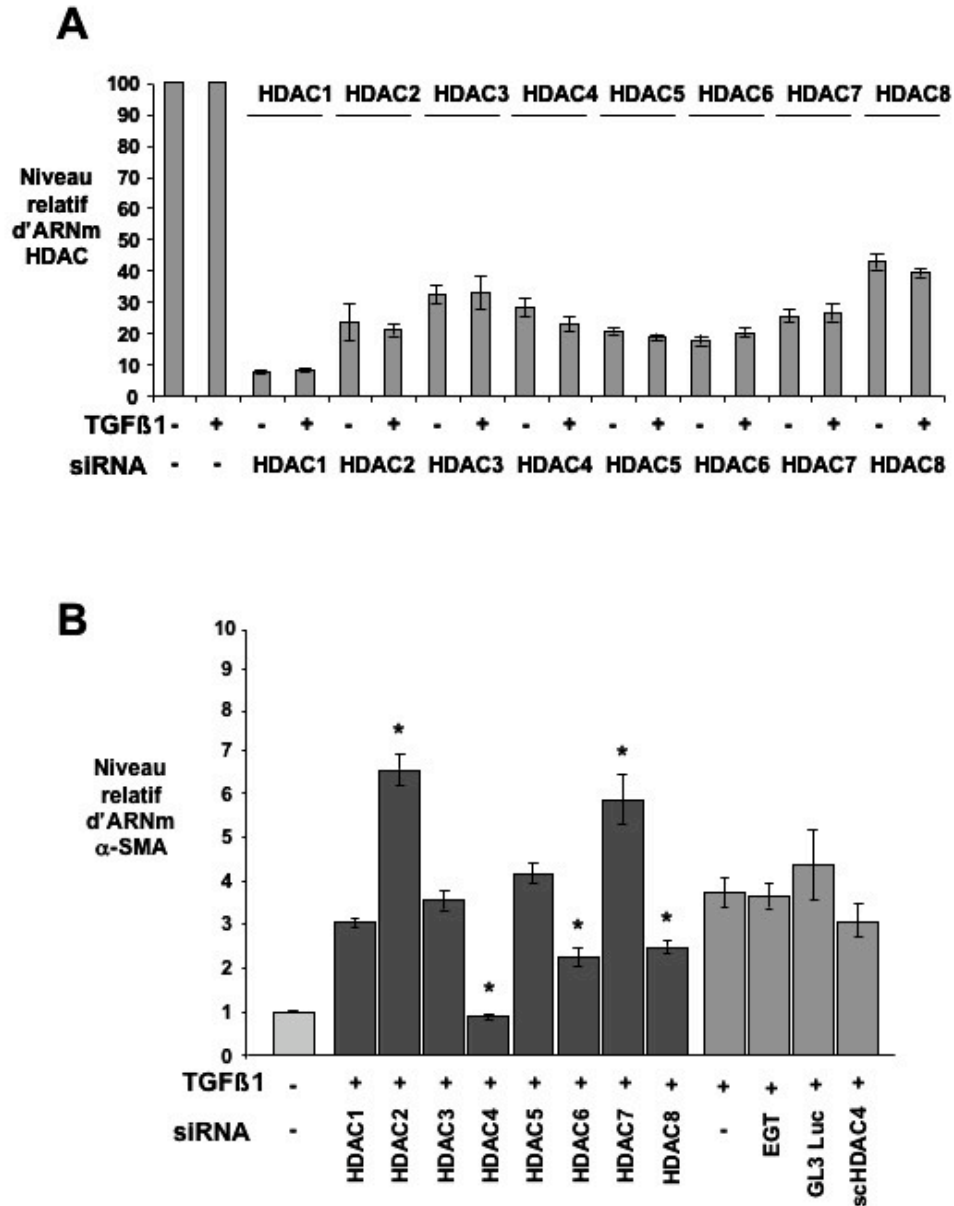


Figure 27 : Étude de l'influence de la diminution d'abondance d'HDACs spécifiques sur la différenciation myofibroblastique induite par le TGFβ1. Des fibroblastes humains primaires ont été transfectés avec des siRNAs dirigés contre chacun des 8 premiers membres de la famille des HDACs (HDAC1 à HDAC8) et ont ensuite été traités avec ou sans TGFβ1 (2.5 ng/ml dans du PBS) pendant 48 heures. Des transfections sans siRNA ainsi que des transfections avec trois siRNA différents : une version « *scrambled* » du siRNA HDAC4 (siRNA scHDAC4), un siRNA dirigé contre la GL3 luciférase (GL3 Luc), et un siRNA contrôle négatif d'Eurogentec (EGT) ont servi de contrôles négatifs. Les niveaux relatifs de transcript de chaque HDAC (A) aussi bien que ceux de l'α-SMA (B) (normalisés par rapport aux niveaux de transcript de GAPDH) ont été évalués par RT-PCR en temps réel. Les différences statistiquement significatives de niveaux relatifs de transcript d'α-SMA entre les cellules contrôles (-, siRNA EGT, siRNA GL3 Luc, et siRNA HDAC4 « *scrambled* » (scHDAC4)) et les cellules transfectées avec chaque siRNA spécifique d'une HDAC sont indiquées par un astérisque (test normal asymptotique, $p < 0.05$). Les données sont exprimées en tant que moyenne de rapports \pm écart type.

3.2.3. HDAC4 est nécessaire à la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1

Nous avons commencé par évaluer la toxicité potentielle associée à la diminution des niveaux d'ARNm d'HDAC4 en utilisant trois siRNAs différents le ciblant spécifiquement. Les mesures des niveaux d'activité de LDH dans les milieux de culture suivant la transfection des cellules avec ces siRNAs n'ont montré aucun effet cytotoxique des siRNAs par rapport aux transfusions contrôles (pas de siRNA, siRNA EGT et siRNA scHDAC4) (données non montrées). En outre, aucune induction de l'expression du transcrite de 2',5'-oligoadénylate synthase-1 (OAS-1) n'a été observée après transfection des siRNAs (données non montrées), indiquant que la transfection des cellules avec ces petits ARNs bicaténaires n'a pas déclenché de réponse de type interféron.

Parmi les trois siRNAs HDAC4 examinés, les siRNA#2 et #3 ont diminué les niveaux de transcrite de HDAC4 dans les fibroblastes le plus efficacement, tandis que cette diminution était plus modeste pour le siRNA#1 (test normal asymptotique, $p < 0.05$) (**Figure 28A**). Comme le montre la **Figure 28B**, l'induction de l' α -SMA par le TGF β 1 est nettement bloquée dans les fibroblastes transfectés avec les deux siRNAs les plus efficaces (#2 et #3) (test normal asymptotique, $p < 0.05$) tandis qu'elle n'est que modérément diminuée dans les fibroblastes transfectés avec le siRNA#1 moins efficace (test normal asymptotique, $p < 0.05$). De plus, la réduction d'abondance du transcrite HDAC4 n'affecte pas le niveau des transcrits des autres HDACs de 1 à 8 (**Figure 29A**) (test normal asymptotique, $p > 0.05$). Des résultats semblables ont été observés, que l'on utilise la GAPDH ou la β -actine comme gènes de référence pour normaliser les niveaux des transcrits d' α -SMA dans les expériences de RT-PCR (données non montrées).

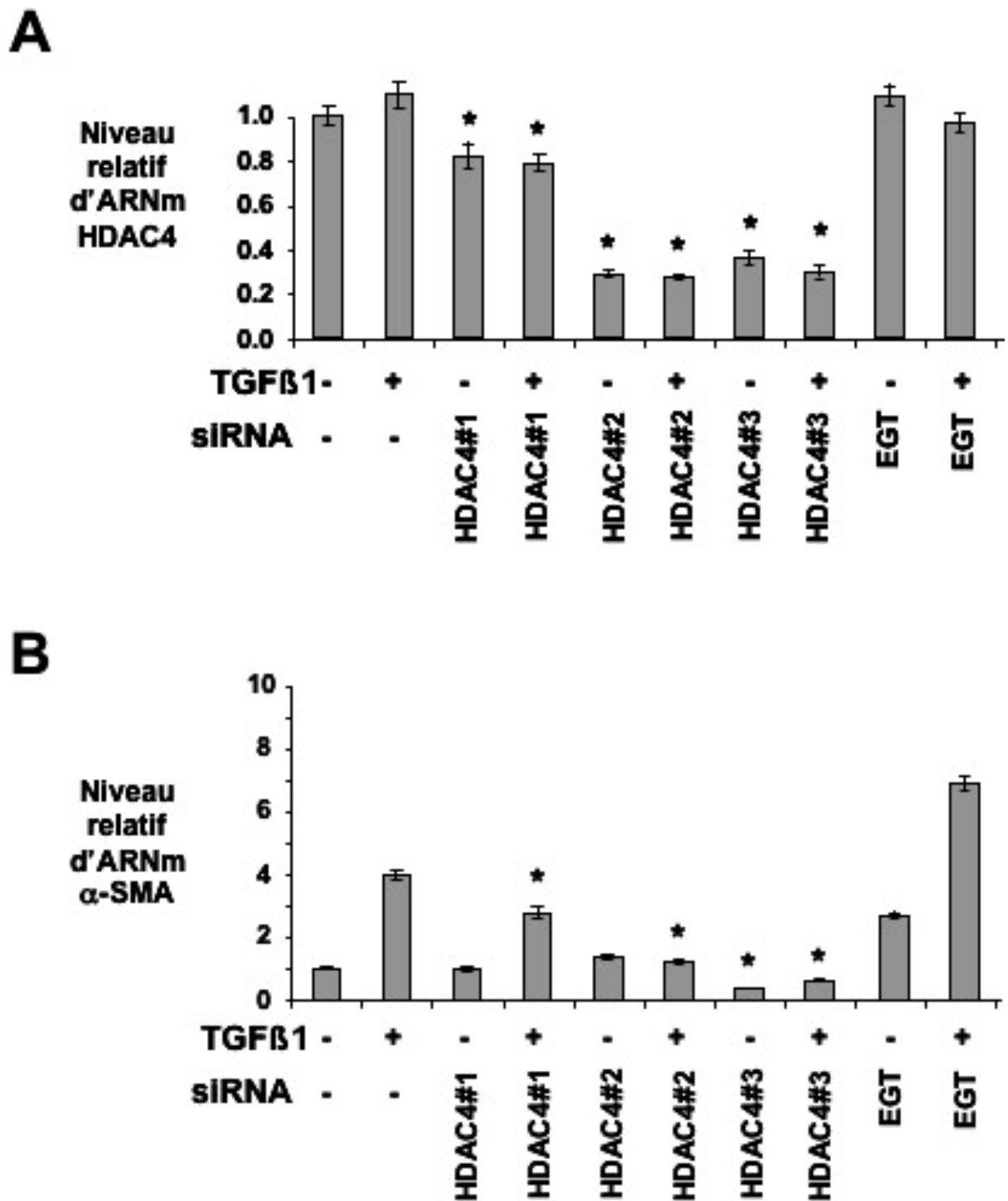


Figure 28 : HDAC4 est nécessaire pour la différenciation myofibroblastique induite par le TGFβ1. Des fibroblastes humains primaires ont été transfectés avec trois siRNAs différents dirigés contre HDAC4, puis traités avec ou sans TGFβ1 (2.5 ng/ml dans du PBS) pendant 48 heures. Les transfections contrôle sans siRNA et la transfection avec le siRNA contrôle négatif d'Eurogentec ont servi de contrôles négatifs. Les niveaux relatifs de transcrite de HDAC4 (A) et d'α-SMA (B) (normalisés aux niveaux de transcrits de GAPDH) ont été évalués par RT-PCR en temps réel. Les réductions statistiquement significatives des niveaux relatifs des transcrits d'HDAC4 et d'α-SMA entre les cellules des transfections contrôles et les cellules transfectées avec chacun des autres siRNAs, en l'absence ou en présence de TGFβ1, sont indiquées par un astérisque (test normal asymptotique, $p < 0.05$). Les données sont exprimées en tant que moyenne de rapports \pm écart type.

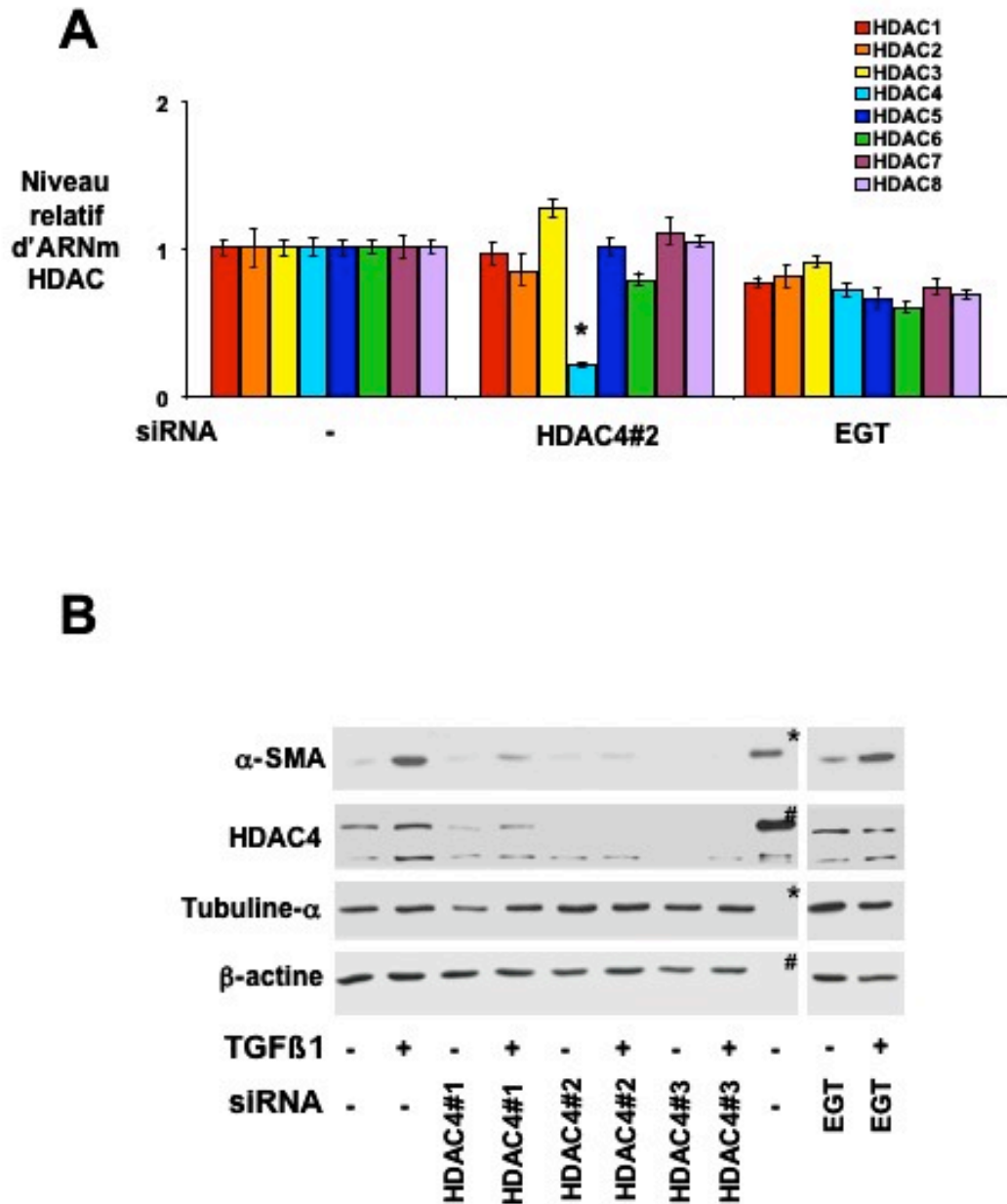


Figure 29 : (A) La diminution de HDAC4 ne modifie pas de manière significative les niveaux des transcrits de HDAC1 à HDAC8 dans des fibroblastes humains primaires. Des fibroblastes humains primaires ont été transfectés avec un siRNA dirigé contre HDAC4 (siRNA HDAC4#2). Les transfections avec uniquement du réactif de transfection et les transfections avec le siRNA contrôle négatif d'Eurogentec (EGT) ont servi de contrôles négatifs. Les niveaux relatifs des transcrits de HDAC1 à HDAC8 (normalisés par rapport au niveau de transcrit de la GAPDH) ont été évalués par RT-PCR en temps réel. Les données ont été exprimées en tant que moyennes des rapports \pm écart type. Les réductions statistiquement significatives des niveaux relatifs de transcrit des HDAC entre les cellules transfectées avec le siRNA HDAC4#2 et les cellules transfectées avec les deux contrôles négatifs sont indiquées par un astérisque (test normal asymptotique, $p < 0.05$).

(B) Le TGFβ1 n'induit pas l'expression de l'α-SMA en l'absence de HDAC4 dans des fibroblastes humains primaires. Des fibroblastes humains primaires ont été transfectés avec trois siRNAs différents dirigés contre HDAC4 et ont ensuite été traités avec ou sans TGFβ1 (2.5 ng/ml dans du PBS). Les transfections contrôles avec uniquement du réactif de transfection et les transfections avec le siRNA contrôle négatif d'Eurogentec (EGT) ont servi de contrôles négatifs. Les niveaux relatifs d'α-SMA, de HDAC4, de tubuline-α, et de β-actine ont été évalués par immunoblot. Les puits marqués par * (α-SMA et tubuline-α) contiennent des extraits totaux de protéines issus de cellules musculaires lisses humaines primaires. Les puits marqués par # (HDAC4 et β-actine) contiennent des extraits protéiques totaux de cellules Saos2 transfectées avec un vecteur d'expression de HDAC4 humaine taguée par un épitope FLAG.

Au niveau protéique, l'analyse par immunoblot a montré que la transfection des HSMCs avec les siRNAs HDAC4 #2 et #3 diminue l'abondance de la protéine HDAC4 et empêche l'induction de l'expression d' α -SMA par TGF β 1 (**Figure 29B**). Cet effet répressif était plus faible dans les cellules transfectées avec le siRNA HDAC4#1. Puisqu'il a été démontré que HDAC4 peut être dégradée par la caspase 2 (Paroni *et al.* 2004) et la caspase 3 (Liu *et al.* 2004), il est possible que la bande de plus faible poids moléculaire observée soit un produit de dégradation de HDAC4.

L'immunocyto-détection de l' α -SMA a confirmé les données d'immunoblot et a également montré que la diminution d'HDAC4 causée par les siRNAs #2 et #3 empêche l'induction des changements morphologiques myofibroblastiques induits par le TGF β 1 (**Figure 30**). Par conséquent, ces résultats ont indiqué que HDAC4 est nécessaire pour que la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1 puisse se faire efficacement.

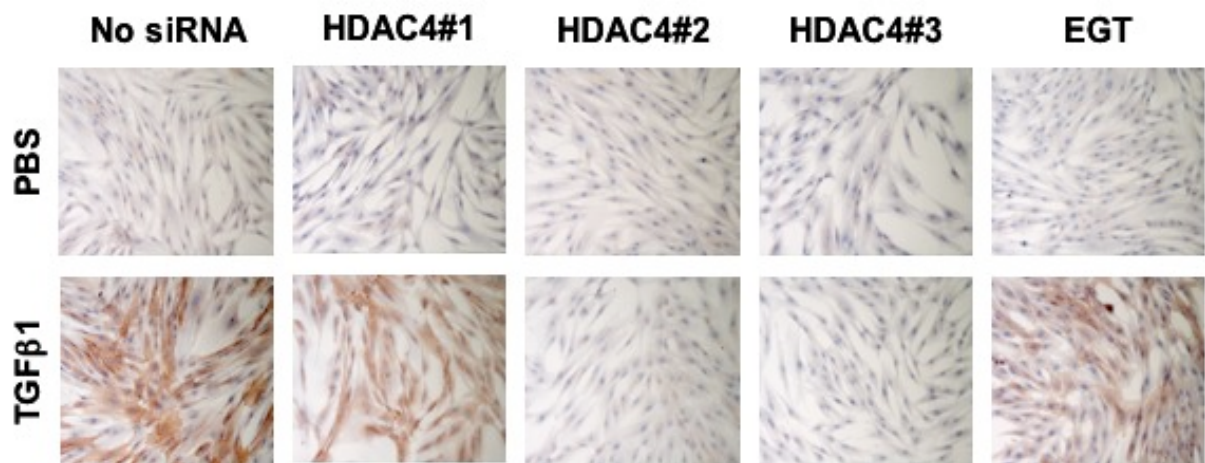


Figure 30 : La diminution d'HDAC4 empêche les fibroblastes humains primaires d'acquérir les caractéristiques morphologiques myofibroblastiques induites par le TGF β 1. Des fibroblastes humains primaires ont été transfectés avec trois siRNAs différents dirigés contre HDAC4 et ont ensuite été traités avec du TGF β 1 ou son véhicule (PBS). Les transfections sans siRNA ou avec le siRNA contrôle négatif d'Eurogentec (EGT) ont servi de contrôles négatifs. L'expression d' α -SMA a été évaluée par immunocyto-marquage.

3.2.4. La diminution d'HDAC4 induit l'expression de TGIF et de TGIF2

Puisque les déacétylases d'histones sont habituellement associées à la répression de l'expression des gènes, nous avons testé l'hypothèse (**Figure 31**) selon laquelle une diminution d'HDAC4 aurait comme conséquence l'induction d'un des inhibiteurs endogènes connus de la voie de signalisation du TGF β , comme par exemple Smad7 (Chen *et al.* 1999; Kato *et al.* 2001; Lindert *et al.* 2005; Valcourt *et al.* 2005; Camoretti-Mercado *et al.* 2006), TGIF (« 5'-TG-3'-interacting factor ») (Rombouts *et al.* 2002; Hu *et al.* 2005; Seo *et al.* 2006), ou TGIF2 (« 5'-TG-3'-interacting factor 2 ») (Melhuish *et al.* 2001; Jin *et al.* 2005).

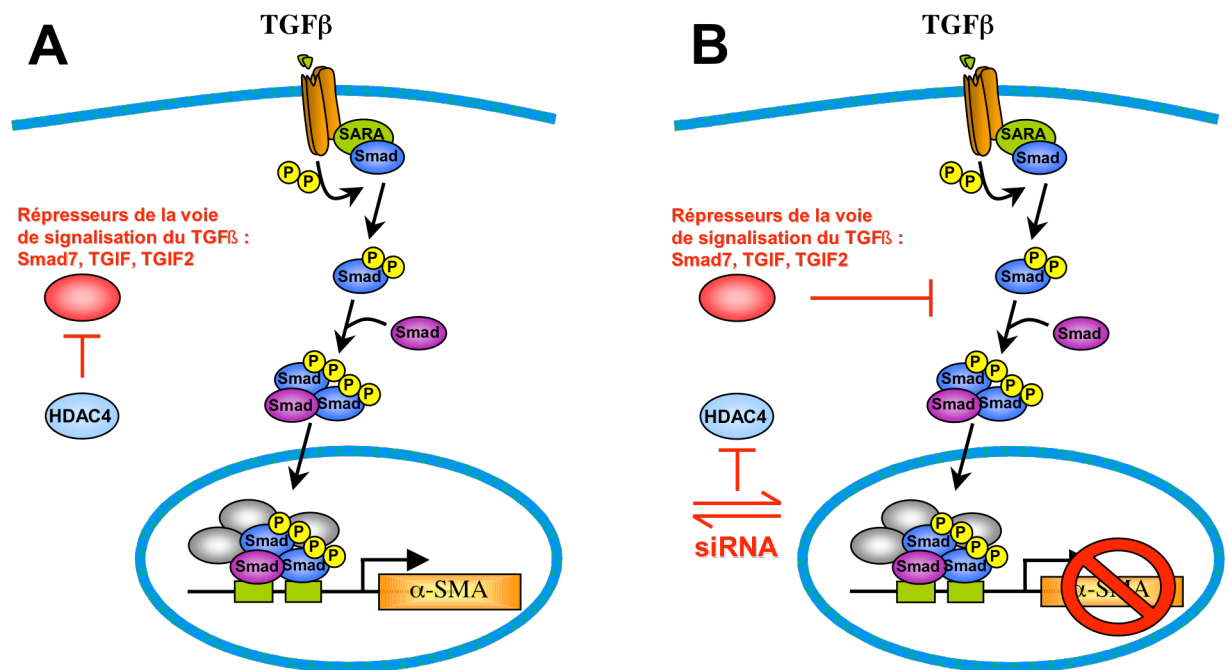


Figure 31 : (A) Illustration d'une hypothèse selon laquelle HDAC4 pourrait réguler négativement l'expression d'inhibiteurs endogènes de la voie de signalisation du TGF β 1.

(B) Par extrapolation, la diminution d'HDAC4 aurait comme conséquence l'induction d'un de ces inhibiteurs et donc empêcherait l'induction de l' α -SMA par le TGF β 1.

Précisons que la cascade de signalisation qui aboutit à la régulation de l'expression de l' α -SMA n'est pas encore connue en détail. Pour l'illustration graphique de notre hypothèse, nous avons pris la liberté de représenter un pan de la cascade de signalisation du TGF β qui est bien connu : celui qui passe par les Smads. SARA : « *Smad Anchor for Receptor Activation* ».

Comme représenté à la **Figure 32**, le TGF β 1 augmente légèrement l'abondance du transcrite de ces inhibiteurs. Aucune augmentation significative des niveaux d'ARNm de Smad7 n'a été observée dans les fibroblastes transfectés par un siRNA HDAC4 (p>0.05). En

revanche, la diminution de HDAC4 dans les fibroblastes a eu comme conséquence d'augmenter les niveaux des transcrits de TGIF et de TGIF2, que les cellules aient été exposées au TGFβ1 ou non (test normal asymptotique, $p < 0.05$).

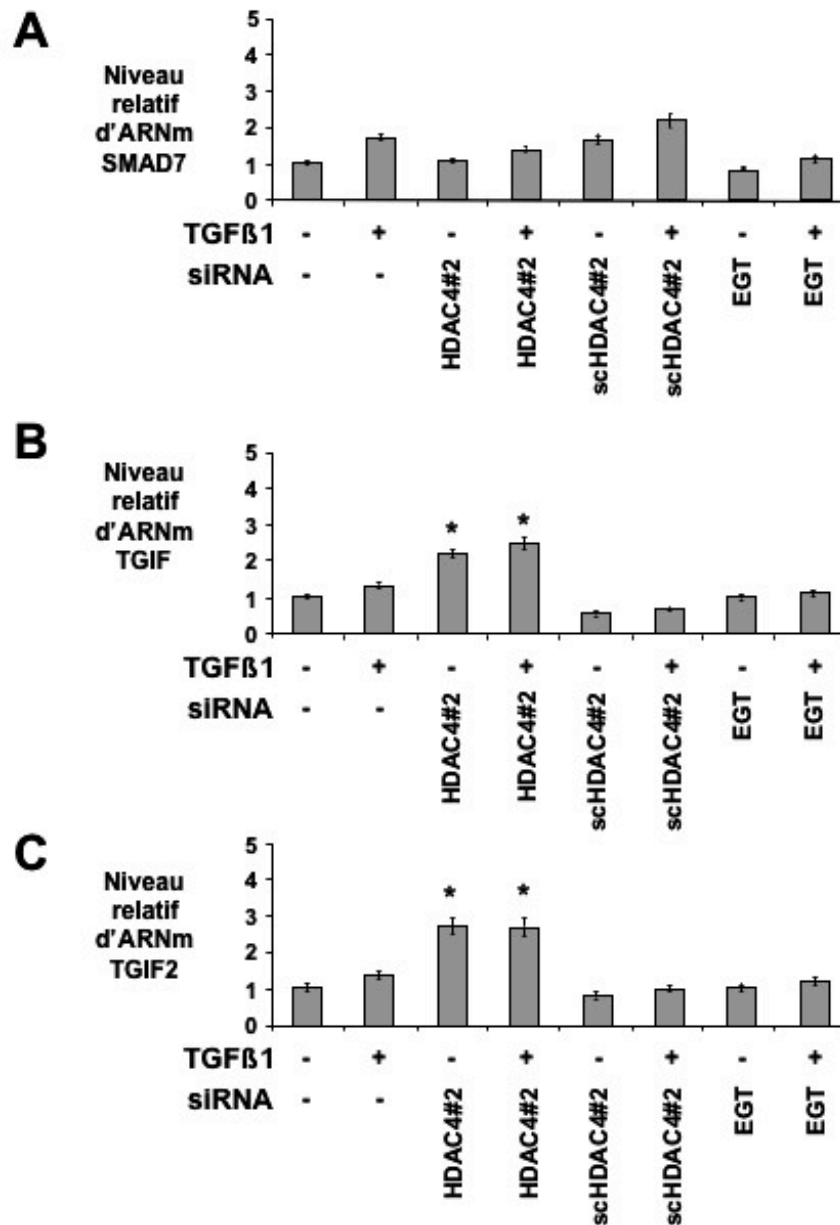


Figure 32 : La réduction forcée d'expression de HDAC4 augmente l'abondance des transcrits de TGIF et de TGIF2, deux inhibiteurs endogènes de la voie de signalisation du TGFβ1, dans des fibroblastes humains primaires. Des fibroblastes humains primaires ont été transfectés avec un siRNA dirigé contre HDAC4 (siRNA HDAC4 #2), avec uniquement du réactif de transfection, avec le siRNA contrôle négatif d'Eurogentec, ou avec un siRNA HDAC4 « scrambled » (siRNA scHDAC4#2), et ont ensuite été traités avec du TGFβ1 ou son véhicule (PBS). Les niveaux relatifs des transcrits de Smad7, TGIF, et TGIF2 ont été évalués par analyse RT-PCR en temps réel. Les données ont été exprimées en tant que moyennes de rapports ± écart type. Les augmentations statistiquement significatives des niveaux relatifs des transcrits de Smad7, TGIF, et TGIF2 entre les cellules transfectées avec le siRNA HDAC4#2 et les cellules transfectées avec contrôles (-, siRNA HDAC4#2 « scrambled », et siRNA EGT) sont indiquées par un astérisque ($p < 0.05$).

3.2.5. Discussion

A l'exception de certains myofibroblastes résidant normalement dans des tissus humains spécifiques, il semble que la plupart des myofibroblastes se différencient localement, suite à des lésions tissulaires, à partir des fibroblastes (Powell *et al.* 1999). Ils synthétisent alors certaines des protéines contractiles normalement exprimées par les cellules musculaires lisses, comme l' α -SMA. Ces cellules stromales hypertrophiques contiennent typiquement de nombreuses fibres de stress d'actine musculaire lisse qui contribuent à la génération des forces mécaniques requises pour la contraction et la fermeture de blessures (Hinz *et al.* 2002; Tomasek *et al.* 2002). L'activation chronique des myofibroblastes a été associée à un certain nombre de conditions pathologiques associées au remodelage des tissus, comme par exemple la cicatrisation hypertrophique, la fibrose interstitielle, et la réponse stromale au site de certaines néoplasies. Le TGF β 1 est généralement considéré comme la principale molécule capable d'activer le programme de différenciation myofibroblastique. D'autres cytokines et facteurs de croissance, tels que le PDGF (« *Platelet-Derived Growth Factor* ») et le TNF- α (« *Tumor Necrosis Factor- α* »), présentent aussi des activités pro-fibrotiques mais n'induisent pas l' α -SMA dans les fibroblastes (Desmouliere *et al.* 1993).

Nous avons démontré que l'inhibition globale de l'activité des HDACs de classes I et II par la TSA empêche l'induction par le TGF β 1 de l'expression *de novo* du transcrit et de la protéine α -SMA, ainsi que les changements morphologiques caractéristiques de la différenciation myofibroblastique au sein de fibroblastes de peau humaine. Ces résultats sont conformes à ceux d'une étude précédente réalisée par Rombouts *et al.*, qui ont rapporté que la TSA supprime l'induction par le TGF β 1 de l'abondance de l'ARNm de l' α -SMA dans des fibroblastes de peau de rat (Rombouts *et al.* 2002). Il a également été démontré que le traitement par la TSA interfère avec d'autres processus biologiques médiés par le TGF β 1, comme la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules du tube proximal rénal humain (Yoshikawa *et al.* 2007) et la répression du gène CIITA (« *Major Histocompatibility Complex class II (MHCII) Transactivator* ») induit par l'interféron- γ dans les cellules microgliales de la souris (Pazmany *et al.* 2006). Ainsi, non seulement nos résultats suggèrent que l'inhibition globale des HDACs pourrait être une approche utile afin d'empêcher la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1, mais en outre ils s'ajoutent aux données récentes suggérant que le TGF β 1 accomplit au moins une partie de ses fonctions biologiques au travers d'une régulation épigénétique impliquant l'activité d'HDACs.

L'impact négatif de la TSA sur la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1 représente bien entendu l'effet cumulé de l'activité inhibitrice de la drogue sur toutes les HDACs présentes dans les fibroblastes. Afin d'étudier la participation individuelle de chaque HDAC dans ce processus, nous avons évalué l'impact de la diminution spécifique de l'abondance d'une HDAC par ARN interférence sur l'expression du gène de l' α -SMA, dans des fibroblastes traités avec du TGF β 1. La diminution forcée de l'expression de chacun des 8 premiers membres de la famille des HDACs a eu comme conséquence des effets divers sur l'abondance du transcrite de l' α -SMA. D'une part, la diminution de HDAC4, de HDAC6 et de HDAC8 a réprimé l'induction d'expression du transcrite de l' α -SMA par le TGF β 1 ; la répression la plus profonde a été observée suite à la réduction d'abondance d'HDAC4. Celle-ci a résulté en un blocage presque complet de l'induction du transcrite et de la protéine α -SMA dans les fibroblastes traités par le TGF β 1. Ainsi, au moins trois HDACs différentes peuvent participer à la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1, ou la favoriser. D'autre part, tandis que la diminution de HDAC1, de HDAC3 et de HDAC5 n'a eu aucun effet sur l'expression du transcrite de l' α -SMA, la diminution de HDAC2 et de HDAC7 a sensiblement accru l'induction de l'expression du transcrite de l' α -SMA, en présence de TGF β 1. Les effets variables de la diminution de chaque HDAC spécifique sur l'expression de l' α -SMA ne sont pas inattendus et sont en accord avec les résultats d'études antérieures ayant porté sur des gènes sous le contrôle du TGF β 1. En effet, différents inhibiteurs d'HDACs peuvent avoir des effets opposés sur l'expression d'un seul gène (par exemple TSA/butyrate de sodium *versus* acide valproïque sur l'expression de Timp-1 (« *Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1* ») (Young *et al.* 2005)) et un seul inhibiteur d'HDAC peut avoir des effets divergents sur l'expression de différents gènes (par exemple l'effet de la TSA sur le collagène de type I *versus* PAI-1 (« *Plasminogen Activator Inhibitor-1* ») (Ghosh *et al.* 2007)). Les sirtuines n'ont pas été analysées dans cette étude. Cependant, ces HDACs de classe III pourraient également à l'avenir s'avérer impliquées dans le programme de différenciation myofibroblastique. En effet, il a récemment été montré que SIRT1, grâce à sa capacité de déacétylation de Smad7 (ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome), atténue l'apoptose induite par le TGF β 1 dans des cellules mésangiales murines (Kume *et al.* 2007).

Il est intéressant de remarquer que, dans nos conditions expérimentales, la diminution d'HDAC4 a été presque aussi efficace que la TSA pour empêcher l'induction de l'expression du gène de l' α -SMA par le TGF β 1. En fait, il n'est peut-être pas tellement étonnant que

HDAC4 soit nécessaire à la différenciation myofibroblastique. En effet, cette HDAC contribue également de manière importante à plusieurs autres programmes de différenciation, liés à d'autres cellules mésenchymateuses telles que les ostéoblastes (Kang *et al.* 2005), les chondrocytes (Vega *et al.* 2004) et les cellules musculaires (McKinsey *et al.* 2000; Miska *et al.* 2001; Ellis *et al.* 2003; Cao *et al.* 2005; Karamboulas *et al.* 2006). A l'avenir, il pourrait être intéressant de chercher à identifier si ces processus de différenciation partagent ou non des voies communes.

Etant donné que des activités HDAC sont généralement associées à la répression de la transcription et que la stimulation de l'expression de l' α -SMA par le TGF β 1 est réprimée par une diminution d'HDAC4, nous avons envisagé l'hypothèse selon laquelle la diminution d'HDAC4 pourrait réguler négativement l'expression de l' α -SMA en induisant l'activité d'un répresseur endogène de la voie de signalisation du TGF β . En d'autres termes, HDAC4 pourrait être nécessaire afin d'empêcher l'expression de répresseurs de la voie de signalisation du TGF β , ce qui permettrait la transcription d' α -SMA. En outre, il a été précédemment observé que l'effet inhibiteur de la TSA sur la transcription de l' α -SMA induite par le TGF β 1 est bloqué par la cycloheximide, c.-à-d. qu'elle exige la synthèse de protéines *de novo* (Rombouts *et al.* 2002). Il se pourrait que ce soit la synthèse d'un répresseur endogène de la voie de signalisation du TGF β qui soit requise. Il existe d'autres mécanismes potentiels par lesquels la diminution d'HDAC4 pourrait réguler négativement l'expression de l' α -SMA : par exemple l'hyperacétylation directe de co-répresseurs de la transcription de l' α -SMA pourrait entraîner leur stabilisation et/ou augmenter leur activité, ou HDAC4 pourrait avoir un effet indépendant de son activité déacétylase. Un certain nombre de répresseurs de la voie de signalisation du TGF β ont été caractérisés. Ils incluent la protéine inhibitrice bien connue Smad7 (Chen *et al.* 1999; Kato *et al.* 2001; Lindert *et al.* 2005; Valcourt *et al.* 2005; Camoretti-Mercado *et al.* 2006) ainsi que TGIF et TGIF2. Ces derniers sont des homéoprotéines capables de se lier à l'ADN. Ils partagent deux blocs de similarité entourant l'homéodomaine et un domaine conservé de répression à l'extrémité carboxy-terminale. Dans la voie de signalisation du TGF β médiée par les Smads, ils agissent en tant que co-répresseurs spécifiques, en interagissant de manière directe avec Smad2, Smad3, le complexe corépresseur Sin3 et HDAC1 (Melhuish *et al.* 2001; Sharma *et al.* 2001; Melhuish *et al.* 2006). Le TGIF peut également faire partie du complexe de ligase d'ubiquitine qui entraîne la dégradation de Smad2 en réponse à la voie de signalisation du TGF β (Seo *et al.* 2004). Des études antérieures ont montré que 1) Smad7 empêche l'expression de l' α -SMA dans différents

types cellulaires (Li *et al.* 2002; Kopp *et al.* 2005), 2) l'expression ectopique de TGIF supprime nettement l'activation, médiée par les Smads, de l'activité de promoteurs sensibles au TGF β et bloque complètement l'expression induite par le TGF β 1 d' α -SMA dans des cellules de rat et des cellules mésangiales (Dai *et al.* 2004), et 3) la TSA augmente l'expression des transcrits de TGIF et de Smad7 dans des fibroblastes de rat cultivés en présence de TGF β (Rombouts *et al.* 2002). Par conséquent, nous avons envisagé que la diminution d'HDAC4 puisse induire une augmentation de ces répresseurs de la voie de signalisation du TGF β . Nous avons constaté que l'abondance des transcrits Smad7, TGIF, et TGIF2 est augmentée en présence de TGF β 1. Cette observation est en accord avec plusieurs études indiquant que ces protéines pourraient présenter une rétroaction négative qui induirait une désensibilisation des cellules à l'action du TGF β 1 (Itoh *et al.* 1998; Rombouts *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003). Cependant, quand nous avons transfecté les fibroblastes avec les siRNAs HDAC4, nous avons constaté une augmentation significative des niveaux des transcrits de TGIF et TGIF2, mais pas de celui de Smad7. Cela suggère que 1) HDAC4 est impliquée dans la régulation de ces deux homoprotéines et 2) les effets inhibiteurs de la diminution d'HDAC4 sur les changements phénotypiques induits par le TGF β 1 sont médiés par l'induction de TGIF et TGIF2. En outre, à notre connaissance, ces données sont les premières à indiquer que l'expression de TGIF et TGIF2 peut être régulée par une HDAC. D'autres études seront nécessaires afin de déterminer les mécanismes précis par lesquels HDAC4 régule l'expression de TGIF et TGIF2.

Dans l'ensemble, les résultats de cette étude mettent en évidence le rôle indispensable de HDAC4 dans la transition phénotypique entre un fibroblaste et un myofibroblaste, lorsqu'elle est induite par le TGF β 1. Ils identifient de ce fait HDAC4 comme étant une cible potentielle pour le traitement des pathologies impliquant la différenciation myofibroblastique.

4. Conclusions et Perspectives

L'étude des HDACs connaît aujourd'hui un engouement important dans de nombreux laboratoires. En témoigne le nombre sans cesse croissant des publications concernant ces enzymes: de 40 avant 1990, il est passé à plus de 4400 à ce jour, avec plus de 500 études publiées cette année. La participation des HDACs à la régulation de phénomènes biologiques aussi importants que la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires en font des cibles de choix pour le développement de nouveaux traitements contre le cancer. Mais l'intérêt d'inhiber une ou plusieurs HDACs à des fins thérapeutiques ne se limite pas à la cancérologie expérimentale et clinique. En effet, certaines HDACs de classe I et de classe II sont pressenties comme cibles potentielles pour le traitement de maladies cardiaques. Ainsi, HDAC1 et HDAC2 participent de manière redondante à la régulation du contrôle de la croissance, de la morphogenèse et de la contractilité du myocarde (Montgomery *et al.* 2007), tandis que HDAC4 apparaît impliquée dans les voies de signalisation qui mènent à l'hypertrophie cardiaque (Little *et al.* 2007).

Nos résultats ont désigné HDAC8 comme un nouveau marqueur biologique du phénotype musculaire lisse. Cependant, les mécanismes qui régulent l'expression d'HDAC8 sélectivement dans les cellules de phénotype musculaire lisse ne sont pas encore connus. Une étude *in situ* détaillée de l'expression du transcrite de HDAC8, ainsi qu'une étude du promoteur du gène *HDAC8* seront probablement nécessaires afin de caractériser ces mécanismes.

En plus de sa localisation cytoplasmique, nous avons observé que HDAC8 présente une distribution d'expression qui semble suivre un motif filamenteux, et il a été décrit qu'elle s'associe spécifiquement à la protéine de fusion inv(16) via le domaine ACD (« *Assembly Competence Domain* ») de la SMMHC (Durst *et al.* 2003). Ces données suggèrent que HDAC8 pourrait s'associer aux complexes d'acto-myosine musculaire lisse et peut-être les réguler. En accord avec cette hypothèse, nous avons démontré pour la première fois que HDAC8 co-immunoprécipite *in vivo* et *in vitro* avec l' α -SMA, mais pas avec l'isoforme ubiquitaire β -actine. Cependant, nos tentatives de co-immunoprécipitation de HDAC8 avec la SMMHC sont restées vaines ; elles pourraient faire l'objet de nouvelles études. Ces observations identifient donc HDAC8 comme étant la première HDAC interagissant de manière spécifique avec le cytosquelette d'actine musculaire lisse. A l'avenir, l'interaction entre HDAC8 et l' α -SMA pourrait être étudiée plus en détail : celle-ci est-elle directe ou

indirecte et quels sont les domaines impliqués dans cette interaction ? L'identité d'autres protéines interagissant avec HDAC8 pourrait par exemple être étudiée grâce à la technique du « *yeast two hybrid* ».

Nous avons largement discuté dans le chapitre consacré à HDAC8 du(des) substrat(s) physiologique(s) de HDAC8. Les histones en font-ils partie ? Existe-t-il, comme nos résultats le donnent à penser, un ou des substrat(s) cytosolique(s) de l'enzyme ? Il a été décrit que la phosphorylation d'HDAC8 au niveau de la sérine 39 a pour conséquence de diminuer son activité de déacétylation des histones H3 et H4 *in vitro* (Lee *et al.* 2004). Nous ne savons cependant pas si HDAC8 a une activité de déacétylation cytoplasmique, ni si une telle activité est aussi affectée par la phosphorylation. Il est également possible que la localisation intracellulaire (noyau *versus* cytoplasme) de HDAC8 soit influencée par sa phosphorylation. Afin de répondre à ces questions, il serait intéressant d'utiliser de nouveaux anticorps anti-phospho(Ser39)-HDAC8 disponibles commercialement depuis peu. A ce jour, il ne peut être exclu que HDAC8 puisse avoir une localisation cellulaire variable en fonction du type cellulaire ou d'éventuelles modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou autre). Dans l'ensemble, nos résultats jettent les bases d'études visant à caractériser les activités précises qu'exerce HDAC8, et plus spécifiquement dans le remodelage du cytosquelette musculaire lisse.

D'un point de vue diagnostique, l'expression d'HDAC8 restreinte aux cellules de phénotype musculaire lisse pourrait être utilisée, par exemple dans les situations dans lesquelles il est nécessaire d'identifier l'origine d'un néoplasme et lorsque l'observation histologique de routine (par exemple après coloration par l'hématoxyline et l'éosine) ne le permet pas. Ainsi, notre laboratoire, en collaboration avec les départements de Pathologie du CHU de Liège et du Massachusetts General Hospital (Boston, MA, USA) a récemment montré que l'immunodétection de HDAC8 pourrait s'avérer un complément utile dans le diagnostic différentiel entre les tumeurs utérines mésoenchymateuses humaines d'origine musculaire lisse et celles développées à partir du stroma endométrial (de Leval *et al.* 2006). Cet outil diagnostique pourrait être étendu à d'autres types de tumeurs dont l'origine est difficile à identifier, telles que les tumeurs stromales gastro-intestinales (« *Gastrointestinal stromal tumors* » ; GISTs) (Fonseca *et al.* 2006; Abraham 2007), ou à des tumeurs musculaires lisses localisées à des sites inhabituels comme la vulve (Khunamornpong *et al.* 2007).

D'un point de vue thérapeutique, il est tentant de s'orienter vers l'utilisation non pas d'inhibiteurs globaux d'HDACs mais d'inhibiteurs spécifiques de celles-ci. Ainsi, deux

équipes ont récemment synthétisé des inhibiteurs spécifiques de HDAC8. Dans un premier temps, Hu *et al.* ont décrit le composé SB-379278-A qui n'est pas capable d'augmenter le niveau d'acétylation des histones dans les cellules SW620. Cet inhibiteur spécifique de HDAC8 n'augmente pas non plus le niveau d'activité du promoteur précoce SV-40 dans les cellules Rat-2 (Hu *et al.* 2003). Puis, au début de cette année, une autre équipe (Krennhrubec *et al.* 2007) a produit une série d'inhibiteurs spécifiques de HDAC8 en se basant sur la conformation spécifique de la poche catalytique de HDAC8, telle qu'observée par analyse cristallographique de complexes HDAC8-inhibiteur d'HDACs (Somoza *et al.* 2004). Ainsi, Krennhrubec *et al.* ont montré qu'un de leurs composés inhibe spécifiquement HDAC8 dans des tests *in vitro* de déacétylation de peptides acétyl-tritiés. De plus, grâce à des analyses par immunoblot utilisant des extraits de cellules HeLa et Hek293 et un anticorps dirigé contre les lysines acétylées, il a été montré que ce composé n'induit pas d'hyperacétylation des histones, mais bien une augmentation du niveau d'acétylation de protéines non-histoniennes, dont il reste à identifier la nature exacte (Krennhrubec *et al.* 2007). Ces observations très récentes renforcent l'hypothèse selon laquelle les histones pourraient ne pas être les substrats d'HDAC8 dans ces lignées cellulaires. Les effets de ces inhibiteurs spécifiques d'HDAC8 sur la contraction de cellules musculaires lisses n'ont malheureusement pas encore été décrits. Cependant, en supposant qu'ils aient pour conséquence de diminuer la capacité contractile de ces cellules, et en espérant qu'ils ne génèrent pas d'effets secondaires empêchant leur administration, leur utilisation pourrait être envisagée dans le traitement de nombreuses pathologies liées à une contraction excessive ou anormale des muscles lisses telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (An *et al.* 2007), l'hypertension (Cain *et al.* 2002), le syndrome du colon irritable, la colique néphrétique, l'instabilité vésicale, l'hyperplasie bénigne de la prostate, ou le travail avant terme.

La suite de notre travail nous a amenés à étudier le rôle des HDACs dans la différenciation myofibroblastique induite par le TGF β 1, phénomène qui est physiopathologiquement proche de la réaction stromale impliquée dans la progression et le développement de certains carcinomes ('stroma réactionnel'). En effet, ce 'stroma réactionnel' est remodelé et fréquemment composé de myofibroblastes et de fibroblastes stimulés à produire, entre autres, certaines protéines de la matrice extracellulaire (Tuxhorn *et al.* 2001; Tuxhorn *et al.* 2002). Nos résultats ont identifié HDAC4 comme étant nécessaire à l'induction de l' α -SMA et de la morphologie myofibroblastique par le TGF β 1. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence le rôle de HDAC4 dans la synthèse de la matrice extracellulaire (données non montrées). Cette observation s'explique peut-être par le fait que l'effet du TGF β 1 pourrait

être médié par des voies de signalisation indépendantes: l'une qui induit des changements phénotypiques et l'expression de l' α -SMA et l'autre qui induit la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (Lindert et al. 2005). A ce jour, nous ne pouvons exclure que que d'autres HDACs pourraient participer à la voie de signalisation du TGF β 1 qui aboutit à la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire.

Le mécanisme exact par lequel HDAC4 affecte l'expression de l'actine α musculaire lisse n'est pas connu mais ne semble pas pouvoir être extrapolé à d'autres isoformes de l'actine. En effet, il a été décrit que dans des cellules COS, la sur-expression de HDAC4 réduit de plus de 80% l'activité basale du promoteur du gène de l'actine α des muscles squelettiques (Davis *et al.* 2003). Nos résultats suggèrent que HDAC4 pourrait réprimer une voie inhibitrice endogène de la signalisation par le TGF β , plus spécifiquement la voie des TGIFs. D'un point de vue mécanistique, une manière de vérifier que HDAC4 bloque bien la différenciation myofibroblastique en réprimant l'expression de TGIF et de TGIF2, serait d'utiliser des siRNAs dirigés contre les transcrits de ces deux protéines, en même temps que ceux dirigés contre HDAC4, afin de rétablir l'expression d' α -SMA induite par le TGF β 1.

Le blocage de la différenciation myofibroblastique induit par la diminution d'abondance de l'expression de HDAC4 pourrait être utilisé à des fins thérapeutiques. Il a été décrit que différents inhibiteurs globaux d'HDACs comme le phénylbutyrate, la TSA et l'acide valproïque, appliqués sur la peau de souris sous forme de crèmes, peuvent supprimer le syndrome cutané causé par les radiations. Les effets de ces inhibiteurs d'HDACs incluent l'induction de la guérison des blessures causées par les radiations et la diminution de la fibrose de la peau (Chung *et al.* 2004). Ainsi, il serait intéressant d'étudier si un inhibiteur spécifique de HDAC4 - qui reste à découvrir - pourrait réduire la fibrose pathologique au niveau cutané ou dans d'autres localisations. Dans ce contexte, l'utilisation d'un tel inhibiteur pour le traitement de maladies telles que la fibrose du foie ou des poumons ou la cicatrisation hypertrophique pourrait s'avérer efficace.

Nous espérons que dans un avenir proche l'identification de la distribution tissulaire de chaque HDAC, l'étude des facteurs affectant leur spécificité, ainsi que le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques d'une seule enzyme permettront de mieux comprendre leurs rôles et fonctions propres et ainsi de développer des outils diagnostiques et thérapeutiques toujours plus pointus.

5. Références

- Abraham, S. C. (2007). "Distinguishing gastrointestinal stromal tumors from their mimics: an update." Adv Anat Pathol 14(3): 178-88.
- Adcock, I. M. (2006). "Histone deacetylase inhibitors as novel anti-inflammatory agents." Curr Opin Investig Drugs 7(11): 966-73.
- Alland, L., R. Muhle, H. Hou, Jr., J. Potes, L. Chin, N. Schreiber-Agus et R. A. DePinho (1997). "Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression." Nature 387(6628): 49-55.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner et A. E. Mirsky (1964). "Acetylation And Methylation Of Histones And Their Possible Role In The Regulation Of Rna Synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A 51: 786-94.
- Alstead, E. M., M. N. Murphy, A. M. Flanagan, A. E. Bishop et H. J. Hodgson (1988). "Familial autonomic visceral myopathy with degeneration of muscularis mucosae." J Clin Pathol 41(4): 424-9.
- Althaus, F. R., L. Hofferer, H. E. Kleczkowska, M. Malanga, H. Naegeli, P. L. Panzeter et C. A. Realini (1994). "Histone shuttling by poly ADP-ribosylation." Mol Cell Biochem 138(1-2): 53-9.
- Amsterdam, A., H. R. Lindner et U. Groschel-Stewart (1977). "Localization of actin and myosin in the rat oocyte and follicular wall by immunofluorescence." Anat Rec 187(3): 311-328.
- An, S. S., T. R. Bai, J. H. Bates, J. L. Black, R. H. Brown, V. Brusasco, P. Chitano, L. Deng, M. Dowell, D. H. Eidelman, *et al.* (2007). "Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma." Eur Respir J 29(5): 834-60.
- Anastasiou, D. et W. Krek (2006). "SIRT1: linking adaptive cellular responses to aging-associated changes in organismal physiology." Physiology (Bethesda) 21: 404-10.
- Apte, M. V., P. S. Haber, T. L. Applegate, I. D. Norton, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola et J. S. Wilson (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." Gut 43(1): 128-133.
- Arnold, M. A., Y. Kim, M. P. Czubryt, D. Phan, J. McAnally, X. Qi, J. M. Shelton, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby et E. N. Olson (2007). "MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development." Dev Cell 12(3): 377-89.
- Atadja, P., M. Hsu, P. Kwon, N. Trogani, K. Bhalla et S. Remiszewski (2004). "Molecular and cellular basis for the anti-proliferative effects of the HDAC inhibitor LAQ824." Novartis Found Symp 259: 249-66; discussion 266-8, 285-8.
- Avalos, J. L., I. Celic, S. Muhammad, M. S. Cosgrove, J. D. Boeke et C. Wolberger (2002). "Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide." Mol Cell 10(3): 523-535.
- Ayer, D. E. (1999). "Histone deacetylases: Transcriptional repression with SINers and NuRDs." Trends Cell Biol 9(5): 193-198.
- Backesjo, C. M., Y. Li, U. Lindgren et L. A. Haldosen (2006). "Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells." J Bone Miner Res 21(7): 993-1002.
- Backs, J., K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang et E. N. Olson (2006). "CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy." J Clin Invest 116(7): 1853-64.
- Bali, P., P. George, P. Cohen, J. Tao, F. Guo, C. Sigua, A. Vishvanath, A. Scuto, S. Annavarapu, W. Fiskus, *et al.* (2004). "Superior activity of the combination of histone

- deacetylase inhibitor LAQ824 and the FLT-3 kinase inhibitor PKC412 against human acute myelogenous leukemia cells with mutant FLT-3." Clin Cancer Res 10(15): 4991-7.
- Baradari, V., A. Huether, M. Hopfner, D. Schuppan et H. Scherubl (2006). "Antiproliferative and proapoptotic effects of histone deacetylase inhibitors on gastrointestinal neuroendocrine tumor cells." Endocr Relat Cancer 13(4): 1237-50.
- Basile, V., R. Mantovani et C. Imbriano (2006). "DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines." J Biol Chem 281(4): 2347-57.
- Benzonana, G., O. Skalli et G. Gabbiani (1988). "Correlation between the distribution of smooth muscle or non muscle myosins and alpha-smooth muscle actin in normal and pathological soft tissues." Cell Motil Cytoskeleton 11(4): 260-274.
- Bertos, N. R., A. H. Wang et X. J. Yang (2001). "Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation." Biochem Cell Biol 79(3): 243-52.
- Bhalla, K. N. (2005). "Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies." J Clin Oncol 23(17): 3971-93.
- Blander, G. et L. Guarente (2004). "The Sir2 family of protein deacetylases." Annu Rev Biochem 73: 417-35.
- Bolden, J. E., M. J. Peart et R. W. Johnstone (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." Nat Rev Drug Discov 5(9): 769-84.
- Bolger, T. A. et T. P. Yao (2005). "Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death." J Neurosci 25(41): 9544-53.
- Bouchain, G. et D. Delorme (2003). "Novel hydroxamate and anilide derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: synthesis and antiproliferative evaluation." Curr Med Chem 10(22): 2359-72.
- Bouras, T., M. Fu, A. A. Sauve, F. Wang, A. A. Quong, N. D. Perkins, R. T. Hay, W. Gu et R. G. Pestell (2005). "SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1." J Biol Chem 280(11): 10264-76.
- Braunstein, M., A. B. Rose, S. G. Holmes, C. D. Allis et J. R. Broach (1993). "Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation." Genes Dev 7(4): 592-604.
- Brinkmann, H., A. L. Dahler, C. Popa, M. M. Serewko, P. G. Parsons, B. G. Gabrielli, A. J. Burgess et N. A. Saunders (2001). "Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase inhibitors is not sufficient to cause growth inhibition in human dermal fibroblasts." J Biol Chem 276(25): 22491-9.
- Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, *et al.* (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." Science 303(5666): 2011-5.
- Bucur, O., S. Ray, M. C. Bucur et A. Almasan (2006). "APO2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy." Front Biosci 11: 1549-68.
- Buggy, J. J., Z. A. Cao, K. E. Bass, E. Verner, S. Balasubramanian, L. Liu, B. E. Schultz, P. R. Young et S. A. Dalrymple (2006). "CRA-024781: a novel synthetic inhibitor of histone deacetylase enzymes with antitumor activity in vitro and in vivo." Mol Cancer Ther 5(5): 1309-17.
- Buggy, J. J., M. L. Sideris, P. Mak, D. D. Lorimer, B. McIntosh et J. M. Clark (2000). "Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8." Biochem J 350: 199-205.

- Butler, L. M., D. B. Agus, H. I. Scher, B. Higgins, A. Rose, C. Cordon-Cardo, H. T. Thaler, R. A. Rifkind, P. A. Marks et V. M. Richon (2000). "Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo." Cancer Res 60(18): 5165-70.
- Byrd, J. C., G. Marcucci, M. R. Parthun, J. J. Xiao, R. B. Klisovic, M. Moran, T. S. Lin, S. Liu, A. R. Sklenar, M. E. Davis, *et al.* (2005). "A phase 1 and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia." Blood 105(3): 959-67.
- Cain, A. E. et R. A. Khalil (2002). "Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney." Semin Nephrol 22(1): 3-16.
- Camoretti-Mercado, B., D. J. Fernandes, S. Dewundara, J. Churchill, L. Ma, P. C. Kogut, J. F. McConville, M. S. Parmacek et J. Solway (2006). "Inhibition of transforming growth factor beta-enhanced serum response factor-dependent transcription by SMAD7." J Biol Chem 281(29): 20383-92.
- Candido, E. P., R. Reeves et J. R. Davie (1978). "Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells." Cell 14(1): 105-13.
- Cao, D., Z. Wang, C. L. Zhang, J. Oh, W. Xing, S. Li, J. A. Richardson, D. Z. Wang et E. N. Olson (2005). "Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin." Mol Cell Biol 25(1): 364-76.
- Caron, C., C. Boyault et S. Khochbin (2005). "Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability." Bioessays 27(4): 408-15.
- Caron, H., B. van Schaik, M. van der Mee, F. Baas, G. Riggins, P. van Sluis, M. C. Hermus, R. van Asperen, K. Boon, P. A. Voute, *et al.* (2001). "The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains." Science 291(5507): 1289-92.
- Casey, T. M., J. Eneman, A. Crocker, J. White, J. Tessitore, M. Stanley, S. Harlow, J. Y. Bunn, D. Weaver, H. Muss, *et al.* (2007). "Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) increase invasion rate of tumor cells: a population study." Breast Cancer Res Treat.
- Centre International de Recherche sur le Cancer, O. (2007). Communiqué de presse N°174.
- Chauchereau, A., M. Mathieu, J. de Saintignon, R. Ferreira, L. L. Pritchard, Z. Mishal, A. Dejean et A. Harel-Bellan (2004). "HDAC4 mediates transcriptional repression by the acute promyelocytic leukaemia-associated protein PLZF." Oncogene 23(54): 8777-84.
- Chen, F., K. Ogawa, R. P. Nagarajan, M. Zhang, C. Kuang et Y. Chen (2003). "Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta." Biochem J 371(Pt 2): 257-63.
- Chen, J., Y. Zhou, S. Mueller-Steiner, L. F. Chen, H. Kwon, S. Yi, L. Mucke et L. Gan (2005). "SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling." J Biol Chem 280(48): 40364-74.
- Chen, L. F. et W. C. Greene (2004). "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." Nat Rev Mol Cell Biol 5(5): 392-401.
- Chen, S. J., W. Yuan, Y. Mori, A. Levenson, M. Trojanowska et J. Varga (1999). "Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3." J Invest Dermatol 112(1): 49-57.
- Chen, Z., S. Clark, M. Birkeland, C. M. Sung, A. Lago, R. Liu, R. Kirkpatrick, K. Johanson, J. D. Winkler et E. Hu (2002). "Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) alpha and beta messenger RNAs by histone deacetylase

- inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells." Cancer Lett 188(1-2): 127-40.
- Cheng, H. L., R. Mostoslavsky, S. Saito, J. P. Manis, Y. Gu, P. Patel, R. Bronson, E. Appella, F. W. Alt et K. F. Chua (2003). "Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 100(19): 10794-9.
- Cheng, W., V. C. Lui, Q. M. Chen et P. K. Tam (2001). "Enteric nervous system, interstitial cells of cajal, and smooth muscle vacuolization in segmental dilatation of jejunum." J Pediatr Surg 36(6): 930-5.
- Chong, Z. Z., S. H. Lin, F. Li et K. Maiese (2005). "The sirtuin inhibitor nicotinamide enhances neuronal cell survival during acute anoxic injury through AKT, BAD, PARP, and mitochondrial associated "anti-apoptotic" pathways." Curr Neurovasc Res 2(4): 271-85.
- Chung, Y. L., A. J. Wang et L. F. Yao (2004). "Antitumor histone deacetylase inhibitors suppress cutaneous radiation syndrome: Implications for increasing therapeutic gain in cancer radiotherapy." Mol Cancer Ther 3(3): 317-25.
- Cohen, H. Y., S. Lavu, K. J. Bitterman, B. Hekking, T. A. Imahiyerobo, C. Miller, R. Frye, H. Ploegh, B. M. Kessler et D. A. Sinclair (2004). "Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis." Mol Cell 13(5): 627-38.
- Cohen, H. Y., C. Miller, K. J. Bitterman, N. R. Wall, B. Hekking, B. Kessler, K. T. Howitz, M. Gorospe, R. de Cabo et D. A. Sinclair (2004). "Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase." Science 305(5682): 390-2.
- Condon, M. S. (2005). "The role of the stromal microenvironment in prostate cancer." Semin Cancer Biol 15(2): 132-7.
- Cui, Y., M. Zhang, R. Pestell, E. M. Curran, W. V. Welshons et S. A. Fuqua (2004). "Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity." Cancer Res 64(24): 9199-208.
- Curtin, M. et K. Glaser (2003). "Histone deacetylase inhibitors: the Abbott experience." Curr Med Chem 10(22): 2373-92.
- Dai, C. et Y. Liu (2004). "Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF." J Am Soc Nephrol 15(6): 1402-12.
- Dangond, F. et S. R. Gullans (1998). "Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate." Biochem Biophys Res Commun 247(3): 833-7.
- Dangond, F., M. Henriksson, G. Zardo, P. Caiafa, T. J. Ekstrom et S. G. Gray (2001). "Differential expression of class I HDACs: roles of cell density and cell cycle." Int J Oncol 19(4): 773-7.
- Das, P. M. et R. Singal (2004). "DNA methylation and cancer." J Clin Oncol 22(22): 4632-42.
- David, G., M. A. Neptune et R. A. DePinho (2002). "SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities." J Biol Chem 277(26): 23658-23663.
- Davis, F. J., M. Gupta, B. Camoretti-Mercado, R. J. Schwartz et M. P. Gupta (2003). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy." J Biol Chem 278(22): 20047-58.

- De Giorgio, R., S. Guerrini, G. Barbara, C. Cremon, V. Stanghellini et R. Corinaldesi (2004). "New insights into human enteric neuropathies." Neurogastroenterol Motil 16 Suppl 1: 143-7.
- de Leval, L., D. Waltregny, J. Boniver, R. H. Young, V. Castronovo et E. Oliva (2006). "Use of histone deacetylase 8 (HDAC8), a new marker of smooth muscle differentiation, in the classification of mesenchymal tumors of the uterus." Am J Surg Pathol 30(3): 319-27.
- de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp et A. B. van Kuilenburg (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." Biochem J 370(Pt 3): 737-49.
- Dequiedt, F., H. Kasler, W. Fischle, V. Kiermer, M. Weinstein, B. G. Herndier et E. Verdin (2003). "HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis." Immunity 18(5): 687-98.
- Deroanne, C. F., K. Bonjean, S. Servotte, L. Devy, A. Colige, N. Clausse, S. Blacher, E. Verdin, J. M. Foidart, B. V. Nusgens, *et al.* (2002). "Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling." Oncogene 21(3): 427-36.
- Derynck, R., Y. Zhang et X. H. Feng (1998). "Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses." Cell 95(6): 737-40.
- Desmouliere, A., A. Geinoz, F. Gabbiani et G. Gabbiani (1993). "Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts." J Cell Biol 122(1): 103-11.
- Drummond, D. C., C. O. Noble, D. B. Kirpotin, Z. Guo, G. K. Scott et C. C. Benz (2005). "Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents." Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 495-528.
- Durst, K. L., B. Lutterbach, T. Kummalu, A. D. Friedman et S. W. Hiebert (2003). "The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain." Mol Cell Biol 23(2): 607-619.
- Eberharter, A. et P. B. Becker (2002). "Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics." EMBO Rep 3(3): 224-9.
- Egger, G., G. Liang, A. Aparicio et P. A. Jones (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." Nature 429(6990): 457-63.
- Elger, M., D. Drenckhahn, R. Nobile, P. Mundel et W. Kriz (1993). "Cultured rat mesangial cells contain smooth muscle alpha-actin not found in vivo." Am J Pathol 142(2): 497-509.
- Ellis, J. J., T. G. Valencia, H. Zeng, L. D. Roberts, R. A. Deaton et S. R. Grant (2003). "CaM kinase IIdelta phosphorylation of 14-3-3beta in vascular smooth muscle cells: activation of class II HDAC repression." Mol Cell Biochem 242(1-2): 153-61.
- Emiliani, S., W. Fischle, C. Van Lint, Y. Al-Abed et E. Verdin (1998). "Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3." Proc Natl Acad Sci U S A 95(6): 2795-800.
- Escaffit, F., O. Vaute, M. Chevillard-Briet, B. Segui, Y. Takami, T. Nakayama et D. Trouche (2007). "Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression." Mol Cell Biol 27(2): 554-67.
- Eyupoglu, I. Y., E. Hahnen, C. Trankle, N. E. Savaskan, F. A. Siebzehrubl, R. Buslei, D. Lemke, W. Wick, R. Fahlbusch et I. Blumcke (2006). "Experimental therapy of malignant gliomas using the inhibitor of histone deacetylase MS-275." Mol Cancer Ther 5(5): 1248-55.

- Finnin, M. S., J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow et N. P. Pavletich (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." Nature 401(6749): 188-193.
- Fischle, W., F. Dequiedt, M. Fillion, M. J. Hendzel, W. Voelter et E. Verdin (2001). "Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo." J Biol Chem 276(38): 35826-35.
- Fischle, W., F. Dequiedt, M. J. Hendzel, M. G. Guenther, M. A. Lazar, W. Voelter et E. Verdin (2002). "Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR." Mol Cell 9(1): 45-57.
- Fischle, W., S. Emiliani, M. J. Hendzel, T. Nagase, N. Nomura, W. Voelter et E. Verdin (1999). "A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p." J Biol Chem 274(17): 11713-20.
- Fischle, W., Y. Wang et C. D. Allis (2003). "Histone and chromatin cross-talk." Curr Opin Cell Biol 15(2): 172-83.
- Fish, J. E., C. C. Matouk, A. Rachlis, S. Lin, S. C. Tai, C. D'Abreo et P. A. Marsden (2005). "The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code." J Biol Chem 280(26): 24824-38.
- Fitzgibbons, P. L. et P. T. Chandrasoma (1987). "Familial visceral myopathy. Evidence of diffuse involvement of intestinal smooth muscle." Am J Surg Pathol 11(11): 846-54.
- Fonseca, I. B., L. S. Spitale, L. Gramatica, H. Cejas, D. J. Piccinni et G. Ghirardi (2006). "[Gastrointestinal stromal tumors: conceptual evolution]." Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba 63(1): 37-45.
- Forte, J. G., B. Ly, Q. Rong, S. Ogihara, M. Ramilo, B. Agnew et X. Yao (1998). "State of actin in gastric parietal cells." Am J Physiol 274(1): C97-104.
- Frye, R. A. (1999). "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity." Biochem Biophys Res Commun 260(1): 273-9.
- Fu, M., M. Rao, C. Wang, T. Sakamaki, J. Wang, D. Di Vizio, X. Zhang, C. Albanese, S. Balk, C. Chang, *et al.* (2003). "Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth." Mol Cell Biol 23(23): 8563-75.
- Fujieda, A., N. Katayama, K. Ohishi, K. Yamamura, T. Shibasaki, Y. Sugimoto, E. Miyata, K. Nishi, M. Masuya, H. Ueda, *et al.* (2005). "A putative role for histone deacetylase in the differentiation of human erythroid cells." Int J Oncol 27(3): 743-8.
- Furumai, R., Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, M. Yoshida et S. Horinouchi (2001). "Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin." Proc Natl Acad Sci U S A 98(1): 87-92.
- Gabbiani, G. (2003). "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases." J Pathol 200(4): 500-3.
- Gabbiani, G., G. B. Ryan et G. Majne (1971). "Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction." Experientia 27(5): 549-50.
- Galasinski, S. C., K. A. Resing, J. A. Goodrich et N. G. Ahn (2002). "Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions." J Biol Chem 277(22): 19618-26.
- Gao, L., M. A. Cueto, F. Asselbergs et P. Atadja (2002). "Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family." J Biol Chem 277(28): 25748-55.
- Gao, Z., Q. He, B. Peng, P. J. Chiao et J. Ye (2006). "Regulation of nuclear translocation of HDAC3 by I κ B α is required for tumor necrosis factor inhibition of

- peroxisome proliferator-activated receptor gamma function." J Biol Chem 281(7): 4540-7.
- Garcia-Manero, G. et J. P. Issa (2005). "Histone deacetylase inhibitors: a review of their clinical status as antineoplastic agents." Cancer Invest 23(7): 635-42.
- Gattuso, J. M., M. A. Kamm et J. C. Talbot (1997). "Pathology of idiopathic megarectum and megacolon." Gut 41: 252-257.
- Gaughan, L., I. R. Logan, S. Cook, D. E. Neal et C. N. Robson (2002). "Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor." J Biol Chem 277(29): 25904-13.
- Gaughan, L., I. R. Logan, D. E. Neal et C. N. Robson (2005). "Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation." Nucleic Acids Res 33(1): 13-26.
- Ghosh, A. K., Y. Mori, E. Dowling et J. Varga (2007). "Trichostatin A blocks TGF-beta-induced collagen gene expression in skin fibroblasts: Involvement of Sp1." Biochem Biophys Res Commun.
- Giannakou, M. E. et L. Partridge (2004). "The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival." Trends Cell Biol 14(8): 408-12.
- Ginies, J. L., H. Francois, M. G. Joseph, G. Champion, L. Coupris et J. M. Limal (1996). "A curable cause of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction in children: idiopathic myositis of the small intestine." J Pediatr Gastroenterol Nutr 23(4): 426-9.
- Gottlicher, M., S. Minucci, P. Zhu, O. H. Kramer, A. Schimpf, S. Giavara, J. P. Sleeman, F. Lo Coco, C. Nervi, P. G. Pelicci, *et al.* (2001). "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells." Embo J 20(24): 6969-78.
- Gray, S. G. et T. J. Ekstrom (2001). "The human histone deacetylase family." Exp Cell Res 262(2): 75-83.
- Greene, W. C. et L. F. Chen (2004). "Regulation of NF-kappaB action by reversible acetylation." Novartis Found Symp 259: 208-17; discussion 218-25.
- Gregoretto, I. V., Y. M. Lee et H. V. Goodson (2004). "Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis." J Mol Biol 338(1): 17-31.
- Grinnell, F. (1994). "Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction." J Cell Biol 124(4): 401-4.
- Gronroos, E., U. Hellman, C. H. Heldin et J. Ericsson (2002). "Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination." Mol Cell 10(3): 483-93.
- Grozinger, C. M., C. A. Hassig et S. L. Schreiber (1999). "Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p." Proc Natl Acad Sci U S A 96(9): 4868-73.
- Grozinger, C. M. et S. L. Schreiber (2000). "Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization." Proc Natl Acad Sci U S A 97(14): 7835-40.
- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature 389(6649): 349-52.
- Gu, W., J. Luo, C. L. Brooks, A. Y. Nikolaev et M. Li (2004). "Dynamics of the p53 acetylation pathway." Novartis Found Symp 259: 197-205; discussion 205-7, 223-5.
- Guarente, L. (2000). "Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging." Genes Dev 14(9): 1021-6.
- Guarente, L. et F. Picard (2005). "Calorie restriction--the SIR2 connection." Cell 120(4): 473-82.

- Gugliotta, P., A. Sapino, L. Macri, O. Skalli, G. Gabbiani et G. Bussolati (1988). "Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody." J Histochem Cytochem 36(6): 659-663.
- Haggarty, S. J., K. M. Koeller, J. C. Wong, C. M. Grozinger et S. L. Schreiber (2003). "Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation." Proc Natl Acad Sci U S A 100(8): 4389-94.
- Haigis, M. C., R. Mostoslavsky, K. M. Haigis, K. Fahie, D. C. Christodoulou, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, M. Karow, G. Blander, *et al.* (2006). "SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells." Cell 126(5): 941-54.
- Han, S., J. Lu, Y. Zhang, C. Cheng, L. Han, X. Wang, L. Li, C. Liu et B. Huang (2006). "Recruitment of histone deacetylase 4 by transcription factors represses interleukin-5 transcription." Biochem J 400(3): 439-48.
- Hassig, C. A. et S. L. Schreiber (1997). "Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs." Curr Opin Chem Biol 1(3): 300-8.
- Hayes, J. J. et J. C. Hansen (2001). "Nucleosomes and the chromatin fiber." Curr Opin Genet Dev 11(2): 124-9.
- Hazan, R. B. et L. Norton (1998). "The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton." J Biol Chem 273(15): 9078-84.
- Hebbes, T. R., A. W. Thorne et C. Crane-Robinson (1988). "A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin." Embo J 7(5): 1395-402.
- Heldin, C. H., K. Miyazono et P. ten Dijke (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature 390(6659): 465-71.
- Hinz, B., G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani et C. Chaponnier (2001). "Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity." Mol Biol Cell 12(9): 2730-41.
- Hinz, B., G. Gabbiani et C. Chaponnier (2002). "The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo." J Cell Biol 157(4): 657-63.
- <http://align.genome.jp>. "ClustalW." Multiple sequence alignment program for DNA or proteins.
- Hu, B., Z. Wu et S. H. Phan (2003). "Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression." Am J Respir Cell Mol Biol 29(3 Pt 1): 397-404.
- Hu, E., Z. Chen, T. Fredrickson, Y. Zhu, R. Kirkpatrick, G. F. Zhang, K. Johanson, C. M. Sung, R. Liu et J. Winkler (2000). "Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor." J Biol Chem 275(20): 15254-15264.
- Hu, E., E. Dul, C. M. Sung, Z. Chen, R. Kirkpatrick, G. F. Zhang, K. Johanson, R. Liu, A. Lago, G. Hofmann, *et al.* (2003). "Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases." J Pharmacol Exp Ther 307(2): 720-728.
- Hu, Z. L., J. F. Wen, D. S. Xiao, H. Zhen et C. Y. Fu (2005). "Effects of transforming growth interacting factor on biological behaviors of gastric carcinoma cells." World J Gastroenterol 11(1): 84-8.
- Huang, E. Y., J. Zhang, E. A. Miska, M. G. Guenther, T. Kouzarides et M. A. Lazar (2000). "Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway." Genes Dev 14(1): 45-54.

- Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X. F. Wang et T. P. Yao (2002). "HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase." Nature 417(6887): 455-458.
- Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaeberlein et L. Guarente (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD- dependent histone deacetylase." Nature 403(6771): 795-800.
- Imai, S., F. B. Johnson, R. A. Marciniak, M. McVey, P. U. Park et L. Guarente (2000). "Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 65: 297-302.
- Inoue, S., A. Mai, M. J. Dyer et G. M. Cohen (2006). "Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis." Cancer Res 66(13): 6785-92.
- Ito, A., Y. Kawaguchi, C. H. Lai, J. J. Kovacs, Y. Higashimoto, E. Appella et T. P. Yao (2002). "MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation." Embo J 21(22): 6236-45.
- Ito, K., S. Yamamura, S. Essilfie-Quaye, B. Cosio, M. Ito, P. J. Barnes et I. M. Adcock (2006). "Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression." J Exp Med 203(1): 7-13.
- Itoh, S., M. Landstrom, A. Hermansson, F. Itoh, C. H. Heldin, N. E. Heldin et P. ten Dijke (1998). "Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7." J Biol Chem 273(44): 29195-201.
- Izutsu, K., M. Kurokawa, Y. Imai, K. Maki, K. Mitani et H. Hirai (2001). "The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling." Blood 97(9): 2815-22.
- Jenuwein, T. et C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science 293(5532): 1074-80.
- Jeon, E. J., K. Y. Lee, N. S. Choi, M. H. Lee, H. N. Kim, Y. H. Jin, H. M. Ryoo, J. Y. Choi, M. Yoshida, N. Nishino, *et al.* (2006). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation." J Biol Chem 281(24): 16502-11.
- Jeong, B. C., C. Y. Hong, S. Chattopadhyay, J. H. Park, E. Y. Gong, H. J. Kim, S. Y. Chun et K. Lee (2004). "Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase." Mol Endocrinol 18(1): 13-25.
- Jeppesen, P. et B. M. Turner (1993). "The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression." Cell 74(2): 281-9.
- Jin, L., Y. Zhou, C. Kuang, L. Lin et Y. Chen (2005). "Expression pattern of TG-interacting factor 2 during mouse development." Gene Expr Patterns 5(4): 457-62.
- Jin, Q., T. Yan, X. Ge, C. Sun, X. Shi et Q. Zhai (2007). "Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis." J Cell Physiol.
- Johnson, C. A. et B. M. Turner (1999). "Histone deacetylases: Complex transducers of nuclear signals." Semin Cell Dev Biol 10(2): 179-188.
- Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." Nat Rev Drug Discov 1(4): 287-99.
- Johnstone, R. W. et J. D. Licht (2003). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target?" Cancer Cell 4(1): 13-8.

- Jostarndt-Fogen, K., V. Djonov et A. Draeger (1998). "Expression of smooth muscle markers in the developing murine lung: potential contractile properties and lineal descent." Histochem Cell Biol 110(3): 273-284.
- Juan, L. J., W. J. Shia, M. H. Chen, W. M. Yang, E. Seto, Y. S. Lin et C. W. Wu (2000). "Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation." J Biol Chem 275(27): 20436-43.
- Kaeberlein, M., M. McVey et L. Guarente (1999). "The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms." Genes Dev 13(19): 2570-80.
- Kaiser, C. et S. R. James (2004). "Acetylation of insulin receptor substrate-1 is permissive for tyrosine phosphorylation." BMC Biol 2: 23.
- Kang, J. S., T. Alliston, R. Delston et R. Derynck (2005). "Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3." Embo J 24(14): 2543-55.
- Kao, G. D., W. G. McKenna, M. G. Guenther, R. J. Muschel, M. A. Lazar et T. J. Yen (2003). "Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response." J Cell Biol 160(7): 1017-27.
- Karamboulas, C., A. Swedani, C. Ward, A. S. Al-Madhoun, S. Wilton, S. Boisvenue, A. G. Ridgeway et I. S. Skerjanc (2006). "HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage." J Cell Sci 119(Pt 20): 4305-14.
- Kato, S., S. Ueda, K. Tamaki, M. Fujii, K. Miyazono, P. ten Dijke, M. Morimatsu et S. Okuda (2001). "Ectopic expression of Smad7 inhibits transforming growth factor-beta responses in vascular smooth muscle cells." Life Sci 69(22): 2641-52.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina et J. V. Small (1999). "Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation." J Cell Biol 146(5): 1033-44.
- Kawai, H., H. Li, S. Avraham, S. Jiang et H. K. Avraham (2003). "Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha." Int J Cancer 107(3): 353-8.
- Kelly, W. K., O. A. O'Connor et P. A. Marks (2002). "Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials." Expert Opin Investig Drugs 11(12): 1695-713.
- Khochbin, S. et A. P. Wolffe (1997). "The origin and utility of histone deacetylases." FEBS Lett 419(2-3): 157-160.
- Khunamornpong, S., K. Sukpan, P. Suprasert, S. Shuangshoti, J. Pintong et S. Siriaunkgul (2007). "Epstein-Barr virus-associated smooth muscle tumor presenting as a vulvar mass in an acquired immunodeficiency syndrome patient: a case report." Int J Gynecol Cancer.
- Kim, H. R., E. J. Kim, S. H. Yang, E. T. Jeong, C. Park, J. H. Lee, M. J. Youn, H. S. So et R. Park (2006). "Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway?" Exp Mol Med 38(6): 616-24.
- Kim, M. M., S. O. Yoon, Y. S. Cho et A. S. Chung (2004). "Histone deacetylases, HDAC1 and HSIR2, act as a negative regulator of ageing through p53 in human gingival fibroblast." Mech Ageing Dev 125(5): 351-7.
- Kim, M. S., H. J. Kwon, Y. M. Lee, J. H. Baek, J. E. Jang, S. W. Lee, E. J. Moon, H. S. Kim, S. K. Lee, H. Y. Chung, *et al.* (2001). "Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes." Nat Med 7(4): 437-43.
- Knoepfler, P. S. et R. N. Eisenman (1999). "Sin meets NuRD and other tails of repression." Cell 99(5): 447-450.

- Knowles, C. H., D. B. Silk, A. Darzi, B. Veress, R. Feakins, A. H. Raimundo, T. Crompton, E. C. Browning, G. Lindberg et J. E. Martin (2004). "Deranged smooth muscle alpha-actin as a biomarker of intestinal pseudo-obstruction: a controlled multinational case series." Gut 53(11): 1583-9.
- Kobayashi, Y., Y. Furukawa-Hibi, C. Chen, Y. Horio, K. Isobe, K. Ikeda et N. Motoyama (2005). "SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress." Int J Mol Med 16(2): 237-43.
- Koipally, J., A. Renold, J. Kim et K. Georgopoulos (1999). "Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes." Embo J 18(11): 3090-3100.
- Kopp, J., E. Preis, H. Said, B. Hafemann, L. Wickert, A. M. Gressner, N. Pallua et S. Dooley (2005). "Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts." J Biol Chem 280(22): 21570-6.
- Kornberg, R. D. et J. O. Thomas (1974). "Chromatin structure; oligomers of the histones." Science 184(139): 865-8.
- Kouzarides, T. (1999). "Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation." Curr Opin Genet Dev 9(1): 40-8.
- Kovacs, J. J., P. J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J. T. Wu, C. V. Nicchitta, M. Yoshida, D. O. Toft, W. B. Pratt et T. P. Yao (2005). "HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor." Mol Cell 18(5): 601-7.
- Kramer, O. H., M. Gottlicher et T. Heinzel (2001). "Histone deacetylase as a therapeutic target." Trends Endocrinol Metab 12(7): 294-300.
- Krennhrubec, K., B. L. Marshall, M. Hedglin, E. Verdin et S. M. Ulrich (2007). "Design and evaluation of 'Linkerless' hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors." Bioorg Med Chem Lett.
- Kumar, A., Z. Lin, S. SenBanerjee et M. K. Jain (2005). "Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases." Mol Cell Biol 25(14): 5893-903.
- Kume, S., M. Haneda, K. Kanasaki, T. Sugimoto, S. Araki, K. Isshiki, M. Isono, T. Uzu, L. Guarente, A. Kashiwagi, *et al.* (2007). "SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation." J Biol Chem 282(1): 151-8.
- Kuo, M. H. et C. D. Allis (1998). "Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation." Bioessays 20(8): 615-26.
- Kuo, M. H., J. Zhou, P. Jambeck, M. E. Churchill et C. D. Allis (1998). "Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo." Genes Dev 12(5): 627-39.
- Langley, E., M. Pearson, M. Faretta, U. M. Bauer, R. A. Frye, S. Minucci, P. G. Pelicci et T. Kouzarides (2002). "Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence." Embo J 21(10): 2383-2396.
- Lazard, D., X. Sastre, M. G. Frid, M. A. Glukhova, J. P. Thiery et V. E. Kotliansky (1993). "Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue." Proc Natl Acad Sci U S A 90(3): 999-1003.
- Lee, H., N. Rezai-Zadeh et E. Seto (2004). "Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A." Mol Cell Biol 24(2): 765-773.
- Lee, H., N. Sengupta, A. Villagra, N. Rezai-Zadeh et E. Seto (2006). "Histone deacetylase 8 safeguards the human ever-shorter telomeres 1B (hEST1B) protein from ubiquitin-mediated degradation." Mol Cell Biol 26(14): 5259-69.

- Lemercier, C., M. P. Brocard, F. Puvion-Dutilleul, H. Y. Kao, O. Albagli et S. Khochbin (2002). "Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor." *J Biol Chem* 277(24): 22045-52.
- Leslie, K. O., J. J. Mitchell, J. L. Woodcock-Mitchell et R. B. Low (1990). "Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung." *Differentiation* 44(2): 143-149.
- Levy, L., Y. Wei, C. Labalette, Y. Wu, C. A. Renard, M. A. Buendia et C. Neuveut (2004). "Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-Tcf4 interaction." *Mol Cell Biol* 24(8): 3404-14.
- Li, J. H., H. J. Zhu, X. R. Huang, K. N. Lai, R. J. Johnson et H. Y. Lan (2002). "Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation." *J Am Soc Nephrol* 13(6): 1464-72.
- Li, M., J. Luo, C. L. Brooks et W. Gu (2002). "Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2." *J Biol Chem* 277(52): 50607-11.
- Lin, H. Y., C. S. Chen, S. P. Lin, J. R. Weng et C. S. Chen (2006). "Targeting histone deacetylase in cancer therapy." *Med Res Rev* 26(4): 397-413.
- Lin, H. Y., R. Hopkins, H. J. Cao, H. Y. Tang, C. Alexander, F. B. Davis et P. J. Davis (2005). "Acetylation of nuclear hormone receptor superfamily members: thyroid hormone causes acetylation of its own receptor by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism." *Steroids* 70(5-7): 444-9.
- Lin, R. J., L. Nagy, S. Inoue, W. Shao, W. H. Miller, Jr. et R. M. Evans (1998). "Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia." *Nature* 391(6669): 811-4.
- Lin, S. J., P. A. Defossez et L. Guarente (2000). "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* 289(5487): 2126-8.
- Lindert, S., L. Wickert, I. Sawitza, E. Wiercinska, A. M. Gressner, S. Dooley et K. Breitkopf (2005). "Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathways leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2." *Matrix Biol* 24(3): 198-207.
- Linggi, B. E., S. J. Brandt, Z. W. Sun et S. W. Hiebert (2005). "Translating the histone code into leukemia." *J Cell Biochem* 96(5): 938-50.
- Little, G. H., Y. Bai, T. Williams et C. Poizat (2007). "Nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta preferentially transmits signals to histone deacetylase 4 in cardiac cells." *J Biol Chem* 282(10): 7219-31.
- Liu, F., M. Dowling, X. J. Yang et G. D. Kao (2004). "Caspase-mediated specific cleavage of human histone deacetylase 4." *J Biol Chem* 279(33): 34537-46.
- Liu, F., N. Pore, M. Kim, K. R. Voong, M. Dowling, A. Maity et G. D. Kao (2006). "Regulation of histone deacetylase 4 expression by the SP family of transcription factors." *Mol Biol Cell* 17(2): 585-97.
- Liu, Y. (2004). "Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action." *Am J Physiol Renal Physiol* 287(1): F7-16.
- Liu, Y., W. R. Randall et M. F. Schneider (2005). "Activity-dependent and -independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle." *J Cell Biol* 168(6): 887-97.
- Long, J., I. Matsuura, D. He, G. Wang, K. Shuai et F. Liu (2003). "Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17): 9791-6.

- Longtine, J. A., G. S. Pinkus, K. Fujiwara et J. M. Corson (1985). "Immunohistochemical localization of smooth muscle myosin in normal human tissues." J Histochem Cytochem 33(3): 179-84.
- Longworth, M. S. et L. A. Laimins (2006). "Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src." Oncogene 25(32): 4495-500.
- Luger, K. et T. J. Richmond (1998). "DNA binding within the nucleosome core." Curr Opin Struct Biol 8(1): 33-40.
- Luo, J., A. Y. Nikolaev, S. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente et W. Gu (2001). "Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress." Cell 107(2): 137-148.
- Luo, J., F. Su, D. Chen, A. Shiloh et W. Gu (2000). "Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis." Nature 408(6810): 377-381.
- Lusser, A., G. Brosch, A. Loidl, H. Haas et P. Loidl (1997). "Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein." Science 277(5322): 88-91.
- Lygoe, K. A., I. Wall, P. Stephens et M. P. Lewis (2007). "The role of vitronectin and fibronectin receptors in oral mucosal and dermal myofibroblast differentiation." Biol Cell.
- Mao, C. et D. J. Shapiro (2000). "A histone deacetylase inhibitor potentiates estrogen receptor activation of a stably integrated vitellogenin promoter in HepG2 cells." Endocrinology 141(7): 2361-9.
- Marks, P., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller et W. K. Kelly (2001). "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." Nat Rev Cancer 1(3): 194-202.
- Marks, P. A. et M. Dokmanovic (2005). "Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents." Expert Opin Investig Drugs 14(12): 1497-511.
- Marks, P. A., T. Miller et V. M. Richon (2003). "Histone deacetylases." Curr Opin Pharmacol 3(4): 344-51.
- Marks, P. A., V. M. Richon, T. Miller et W. K. Kelly (2004). "Histone deacetylase inhibitors." Adv Cancer Res 91: 137-68.
- Marmorstein, R. (2004). "Structure and chemistry of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deactylases." Biochem Soc Trans 32(Pt 6): 904-9.
- Martinez-Balbas, M. A., U. M. Bauer, S. J. Nielsen, A. Brehm et T. Kouzarides (2000). "Regulation of E2F1 activity by acetylation." Embo J 19(4): 662-71.
- Massague, J. et D. Wotton (2000). "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system." Embo J 19(8): 1745-54.
- Matsuyama, A., T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, *et al.* (2002). "In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation." Embo J 21(24): 6820-31.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, J. Lu et E. N. Olson (2000). "Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation." Nature 408(6808): 106-111.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang et E. N. Olson (2000). "Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5." Proc Natl Acad Sci U S A 97(26): 14400-14405.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang et E. N. Olson (2001). "Control of muscle development by dueling HATs and HDACs." Curr Opin Genet Dev 11(5): 497-504.
- Megee, P. C., B. A. Morgan, B. A. Mittman et M. M. Smith (1990). "Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation." Science 247(4944): 841-5.

- Mei, S., A. D. Ho et U. Mahlknecht (2004). "Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review)." Int J Oncol 25(6): 1509-19.
- Melhuish, T. A., C. M. Gallo et D. Wotton (2001). "TGIF2 interacts with histone deacetylase 1 and represses transcription." J Biol Chem 276(34): 32109-14.
- Melhuish, T. A. et D. Wotton (2006). "The Tgif2 gene contains a retained intron within the coding sequence." BMC Mol Biol 7: 2.
- Michan, S. et D. Sinclair (2007). "Sirtuins in mammals: insights into their biological function." Biochem J 404(1): 1-13.
- Miller, T. A., D. J. Witter et S. Belvedere (2003). "Histone deacetylase inhibitors." J Med Chem 46(24): 5097-116.
- Minucci, S., V. Horn, N. Bhattacharyya, V. Russanova, V. V. Ogryzko, L. Gabriele, B. H. Howard et K. Ozato (1997). "A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A 94(21): 11295-300.
- Minucci, S., C. Nervi, F. Lo Coco et P. G. Pelicci (2001). "Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?" Oncogene 20(24): 3110-5.
- Miska, E. A., C. Karlsson, E. Langley, S. J. Nielsen, J. Pines et T. Kouzarides (1999). "HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor." Embo J 18(18): 5099-107.
- Miska, E. A., E. Langley, D. Wolf, C. Karlsson, J. Pines et T. Kouzarides (2001). "Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation." Nucleic Acids Res 29(16): 3439-47.
- Mitros, F. A., M. D. Schuffler, K. Teja et S. Anuras (1982). "Pathologic features of familial visceral myopathy." Hum Pathol 13(9): 825-33.
- Mizzen, C. A. et C. D. Allis (2000). "Transcription. New insights into an old modification." Science 289(5488): 2290-1.
- Monneret, C. (2007). "Histone deacetylase inhibitors for epigenetic therapy of cancer." Anticancer Drugs 18(4): 363-70.
- Montgomery, R. L., C. A. Davis, M. J. Potthoff, M. Haberland, J. Fielitz, X. Qi, J. A. Hill, J. A. Richardson et E. N. Olson (2007). "Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility." Genes Dev 21(14): 1790-802.
- Moore, S. W., J. W. Schneider et R. O. Kaschula (2002). "Unusual variations of gastrointestinal smooth muscle abnormalities associated with chronic intestinal pseudo-obstruction." Pediatr Surg Int 18(1): 13-20.
- Motta, M. C., N. Divecha, M. Lemieux, C. Kamel, D. Chen, W. Gu, Y. Bultsma, M. McBurney et L. Guarente (2004). "Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors." Cell 116(4): 551-63.
- Munshi, N., M. Merika, J. Yie, K. Senger, G. Chen et D. Thanos (1998). "Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome." Mol Cell 2(4): 457-67.
- Nagy, L., H. Y. Kao, D. Chakravarti, R. J. Lin, C. A. Hassig, D. E. Ayer, S. L. Schreiber et R. M. Evans (1997). "Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase." Cell 89(3): 373-380.
- Nair, A. R., L. J. Boersma, L. Schiltz, M. A. Chaudhry et R. J. Muschel (2001). "Paradoxical effects of trichostatin A: inhibition of NF- κ B-associated histone acetyltransferase activity, phosphorylation of hGCN5 and downregulation of cyclin A and B1 mRNA." Cancer Lett 166(1): 55-64.

- Nakajima, H., Y. B. Kim, H. Terano, M. Yoshida et S. Horinouchi (1998). "FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor." Exp Cell Res 241(1): 126-33.
- Newmark, H. L., J. R. Lupton et C. W. Young (1994). "Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status." Cancer Lett 78(1-3): 1-5.
- Newmark, H. L. et C. W. Young (1995). "Butyrate and phenylacetate as differentiating agents: practical problems and opportunities." J Cell Biochem Suppl 22: 247-53.
- Nezelof, C., E. Vivien, P. Bigel, C. Nihoul-Fekete, F. Arnaud-Battandier, J. L. Bresson, P. Arhan et C. Ricour (1985). "[Idiopathic myositis of the small intestine. An unusual cause of chronic intestinal pseudo-obstruction in children]." Arch Fr Pediatr 42(10): 823-8.
- Ng, H. H. et A. Bird (2000). "Histone deacetylases: silencers for hire." Trends Biochem Sci 25(3): 121-6.
- Nicholson, J. M., C. M. Wood, C. D. Reynolds, A. Brown, S. J. Lambert, L. Chantalat et J. P. Baldwin (2004). "Histone structures: targets for modifications by molecular assemblies." Ann N Y Acad Sci 1030: 644-55.
- Nielsen, P. R., D. Nietlispach, H. R. Mott, J. Callaghan, A. Bannister, T. Kouzarides, A. G. Murzin, N. V. Murzina et E. D. Laue (2002). "Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9." Nature 416(6876): 103-7.
- Nielsen, S. J., R. Schneider, U. M. Bauer, A. J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, M. Cleary, T. Jenuwein, R. E. Herrera, *et al.* (2001). "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters." Nature 412(6846): 561-5.
- Niessen, P., S. Clement, L. Fontao, C. Chaponnier, B. Teunissen, S. Rensen, G. van Eys et G. Gabbiani (2004). "Biochemical evidence for interaction between smoothelin and filamentous actin." Exp Cell Res 292(1): 170-8.
- North, B. J., B. L. Marshall, M. T. Borra, J. M. Denu et E. Verdin (2003). "The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase." Mol Cell 11(2): 437-44.
- Nouchi, T., Y. Tanaka, T. Tsukada, C. Sato et F. Marumo (1991). "Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis." Liver 11(2): 100-105.
- O'Shea, J. J., Y. Kanno, X. Chen et D. E. Levy (2005). "Cell signaling. Stat acetylation--a key facet of cytokine signaling?" Science 307(5707): 217-8.
- Onyango, P., I. Celic, J. M. McCaffery, J. D. Boeke et A. P. Feinberg (2002). "SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A 99(21): 13653-13658.
- Parekh, B. S. et T. Maniatis (1999). "Virus infection leads to localized hyperacetylation of histones H3 and H4 at the IFN-beta promoter." Mol Cell 3(1): 125-9.
- Paroni, G., M. Mizzau, C. Henderson, G. Del Sal, C. Schneider et C. Brancolini (2004). "Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis." Mol Biol Cell 15(6): 2804-18.
- Pazmany, T. et T. B. Tomasi (2006). "The major histocompatibility complex class II transactivator is differentially regulated by interferon-gamma and transforming growth factor-beta in microglial cells." J Neuroimmunol 172(1-2): 18-26.
- Peixoto, P. et A. Lansiaux (2006). "[Histone-deacetylases inhibitors: from TSA to SAHA]." Bull Cancer 93(1): 27-36.
- Peltonen, K., T. M. Kiviharju, P. M. Jarvinen, R. Ra et M. Laiho (2005). "Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis." Pigment Cell Res 18(3): 196-202.

- Pflum, M. K., J. K. Tong, W. S. Lane et S. L. Schreiber (2001). "Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation." J Biol Chem 276(50): 47733-47741.
- Piekarz, R. L., R. Robey, V. Sandor, S. Bakke, W. H. Wilson, L. Dahmouh, D. M. Kingma, M. L. Turner, R. Altemus et S. E. Bates (2001). "Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report." Blood 98(9): 2865-8.
- Pollard, T. D. et J. A. Cooper (1982). "Methods to characterize actin filament networks." Methods Enzymol 85: 211-33.
- Pollard, T. D. et J. A. Cooper (1986). "Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions." Annu Rev Biochem 55: 987-1035.
- Powell, D. W., R. C. Mifflin, J. D. Valentich, S. E. Crowe, J. I. Saada et A. B. West (1999). "Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease." Am J Physiol 277(1 Pt 1): C1-9.
- Prasad, K. N. (1980). "Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions." Life Sci 27(15): 1351-8.
- Protacio, R. U., G. Li, P. T. Lowary et J. Widom (2000). "Effects of histone tail domains on the rate of transcriptional elongation through a nucleosome." Mol Cell Biol 20(23): 8866-78.
- Puccetti, E., X. Zheng, D. Brambilla, A. Seshire, T. Beissert, S. Boehrer, H. Nurnberger, D. Hoelzer, O. G. Ottmann, C. Nervi, *et al.* (2005). "The integrity of the charged pocket in the BTB/POZ domain is essential for the phenotype induced by the leukemia-associated t(11;17) fusion protein PLZF/RARalpha." Cancer Res 65(14): 6080-8.
- Quivy, V. et C. Van Lint (2004). "Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation." Biochem Pharmacol 68(6): 1221-9.
- Ramadori, G., T. Veit, S. Schwogler, H. P. Dienes, T. Knittel, H. Rieder et K. H. Meyer zum Buschenfelde (1990). "Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 59(6): 349-357.
- Remiszewski, S. W. (2003). "The discovery of NVP-LAQ824: from concept to clinic." Curr Med Chem 10(22): 2393-402.
- Rice, J. C. et C. D. Allis (2001). "Code of silence." Nature 414(6861): 258-61.
- Richon, V. M., S. Emiliani, E. Verdin, Y. Webb, R. Breslow, R. A. Rifkind et P. A. Marks (1998). "A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases." Proc Natl Acad Sci U S A 95(6): 3003-7.
- Richon, V. M., Y. Webb, R. Merger, T. Sheppard, B. Jursic, L. Ngo, F. Civoli, R. Breslow, R. A. Rifkind et P. A. Marks (1996). "Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A 93(12): 5705-8.
- Rishikof, D. C., D. A. Ricupero, H. Liu et R. H. Goldstein (2004). "Phenylbutyrate decreases type I collagen production in human lung fibroblasts." J Cell Biochem 91(4): 740-8.
- Roberts, A. B., M. B. Sporn, R. K. Assoian, J. M. Smith, N. S. Roche, L. M. Wakefield, U. I. Heine, L. A. Liotta, V. Falanga, J. H. Kehrl, *et al.* (1986). "Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 83(12): 4167-71.
- Rockey, D. C., J. K. Boyles, G. Gabbiani et S. L. Friedman (1992). "Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture." J Submicrosc Cytol Pathol 24(2): 193-203.

- Rogina, B. et S. L. Helfand (2004). "Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction." Proc Natl Acad Sci U S A 101(45): 15998-6003.
- Rombouts, K., T. Niki, P. Greenwel, A. Vandermonde, A. Wielant, K. Hellemans, P. De Bleser, M. Yoshida, D. Schuppan, M. Rojkind, *et al.* (2002). "Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF-beta(1)-induced fibrogenesis in skin fibroblasts." Exp Cell Res 278(2): 184-97.
- Ronnov-Jessen, L. et O. W. Petersen (1993). "Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia." Lab Invest 68(6): 696-707.
- Ronnov-Jessen, L., O. W. Petersen et M. J. Bissell (1996). "Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction." Physiol Rev 76(1): 69-125.
- Rossig, L., C. Urbich, T. Bruhl, E. Dernbach, C. Heeschen, E. Chavakis, K. Sasaki, D. Aicher, F. Diehl, F. Seeger, *et al.* (2005). "Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells." J Exp Med 201(11): 1825-35.
- Roy, S., K. Packman, R. Jeffrey et M. Tenniswood (2005). "Histone deacetylase inhibitors differentially stabilize acetylated p53 and induce cell cycle arrest or apoptosis in prostate cancer cells." Cell Death Differ 12(5): 482-91.
- Rumessen, J. J. et J. M. Vanderwinden (2003). "Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond." Int Rev Cytol 229: 115-208.
- Rundlett, S. E., A. A. Carmen, R. Kobayashi, S. Bavykin, B. M. Turner et M. Grunstein (1996). "HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription." Proc Natl Acad Sci U S A 93(25): 14503-8.
- Ruuska, T. H., R. Karikoski, V. V. Smith et P. J. Milla (2002). "Acquired myopathic intestinal pseudo-obstruction may be due to autoimmune enteric leiomyositis." Gastroenterology 122(4): 1133-9.
- Ruzanov, P. V., V. M. Evdokimova, N. L. Korneeva, J. W. Hershey et L. P. Ovchinnikov (1999). "Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments." J Cell Sci 112: 3487-96.
- Ryan, Q. C., D. Headlee, M. Acharya, A. Sparreboom, J. B. Trepel, J. Ye, W. D. Figg, K. Hwang, E. J. Chung, A. Murgo, *et al.* (2005). "Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma." J Clin Oncol 23(17): 3912-22.
- Sadekova, S., N. Lamarche-Vane, X. Li et N. Beauchemin (2000). "The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases." Mol Biol Cell 11(1): 65-77.
- Saito, A., T. Yamashita, Y. Mariko, Y. Nosaka, K. Tsuchiya, T. Ando, T. Suzuki, T. Tsuruo et O. Nakanishi (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(8): 4592-7.
- Sakuma, T., K. Uzawa, T. Onda, M. Shiiba, H. Yokoe, T. Shibahara et H. Tanzawa (2006). "Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma." Int J Oncol 29(1): 117-24.
- Sanders, K. M., S. D. Koh et S. M. Ward (2006). "Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract." Annu Rev Physiol 68: 307-43.

- Saunders, L. R. et E. Verdin (2006). "Ornithine decarboxylase activity in tumor cell lines correlates with sensitivity to cell death induced by histone deacetylase inhibitors." Mol Cancer Ther 5(11): 2777-85.
- Saunders, L. R. et E. Verdin (2007). "Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging." Oncogene 26(37): 5489-504.
- Scacheri, P. C., O. Rozenblatt-Rosen, N. J. Caplen, T. G. Wolfsberg, L. Umayam, J. C. Lee, C. M. Hughes, K. S. Shanmugam, A. Bhattacharjee, M. Meyerson, *et al.* (2004). "Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A 101(7): 1892-7.
- Schemann, M. et M. Neunlist (2004). "The human enteric nervous system." Neurogastroenterol Motil 16: 55-59.
- Scher, M. B., A. Vaquero et D. Reinberg (2007). "SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress." Genes Dev 21(8): 920-8.
- Schmitt-Graff, A., A. Desmouliere et G. Gabbiani (1994). "Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: An example of fibroblastic cell plasticity." Virchows Arch 425(1): 3-24.
- Schmitt-Graff, A., S. Kruger, F. Bochard, G. Gabbiani et H. Denk (1991). "Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers." Am J Pathol 138(5): 1233-1242.
- Schuffler, M. D., M. C. Lowe et A. H. Bill (1977). "Studies of idiopathic intestinal pseudoobstruction. I. Hereditary hollow visceral myopathy: clinical and pathological studies." Gastroenterology 73(2): 327-38.
- Schurch, W., O. Skalli, T. A. Seemayer et G. Gabbiani (1987). "Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. I. Smooth muscle tumors." Am J Pathol 128(1): 91-103.
- Schwer, B., J. Bunkenborg, R. O. Verdin, J. S. Andersen et E. Verdin (2006). "Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2." Proc Natl Acad Sci U S A 103(27): 10224-9.
- Schwer, B., B. J. North, R. A. Frye, M. Ott et E. Verdin (2002). "The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase." J Cell Biol 158(4): 647-657.
- Seo, S. R., N. Ferrand, N. Faresse, C. Prunier, L. Abecassis, M. Pessah, M. F. Bourgeade et A. Atfi (2006). "Nuclear retention of the tumor suppressor cPML by the homeodomain protein TGIF restricts TGF-beta signaling." Mol Cell 23(4): 547-59.
- Seo, S. R., F. Lallemand, N. Ferrand, M. Pessah, S. L'Hoste, J. Camonis et A. Atfi (2004). "The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation." Embo J 23(19): 3780-92.
- Serini, G. et G. Gabbiani (1999). "Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation." Exp Cell Res 250(2): 273-83.
- Sharma, M. et Z. Sun (2001). "5'TG3' interacting factor interacts with Sin3A and represses AR-mediated transcription." Mol Endocrinol 15(11): 1918-28.
- Shen, T., Y. Liu, W. R. Randall et M. F. Schneider (2006). "Parallel mechanisms for resting nucleo-cytoplasmic shuttling and activity dependent translocation provide dual control of transcriptional regulators HDAC and NFAT in skeletal muscle fiber type plasticity." J Muscle Res Cell Motil 27(5-7): 405-11.
- Simonsson, M., C. H. Heldin, J. Ericsson et E. Gronroos (2005). "The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability." J Biol Chem 280(23): 21797-803.

- Skalli, O., P. Ropraz, A. Trzeciak, G. Benzonana, D. Gillesen et G. Gabbiani (1986). "A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation." J Cell Biol 103(6 Pt 2): 2787-96.
- Smith, J. (2002). "Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity." Trends Cell Biol 12(9): 404-406.
- Smith, P. C., M. Caceres et J. Martinez (2006). "Induction of the myofibroblastic phenotype in human gingival fibroblasts by transforming growth factor-beta1: role of RhoA-ROCK and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways." J Periodontal Res 41(5): 418-25.
- Smith, V. V. et P. J. Milla (1997). "Histological phenotypes of enteric smooth muscle disease causing functional intestinal obstruction in childhood." Histopathology 31: 112-122.
- Solomon, J. M., R. Pasupuleti, L. Xu, T. McDonagh, R. Curtis, P. S. DiStefano et L. J. Huber (2006). "Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage." Mol Cell Biol 26(1): 28-38.
- Somech, R., S. Izraeli et J. S. A (2004). "Histone deacetylase inhibitors--a new tool to treat cancer." Cancer Treat Rev 30(5): 461-72.
- Somoza, J. R., R. J. Skene, B. A. Katz, C. Mol, J. D. Ho, A. J. Jennings, C. Luong, A. Arvai, J. J. Buggy, E. Chi, *et al.* (2004). "Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the Class I histone deacetylases." Structure (Camb) 12(7): 1325-1334.
- Sonnemann, J., J. Gange, K. S. Kumar, C. Muller, P. Bader et J. F. Beck (2005). "Histone deacetylase inhibitors interact synergistically with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in carcinoma cell lines." Invest New Drugs 23(2): 99-109.
- Strahl, B. D. et C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature 403(6765): 41-5.
- Subramanian, C., A. W. Opiari, Jr., X. Bian, V. P. Castle et R. P. Kwok (2005). "Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 102(13): 4842-7.
- Suzuki, T., T. Ando, K. Tsuchiya, N. Fukazawa, A. Saito, Y. Mariko, T. Yamashita et O. Nakanishi (1999). "Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives." J Med Chem 42(15): 3001-3.
- Taghiyev, A. F., N. V. Guseva, R. A. Glover, O. W. Rokhlin et M. B. Cohen (2006). "TSA-induced cell death in prostate cancer cell lines is caspase-2 dependent and involves the PIDDosome." Cancer Biol Ther 5(9): 1199-205.
- Takami, Y. et T. Nakayama (2000). "N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal, and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line." J Biol Chem 275(21): 16191-201.
- Tang, B. L. et C. E. Chua (2007). "SIRT1 and neuronal diseases." Mol Aspects Med.
- Tanno, M., J. Sakamoto, T. Miura, K. Shimamoto et Y. Horio (2007). "Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1." J Biol Chem 282(9): 6823-32.
- Taunton, J., C. A. Hassig et S. L. Schreiber (1996). "A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p." Science 272(5260): 408-11.
- Thevenet, L., C. Mejean, B. Moniot, N. Bonneaud, N. Galeotti, G. Aldrian-Herrada, F. Poulat, P. Berta, M. Benkirane et B. Boizet-Bonhoure (2004). "Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation." Embo J 23(16): 3336-45.
- Thiagalingam, S., K. H. Cheng, H. J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam et J. F. Ponte (2003). "Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code." Ann N Y Acad Sci 983: 84-100.

- Tissenbaum, H. A. et L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Nature 410(6825): 227-30.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier et R. A. Brown (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol 3(5): 349-63.
- Tong, X., L. Yin et C. Giardina (2004). "Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition." Biochem Biophys Res Commun 317(2): 463-71.
- Touma, S. E., J. S. Goldberg, P. Moench, X. Guo, S. K. Tickoo, L. J. Gudas et D. M. Nanus (2005). "Retinoic acid and the histone deacetylase inhibitor trichostatin a inhibit the proliferation of human renal cell carcinoma in a xenograft tumor model." Clin Cancer Res 11(9): 3558-66.
- Tran, A. D., T. P. Marmo, A. A. Salam, S. Che, E. Finkelstein, R. Kabarriti, H. S. Xenias, R. Mazitschek, C. Hubbert, Y. Kawaguchi, *et al.* (2007). "HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions." J Cell Sci 120(Pt 8): 1469-79.
- Tsai, S. C. et E. Seto (2002). "Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2." J Biol Chem 277(35): 31826-33.
- Tse, C., T. Sera, A. P. Wolffe et J. C. Hansen (1998). "Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III." Mol Cell Biol 18(8): 4629-38.
- Tsuji, N., M. Kobayashi, K. Nagashima, Y. Wakisaka et K. Koizumi (1976). "A new antifungal antibiotic, trichostatin." J Antibiot (Tokyo) 29(1): 1-6.
- Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala et D. R. Rowley (2001). "Reactive stroma in prostate cancer progression." J Urol 166(6): 2472-83.
- Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala, M. J. Smith, V. C. Smith, T. D. Dang et D. R. Rowley (2002). "Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling." Clin Cancer Res 8(9): 2912-23.
- Ungerstedt, J. S., Y. Sowa, W. S. Xu, Y. Shao, M. Dokmanovic, G. Perez, L. Ngo, A. Holmgren, X. Jiang et P. A. Marks (2005). "Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 102(3): 673-8.
- Urnov, F. D. et A. P. Wolffe (2001). "Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance)." Oncogene 20(24): 2991-3006.
- Valcourt, U., M. Kowanetz, H. Niimi, C. H. Heldin et A. Moustakas (2005). "TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition." Mol Biol Cell 16(4): 1987-2002.
- Van den Wyngaert, I., W. de Vries, A. Kremer, J. Neefs, P. Verhasselt, W. H. Luyten et S. U. Kass (2000). "Cloning and characterization of human histone deacetylase 8." FEBS Lett 478(1-2): 77-83.
- van der Horst, A., L. G. Tertoolen, L. M. de Vries-Smits, R. A. Frye, R. H. Medema et B. M. Burgering (2004). "FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1)." J Biol Chem 279(28): 28873-9.
- Van Lint, C., S. Emiliani et E. Verdin (1996). "The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation." Gene Expr 5(4-5): 245-53.
- Vannini, A., C. Volpari, G. Filocamo, E. C. Casavola, M. Brunetti, D. Renzoni, P. Chakravarty, C. Paolini, R. De Francesco, P. Gallinari, *et al.* (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.

- VanOosten, R. L., J. M. Moore, B. Karacay et T. S. Griffith (2005). "Histone deacetylase inhibitors modulate renal cell carcinoma sensitivity to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis by enhancing TRAIL-R2 expression." Cancer Biol Ther 4(10): 1104-12.
- Vaziri, H., S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente et R. A. Weinberg (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell 107(2): 149-159.
- Vega, R. B., K. Matsuda, J. Oh, A. C. Barbosa, X. Yang, E. Meadows, J. McAnally, C. Pomajzl, J. M. Shelton, J. A. Richardson, *et al.* (2004). "Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis." Cell 119(4): 555-66.
- Verdin, E., F. Dequiedt et H. G. Kasler (2003). "Class II histone deacetylases: versatile regulators." Trends Genet 19(5): 286-93.
- Verrecchia, F. et A. Mauviel (2002). "Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation." J Invest Dermatol 118(2): 211-5.
- Vigushin, D. M., S. Ali, P. E. Pace, N. Mirsaidi, K. Ito, I. Adcock et R. C. Coombes (2001). "Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo." Clin Cancer Res 7(4): 971-6.
- Wallis, B., U. Groschel-Stewart, P. Kannisto, C. Owman, N. O. Sjoberg et K. Unsicker (1990). "Immunocytochemical demonstration of contractile cells in the human ovarian follicle." Experientia 46(7): 682-683.
- Waltregny, D., B. North, F. Van Mellaert, J. de Leval, E. Verdin et V. Castronovo (2004). "Screening of histone deacetylases (HDAC) expression in human prostate cancer reveals distinct class I HDAC profiles between epithelial and stromal cells." Eur J Histochem 48(3): 273-90.
- Waltregny, D., B. J. North, F. Van Mellaert, J. de Leval, E. Verdin et V. Castronovo (2004). "Screening of histone deacetylases (HDAC) expression in human prostate cancer reveals distinct class I HDAC profiles between epithelial and stromal cells." Eur J Histochem 48: 273-290.
- Wang, A. H., N. R. Bertos, M. Vezmar, N. Pelletier, M. Crosato, H. H. Heng, J. Th'ng, J. Han et X. J. Yang (1999). "HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor." Mol Cell Biol 19(11): 7816-27.
- Wang, A. H., M. J. Kruhlak, J. Wu, N. R. Bertos, M. Vezmar, B. I. Posner, D. P. Bazett-Jones et X. J. Yang (2000). "Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins." Mol Cell Biol 20(18): 6904-12.
- Wang, A. H. et X. J. Yang (2001). "Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals." Mol Cell Biol 21(17): 5992-6005.
- Wang, C., M. Fu, R. H. Angeletti, L. Siconolfi-Baez, A. T. Reutens, C. Albanese, M. P. Lisanti, B. S. Katzenellenbogen, S. Kato, T. Hopp, *et al.* (2001). "Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity." J Biol Chem 276(21): 18375-83.
- Wang, Y. et H. A. Tissenbaum (2006). "Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO." Mech Ageing Dev 127(1): 48-56.
- Watanabe, K., M. Towatari, Y. Ozawa, Y. Miyata, M. Okamoto, A. Abe, T. Naoe et H. Saito (2003). "Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation." Oncogene 22(57): 9176-84.
- Waterman-Storer, C. M. et E. Salmon (1999). "Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility." Curr Opin Cell Biol 11(1): 61-7.
- Wedel, T., G. J. Van Eys, D. Waltregny, W. Glenisson, V. Castronovo et J. M. Vanderwinden (2006). "Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal

- musculature in severe colorectal motility disorders." Neurogastroenterol Motil 18(7): 526-38.
- Wetzel, M., D. R. Premkumar, B. Arnold et I. F. Pollack (2005). "Effect of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, on glioma proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest and apoptosis." J Neurosurg 103(6 Suppl): 549-56.
- Wijmenga, C., P. E. Gregory, A. Hajra, E. Schrock, T. Ried, R. Eils, P. P. Liu et F. S. Collins (1996). "Core binding factor beta-smooth muscle myosin heavy chain chimeric protein involved in acute myeloid leukemia forms unusual nuclear rod-like structures in transformed NIH 3T3 cells." Proc Natl Acad Sci U S A 93(4): 1630-5.
- Williams, R. J. (2001). "Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits hypoxia-induced angiogenesis." Expert Opin Investig Drugs 10(8): 1571-3.
- Wolf, D., M. Rodova, E. A. Miska, J. P. Calvet et T. Kouzarides (2002). "Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP)." J Biol Chem 277(28): 25562-7.
- Wolffe, A. P. (1996). "Histone deacetylase: a regulator of transcription." Science 272(5260): 371-2.
- Woo, S. H., S. Frechette, E. Abou Khalil, G. Bouchain, A. Vaisburg, N. Bernstein, O. Moradei, S. Leit, M. Allan, M. Fournel, *et al.* (2002). "Structurally simple trichostatin A-like straight chain hydroxamates as potent histone deacetylase inhibitors." J Med Chem 45(13): 2877-85.
- Wood, J. G., B. Rogina, S. Lavu, K. Howitz, S. L. Helfand, M. Tatar et D. Sinclair (2004). "Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans." Nature 430(7000): 686-9.
- Woodcock, C. L. et S. Dimitrov (2001). "Higher-order structure of chromatin and chromosomes." Curr Opin Genet Dev 11(2): 130-5.
- Worman, S. et T. G. Ganiats (1995). "Hirschsprung's disease: a cause of chronic constipation in children." Am Fam Physician 51(2): 487-94.
- Wotton, D. et J. Massague (2001). "Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling." Curr Top Microbiol Immunol 254: 145-64.
- Wu, X., T. Zhang, J. Bossuyt, X. Li, T. A. McKinsey, J. R. Dedman, E. N. Olson, J. Chen, J. H. Brown et D. M. Bers (2006). "Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling." J Clin Invest 116(3): 675-82.
- Xu, W. S., R. B. Parmigiani et P. A. Marks (2007). "Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action." Oncogene 26(37): 5541-52.
- Yamamoto, H., K. Schoonjans et J. Auwerx (2007). "Sirtuin Functions In Health And Disease." Mol Endocrinol.
- Yang, T., M. Fu, R. Pestell et A. A. Sauve (2006). "SIRT1 and endocrine signaling." Trends Endocrinol Metab 17(5): 186-91.
- Yang, W. M., C. Inouye, Y. Zeng, D. Bearss et E. Seto (1996). "Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 12845-50.
- Yang, W. M., S. C. Tsai, Y. D. Wen, G. Fejer et E. Seto (2002). "Functional domains of histone deacetylase-3." J Biol Chem 277: 9447-9454.
- Yang, W. M., Y. L. Yao, J. M. Sun, J. R. Davie et E. Seto (1997). "Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family." J Biol Chem 272(44): 28001-7.
- Yang, X. J. et S. Gregoire (2005). "Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication." Mol Cell Biol 25(8): 2873-84.
- Yang, Y., H. Hou, E. M. Haller, S. V. Nicosia et W. Bai (2005). "Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation." Embo J 24(5): 1021-32.

- Yao, Y. L., W. M. Yang et E. Seto (2001). "Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation." Mol Cell Biol 21(17): 5979-91.
- Yeung, F., J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller, D. R. Jones, R. A. Frye et M. W. Mayo (2004). "Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase." Embo J 23(12): 2369-80.
- Yoshida, M. et T. Beppu (1988). "Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A." Exp Cell Res 177(1): 122-31.
- Yoshida, M., R. Furumai, M. Nishiyama, Y. Komatsu, N. Nishino et S. Horinouchi (2001). "Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy." Cancer Chemother Pharmacol 48 Suppl 1: S20-6.
- Yoshida, M., S. Horinouchi et T. Beppu (1995). "Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function." Bioessays 17(5): 423-30.
- Yoshida, M., M. Kijima, M. Akita et T. Beppu (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." J Biol Chem 265(28): 17174-9.
- Yoshida, M., A. Matsuyama, Y. Komatsu et N. Nishino (2003). "From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors." Curr Med Chem 10(22): 2351-8.
- Yoshida, M., T. Shimazu et A. Matsuyama (2003). "Protein deacetylases: enzymes with functional diversity as novel therapeutic targets." Prog Cell Cycle Res 5: 269-78.
- Yoshikawa, M., K. Hishikawa, T. Marumo et T. Fujita (2007). "Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells." J Am Soc Nephrol 18(1): 58-65.
- Youn, H. D., C. M. Grozinger et J. O. Liu (2000). "Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4." J Biol Chem 275(29): 22563-7.
- Young, D. A., O. Billingham, C. L. Sampieri, D. R. Edwards et I. M. Clark (2005). "Differential effects of histone deacetylase inhibitors on phorbol ester- and TGF-beta1 induced murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression." Febs J 272(8): 1912-26.
- Yuan, Z. L., Y. J. Guan, D. Chatterjee et Y. E. Chin (2005). "Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue." Science 307(5707): 269-73.
- Zeng, L., Y. Zhang, S. Chien, X. Liu et J. Y. Shyy (2003). "The role of p53 deacetylation in p21Waf1 regulation by laminar flow." J Biol Chem 278(27): 24594-24599.
- Zhang, C. L., T. A. McKinsey, J. R. Lu et E. N. Olson (2001). "Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor." J Biol Chem 276(1): 35-9.
- Zhang, C. L., T. A. McKinsey et E. N. Olson (2002). "Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation." Mol Cell Biol 22(20): 7302-12.
- Zhang, H. Y., M. Gharaee-Kermani, K. Zhang, S. Karmioli et S. H. Phan (1996). "Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Am J Pathol 148(2): 527-537.
- Zhang, X. D., S. K. Gillespie, J. M. Borrow et P. Hersey (2003). "The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis." Biochem Pharmacol 66(8): 1537-45.

- Zhang, Y., N. Li, C. Caron, G. Matthias, D. Hess, S. Khochbin et P. Matthias (2003). "HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo." Embo J 22(5): 1168-1179.
- Zhang, Y., H. H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird et D. Reinberg (1999). "Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation." Genes Dev 13(15): 1924-1935.
- Zhao, X., A. Ito, C. D. Kane, T. S. Liao, T. A. Bolger, S. M. Lemrow, A. R. Means et T. P. Yao (2001). "The modular nature of histone deacetylase HDAC4 confers phosphorylation-dependent intracellular trafficking." J Biol Chem 276(37): 35042-8.

6. Annexes

6.1. Annexe 1 : Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues, (*American Journal of Pathology*)

Expression of Histone Deacetylase 8, a Class I Histone Deacetylase, Is Restricted to Cells Showing Smooth Muscle Differentiation in Normal Human Tissues

David Waltregny,^{*†} Laurence de Leval,[‡]
Wendy Glénisson,^{*} Siv Ly Tran,^{*} Brian J. North,[§]
Akeila Bellahcène,^{*} Ulrich Weidle,[¶] Eric Verdin,[§]
and Vincent Castronovo^{*}

From the Metastasis Research Laboratory and Center of Experimental Cancer Research^{*} and the Departments of Urology[†] and Pathology,[‡] University of Liège, Liège, Belgium; the Gladstone Institutes of Virology and Immunology,[§] University of California, San Francisco, California; and Roche Diagnostics,[¶] Penzberg, Germany

Histone deacetylases (HDACs) were originally identified as nuclear enzymes involved in gene transcription regulation. Until recently, it was thought that their activity was restricted within the nucleus, with histones as unique substrates. The demonstration that specific HDACs deacetylate nonhistone proteins, such as p53 and α -tubulin, broadened the field of activity of these enzymes. HDAC8, a class I HDAC, is considered to be ubiquitously expressed, as suggested by results of Northern blots performed on tissue RNA extracts, and transfection experiments using various cell lines have indicated that this enzyme may display a prominent nuclear localization. Using immunohistochemistry, we unexpectedly found that, in normal human tissues, HDAC8 is exclusively expressed by cells showing smooth muscle differentiation, including visceral and vascular smooth muscle cells, myoepithelial cells, and myofibroblasts, and is mainly detected in their cytosol. These findings were confirmed *in vitro* by nucleocytoplasmic fractionation and immunoblot experiments performed on human primary smooth muscle cells, and by the cytosolic detection of epitope-tagged HDAC8 overexpressed in fibroblasts. Immunocytochemistry strongly suggested a cytoskeleton-like distribution of the enzyme. Further double-immunofluorescence staining experiments coupled with confocal microscopy analysis showed that epitope-tagged HDAC8 overexpressed in murine fibroblasts formed cytoplasmic stress fiber-like structures that co-localized with the smooth muscle cytoskeleton protein smooth muscle α -actin. Our works represent the first demonstration of the restricted expression of a class I HDAC to a specific cell

type and indicate that HDAC8, besides being a novel marker of smooth muscle differentiation, may play a role in the biology of these contractile cells. (Am J Pathol 2004, 165:553–564)

Histone deacetylases (HDACs) represent a large family of enzymes identified as key regulators of nucleosomal histone acetylation, a major event that controls eukaryotic gene transcription.^{1,2} Most HDACs can function as transcriptional co-repressors and are often present in large multisubunit complexes, such as the sin3 complex.^{3–6} Currently, at least 18 different members of the HDAC family have been isolated from mammalian cells⁷ and are classified into three groups: 1) class I members, including HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, and HDAC11, which are homologous to the yeast Rpd3 protein;^{8–13} 2) class II HDACs, including HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, and HDAC10, which have similarities to yeast Hda1;^{14–20} and 3) NAD-dependent sirtuin (SIRT) proteins, which are homologous to the yeast Sir2 protein.^{21–23} Although the precise functions of each member of the HDAC and SIRT families are primarily unknown, accumulating evidence suggests that they are involved in important biological activities, such as cell differentiation, proliferation, apoptosis, and senescence.²⁴

Although it has been initially considered that HDACs' activities are restricted to the nucleus for deacetylation of nucleosomal histones, recent observations have indicated that this is not always the case. Indeed, it appears that some HDACs can deacetylate nonhistone nuclear and cytoplasmic proteins, such as the tumor suppressor p53^{25–27} and the cytoskeletal protein α -tubulin.²⁸ Interestingly, the deacetylation of these proteins affects their activity. Based on these observations, it is expected that HDACs might exert, within the cell, much broader biological activities than the exclusive control of gene transcription.

Supported by the National Fund for Scientific Research (Belgium), the Centre Anti-Cancéreux de l'Université de Liège, the Fondation Léon Frédéricq, TELEVIE, and the Interuniversity Attraction Pole.

Accepted for publication April 21, 2004.

Address reprint requests to David Waltregny, M.D., Ph.D., Metastasis Research Laboratory, Pathology Building, Bat. B23, level –1, CHU Sart Tilman Liège, B-4000 Liège 1, Belgium. E-mail: david.waltregny@ulg.ac.be.

Despite the unanimous recognition that HDACs represent a family of key enzymes with paramount activities for the cell, information regarding the exact role of each individual HDAC has remained scarce. One approach to explore the function(s) of specific HDACs is to examine their profile of expression in specific tissues. We have successfully used such a strategy to recently demonstrate that HDAC7 acts as a regulator of Nur77 and apoptosis in developing thymocytes.²⁹

Class I HDACs have ~350 to 500 amino acids and their transcript expression is considered to be ubiquitous.³⁰ Class II HDACs are much larger proteins with ~1000 amino acids; their mRNA distribution is more restricted and they are implicated in the development and differentiation of cardiac and skeletal striated muscle.³¹ Class II enzymes can shuttle in and out of the nucleus on certain cellular signals.³² Among class I members, HDAC1 and HDAC2 are localized exclusively in the cell nucleus³⁰ whereas HDAC3 can be detected in the nuclear and cytoplasm compartments.³³

Database searches for expressed sequence tags showing high similarity with class I HDACs have led to the cloning of the cDNA for human HDAC8, the fourth identified class I HDAC.^{10,11,13} This enzyme encodes 377 amino acid residues and is evolutionary most similar to HDAC3 with 34% overall identity. Although Northern blot analyses have revealed that HDAC8 mRNA expression is ubiquitous,^{10,11,13} but distinct from that of HDAC1 and HDAC3,¹⁰ no data have been available on the distribution of the enzyme in human tissues.

As a result of a screening of HDAC expression profiles in human prostate tissues, we have observed that HDAC8, rather than being detected in all cell types, is exclusively expressed by some prostate stromal cells as well as by cells present in vascular walls. We have extended our investigation to most human tissues and herein demonstrate that HDAC8 is exclusively expressed by normal human cells showing smooth muscle differentiation *in vivo*, including vascular and visceral smooth muscle cells, myoepithelial cells, and myofibroblasts. Unexpectedly, the enzyme is predominantly cytosolic, both in human tissues and in *in vitro* grown human vascular smooth muscle cells where it displays a cytoskeleton-like pattern of expression. We provide evidence that HDAC8 may co-localize with the smooth muscle cytoskeleton protein smooth muscle α -actin (α -SMA). Altogether, our results unveil HDAC8 as a novel biological marker of the smooth muscle phenotype and suggest a specific involvement for this HDAC in smooth muscle differentiation.

Materials and Methods

Cell Lines, Tissue Culture, and Reagents

NIH-3T3 mouse embryonic fibroblast and HeLa human cervix epithelial cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Primary human skin fibroblasts were established by outgrowth of normal human skin biopsies as detailed elsewhere.^{34,35} Primary human smooth muscle cells (HSMCs) were har-

vested from human umbilical cord veins, essentially as previously described,^{35,36} after removal of the endothelial cell layer.³⁷ Briefly, umbilical cord veins were cannulated and flushed with 50 ml of RPMI 1640 culture medium (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) to remove blood, and allowed to drain. The vein was then filled with 1 mg/ml of collagenase A (Roche, Mannheim, Germany) in RPMI 1640 and incubated at 37°C in a bath containing sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) without calcium, magnesium, and sodium bicarbonate for 10 minutes. Endothelial cells were removed by thoroughly flushing with 50 ml of RPMI 1640. The vein was further rinsed with 50 ml of RPMI 1640 before reintroducing collagenase A in its lumen. After incubation at 37°C for 20 minutes, smooth muscle cells were harvested by thoroughly flushing with 50 ml of RPMI 1640, centrifuged, resuspended in culture medium, and seeded onto Petri dishes. All cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% decomplemented (heat-inactivated) fetal bovine serum (Biowhittaker, Walkersville, MD), 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 0.1% fungizone, and 2 mmol/L L-glutamine at 37°C in a humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere. Primary human cells were used between passages 7 and 13. *In vitro* grown HSMCs displayed a typical smooth muscle cell morphology and immunoblot experiments enabled to check that, at passages 7 through 13, HSMCs retained α -SMA and smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) expression (data not show). All tissue culture reagents were obtained from Invitrogen unless otherwise specified.

Tissues

Formalin-fixed paraffin-embedded normal human tissue samples were obtained from the Department of Pathology at the University Hospital of Liège, Belgium. The organs from which the tissues were sampled are listed in Table 1.

Cloning of HDAC8, Transfections, and Immunofluorescence

Total RNA was extracted from HSMCs using the RNeasy mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA), according to the manufacturer's protocol. To obtain the full-length human HDAC8 cDNA, a reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification of HSMC total RNA was set up with the use of the Pfu DNA polymerase (Promega, Leiden, The Netherlands) and the following primers: 5'-CACC-ATGGAGGAGCCGAGGAA-3' (GenBank NM_018486 bases 43 to 60) and 5'-GACCACATGCTTCAGATTC-CCTT-3' (GenBank NM_018486 bases 1173 to 1149). pcDNA3.1D/HDAC8/V5-His was constructed by directional cloning of the HDAC8 coding sequence upstream of and in-frame with the carboxy-terminal V5 epitope and hexahistidine sequence into pcDNA3.1D/V5-His-Topo (Invitrogen). Mock transfection with transfecting reagent alone and transfection with pcDNA3.1D/lacZ/V5-His plasmid (Invitrogen) served as controls. The HDAC8 con-

Table 1. Localization of HDAC8 Expression in Various Normal Human Tissues and Organs

Anatomical structure	Distribution of HDAC8 expression
Respiratory tract	
Trachea, bronchi and bronchioli	Myoepithelial cells from mucous glands [†] Muscular layer*
Lung	Alveolar septae myofibroblasts [‡]
Genitourinary tract	
Kidney	Muscular layer of renal pelvis* Capsule*
Ureter	Muscular layer*
Urinary bladder	Muscular layer*
Prostate	Stromal cells [‡]
Vas deferens and epididymis	Periductal layer*
Testis	Peritubular myoid cells [‡]
Uterus	Myometrium* Cervix stroma*
Fallopian tube	Muscular layer*
Ovary	External theca cells [‡]
Gastrointestinal tract	
Small intestine and colon	Muscularis mucosae* Muscularis propria* Subepithelial myofibroblasts in lamina propria [‡]
Stomach	NA
Esophagus	NA
Gallbladder	NA
Pancreas	NR
Liver	Capsule*
Lymphoid organs	
Spleen	Capsule* Reticular cells [‡]
Thymus	NR
Endocrine glands	
Salivary glands	Myoepithelial cells [†]
Thyroid and parathyroid glands	NR
Adrenal gland	Capsule*
Nervous system	
Spinal cord	NR
Peripheral nerve	NR
Brain	NR
Muscles	
Myocardium	NR
Skeletal muscle	NR
Other tissues and organs	
Bone	NR
Skin	Erector pili* Myoepithelial cells of sweat glands [†]
Mammary gland	Myoepithelial cells of lobules and ducts [†]

NA, not assessed; NR, no specific reactivity, with the exception of vascular reactivity that was detected in smooth muscle cells from arteries, arterioles, veins, and venules as well as in pericytes from all organs and tissues tested.

*, Smooth muscle cells; †, myoepithelial cells; ‡, myofibroblasts.

struct was checked by DNA sequencing of the insert and multiple cloning sites. Human HDAC3, HDAC6, and HDAC8 cDNAs were also subcloned to generate C-terminal FLAG-tagged fusions into a FLAG vector [a derivative of the pcDNA3.1(+) vector backbone (Invitrogen)], as previously described.^{38,39}

NIH-3T3 cells grown on coverslips in 35-mm dishes were transfected at a density of 3×10^4 cells/cm² with 2 μ g of pcDNA3.1D/HDAC8/V5-His or pcDNA3.1D/lacZ/V5-His plasmid and 6 μ l of FUGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), according to the manufacturer's directions. Cells were cultured for 24 hours, washed twice with PBS (10 mmol/L sodium phosphate and 0.9% NaCl, pH 7.4), and either fixed with 2% formaldehyde for 15 minutes or subjected to lysis for total protein extraction. Detection of V5-tagged proteins

was performed by Western blot analysis, as detailed below. Indirect immunofluorescence was used to show the subcellular localization of V5-tagged HDAC8. Briefly, after fixation and two washes in PBS, the endogenous peroxidase activity was blocked with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes. After washes in distilled water for 5 minutes and in PBS for 20 minutes, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) for 5 minutes on ice. The slides were then incubated with 3% normal horse serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) in PBS for 30 minutes to block the nonspecific serum-binding sites. Anti-V5 antibody (Invitrogen) at a dilution of 1:500 was applied and incubated for 1 hour, followed by incubation with a biotinylated horse anti-mouse IgG antibody and the avidin-biotin-peroxidase complex ABC (Vectastain Elite immu-

noperoxidase kit; Vector Laboratories, Inc.). After each incubation, the slides were washed three times with 1% normal horse serum in PBS for 5 minutes. Peroxidase activity was developed with a solution containing fluorescein isothiocyanate-conjugated tyramine in amplification diluent (NEN, Boston, MA). After three washes in PBS for 10 minutes, the cells were counterstained with 4',6'-diamidino-2'-phenylindole dichloride (Roche Diagnostics) and the coverslips were mounted with anti-fading fluorescent mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA) for microscopic examination. Color photomicrographs of the slides were taken with an Axioplan fluorescence microscope (Zeiss) equipped with appropriate filter sets.

For double-immunofluorescence staining experiments, NIH-3T3 cells grown on coverslips were transfected with pcDNA3.1(+)/HDAC3/FLAG, pcDNA3.1(+)/HDAC6/FLAG, or pcDNA3.1(+)/HDAC8/FLAG and FUGENE 6 transfection reagent. NIH-3T3 cells transfected with pcDNA3.1(+)/FLAG alone served as negative control. Transfected cells were processed for immunofluorescence microscopy 48 hours after transfection. Cells on coverslips were washed twice in PBS for 10 minutes, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes, followed by permeabilization in 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. After three washes for 10 minutes each in PBS, cells were incubated for 10 minutes in 10% bovine serum albumin in PBS and then incubated for 1 hour with anti- α -SMA or anti-FLAG antibodies or together, each diluted 1:500 in PBS + 0.1% Tween-20. Cells were washed three times for 10 minutes in PBS containing 0.1% Tween-20, followed by incubation for 1 hour with donkey anti-mouse IgG Cy2-conjugated or donkey anti-rabbit IgG Cy3-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) or together, each diluted 1:500 in PBS + 0.1% Tween-20. Cells were then washed three times for 10 minutes each in PBS and once briefly in ddH₂O, and mounted on slides with Gel Mount (Biomedica Corp., Foster City, CA). Confocal images were acquired by laser-scanning confocal microscopy with an Olympus BX60 microscope equipped with a Radiance 2000 confocal setup (Bio-Rad, Hercules, CA).

Antibodies

Anti-HDAC8 antibody (N-20) was raised against an epitope mapping at the N-terminus of human HDAC8 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Polyclonal rabbit anti-HDAC1 (no. 2062), anti-HDAC3 (no. 2632), and anti-HDAC5 (no. 2082) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti- α -tubulin (clone B512), anti- α -SMA (clone 1A4), and anti-SMMHC (M-7786) monoclonal antibodies as well as anti-FLAG (F-7425) rabbit polyclonal antibody were from Sigma (Bornem, Belgium).

Protein Extraction

HDAC8 protein expression was examined in primary HSMCs and fibroblasts and in HeLa epithelial cells. After rinses in PBS (PBS Dulbecco's without calcium, magne-

sium, and sodium bicarbonate), *in vitro* grown subconfluent cells were scrapped and pelleted by centrifugation at $300 \times g$ for 10 minutes. Total protein lysates were obtained by incubating cell pellets with protein lysis buffer containing 0.1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris (pH 7.5), 250 mmol/L NaCl, 1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mmol/L dithiothreitol, 1 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, and Complete protease inhibitor cocktail (Roche). Protein lysates were placed in ice for 30 minutes, vortexed every 10 minutes, and then cleared by centrifugation at $12,000 \times g$ for 20 minutes at 4°C. The supernatants were retrieved and frozen at -80°C until use in immunoblot assays. The protein concentration was measured using a bicinchoninic acid determination kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

Immunoblotting

Equal amounts of protein lysates were resolved by size on 10% Bis-Tris-polyacrylamide gels (Invitrogen) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), which were stained with Ponceau S (Sigma Chemical Company) to examine the equal protein sample loading and transferring (data not shown). The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (20 mmol/L Tris base, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T), and probed with the following primary antibodies: anti-HDAC1, anti-HDAC3, anti-HDAC8, and anti- α -tubulin. After washing in TBS-T, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad Laboratories) and developed using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit; Amersham Corp., Arlington Heights, IL), according to the instructions of the manufacturer. Membranes were exposed to Kodak X-Omat AR films (Eastman-Kodak, Rochester, NY).

Nuclear and Cytoplasmic Fractionation

Approximately 10^7 cells were collected and washed twice in ice-cold PBS. The cell pellet was resuspended in 1 ml of washing buffer (10 mmol/L HEPES, pH 7.9, 20 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L dithiothreitol, and protease inhibitors), microcentrifuged at $100 \times g$ for 2 minutes at 4°C, and then lysed in 500 μ l of buffer A (10 mmol/L HEPES, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 0.2% Nonidet P-40, 1 mmol/L dithiothreitol, and protease inhibitors). After incubation on ice for 30 seconds, nuclei were pelleted by microcentrifugation at $3500 \times g$ for 5 minutes at 4°C and supernatant was collected as the cytoplasmic fraction. The nuclei pellet was washed three times in 500 μ l of washing buffer and then resuspended in 1 vol of buffer B (20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 630 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 25% glycerol, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L dithiothreitol, and protease inhibitors). The suspension was mixed gently by rocking for 45 minutes at 4°C and then centrifuged at $14,000 \times g$ for 30 minutes at 4°C. Supernatant was collected as the nuclear fraction.

The amount of HDAC1, HDAC3, HDAC8, and α -tubulin in the fractionated nuclear and cytoplasmic cell extracts was analyzed by immunoblotting, as detailed above.

Immunoperoxidase

Detection of HDAC8 protein in human tissues and cells was performed with the use of an immunoperoxidase technique and the ABC Vectastain Elite kit (Vector Laboratories, Inc.) according to the supplier's directions with some modifications. Primary human skin fibroblasts, murine NIH-3T3 fibroblasts, and HSMCs were seeded onto poly-L-lysine-coated glass slides, grown to 70 to 80% confluence, washed with PBS, and then fixed with freshly prepared 2% formaldehyde for 15 minutes. Five- μ m formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols. After blocking of the endogenous peroxidase activity with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes, the sections were heated in a water-bath at 95°C in citrate buffer, allowed to cool down, and then incubated with 1% normal horse serum (α -SMA and SMMHC), 1% normal goat serum (HDAC5), or 1% normal swine serum (HDAC8) in PBS for 30 minutes. For anti-SMMHC immunostaining, an additional trypsinization step was performed as previously described,⁴⁰ before heating the sections for antigen retrieval; tissue sections were incubated with 0.125 mg/ml trypsin (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) in PBS for 20 minutes at 37°C and then washed with PBS for 20 minutes. Mouse anti- α -SMA antibody at a dilution of 1:400, mouse anti-SMMHC antibody at a dilution of 1:2500, rabbit anti-HDAC5 antibody at a dilution of 1:500 or goat anti-HDAC8 antibody at a dilution of 1:200 was incubated overnight at 4°C, followed by biotinylated horse anti-mouse, goat anti-rabbit, or swine anti-goat IgG antibody and the avidin-biotin-peroxidase complex. Washes were performed three times with PBS after each incubation step. Peroxidase activity was developed by a solution of (Vel, Leuven, Belgium) dissolved in PBS and 0.03% H₂O₂. The 3–3' diaminobenzidine tetrahydrochloride solution was filtered and applied to the sections for 4 minutes. Finally, Carazzi's hematoxylin was used to counterstain the slides that were then dehydrated and mounted. Control experiments included omission of the first antibody and preincubation of anti-HDAC8 antibody with a 50-molar excess of the corresponding peptide before the antibody's use in the immunoperoxidase assay. Masson's trichrome staining was performed on paraffin-embedded tissues as previously described⁴¹ to delineate collagen and smooth muscle fibers. Photomicrographs of the slides were taken with a Zeiss microscope.

Results

HDAC8 Expression in Normal Human Tissues Is Restricted to Cells Showing Smooth Muscle Differentiation

Immunohistochemistry was performed with the use of a specific anti-HDAC8 antibody to assess HDAC8 expres-

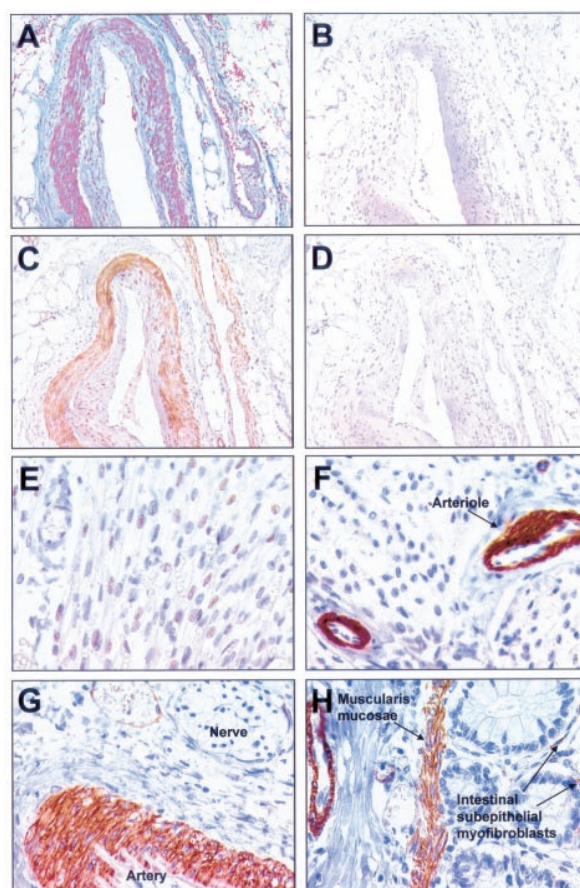


Figure 1. **A:** Masson's trichrome staining of arterial walls present in the fat tissue surrounding a human prostate gland. Smooth muscle fibers appeared violet and collagen fibers were stained in green. HDAC8 expression was analyzed in serial tissue sections of the same arterial walls as in **A** using an immunoperoxidase technique, as described in Materials and Methods. **B:** Control immunohistochemical experiment in which the anti-HDAC8 antibody had been replaced with PBS. **C:** Incubation of the section with anti-HDAC8 antibody yielded a specific intense immunoreactivity in smooth muscle cells from the arterial walls. **D:** Control experiment in which anti-HDAC8 antibody had been preincubated with a molar excess of the corresponding peptide. **E:** Immunohistochemical detection of HDAC5 in the nucleus of human cardiomyocytes. **F:** Detection of HDAC8 by immunohistochemistry in myocardium. Neither cardiomyocytes nor endothelial cells from small arteries exhibited a detectable level of HDAC8 expression whereas vascular smooth muscle cells harbored strong anti-HDAC8 immunoreactivity. Note a detectable level of HDAC8 expression in a small capillary wall. **G:** Strong diffuse cytoplasmic anti-HDAC8 immunoreactivity in smooth muscle cells from a small artery wall in a liver portal space. Note the absence of specific reactivity in an adjacent nerve. **H:** Strong diffuse anti-HDAC8 reactivity in the cytosol of smooth muscle cells from colon muscularis mucosae and from arterial and capillary walls. Note detectable HDAC8 expression in scattered cells with myofibroblastic features (intestinal subepithelial myofibroblasts) located in the lamina propria. Tissue sections were counterstained with hematoxylin. Original magnifications: $\times 100$ (**A–D**); $\times 200$ (**E, F**); $\times 400$ (**G, H**).

sion in a large number of normal human tissue types and organs. Figures 1 and 2 show representative photomicrographs of anti-HDAC8 immunoreactivity. Masson's trichrome staining was used to distinguish collagen and smooth muscle fibers present in the wall of small arteries (Figure 1A). As shown in Figure 1C, anti-HDAC8 immunoreactivity was detected only in the smooth muscle cells of the vascular walls. Control immunohistochemical experiments in which the anti-HDAC8 antibody had been

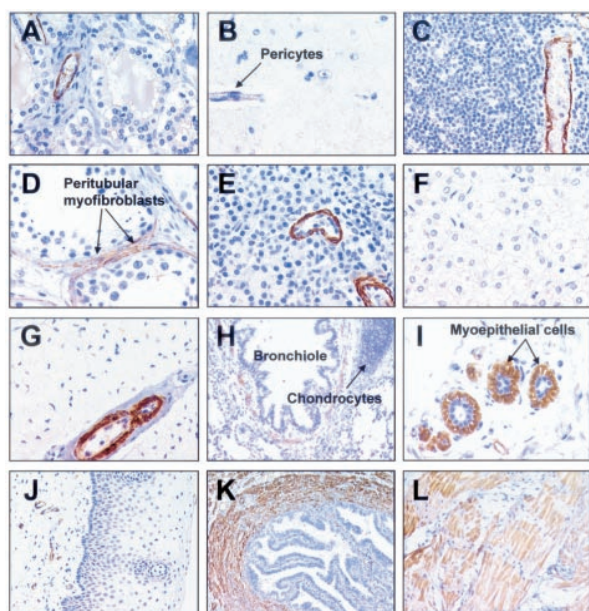


Figure 2. Immunodetection of HDAC8 in various human organs and tissues. Formalin-fixed, paraffin-embedded human tissue sections were subjected to detection of HDAC8 by immunoperoxidase, as described in Materials and Methods. HDAC8 expression was investigated in thyroid (A), brain (B), thymus (C), testis (D), pancreas (E), liver (hepatocytes) (F), skeletal muscle (G), lung (H), breast (I), uterine cervix (J), fallopian tube (K), and bladder wall (L). Sections were counterstained with hematoxylin. Original magnifications: $\times 100$ (C, H); $\times 200$ (J, K, L); $\times 400$ (A, B, E, G); $\times 630$ (D, F, I).

preincubated with a molar excess of the corresponding peptide completely abolished the labeling (Figure 1D). Similarly, no specific staining was observed when the primary antibody was replaced with PBS in the immunoperoxidase procedure (Figure 1B).

Anti-HDAC8 immunoreactivity, characterized by intense diffuse cytoplasmic staining, was exclusively detected *in vivo* in human cells showing smooth muscle differentiation, *in extenso* visceral and vascular smooth muscle cells, myoepithelial cells, and myofibroblasts. Table 1 details the distribution of HDAC8 expression in the various human tissues analyzed. As shown in Figures 1 and 2, HDAC8 expression was detected in vascular smooth muscle cells, including large vessel (arteries and veins) and microvessel (arterioles, venules, and capillaries) smooth muscle cells. Anti-HDAC8 immunoreactivity was also found in smooth muscle cells from all smooth muscle-containing organs tested, such as intestine (Figure 1H), lung (Figure 2H), fallopian tubes (Figure 2K), and bladder (Figure 2L).

HDAC8 expression was also searched in myoepithelium-bearing glands, including mammary gland alveoli and ducts, respiratory tract mucous glands, salivary glands, and skin eccrine glands. HDAC8 was detected in myoepithelial cells from all these glandular structures (Figures 2I and 3, and data not shown). To assess the possible co-localization of HDAC8 with α -SMA and SMMHC, two well-known smooth muscle-specific cytoskeleton proteins,^{40,42,43} serial sections from normal human breast, trachea, salivary glands, and skin tissues were subjected to immunohistochemistry using specific

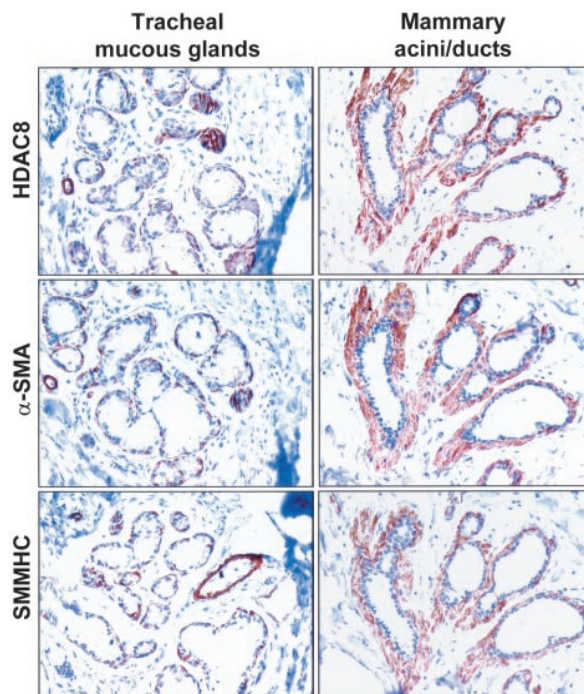


Figure 3. Immunodetection of HDAC8, α -SMA, and SMMHC in myoepithelial cells from normal human tracheal mucous glands and mammary acini/ducts. Serial sections of these tissues were subjected to detection of HDAC8, α -SMA, and SMMHC by immunoperoxidase, as described in Materials and Methods. Original magnifications, $\times 400$.

anti-HDAC8, anti- α -SMA, and anti-SMMHC antibodies. Our results showed that myoepithelial cells from mammary acini/ducts, tracheal mucous glands, salivary glands, and skin eccrine glands co-expressed the three proteins (Figure 3 and data not shown).

HDAC8 expression was also detected in various myofibroblasts-containing tissues. Figures 1H and 2D represent photomicrographs of intestine and testis tissue sections, respectively, which were immunostained with anti-HDAC8 antibody. As observed in Figure 1H, HDAC8 expression was found in smooth muscle cells from vascular walls, in smooth muscle cells from muscularis mucosae, as well as in intestinal subepithelial myofibroblasts present in the lamina propria and extending from the muscularis mucosae to the subepithelial aspect of the surface epithelium. In testis, HDAC8 expression was observed in a thin layer of myofibroblasts (peritubular myoid cells) located around seminiferous tubules. Myofibroblastic cells from several, but not all, other myofibroblasts-containing normal human tissues analyzed also exhibited HDAC8 expression. Indeed, in addition to its detection in testis peritubular myoid cells and intestine subepithelial myofibroblasts, HDAC8 was also expressed by lung alveolar septae myofibroblasts, prostate stromal cells, reticular cells of the spleen, and external theca cells of the ovary (Figure 4 and data not shown). Interestingly, like myoepithelial cells, all these myofibroblastic cells co-expressed HDAC8, α -SMA, and SMMHC (Figure 4 and data not shown). No specific anti-HDAC8 immunoreactivity was detected in some other types of myofibroblastic cells, such as reticular cells of the thymus (Figure 2C),

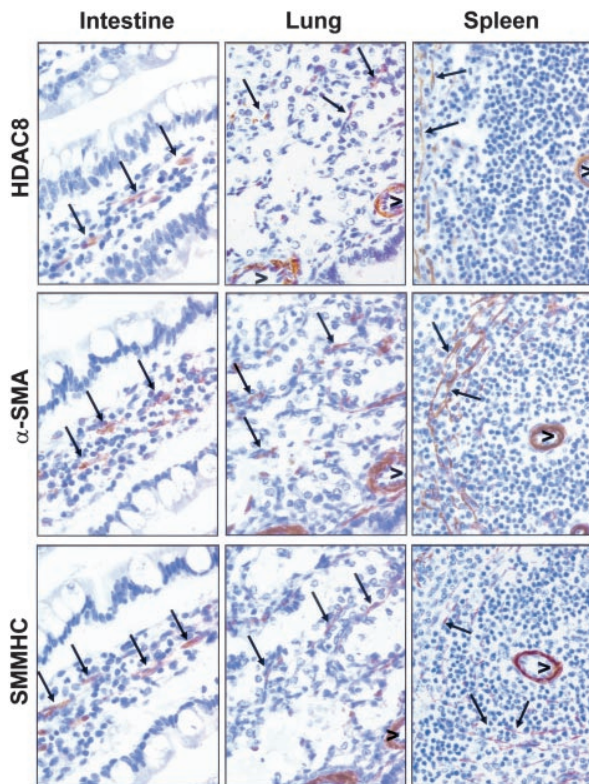


Figure 4. Immunodetection of HDAC8, α -SMA, and SMMHC in myofibroblastic cells from normal human intestine, lung, and spleen. Intestinal sub-epithelial myofibroblasts, lung alveolar septae myofibroblasts, and spleen reticular cells co-expressed HDAC8, α -SMA, and SMMHC. Serial sections of these tissues were subjected to detection of HDAC8, α -SMA, and SMMHC by immunoperoxidase, as described in Materials and Methods. v = vessel; **arrows** indicate myofibroblastic cells. Original magnifications, $\times 400$.

stromal cells of the breast (Figures 2I and 3), periacinar stellate cells of the pancreas (Figure 2E), perisinusoidal stellate (Ito) cells of the liver (Figure 2F), and mesangial cells of the kidney (data not shown).

HDAC8 protein was not detected in nonsmooth muscle cells. In particular, striated muscle (Figures 1F and 2G), neuronal (Figures 1G and 2B), endothelial (Figures 1F, 2E, and 2G), and epithelial (Figures 1H, 2A, 2E, 2F, 2H, 2I, 2J, 2K, and 4) cells as well as osteocytes (data not shown), chondrocytes (Figure 2H), lymphocytes (Figure 2C and 4), and fibrocytes (Figures 1, 2, and 3) were devoid of anti-HDAC8 immunoreactivity.

HDAC8 expression was also investigated by immunoblot in *in vitro* grown HSMCs, human skin fibroblasts, and human HeLa cervix epithelial cells. Among the three cell lines, the abundance of HDAC8 was the highest in HSMCs, with lower levels in human fibroblasts (Figure 5A). We had observed that cervix keratinocytes from normal human tissues did not express detectable levels of HDAC8 (Figure 2J). Similarly and as previously described,⁴⁴ *in vitro* grown HeLa human cervix epithelial cells exhibited no detectable expression of the enzyme (Figure 5A).

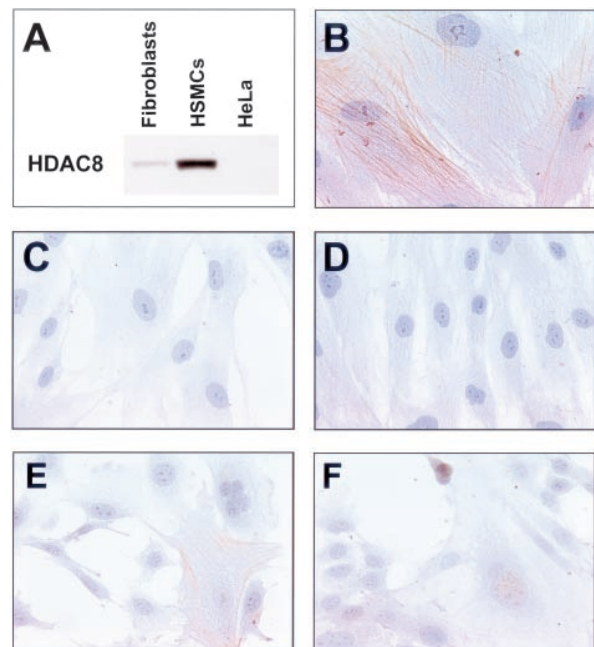


Figure 5. A: Protein lysates from primary human skin fibroblasts, primary HSMCs, and HeLa human cervix epithelial cells were subjected to immunoblot analysis of HDAC8 expression, as described in Materials and Methods. HDAC8 expression was investigated in human primary skin fibroblasts and smooth muscle cells from human umbilical cord vein (HSMC), by immunoperoxidase, as described in Materials and Methods. **B:** Anti-HDAC8 immunostaining presented a pattern suggestive of a cytoskeletal association in HSMCs. **C:** Anti-HDAC8 immunoreactivity in HSMCs was abolished by preincubating anti-HDAC8 antibody with a molar excess of the corresponding peptide. **D:** Primary human skin fibroblasts usually exhibited no detectable level of anti-HDAC8 immunoreactivity. **E** and **F:** Detection of HDAC8 in the cytoplasm (**E**) or nucleus (**F**) of NIH-3T3 cells. Original magnifications: $\times 630$ (**B**); $\times 400$ (**C**, **D**); $\times 200$ (**E**, **F**).

HDAC8 Is a Predominantly Cytoplasmic HDAC and Co-Localizes with α -SMA

In all human tissues in which HDAC8 expression was detectable, the enzyme was present mainly in the cytoplasmic compartment of the enzyme-expressing cells (Figures 1 through 4). This contrasted with the subcellular localization of HDAC5, a class II HDAC involved in skeletal muscle differentiation. Indeed, HDAC5 expression was observed in the nucleus of cardiac myocytes (Figure 1E).

Immunocytochemistry experiments also showed the prominent cytoplasm localization of HDAC8 in HSMCs, with a distribution pattern suggestive of a cytoskeletal association (Figure 5B). To verify the specificity of the anti-HDAC8 immunoreactivity obtained in primary cultures, the antibody was preincubated with a molar excess of the corresponding peptide. The preincubation of the antibody with its peptide produced a complete disappearance of the staining (Figure 5C). Similarly to fibroblasts in human tissues, cultured fibroblasts usually exhibited no detectable expression of HDAC8 (Figure 5D). Murine NIH-3T3 fibroblasts displayed both nuclear and cytoplasmic expression of HDAC8 (Figure 5, E and F). The cytoplasm distribution of HDAC8 in these cells was

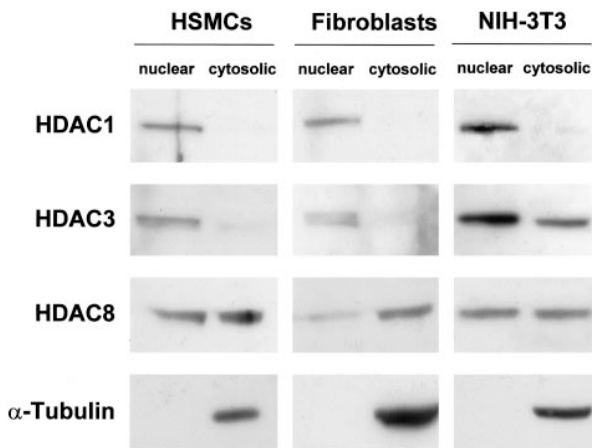


Figure 6. The amount of HDAC1, HDAC3, HDAC8, and α -tubulin in the fractionated nuclear and cytosolic extracts from primary human skin fibroblasts, HSMCs, and NIH-3T3 fibroblasts was analyzed by immunoblotting as described in Materials and Methods.

similar to that observed in HSMCs (Figure 5, compare B with E).

To further examine the subcellular localization of HDAC8, we performed cell fractionation experiments with the use of primary human fibroblasts, HSMCs, and NIH-3T3 cells. After separation of the cytoplasm and nuclear fractions, HDAC8 was enriched in the cytoplasm fraction, whereas HDAC1 and the cytoskeleton protein α -tubulin were localized exclusively in the nucleus and in the cytosol, respectively. HDAC3 was mainly localized in the nuclear compartment although it was also detected in the cytosol (Figure 6).

Transfection experiments also indicated that HDAC8 could be localized in the cytoplasm. A V5-tagged HDAC8 construct was transiently transfected into NIH-3T3 cells. Forced expression of the tagged enzyme was checked by immunoblot analysis using an anti-V5 antibody (Figure 7A). Indirect immunofluorescence using the same antibody was used to visualize the cellular localization of transfected HDAC8. As shown in Figure 7B, exogenous HDAC8 was localized both in the cytoplasm and in the nucleus of NIH-3T3 cells.

In cultured HSMCs and NIH-3T3 cells, the distribution of HDAC8 expression was reminiscent of stress fiber-like structures, suggesting a possible association of the enzyme with the smooth muscle cytoskeleton. To investigate whether HDAC8 may associate with smooth muscle cytoskeleton proteins, and in particular with α -SMA, double-immunofluorescence staining experiments coupled with confocal microscopy analysis were performed with an antibody for α -SMA and with an anti-FLAG antiserum after transfection of cDNAs encoding either HDAC3, HDAC6, or HDAC8 (C-terminal FLAG-tagged) in NIH-3T3 cells. As shown in Figure 8, exogenous HDAC8, detected with an anti-FLAG antibody, was present in the nuclear and cytoplasmic compartments. Thus, exogenously expressed HDAC8 displayed an intracellular localization similar to that of endogenously expressed HDAC8 (Figure 5, E and F). In the cytoplasm, FLAG-tagged HDAC8 displayed a stress fiber-like distribution of expression,

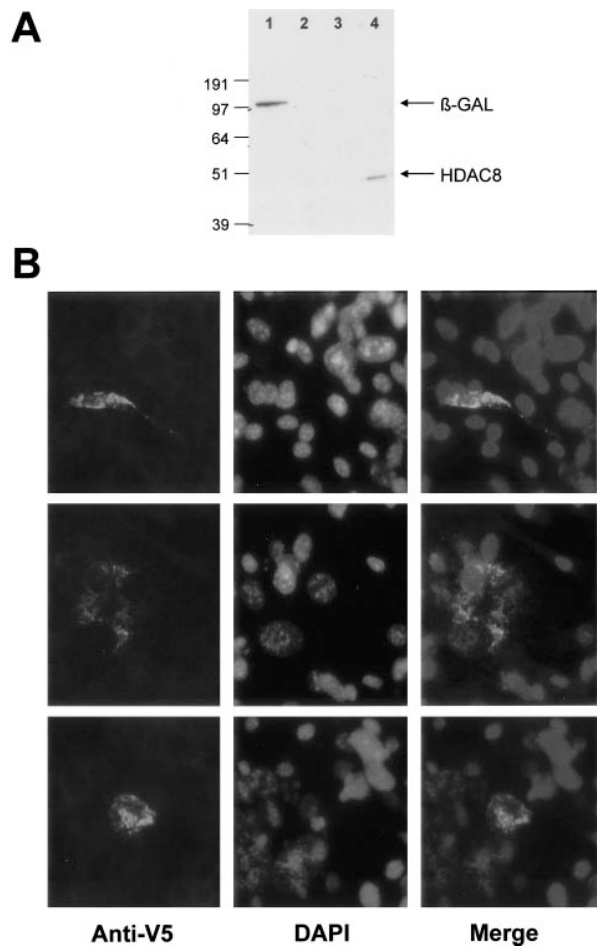


Figure 7. A: Western blot analysis of transfected recombinant human HDAC8 in NIH-3T3 cells. Total cell extracts from NIH-3T3 cells transiently transfected with pcDNA3.1D/HDAC8/V5-His, as in Materials and Methods, were subjected to immunoblot analysis using an anti-V5 antibody (Invitrogen). Lane designations were as follows: **lane 1**, NIH-3T3 transiently transfected with pcDNA3.1D/lacZ/V5-His; **lane 2**, NIH-3T3 transiently transfected with the insert-less vector; **lane 3**, untransfected NIH-3T3 cells; **lane 4**, NIH-3T3 transiently transfected with pcDNA3.1D/HDAC8/V5-His. **B:** Subcellular localization of V5-tagged HDAC8 transfected into NIH-3T3 cells. **Left:** Representative examples of anti-V5 immunofluorescence, as described in Materials and Methods. **Middle and right:** 4',6'-diamidino-2'-phenylindole dichloride and merged images, respectively.

and more importantly, co-localized with α -SMA, mainly as filamentous structures (Figure 8). No co-localization was found between α -SMA and either FLAG-tagged HDAC3, which was almost exclusively nuclear, or FLAG-tagged HDAC6, which is known to associate with α -tubulin (Figure 8).^{28,39,45}

Discussion

Initial experiments performed on total tissue extracts have indicated that HDAC8 may be ubiquitously expressed in human tissues and organs,^{10,11,13} with the corollary that the enzyme would exert its deacetylase activity necessary for each cell type. The data of our current study cancel out these assumptions because, as demonstrated herein, HDAC8 protein expression is restricted to a specific human cell type that comprises

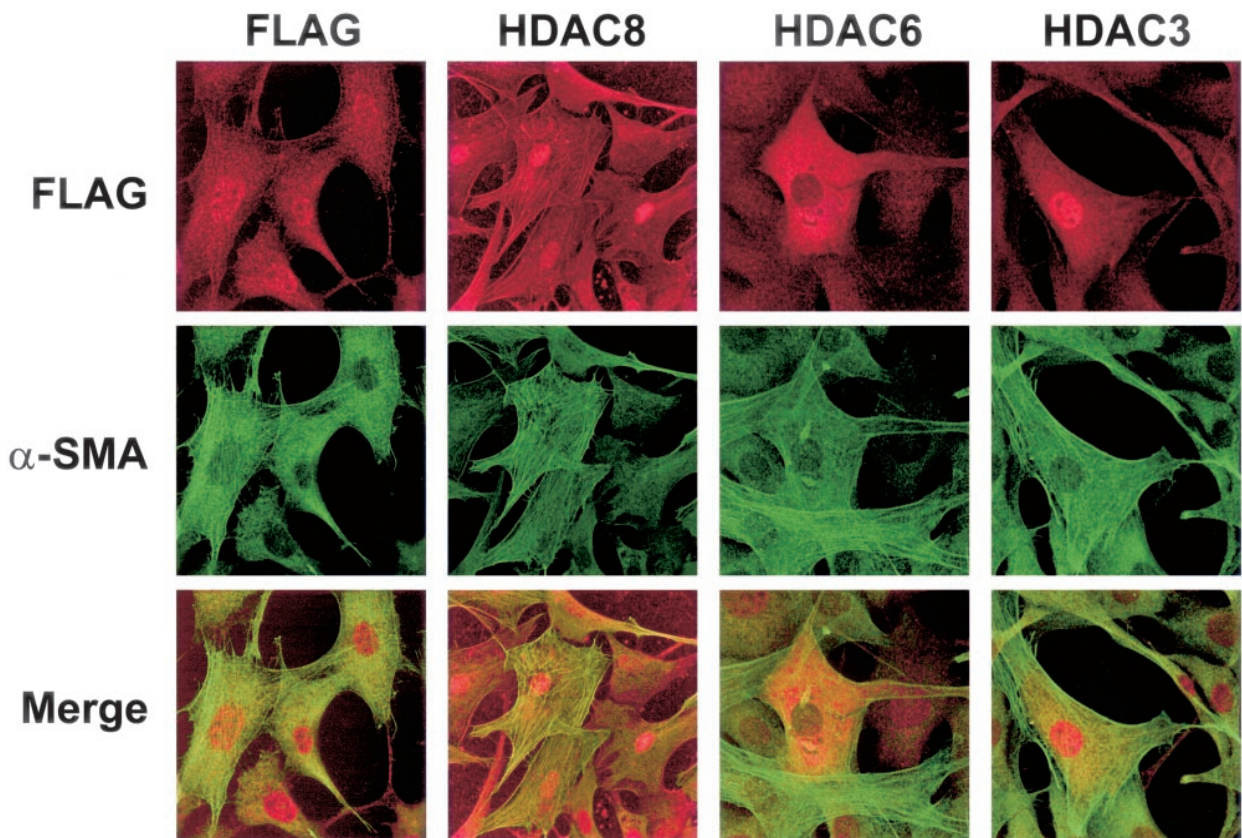


Figure 8. Double-immunofluorescence staining coupled with confocal microscopy analysis, using anti- α -SMA and anti-FLAG antibodies after transfection of cDNAs encoding either HDAC3, HDAC6, or HDAC8 (C-terminal FLAG-tagged) in NIH-3T3 cells. NIH-3T3 cells grown on coverslips were transfected with pcDNA3.1(+)/HDAC3/FLAG, pcDNA3.1(+)/HDAC6/FLAG, or pcDNA3.1(+)/HDAC8/FLAG. NIH-3T3 cells transfected with pcDNA3.1(+)/FLAG alone served as negative control. Transfected cells were processed for immunofluorescence microscopy 48 hours after transfection and analyzed using confocal microscopy as described in Materials and Methods.

various cells sharing a common phenotype: smooth muscle cell differentiation. This specialized cell type includes visceral and vascular smooth muscle cells as well as myoepithelial cells and myofibroblasts. Our findings demonstrate the limitations of techniques applied to total tissue or organ extracts for the search of the expression profiles of a specific protein both at the mRNA or protein levels. Immunohistochemistry probably remains the only definitive strategy to elucidate the precise pattern of expression of a specific molecule in an animal body. This technique has enabled us to demonstrate that, rather than being a protein expressed in a ubiquitous manner in all human tissues, HDAC8 is a potential novel smooth muscle cell differentiation marker. Such a statement is supported by the observation that primary HSMCs exhibit substantially higher amounts of HDAC8 than primary human fibroblasts and HeLa cervix epithelial cells.

It has been known for more than 15 years that, similarly to vascular and visceral smooth muscle cells, myoepithelial cells express the α -SMA isoform and SMMHC, two major proteins of the smooth muscle actomyosin complex.^{40,43,46,47} In this study, we have demonstrated that myoepithelial cells from all myoepithelium-bearing glands analyzed, including mammary, tracheo-bronchial, salivary, and sweat glands, also co-express HDAC8. In addition, we have found that HDAC8 is expressed by

myofibroblasts residing in some, but not all, myofibroblasts containing normal human tissues tested in this study. Indeed, we have observed that the enzyme is present in lung alveolar septae myofibroblasts, prostate stromal cells, reticular cells of the spleen, external theca cells of the ovary, testis peritubular myoid cells, and intestine subepithelial myofibroblasts. Interestingly, we have been able to show that these myofibroblastic cells co-express α -SMA and smooth muscle myosin, as previously reported.⁴⁸⁻⁵⁴ On the other hand, no detectable level of HDAC8 expression has been observed in reticular cells of the thymus, stromal cells of the breast, periacinar stellate cells of the pancreas, perisinusoidal stellate (Ito) cells of the liver, and mesangial cells of the kidney. It is noteworthy that these HDAC8-negative myofibroblasts may express neither α -SMA nor SMMHC.^{40,43,46,55-61} Therefore, altogether these observations suggest that co-expression of HDAC8, α -SMA, and SMMHC may identify subsets of myofibroblasts residing in specific normal human tissues.

Our original observations also include that HDAC8, a class I HDAC, is predominantly detected in the cytoplasm of smooth muscle cells rather than in the nuclear compartment, both *in vivo* and *in vitro*. The prominent cytosolic expression of HDAC8 observed in this current study contrasts with a previous observation showing that a N-terminally myc-tagged HDAC8 construct transiently

transfected into NIH-3T3 cells was expressed only in the cell nucleus.¹⁰ These differences in protein subcellular localization may be explained by an improper folding of the N-terminally tagged protein construct, which may impede its localization to the cytoplasm. Indeed, another group has found the enzyme to be located in the nucleus as well as in the cytoplasm of HEK293 cells transfected with an HDAC8 construct tagged at the C terminus.¹¹ In our study, NIH-3T3 cells transfected with a C-terminally V5-tagged HDAC8 construct expressed the exogenous protein both in the cytoplasm and in the nucleus. This subcellular distribution of exogenous HDAC8 was similar to that of the endogenously expressed enzyme in these cells, as revealed by nuclear and cytoplasmic fractionation and immunocytochemistry experiments. We therefore conclude that HDAC8 is a predominantly cytosolic HDAC. This observation is not unprecedented for a class I HDAC because HDAC3 can be also cytoplasmic and contains a nuclear export signal in its central portion.^{33,62} Whether HDAC8 also possesses a nuclear export motif remains to be determined.

Contradictory results have been reported with respect to the capacity of HDAC8 to deacetylate histones. Hu and colleagues¹⁰ have shown that HDAC8 expressed in HEK293 cells, could exhibit TSA-inhibitable deacetylase activity toward acetylated histones. In addition, they have observed in co-transfection experiments that HDAC8 was able to repress a viral SV40 early promoter activity. Finally, they have shown that bacterially expressed, purified human recombinant HDAC8 protein was active toward acetylated histones H3 and H4, suggesting that HDAC8 may be active in the absence of cofactors and without further posttranslational modifications that occur in eukaryotic cells. Buggy and colleagues¹³ have shown that purified FLAG-tagged human HDAC8 from transfected insect Sf9 cells could deacetylate a radioacetylated histone H4 peptide in a reaction inhibited by both sodium butyrate and TSA. Van den Wyngaert and colleagues¹¹ created HEK293 clones that constitutively overexpressed HDAC8 fivefold to sixfold above untransfected cells. Total cell extracts from HDAC8 stably transfected cells showed increased deacetylation activity as compared with the vector-transfected control cells. However, no change in the level of histone acetylation was observed between the HDAC8- and empty vector-transfected cells. In addition, immunoprecipitated HDAC8 showed no significant deacetylase activity. Whether HDAC8 has HDAC activity remains to be definitively clarified. However, our findings showing a prominent cytoplasmic localization of the enzyme suggest that HDAC8 may have other substrate(s) than acetylated histones. In addition, cytoplasmic HDAC8 distribution with a filamentous-like pattern reminiscent of stress fibers was suggestive of a cytoskeletal association. Further to this observation, we have used double-immunofluorescence staining experiments coupled with confocal microscopy analysis to show that epitope-tagged HDAC8 overexpressed in NIH-3T3 cells forms cytoplasmic stress fiber-like structures that co-localize with α -SMA. Recently, Durst and colleagues⁶³ have demonstrated that the protein product resulting from inversion(16), a frequent chromosomal

translocation found in acute myeloid leukemia, which fuses the first 165 amino acids of core binding factor β (CBF- β) to the tail region of SMMHC, specifically associates with HDAC8 through a domain present in the C-terminal SMMHC portion of the CBF- β -SMMHC fusion protein. Moreover, it has been previously shown that, in NIH-3T3 cells transfected with full length CBF- β -SMMHC plasmid cDNA, the fusion protein was present in cytoplasm stress fibers-like structures co-localizing with actin filaments.⁶⁴ Altogether, these reports as well as our findings suggest that HDAC8 may be involved in the regulation of smooth muscle acto-myosin complexes. Additional studies are required to test this hypothesis. In this respect, it is noteworthy that HDAC6, a class II HDAC, and SIRT2, a class III HDAC, have been recently reported to deacetylate cytoskeletal acetylated α -tubulin.^{28,45,65,66}

In conclusion, our results demonstrate that HDAC8, a predominantly cytoplasmic HDAC, is a novel marker of smooth muscle cell differentiation. We are conducting further investigations to determine the potential involvement of HDAC8 in the regulation of the smooth muscle contractile apparatus.

Acknowledgments

We thank Pascale Heneaux and Marie-Christine Petit for their expert technical assistance.

References

1. Megee PC, Morgan BA, Mittman BA, Smith MM: Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science* 1990, 247:841–845
2. Grunstein M: Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997, 389:349–352
3. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM: Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 1997, 89:373–380
4. Alland L, Muhle R, Hou Jr H, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA: Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 1997, 387:49–55
5. Koipally J, Renold A, Kim J, Georgopoulos K: Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J* 1999, 18:3090–3100
6. Knoepfler PS, Eisenman RN: Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 1999, 99:447–450
7. Gray SG, Ekstrom TJ: The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 2001, 262:75–83
8. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL: A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 1996, 272:408–411
9. Yang WM, Yao YL, Sun JM, Davie JR, Seto E: Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem* 1997, 272:28001–28007
10. Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Sung CM, Liu R, Winkler J: Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem* 2000, 275:15254–15264
11. Van den Wyngaert I, de Vries W, Kremer A, Neefs J, Verhasselt P, Luyten WH, Kass SU: Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett* 2000, 478:77–83
12. Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P: Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 2002, 277:25748–25755

13. Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, Clark JM: Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J* 2000, 350:199–205
14. 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, 96:4868–4873
15. Kao HY, Downes M, Ordentlich P, Evans RM: Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev* 2000, 14:55–66
16. Zhou X, Marks PA, Rifkind RA, Richon VM: Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:10572–10577
17. Fischer DD, Cai R, Bhatia U, Asselbergs FA, Song C, Terry R, Trogani N, Widmer R, Atadja P, Cohen D: Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem* 2002, 277:6656–6666
18. Guardiola AR, Yao TP: Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem* 2002, 277:3350–3356
19. Kao HY, Lee CH, Komarov A, Han CC, Evans RM: Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J Biol Chem* 2002, 277:187–193
20. Tong JJ, Liu J, Bertos NR, Yang XJ: Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res* 2002, 30:1114–1123
21. Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L: Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000, 403:795–800
22. Frye RA: Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 260:273–279
23. Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E: The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 2002, 158:647–657
24. De Ruijter AJ, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg AB: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003, 370:737–749
25. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA: hSIRT1(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001, 107:149–159
26. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W: Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001, 107:137–148
27. Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T: Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 2002, 21:2383–2396
28. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP: HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 2002, 417:455–458
29. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG: Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 2003, 19:286–293
30. Emiliani S, Fischle W, Van Lint C, Al-Abed Y, Verdin E: Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:2795–2800
31. Bertos NR, Wang AH, Yang XJ: Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol* 2001, 79:243–252
32. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN: Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 2001, 11:497–504
33. Yang WM, Tsai SC, Wen YD, Fejer G, Seto E: Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem* 2002, 277:9447–9454
34. Delvoye P, Nusgens B, Lapiere CM: The capacity of retracting a collagen matrix is lost by dermatosparactic skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1983, 81:267–270
35. Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clause N, Blacher S, Verdin E, Foidart JM, Nusgens BV, Castronovo V: Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 2002, 21:427–436
36. Deroanne CF, Vouret-Craviari V, Wang B, Pouyssegur J: EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway. *J Cell Sci* 2003, 116:1367–1376
37. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973, 52:2745–2756
38. Fischle W, Emiliani S, Hendzel MJ, Nagase T, Nomura N, Voelter W, Verdin E: A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem* 1999, 274:11713–11720
39. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E: The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003, 11:437–444
40. Longtine JA, Pinkus GS, Fujiwara K, Corson JM: Immunohistochemical localization of smooth muscle myosin in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985, 33:179–184
41. Hallahan DE, Geng L, Shyr Y: Effects of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) null mutation on radiation-induced pulmonary fibrosis and respiratory insufficiency in mice. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94:733–741
42. Schurch W, Skalli O, Seemayer TA, Gabbiani G: Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. I. Smooth muscle tumors. *Am J Pathol* 1987, 128:91–103
43. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzionana G, Gillissen D, Gabbiani G: A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986, 103:2787–2796
44. Glaser KB, Li J, Staver MJ, Wei RQ, Albert DH, Davidsen SK: Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 310:529–536
45. 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: In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* 2002, 21:6820–6831
46. Benzionana G, Skalli O, Gabbiani G: Correlation between the distribution of smooth muscle or non muscle myosins and alpha-smooth muscle actin in normal and pathological soft tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988, 11:260–274
47. Gugliotta P, Sapino A, Macri L, Skalli O, Gabbiani G, Bussolati G: Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody. *J Histochem Cytochem* 1988, 36:659–663
48. Amsterdam A, Lindner HR, Groschel-Stewart U: Localization of actin and myosin in the rat oocyte and follicular wall by immunofluorescence. *Anat Rec* 1977, 187:311–328
49. Leslie KO, Mitchell JJ, Woodcock-Mitchell JL, Low RB: Alpha smooth muscle actin expression in developing and adult human lung. *Differentiation* 1990, 44:143–149
50. Walles B, Groschel-Stewart U, Kannisto P, Owman C, Sjöberg NO, Unsicker K: Immunocytochemical demonstration of contractile cells in the human ovarian follicle. *Experientia* 1990, 46:682–683
51. Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G: Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 1994, 425:3–24
52. Zhang HY, Gharaee-Kermani M, Zhang K, Karmiol S, Phan SH: Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996, 148:527–537
53. Jostarndt-Fogen K, Djonov V, Draeger A: Expression of smooth muscle markers in the developing murine lung: potential contractile properties and lineal descent. *Histochem Cell Biol* 1998, 110:273–284
54. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB: Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999, 277:C1–C9
55. Ramadori G, Veit T, Schwogler S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH: Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990, 59:349–357
56. Nouchi T, Tanaka Y, Tsukada T, Sato C, Marumo F: Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* 1991, 11:100–105
57. Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H: Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol* 1991, 138:1233–1242
58. Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL: Rat hepatic lipo-

- cytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992, 24:193–203
59. Elger M, Drenckhahn D, Nobiling R, Mundel P, Kriz W: Cultured rat mesangial cells contain smooth muscle alpha-actin not found in vivo. *Am J Pathol* 1993, 142:497–509
 60. Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Kotliansky VE: Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:999–1003
 61. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS: Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998, 43:128–133
 62. Takami Y, Nakayama T: N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal, and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line. *J Biol Chem* 2000, 275:16191–16201
 63. Durst KL, Lutterbach B, Kummalua T, Friedman AD, Hiebert SW: The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol Cell Biol* 2003, 23:607–619
 64. Wijmenga C, Gregory PE, Hajra A, Schrock E, Ried T, Eils R, Liu PP, Collins FS: Core binding factor beta-smooth muscle myosin heavy chain chimeric protein involved in acute myeloid leukemia forms unusual nuclear rod-like structures in transformed NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:1630–1635
 65. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL: Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:4389–4394
 66. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E: The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003, 11:437–444

6.2. Annexe 2 : Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle α -actin and is essential for smooth muscle cell contractility, (*FASEB Journal*)

The FASEB Journal express article 10.1096/fj.04-2303fje. Published online March 16, 2005

Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle α -actin and is essential for smooth muscle cell contractility

David Waltregny,^{*,†,1} Wendy Glénisson,^{*,1} Siv Ly Tran,^{*} Brian J. North,[‡] Eric Verdin,[‡]
Alain Colige,[§] and Vincent Castronovo^{*}

^{*}Metastasis Research Laboratory, [†]Department of Urology, and [§]Laboratory of Connective Tissues Biology, University of Liège, Liège, Belgium; and [‡]Gladstone Institutes for Virology and Immunology, University of California, San Francisco, California, USA

¹These authors contributed equally to this work.

Correspondence: David Waltregny, Metastasis Research Laboratory, Pathology Building, Bat. B23, Level -1, CHU Sart Tilman Liège, B-4000, Liège 1, Belgium. E-mail: David.Waltregny@ulg.ac.be

ABSTRACT

Although originally characterized as nuclear enzymes controlling the stability of nucleosomes, histone deacetylases (HDACs) may also exert their activity within the cytosol. Recently, we have demonstrated that HDAC8, a class I HDAC, is a novel, prominently cytosolic marker of smooth muscle differentiation. As HDAC8 displays a striking stress fiber-like pattern of distribution and is coexpressed in vivo with smooth muscle α -actin (α -SMA) and smooth muscle myosin heavy chain, we have explored the possible participation of this HDAC in smooth muscle cytoskeleton regulation. Cell fractionation assays performed with primary human smooth muscle cells (HSMCs) showed that HDAC8, in contrast to HDAC1 and HDAC3, was enriched in cytoskeleton-bound protein fractions and insoluble cell pellets, suggesting an association of HDAC8 with the cytoskeleton. Coimmunoprecipitation experiments using HSMCs, NIH-3T3 cells, and human prostate tissue lysates further demonstrated that HDAC8 associates with α -SMA but not with β -actin. HDAC8 silencing through RNA interference strongly reduced the capacity of HSMCs to contract collagen lattices. Mock transfections had no effect on HSMC contractility, and transfections with small interfering RNAs (siRNAs) specific for HDAC6, a cytosolic HDAC that functions as an α -tubulin deacetylase, resulted in a weak contraction inhibition. Although mock- and HDAC6 siRNA-transfected HSMCs showed no noticeable morphological changes, HDAC8 siRNA-transfected HSMCs displayed a size reduction with diminished cell spreading after replating. Altogether, our findings indicate that HDAC8 associates with the smooth muscle actin cytoskeleton and may regulate the contractile capacity of smooth muscle cells.

Key Words: siRNA • cytoskeleton • collagen lattice contraction

Histone deacetylases (HDACs) constitute a family of enzymes originally identified as key regulators of nucleosomal histone acetylation, a major event that controls gene transcription (1, 2). Most HDACs can indeed function as transcriptional corepressors and are often present in large, multi-subunit complexes, such as the sin3 complex (3–6). Multiple forms of HDAC have been identified in mammalian cells (7), and these enzymes are usually separated into three classes on the basis of their similarity to various yeast HDACs: class I members, including HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, and HDAC11, which are homologous to the yeast RPD3 protein (8–14); class II HDACs, including HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, and HDAC10, which have similarities to yeast HDA1 (15–22); and sirtuin (SIRT) proteins, which are homologous to the yeast SIR2 protein and require nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) as a cofactor (23–25). To date, seven human SIRT homologues have been uncovered.

Although the exact functions of each member of the HDAC family are currently unknown, evidence suggests that they are involved in diverse, important biological activities, ranging from hormone-induced gene regulation to cell proliferation, differentiation, apoptosis, and senescence (reviewed in ref 26).

Initial observations have indicated that HDAC activities are constrained to the nucleus for deacetylation of nucleosomal histones. However, it has recently become clear that a number of nonhistone nuclear proteins, including the tumor suppressor p53 (27–33), are also substrates for HDACs, which regulate their activity by deacetylation. In addition, some HDACs, such as HDAC6 and SIRT2, are predominantly expressed in the cell cytoplasm. These HDACs can deacetylate a nonhistone cytosolic protein, the cytoskeletal protein α -tubulin (34–38), with concomitant destabilization of dynamic microtubules (36). Finally, recent reports have suggested a previously unrecognized HDAC location in the cell. We and others (39, 40) have indeed demonstrated that SIRT3, a human SIR2 homologue, is a mitochondrial NAD-dependent deacetylase, suggesting that this SIRT may deacetylate a substrate localized within this organelle. In addition to these observations, a recent phylogenetic analysis of bacterial HDAC relatives has suggested that all three HDAC classes precede the evolution of histone proteins, raising the possibility that the primary activity of some HDAC enzymes is directed against nonhistone substrates. It is thus expected that HDACs might exert, within the cell, much broader biological activities than the exclusive control of gene transcription.

In the course of a recent screening of class I HDAC expression profiles in human prostate tissues (41), we have observed unexpectedly that HDAC8 is expressed exclusively *in vivo* by cells showing smooth muscle differentiation, including vascular and visceral smooth muscle cells, myoepithelial cells, and myofibroblasts (42). In addition, the enzyme is coexpressed with two major constituents of the smooth muscle contractile apparatus, smooth muscle α -actin (α -SMA) and smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC). It is interesting that HDAC8 exhibits a prominent cytoplasmic localization in tissues and in cultured human smooth muscle cells (HSMCs), where it displays a striking cytoskeleton-like pattern of distribution, reminiscent of actin stress fibers. Double immunofluorescence staining experiments coupled with confocal microscopy analysis have revealed that epitope-tagged HDAC8 overexpressed in murine fibroblasts forms cytoplasmic stress fiber-like structures that colocalize with α -SMA (42). Altogether, our findings have revisited the concept that HDAC8 is a class I HDAC, as it is

neither predominantly nuclear nor ubiquitously expressed. It is more important that our findings have suggested that HDAC8 may specifically participate in the biology of smooth muscle cells.

We have herein investigated the possible involvement of HDAC8 in the regulation of smooth muscle cytoskeleton. To the best of our knowledge, our data are the first to show the interaction of a HDAC with the actin cytoskeleton. Indeed, we demonstrate that HDAC8 associates, *in vitro* and *in vivo*, with α -SMA. In addition, HDAC8 silencing by RNA interference results in marked alterations of HSMC morphology and strongly inhibits their capacity to contract collagen lattices. We thus conclude that HDAC8 is involved in the regulation of smooth muscle cytoskeleton dynamics.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, tissue culture, and reagents

NIH-3T3 mouse embryonic fibroblast cell line (ATCC CRL-1658) was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Primary vascular HSMCs were isolated from human umbilical cord vein following a method described previously (42), and primary human skin fibroblasts were established by outgrowth of normal human skin biopsies as detailed elsewhere (43, 44). All cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% decompemented (heat-inactivated) fetal bovine serum (FBS; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) and 2 mM L-glutamine at 37°C in a humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere. Primary human cells were used between passages 9 and 14. All tissue-culture reagents were obtained from Invitrogen (Merelbeke, Belgium) unless otherwise specified.

Tissues

Fresh, noncancerous prostate tissue samples were obtained from patients who had undergone a radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer in the Department of Urology at the University Hospital of Liège (Belgium). Snap-frozen, normal prostate tissues were harvested from radical prostatectomy specimens as described previously (41, 45, 46). The Ethics Committee of the University Hospital of Liège approved the specific protocol used in this study.

Protein extraction

Cells were rinsed and scrapped in phosphate-buffered saline (PBS; Dulbecco's PBS minus divalent cations) and then pelleted by centrifugation at 1600 g for 10 min. Pulverization of the snap-frozen prostate tissues was performed with the use of a Mikro-Dismembrator U (Braun Biotech, Melsungen, Germany) and generated tissue powder that was immediately processed for protein extraction. Total protein lysates were obtained by incubating cell pellets or tissue powder with protein lysis buffer (0.1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM dithiothreitol) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Protein lysates were placed in ice for 30 min, vortexed every 10 min, and then cleared by centrifugation at 12,000 g for 20 min at 4°C. The supernatants were retrieved and frozen at –

80°C until use in immunoblot assays. The protein concentration was measured using a bicinchoninic acid (BCA) determination kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA).

Antibodies

Anti-HDAC8 antibodies (N-20, E-5) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal rabbit anti-HDAC1 (#2062) and anti-HDAC3 (#2632) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti- α -tubulin (clone B-5-1-2), antiacetylated α -tubulin (clone 6-11B-1), anti-SMMHC (clone HSM-V), and anti- β -actin (clone AC-15) monoclonal antibodies (mAb) were from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Anti- α -SMA (clone 1A4) antibody, immunoglobulin G1 (IgG1; clone DAK-GO1), and IgG2a (clone DAK-GO5) were obtained from Dako (Glostrup, Denmark). Goat anti-rabbit IgG, rabbit anti-mouse IgG, and donkey anti-goat IgG horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), Dako, and Santa Cruz Biotechnology.

Western blot analysis

Protein lysates were resolved by size on NuPAGE® Bis-Tris or sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels (Invitrogen and Bio-Rad Laboratories) and transferred, as recommended by the manufacturers, onto polyvinylidene difluoride (Roche Diagnostics) or nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories) membranes, which were stained with Ponceau S (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to examine the equal protein sample loading and transferring. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (20 mM Tris base, pH 7.6, 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and were probed with primary antibodies. After washing in TBS-T, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies and developed using a chemiluminescence detection system (enhanced chemiluminescence detection kit, Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA), according to the instructions of the manufacturer. Membranes were exposed to Kodak X-Omat AR films.

Cell fractionation

Cell fractionation was performed essentially as described previously (47). Briefly, subconfluent cells were rinsed in ice-cold PBS, then scraped in ice-cold buffer A (10 mM Tris, pH 7.6, 0.25 M sucrose, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂), and pelleted by centrifugation at 1000 g for 5 min at 4°C. The pellet was gently resuspended in ice-cold buffer A with 0.2% Nonidet P-40 (NP-40), 1% Na₃VO₄, and 4% Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). This initial, brief extraction with a buffer containing nonionic NP-40 detergent and a low salt concentration was performed to solubilize the phospholipid bilayer of the plasma membrane, thus releasing cytosolic components but leaving the cell matrix (insoluble network of cytoskeletal filaments also containing fragments of rough endoplasmic reticulum or Golgi) intact. After incubation on ice for 10 min, the lysate was centrifuged at 1000 g for 5 min at 4°C, and the supernatant was collected as the “free cytosolic” fraction. The pellet containing the insoluble cell matrix was then washed in ice-cold buffer A. Following centrifugation at 1000 g for 5 min at 4°C, the pellet was gently resuspended in ice-cold buffer B containing 130 mM KCl (10 mM Tris, pH 7.0, 0.25 M sucrose, 130 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 1% Na₃VO₄, and protease inhibitor cocktail), which causes release of actin and other cytoskeletal components

and allows isolation of the proteins specifically associated with the cytoskeleton rather than those that are free in the cytosol or associated with the protein synthetic apparatus. After incubation on ice for 10 min and centrifugation at 1500 g for 10 min at 4°C, the supernatant was collected as the “cytoskeletal bound” fraction. The pellet was resuspended in ice-cold buffer B with 0.5% NP-40, 0.5% deoxycholate containing 1% Na₃VO₄ and protease inhibitor cocktail, incubated on ice for 10 min, and then centrifuged at 2000 g for 10 min at 4°C. The supernatant containing intracellular proteins associated with subcellular organelle remnants was collected as the “membrane bound” fraction. The pellet was then subjected to F-actin depolymerization by vigorous vortexing in low stringency lysis buffer (LB) plus an equal volume of actin depolymerization buffer (1.5 M guanidinium-HCl, 1 M Na-acetate, 10 mM CaCl₂, 1 mM adenosine 5'-triphosphate), as described previously (48). After incubation on ice for 10 min to depolymerize actin filaments, the sample was centrifuged at 15,000 g for 5 min at 4°C, and the supernatant was collected as the “solubilized pellet” fraction. The different fractions were analyzed by Western blotting using antibodies against α -SMA, β -actin, HDAC1, HDAC3, and HDAC8.

Coimmunoprecipitation

Protein lysates from HSMCs and from human prostate tissues were subjected to immunoprecipitation using anti- α -SMA, anti- β -actin, or anti-SMMHC mouse mAb to study the potential association of these cytoskeletal proteins with HDAC8. Pelleted cells and prostate tissue powder were lysed in ice-cold lysis buffer (containing 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, in physiological solution) or in high stringency buffer (HB; containing 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate in physiological solution), as described previously (49). Protease inhibitors (50 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, and Complete protease inhibitor mixture from Roche) were added freshly. Protein lysates were incubated at 4°C for 30 min, vortexed every 10 min, and then centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4°C. Protein extracts were precleared by incubation with 150 μ l of a 50% slurry of protein G-sepharose beads (Amersham Biosciences) for 2 h at 4°C on an orbital shaker. Equal amounts of total protein extracts (1500 μ g per immunoprecipitation), as determined by BCA protein assay (Pierce Chemical Co.), were incubated with anti- α -SMA, anti- β -actin, or anti-SMMHC antibody into the corresponding lysis buffer overnight at 4°C with constant rotation. Control samples were incubated with the same concentration of nonimmune mouse IgG2a (α -SMA and β -actin) or IgG1 (SMMHC). Subsequently, 75 μ l of a 50% slurry of protein G-sepharose beads was added to each sample and incubated for 1 h at 4°C with mild agitation. Beads were collected by centrifugation. After three washes with cold LB or HB, pelleted beads were quenched in protein sample buffer and boiled. Supernatants were retrieved and divided into fractions to allow their analysis by Western blot with different antibodies whenever needed. In each experiment, unless otherwise specified, 20 μ g whole extracts and immunocomplexes recovered from 300 μ g starting whole extracts were analyzed by immunoblot using antibodies directed against α -SMA, β -actin, SMMHC, HDAC8, HDAC1, and HDAC3.

Small interfering RNA (siRNA) transfection

All siRNAs used in this study were made of two complementary nucleotide strands containing 19 RNA bases followed by two DNA bases (T). They were chemically synthesized and

polyacrylamide gel electrophoresis-purified (Eurogentec, Seraing, Belgium). The following oligonucleotide sequences were used: 5'-UGAGCCCCACCGAAUCCAATT-3' and 5'-UUGGAUUCGGUGGGGCUCATT-3' for HDAC8 siRNA #1; 5'-ACGGGCCAGUAUGGUGCAUTT-3' and 5'-AUGCACCAUACUGGCCCGUTT-3' for HDAC8 siRNA #2; and 5'-CUGCAAGGGAUGGAUCUGATT-3' and 5'-UCAGAUCCAUCCCUUGCAGTT-3' for HDAC6 siRNA. This HDAC6 siRNA has been previously shown to efficiently silence HDAC6 expression (35). Each pair of oligonucleotides was annealed at a concentration of 20 μ M in 50 mM Tris, pH 7.5–8.0, 100 mM NaCl. Calcium phosphate-mediated transfection was performed in 10 cm Petri dishes with a final concentration of 20 nM each siRNA, unless otherwise specified. HDAC6 siRNA was added to the transfection medium at a final concentration of 40 nM.

Cells were plated ~24 h before transfection, and the medium was changed 1 h prior to transfection. Cells were transfected at a starting confluence between 40% and 60%. After transfection, cells were incubated in 10% FBS medium and collected 48 h later. In some experiments, cells were transfected three times over 4 days and collected 24 h after final transfection. For collagen contraction assays, cells were transfected twice over 2 days and added to the hydrated collagen lattices 48 h after the second transfection. Mock transfections with transfecting reagent alone served as negative control. Cell survival was also monitored following mock or HDAC8 siRNA #1 transfections. HSMCs were transfected once for 16 h, with or without HDAC8 siRNA #1. After transfection, living and dead cells were counted using blue trypan at different times. Transfected HSMCs were also split 72 h after transfection, and equal numbers of cells were replated and then counted again 72 h after splitting. Significant silencing of HDAC8 expression by siRNA HDAC8 #1 was observed at the time of cell splitting by immunoblot analysis (data not shown).

Contraction of hydrated collagen lattices

Collagen I was acid-extracted from newborn bovine skin, as described previously (43, 50). Collagen was dissolved at 1 mg/mL in sterile 0.1% acetic acid. Collagen gel contraction assays were essentially performed as described (51, 52). Briefly, concentrated DMEM, bicarbonate buffer solutions, and collagen were mixed on ice to yield a neutralized collagen gel solution. HSMCs were added to this collagen solution to obtain a cellular suspension containing 8×10^3 cells/mL in 0.3 mg/mL collagen, $1 \times$ DMEM, 10% fetal calf serum, 25 mM sodium bicarbonate, 2 mM glutamine, 50 μ g/mL ascorbic acid, 100 units/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Samples (5 mL) of the cell/collagen mixtures were prewarmed for ~5 min at room temperature, placed in 60-mm plastic bacteriological dishes, and then incubated at 37°C in a humidified CO₂ incubator to allow gel polymerization.

Relaxation of the polymerized lattices was initiated 1 h later by dislodging them from the surrounding plastic surface with a gentle rocking movement. Gels were allowed to contract for several days at 37°C in the cell culture incubator. The contracted gels were photographed, and the area of the gels was measured at defined time intervals. A minimum of three lattices was assayed per experimental condition. The contraction percentage was calculated by reporting the area of retracted lattice to the surface of the dish. Mean values are expressed \pm SD of the mean. Experiments were performed at least three times.

In parallel with the collagen contraction assays, *in vitro*-grown HSMCs, subjected to the same experimental conditions (transfections) as those included in the contraction assay, were lysed in protein lysis buffer at the time cells assayed for gel contraction were added to the collagen matrices. Protein lysates were analyzed by immunoblot as described above. Similar dilutions of HSMC suspensions were also reseeded in plastic culture dishes at the time HSMCs assayed for gel contraction were added in the collagen matrices to assess cell morphology, which was also examined routinely before trypsinization and subsequent reseeding. Photomicrographs of the cell monolayers were taken with a Leica microscope at different times before and after the start of the gel contraction.

RESULTS

HDAC8 associates with α -SMA *in vitro* and *in vivo*

We have recently reported that HDAC8 is a novel marker of smooth muscle differentiation with a predominant cytosolic localization and that this enzyme displays a striking cytoskeleton-like pattern of distribution reminiscent of actin stress fibers in cultured HSMCs (42). Notably, epitope-tagged HDAC8, but not HDAC3 or HDAC6, overexpressed in murine NIH-3T3 fibroblasts, is able to form cytoplasmic stress fiber-like structures that colocalize with α -SMA, suggesting a possible specific association of HDAC8 with the smooth muscle cytoskeleton (42). To investigate the existence of an association between HDAC8 and the actin cytoskeleton in HSMCs, two approaches were used in this study. We first performed cell fractionation experiments in which sequential detergent and salt extractions produced three fractions, one cytosolic in origin (free cytosolic), one enriched in cytoskeletal components (cytoskeletal bound), and one containing intracellular proteins associated with subcellular organelle remnants (membrane bound). Although this fractionation procedure is relatively crude, as there is always some degree of cross-contamination between fractions, it allows us to assess whether a specific protein is enriched in specific fractions within the constraints of the method (47). Following this copurification procedure, the remaining insoluble pellet was subjected to F-actin depolymerization, and the supernatant was collected as the solubilized pellet. The expression of α -SMA, HDAC8, β -actin, HDAC1, and HDAC3 was analyzed by immunoblot in the protein extracts from the three different fractions (free cytosolic, cytoskeletal bound, membrane bound) and from the solubilized pellet. As shown in [Fig. 1](#), the actin isoforms (α -SMA and β -actin) were present in all three fractions with an expected modest enrichment in the cytoskeletal bound fraction. HDAC8 was found in the same fractions with also slightly higher levels observed in the cytoskeletal bound fraction. In addition, HDAC8 and, expectedly, the actin isoforms copurified in the solubilized pellet fraction obtained after F-actin depolymerization. In contrast, two other class I HDACs, HDAC1 and HDAC3, were absent from the cytoskeletal bound and solubilized pellet fractions and were detectable only in the membrane bound extracts. Therefore, under these experimental conditions, HDAC8 but not HDAC1 or HDAC3 appeared to be associated with components of the cytoskeleton.

We then investigated whether HDAC8 could associate, directly or indirectly, with α -SMA. To this end, we have used protein coimmunoprecipitation, an approach that has previously been used to study the interaction between a specific protein and actin isoforms (53–56). Endogenous α -SMA was pulled down from HSMC total protein lysates with the use of an anti- α -SMA mAb that specifically recognizes the NH₂-terminal sequence Ac-EEED of the protein (57). The

immunoprecipitates were subjected to immunoblot analysis using antibodies directed against α -SMA, HDAC8, HDAC1, and HDAC3. As shown in [Fig. 2A](#), HDAC8 coimmunoprecipitated with α -SMA, and HDAC1 and HDAC3 were not detected in the immune complexes. When the anti- α -SMA antibody was replaced with mouse IgG of the same isotype, as negative control for immunoprecipitation, no α -SMA, HDAC8, HDAC1, or HDAC3 was found in the immunoprecipitates ([Fig. 2A](#)). Similar results were obtained when cell lysates were prepared with two different lysis buffers, LB or HB ([Fig. 2A](#)). Our attempts to demonstrate that inversely, α -SMA coimmunoprecipitates with endogenous HDAC8 have remained unsuccessful, as we have been unable to immunoprecipitate HDAC8 despite the use of various specific anti-HDAC8 antibodies. To search for a possible association between HDAC8 and another actin isoform, similar pull-down assays were carried out with the use of a mAb against the ubiquitously expressed β -actin protein. As shown in [Fig. 2B](#), no α -SMA, HDAC8, or HDAC3 protein was detected in the β -actin-containing immunocomplexes. Coimmunoprecipitation experiments were also performed with the use of protein lysates from normal human prostate tissues, which are highly enriched in HDAC8-expressing myofibroblasts (42). [Figure 3](#) clearly shows that as in HSMCs, endogenous HDAC8, but not HDAC1 or HDAC3, associates with α -SMA in normal prostate tissue as well as in NIH-3T3 cells. In addition, the α -SMA-containing immunocomplexes were devoid of detectable β -actin ([Fig. 3](#)). Coimmunoprecipitation experiments performed with the use of anti- β -actin and prostate tissue lysates did not yield any detectable HDAC8 or α -SMA in the immunoprecipitates (data not shown). Finally, immunoprecipitations using a specific anti-SMMHC mAb and HSMC or human prostate lysates yielded SMMHC-containing immunocomplexes in which HDAC8 enzyme was not detected (data not shown).

HDAC8 silencing by RNA interference impairs the capacity of HSMCs to contract collagen lattices

Our observation that HDAC8 may associate specifically with a smooth muscle cytoskeleton protein leads us to hypothesize that HDAC8 may be involved in the regulation of the smooth muscle contractile apparatus. To test this hypothesis, we have used RNA interference to determine the impact of a reduction of HDAC8 abundance in HSMCs upon the capability of these cells to contract type I collagen lattices in vitro.

Primary HSMCs were transfected with two different siRNAs specific for HDAC8: HDAC8 siRNA #1, which targets a 3' region of HDAC8 mRNA upstream of the stop codon, and HDAC8 siRNA #2, which recognizes a 5' region located close to the start codon of the transcript. To determine the optimal concentration of siRNAs, HSMCs were transfected with HDAC8 siRNAs at concentrations of 0, 5, 20, or 40 nM. As shown in [Fig. 4A](#), immunoblot analysis of HDAC8 expression in these cells indicated that the reduction of HDAC8 abundance in HSMCs by HDAC8 siRNA #1 was siRNA concentration-dependent, with a marked reduction at 20 nM or 40 nM. The amount of β -actin protein was not affected by transfections with various concentrations of HDAC8 siRNA #1 ([Fig. 4A](#)). On the basis of these results, all further transfections with HDAC8 siRNAs in this study were performed with a final concentration of 20 nM.

HDAC8 siRNA #1 transfection was able to induce a substantial silencing of HDAC8 expression in HSMCs (Figs. 4A, B and 5B) as well as in NIH-3T3 cells, which also express HDAC8 (42) (Fig. 4B). However, transfections with HDAC8 siRNA #2 were inefficient to reduce HDAC8 abundance in these cell lines (Figs. 4B and 5B). Thus, between two HDAC8 siRNAs tested, only one of them had a suppressive effect on HDAC8 protein expression. We thus further used HDAC8 siRNA #2 as an additional negative control together with mock transfections carried out without siRNAs in the transfection medium.

To verify that HDAC8 siRNAs induced the specific degradation of HDAC8 transcripts, NIH-3T3 cells and HSMCs were transfected with HDAC8 siRNA #1 or HDAC8 siRNA #2, and the expression levels of other class I HDACs (HDAC1 and HDAC3), which share a high sequence homology with HDAC8, were assessed. We have observed that even following three transfections over 4 days, the expression levels of HDAC1 and HDAC3 as well as those of cytoskeletal β -actin and α -tubulin proteins were not reduced by HDAC8 siRNA #1 or siRNA #2 transfections in NIH-3T3 cells or HSMCs (Fig. 4B).

To determine whether HDAC8 may participate in the mechanisms conferring contractile capacity to smooth muscle cells, HSMCs were transfected twice over 48 h without siRNA, with HDAC8 siRNA #1, with HDAC8 siRNA #2, or with HDAC6 siRNA. Forty-eight hours after the second transfection, HSMCs were lysed in protein extraction buffer for immunoblot analysis, assayed for collagen gel contraction, or reseeded on plastic dishes to evaluate their morphology (Fig. 5A).

Immunoblot analysis was used to examine the HDAC8 content and α -tubulin acetylation level of the cells. Protein lysates subjected to immunoblot analysis were extracted exactly at the time when transfected cells were incubated in the collagen solution to ensure that these cells displayed reduced target gene expression with the various siRNAs at the start of the collagen contraction assay. Figure 5B shows that the amount of HDAC8 protein was decreased only in cells transfected with HDAC8 siRNA #1. As HDAC6 is an α -tubulin deacetylase (34–37) and as none of the available anti-HDAC6 antibodies in our laboratory have been working in immunoblot so far, the efficiency of HDAC6 silencing by HDAC6 siRNA was indirectly determined by analyzing the amount of acetylated α -tubulin. We observed that only HSMCs transfected with siRNAs specific for HDAC6 displayed increased levels of acetylated α -tubulin. The levels of β -actin were unaffected by the various transfections. These results indicated that the targeted HDACs were at least partially silenced when HSMCs were incubated in the collagen lattices. We then compared the ability of HDAC8-silenced, HDAC6-silenced, and control cells to contract a collagen lattice into which they had been incubated.

Figure 6A shows a representative image of collagen lattices photographed 24 h after release of the lattices. At that time point, the mean area of the lattices containing HDAC8 siRNA #1-transfected HSMCs was eight to nine times larger than the mean area of the lattices incubated with mock or HDAC8 siRNA #2-transfected HSMCs and 4.8 times larger than the mean area of lattices incubated with HDAC6-silenced HSMCs. This strong contraction inhibition obtained with HDAC8 siRNA #1-transfected HSMCs persisted over a 6-day period (Fig. 6B). These experiments were performed at least three times, and similar results were obtained.

HDAC8 silencing by RNA interference induces morphological changes in HSMCs

The morphology of siRNA-transfected HSMCs was assessed before and after reseeding at the time when transfected HSMCs were added into the collagen matrices. Before trypsinization and reseeding, no evident change in cellular morphology was noted by light microscopy examination. [Figure 7A, B](#) shows representative low and high magnification photomicrographs, respectively, of transfected HSMCs 48 h after reseeding. As compared with mock-transfected HSMCs, HDAC8 siRNA #2- and HDAC6 siRNA-transfected HSMCs exhibited no obvious modification in cell shape or size at any time after reseeding. It is striking that HDAC8 siRNA #1-transfected HSMCs exhibited a noticeable reduction in size with decreased cell spreading. These morphological changes were noted as early as 1 h after replating and were maintained for approximately 1 week. Thereafter, cellular morphology resumed to that of control HSMCs (data not shown). Monitoring cell survival using trypan blue exclusion showed no difference in the number of living or dead cells between mock and HDAC8 siRNA #1-transfected HSMCS at different times before or after cell splitting (data not shown).

DISCUSSION

To date, the HDAC family contains 18 members and is usually separated into three classes on the basis of their similarity to various yeast HDACs. HDAC8 belongs to the first class, comprising HDACs, initially considered to be expressed exclusively in the nucleus, where they regulate gene transcription by deacetylating histone tail lysine residues. Our recent demonstration that HDAC8 is detected specifically in the cytosol of normal human cells showing smooth muscle differentiation has indicated potential new functions for this enzyme in this particular subset of contractile cells (42). Indeed, we have previously demonstrated, using immunocytochemistry and confocal microscopy, that HDAC8 exhibits a cytosolic distribution reminiscent of actin stress fibers and colocalizes with α -SMA in the cytosol, suggesting that HDAC8 may associate with the cytoskeletal apparatus (42).

This study provides the first evidence that a class I HDAC associates with the actin cytoskeleton. Initial cellular fractionation experiments have shown that as opposed to HDAC1 and HDAC3, HDAC8 can be copurified with α -SMA and β -actin and can be released from detergent-insoluble pellets by F-actin depolymerization. These results suggest that this HDAC may, at least in part, associate with the actin cytoskeleton, possibly with its filamentous form (F-actin), as already suggested by previous colocalization studies (42).

F-actin is generally associated with nonionic, detergent-insoluble pools, and thus, its association with other proteins may not always be readily detected by coimmunoprecipitation. However, the coimmunoprecipitation of a specific protein with actin in Triton X-100 or NP-40-soluble protein extracts does not reject the possibility that this protein binds effectively to the filamentous form of actin (53–55). In fact, nonionic, detergent-soluble pools have been shown to contain globular and filamentous actin (58), and coimmunoprecipitations using NP-40 or Triton X-100-containing lysis buffers have been used to detect the interaction of specific proteins with F-actin (53, 56). Possibly, short fragments of F-actin that arrest in an early stage of polymerization or that result from mechanical shearing of F-actin during extraction allow the detection of soluble, F-actin-containing protein complexes (53, 59, 60). In this study, coimmunoprecipitation experiments have been performed and have further demonstrated that HDAC8 associates with the smooth

muscle isoform of α -actin in protein lysates from primary HSMCs, NIH-3T3 cells, and human prostate tissues. No association was found between HDAC8 and the ubiquitously expressed β -actin isoform. Also, neither HDAC1 nor HDAC3, two other class I HDACs, was detected in the α -SMA-containing immunocomplexes, thereby suggesting that HDAC8 interacts uniquely and specifically with the smooth muscle cytoskeleton.

It is interesting that it has been previously demonstrated that the protein product resulting from inversion (16), a frequent chromosomal translocation found in acute myeloid leukemia, which fuses the first 165 amino acids of core-binding factor β (CBF- β) to the tail region of SMMHC, specifically associates with HDAC8 (49). This interaction is mediated through a domain present in the C-terminal SMMHC portion of the CBF- β -SMMHC fusion protein (49). This fusion protein overexpressed in NIH-3T3 cells is also detected in the cytoplasm as stress fiber-like structures colocalizing with actin filaments (61). However, the possible association of HDAC8 with the cytoskeletal protein SMMHC has not been examined. In this study, we have therefore investigated whether HDAC8 could coimmunoprecipitate with SMMHC. Under our experimental conditions, we failed to show such an interaction. However, an association between HDAC8 and SMMHC could not be ruled out, as for example, the antibody used for immunoprecipitation may have hampered the coimmunoprecipitation of the two proteins.

Whether HDAC8 interacts directly or indirectly with α -SMA and whether any smooth muscle cytoskeletal protein may be a target of the deacetylase activity of HDAC8 remain to be elucidated. In this respect, several lines of evidence currently suggest that histones may not be the “natural” substrates of HDAC8. Van den Wyngaert et al. (12) have shown that total cell extracts from HDAC8 stably transfected human embryonic kidney 293 clones overexpressing HDAC8, five- to sixfold above untransfected cells, did not exhibit any change in the level of histone acetylation as compared with empty vector-transfected cells. In addition, HDAC8 immunoprecipitated from these cells showed no significant deacetylase activity (12). Furthermore, Hu et al. (62) have recently identified a potent HDAC8 selective inhibitor compound, SB-379872-A, which was not capable of increasing cellular histone acetylation or the activity of an early simian virus 40 promoter. These findings suggest that proteins other than histones are the physiologic substrates of HDAC8. The association of a HDAC with the cytoskeleton has in fact been reported previously, as HDAC6 and SIRT2, two predominant HDACs, can deacetylate α -tubulin (34–38).

HDAC8 RNA interference has been used in this study to investigate the potential functions of this enzyme in smooth muscle cell biology. A striking reduction in cell size with decreased spreading was found in HDAC8-silenced HSMCs, and control and HDAC6 siRNA-transfected HSMCs exhibited no obvious modification in cell shape or size at any time before or after reseeding. HDAC8 silencing-induced alterations of smooth muscle cell shape were readily detectable only after trypsinization and replating of the cells. This observation suggests that HDAC8, possibly through its interaction with α -SMA cytoskeletal protein, regulates the dynamics of smooth muscle cytoskeleton rather than its statics and may be involved in mechanisms responsible for the attachment/spreading of these cells. This involvement may, at least in part, account for the reduced capability of HDAC8-silenced HSMCs to contract type I collagen lattices. Indeed, we have further demonstrated that HDAC8 is necessary for conferring the capacity of HSMCs to contract type I collagen lattices. We speculate that HDAC8 may exert

its effects through a predominant cytosolic deacetylase activity, possibly affecting the function of smooth muscle cytoskeletal proteins, although at this time, it cannot be excluded that HDAC8 may have gene expression-related activities. Further studies are needed to address this issue. Previous reports have clearly identified HDAC6, a class II HDAC, as a microtubule-associated deacetylase that can destabilize dynamic microtubules (36) and promote chemotactic cell movement (35). In addition, recent studies have shown that microtubule stability affects actin-dependent membrane ruffling and cell mobility by activating the small GTPases Rac-1 and Rho (63, 64). Thus, it is not surprising that increased α -tubulin acetylation resulting from HDAC6 silencing in HSMCs may also impair, to some degree, the capability of these cells to contract collagen lattices, as observed in this study.

In conclusion to this study, we have demonstrated that HDAC8 associates with and regulates smooth muscle cell cytoskeleton dynamics. Our findings lay the ground for the rational investigation of the mechanisms underlying HDAC8-enabled smooth muscle cytoskeleton remodeling.

ACKNOWLEDGMENTS

Grant sponsors include National Fund for Scientific Research (Belgium), Centre Anti-Cancéreux de l'Université de Liège, Fondation Léon Frédéricq, TELEVIE, European FP6 STROMA and METABRE, and the Interuniversity Attraction Pole (Belgian Science Policy).

REFERENCES

1. Megee, P. C., Morgan, B. A., Mittman, B. A., and Smith, M. M. (1990) Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science* **247**, 841–845
2. Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349–352
3. Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**, 373–380
4. Alland, L., Muhle, R., Hou Jr., H., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**, 49–55
5. Koipally, J., Renold, A., Kim, J., and Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J.* **18**, 3090–3100
6. Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* **99**, 447–450
7. Gray, S. G., and Ekstrom, T. J. (2001) The human histone deacetylase family. *Exp. Cell Res.* **262**, 75–83

8. Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408–411
9. Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R., and Seto, E. (1997) Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J. Biol. Chem.* **272**, 28001–28007
10. Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y., and Verdin, E. (1998) Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2795–2800
11. Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., Johanson, K., Sung, C. M., Liu, R., and Winkler, J. (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J. Biol. Chem.* **275**, 15254–15264
12. Van den Wyngaert, I., de Vries, W., Kremer, A., Neefs, J., Verhasselt, P., Luyten, W. H., and Kass, S. U. (2000) Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett.* **478**, 77–83
13. Buggy, J. J., Sideris, M. L., Mak, P., Lorimer, D. D., McIntosh, B., and Clark, J. M. (2000) Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem. J.* **350**, 199–205
14. Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 25748–25755
15. Grozinger, C. M., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4868–4873
16. Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M. J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W., and Verdin, E. (1999) A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J. Biol. Chem.* **274**, 11713–11720
17. Kao, H. Y., Downes, M., Ordentlich, P., and Evans, R. M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* **14**, 55–66
18. Zhou, X., Marks, P. A., Rifkind, R. A., and Richon, V. M. (2001) Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10572–10577
19. Fischer, D. D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F. A., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P., and Cohen, D. (2002) Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J. Biol. Chem.* **277**, 6656–6666

20. Guardiola, A. R., and Yao, T. P. (2002) Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* **277**, 3350–3356
21. Kao, H. Y., Lee, C. H., Komarov, A., Han, C. C., and Evans, R. M. (2002) Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 187–193
22. Tong, J. J., Liu, J., Bertos, N. R., and Yang, X. J. (2002) Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1114–1123
23. Frye, R. A. (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 273–279
24. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–800
25. Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5807–5811
26. De Ruijter, A. J., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and Van Kuilenburg, A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749
27. Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., and Weinberg, R. A. (2001) hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149–159
28. Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U. M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Kouzarides, T. (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* **21**, 2383–2396
29. Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., and Gu, W. (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* **408**, 377–381
30. Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137–148
31. Avalos, J. L., Celic, I., Muhammad, S., Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., and Wolberger, C. (2002) Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol. Cell* **10**, 523–535
32. Smith, J. (2002) Human Sir2 and the “silencing” of p53 activity. *Trends Cell Biol.* **12**, 404–406

33. Zeng, L., Zhang, Y., Chien, S., Liu, X., and Shyy, J. Y. (2003) The role of p53 deacetylation in p21^{Waf1} regulation by laminar flow. *J. Biol. Chem.* **278**, 24594–24599
34. Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4389–4394
35. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., and Yao, T. P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458
36. Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* **21**, 6820–6831
37. North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., and Verdin, E. (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* **11**, 437–444
38. Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* **22**, 1168–1179
39. Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J. M., Boeke, J. D., and Feinberg, A. P. (2002) SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13653–13658
40. Schwer, B., North, B. J., Frye, R. A., Ott, M., and Verdin, E. (2002) The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J. Cell Biol.* **158**, 647–657
41. Waltregny, D., North, B. J., Van Mellaert, F., de Leval, J., Verdin, E., and Castronovo, V. (2004) Screening of histone deacetylases (HDAC) expression in human prostate cancer reveals distinct class I HDAC profiles between epithelial and stromal cells. *Eur. J. Histochem.* **48**, 273–290
42. Waltregny, D., de Leval, L., Glénisson, W., Tran, S. L., North, B. J., Bellahcène, A., Weidle, U. H., Verdin, E., and Castronovo, V. (2004) Expression of HDAC8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. *Am. J. Pathol.* **165**, 553–564
43. Delvoye, P., Nusgens, B., and Lapiere, C. M. (1983) The capacity of retracting a collagen matrix is lost by dermatosparactic skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 267–270
44. Deroanne, C. F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clause, N., Blacher, S., Verdin, E., Foidart, J. M., Nusgens, B. V., and Castronovo, V. (2002) Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* **21**, 427–436

45. Wheeler, T. M., and Lebovitz, R. M. (1994) Fresh tissue harvest for research from prostatectomy specimens. *Prostate* **25**, 274–279
46. van den Brule, F. A., Waltregny, D., and Castronovo, V. (2001) Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J. Pathol.* **193**, 80–87
47. Carraway, K. L., and Carraway, C. A. C. (2000) Signalling complexes: Association of signalling proteins with the cytoskeleton. In *Cytoskeleton: Signalling and Cell Regulation* (Hames, B D., ed) pp. 51–78, Oxford University Press, NY
48. Snabes, M. C., Boyd III, A. E., Pardue, R. L., and Bryan, J. (1981) A DNase I binding/immunoprecipitation assay for actin. *J. Biol. Chem.* **256**, 6291–6295
49. Durst, K. L., Lutterbach, B., Kummalu, T., Friedman, A. D., and Hiebert, S. W. (2003) The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 607–619
50. Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C. (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1274–1278
51. Delvoye, P., Wiliquet, P., Leveque, J. L., Nusgens, B. V., and Lapiere, C. M. (1991) Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 898–902
52. Lambert, C. A., Soudant, E. P., Nusgens, B. V., and Lapiere, C. M. (1992) Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces. *Lab. Invest.* **66**, 444–451
53. Hazan, R. B., and Norton, L. (1998) The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**, 9078–9084
54. Niessen, P., Clement, S., Fontao, L., Chaponnier, C., Teunissen, B., Rensen, S., van Eys, G., and Gabbiani, G. (2004) Biochemical evidence for interaction between smoothelin and filamentous actin. *Exp. Cell Res.* **292**, 170–178
55. Ruzanov, P. V., Evdokimova, V. M., Korneeva, N. L., Hershey, J. W., and Ovchinnikov, L. P. (1999) Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J. Cell Sci.* **112**, 3487–3496
56. Sadekova, S., Lamarche-Vane, N., Li, X., and Beauchemin, N. (2000) The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Mol. Biol. Cell* **11**, 65–77
57. Chaponnier, C., Goethals, M., Janmey, P. A., Gabbiani, F., Gabbiani, G., and Vandekerckhove, J. (1995) The specific NH₂-terminal sequence Ac-EEED of α -smooth muscle actin plays a role in polymerization in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* **130**, 887–895

58. Forte, J. G., Ly, B., Rong, Q., Ogihara, S., Ramilo, M., Agnew, B., and Yao, X. (1998) State of actin in gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* **274**, C97–C104
59. Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (1982) Methods to characterize actin filament networks. *Methods Enzymol.* **85**, 211–233
60. Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987–1035
61. Wijmenga, C., Gregory, P. E., Hajra, A., Schrock, E., Ried, T., Eils, R., Liu, P. P., and Collins, F. S. (1996) Core binding factor β -smooth muscle myosin heavy chain chimeric protein involved in acute myeloid leukemia forms unusual nuclear rod-like structures in transformed NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1630–1635
62. Hu, E., Dul, E., Sung, C. M., Chen, Z., Kirkpatrick, R., Zhang, G. F., Johanson, K., Liu, R., Lago, A., Hofmann, G., Macarron, R., de los Frailes, M., Perez, P., Krawiec, J., Winkler, J., and Jaye, M. (2003) Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 720–728
63. Waterman-Storer, C. M., and Salmon, E. (1999) Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 61–67
64. Kaverina, I., Krylyshkina, O., and Small, J. V. (1999) Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* **146**, 1033–1044

Received July 13, 2004; accepted January 24, 2005.

Fig. 1

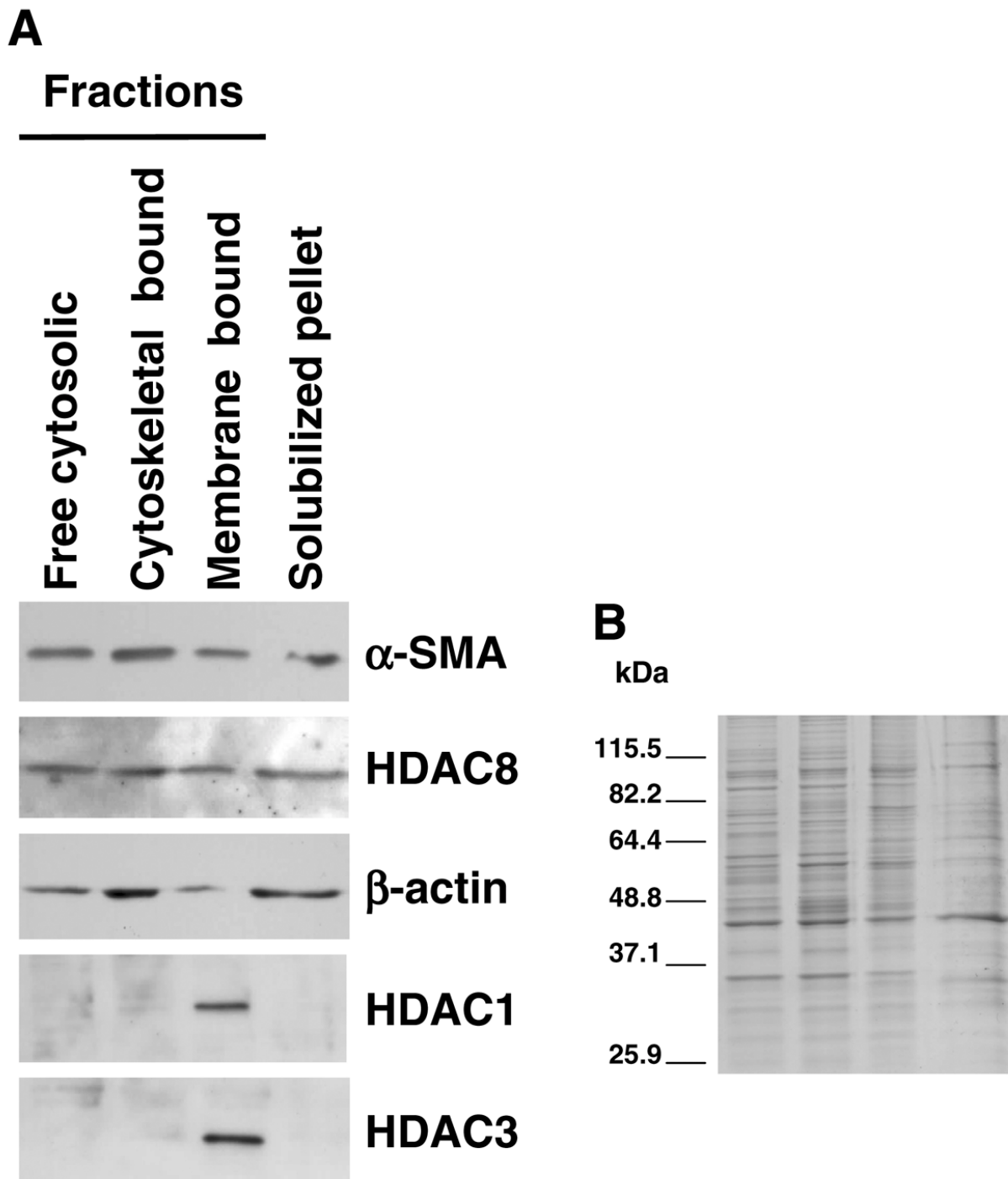


Figure 1. Copurification of HDAC8 with the actin cytoskeleton in HSMCs. **A)** Subcellular fractionation was performed in primary smooth muscle cells from human umbilical cord vein (HSMCs) using a sequential detergent and salt extraction procedure that yielded three fractions, one cytosolic in origin (free cytosolic), one enriched in cytoskeletal component (cytoskeletal bound), and one containing cell membrane and intracellular proteins associated with subcellular organelle remnants (membrane bound), as described in Materials and Methods. The remaining insoluble pellet was subjected to F-actin depolymerization, and the supernatant was collected as the solubilized pellet fraction. The abundance of α -SMA, HDAC8, β -actin, HDAC1, and HDAC3 in the protein extracts from the four different fractions, as indicated, was analyzed by immunoblot. **B)** A Coomassie staining of a representative gel was performed to check loading. Sizes in kDa are shown, as defined by molecular weight markers.

Fig. 2

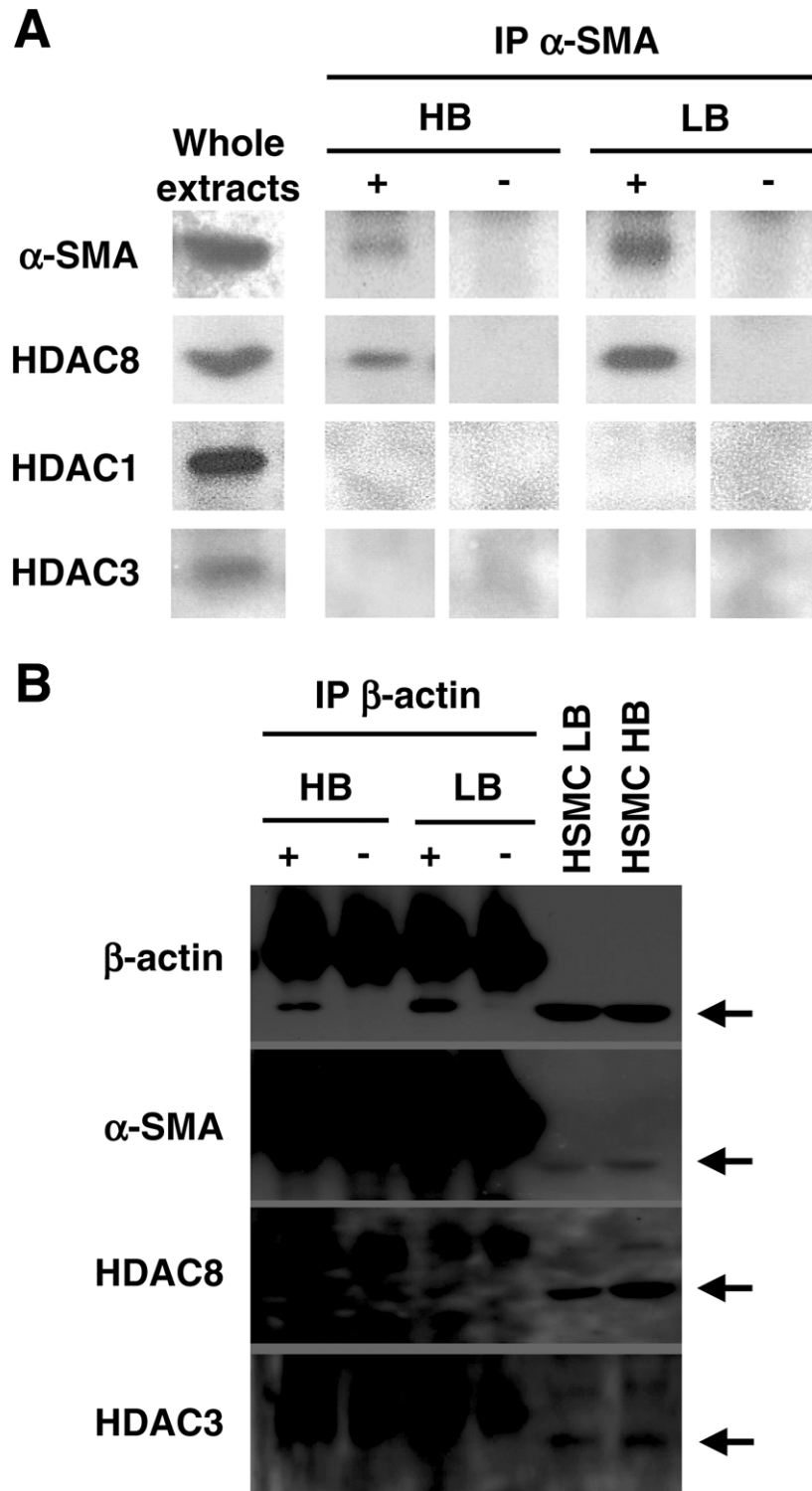


Figure 2. Interaction of HDAC8 with α -SMA, not with β -actin, in HSMCs. Primary smooth muscle cells from human umbilical cord veins (HSMCs) were lysed in ice-cold HB or in LB. Protein lysates from these cells were immunoprecipitated (IP) with mAb against α -SMA (A) or β -actin (B). Immunoprecipitations with IgG2a served as negative controls. In each experiment, 20 μ g whole extracts and immunocomplexes recovered from 300 μ g starting whole extracts were analyzed by immunoblot using antibodies directed against α -SMA, β -actin, HDAC8, HDAC1, and HDAC3.

Fig. 3

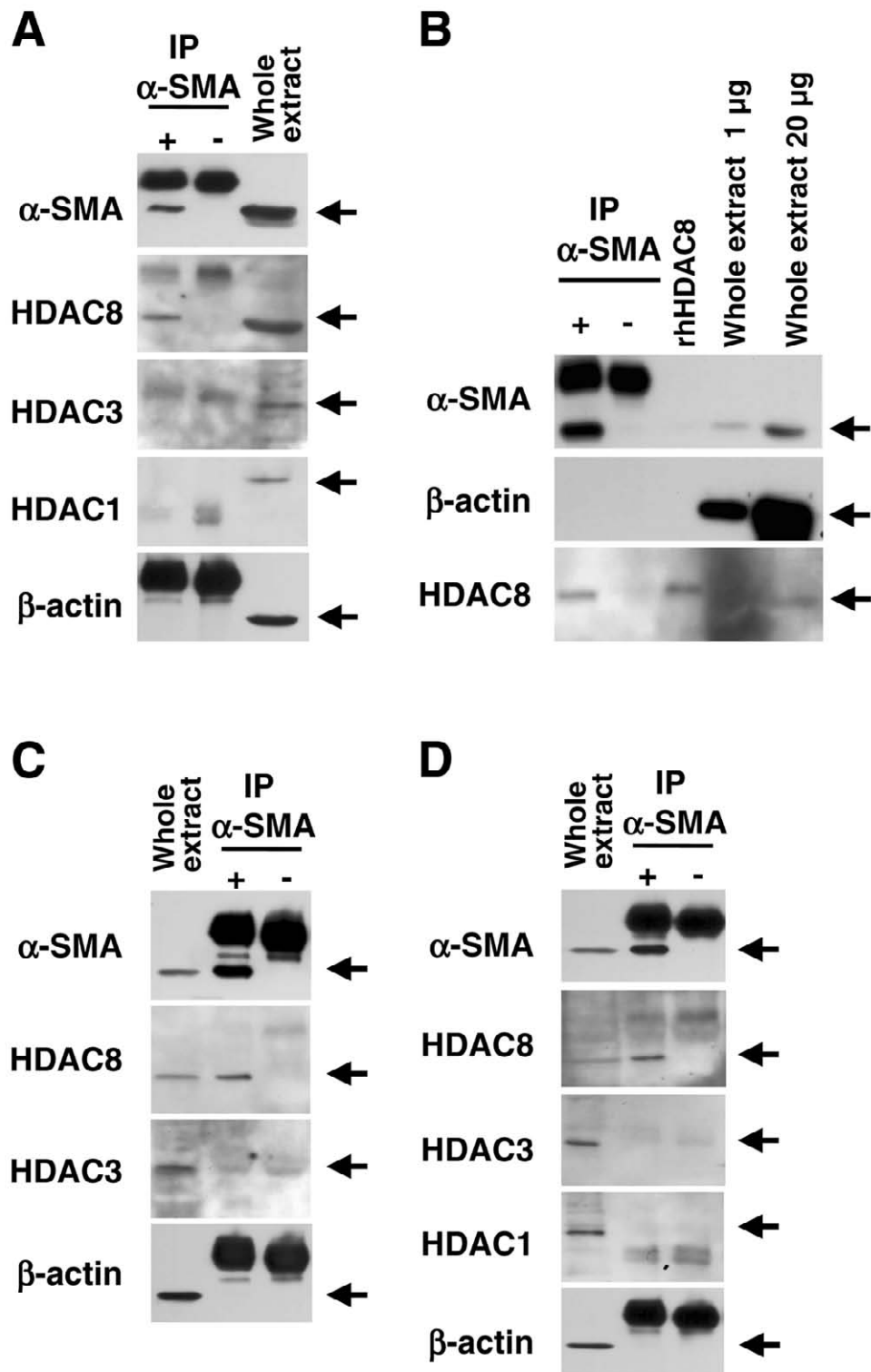


Figure 3. Interaction of HDAC8 with α -SMA in normal human prostate tissues and NIH-3T3 cells. Protein lysates from normal human prostate tissues (three representative examples shown in A–C) and NIH-3T3 (D) were immunoprecipitated with a mAb against α -SMA or IgG2a (as control). Unless otherwise specified, 20 μ g whole extracts and immunoprecipitates from 300 μ g starting whole extracts were subjected to immunoblot analysis using antibodies directed against α -SMA, HDAC8, HDAC3, HDAC1, and β -actin. rhHDAC8, Recombinant human HDAC8.

Fig. 4

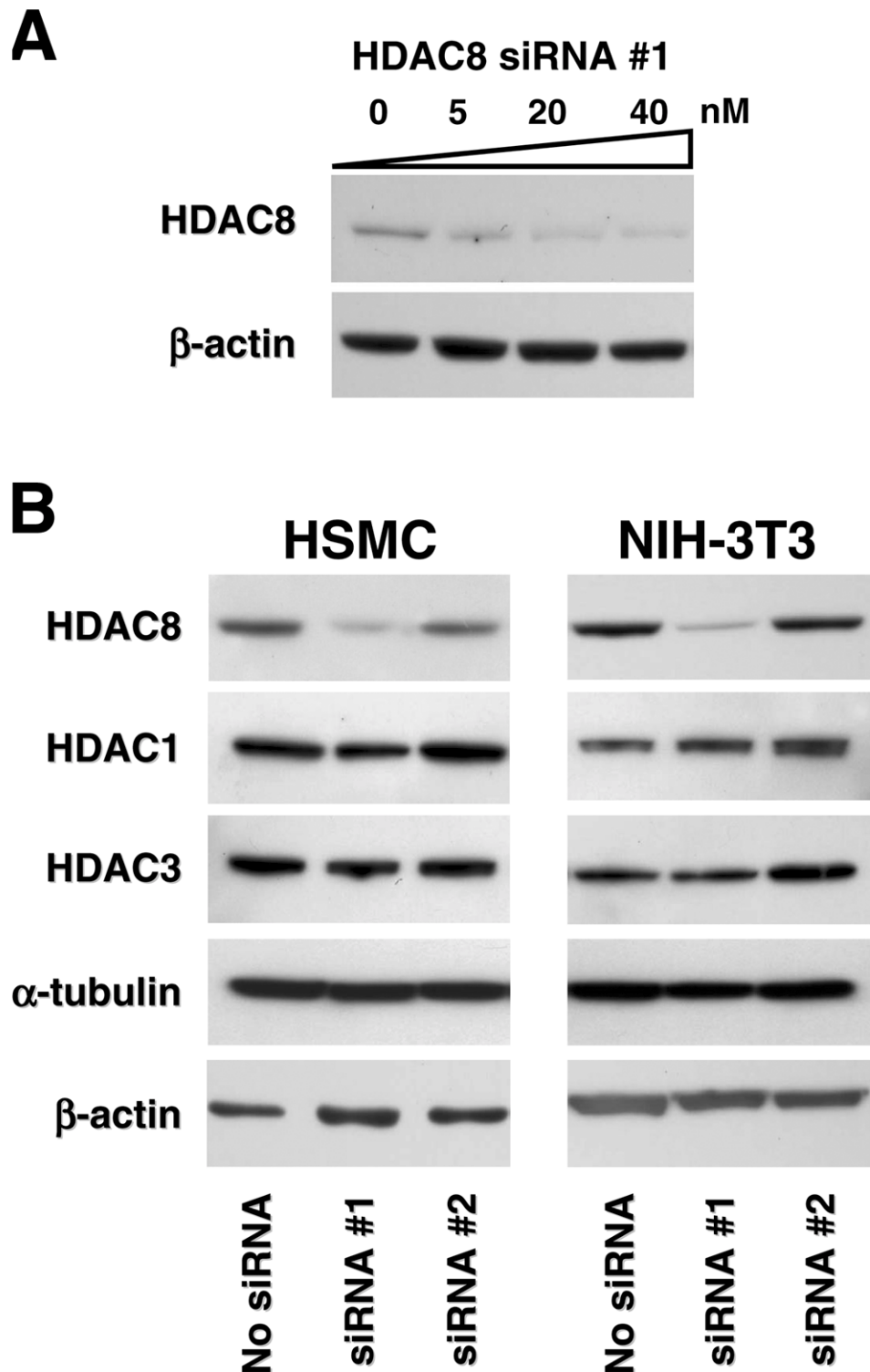


Figure 4. Dose-dependent and specific silencing of HDAC8 expression using RNA interference. **A)** Primary smooth muscle cells from human umbilical cord vein (HSMCs) were transfected for 16 h with HDAC8 siRNA #1 at a final concentration of 0, 5, 20, or 40 nM. Cells were lysed in protein extraction buffer 48 h after transfection, and lysates were subjected to immunoblot analysis of HDAC8 and β -actin expression. **B)** HSMC and NIH-3T3 fibroblasts were transfected three times over 4 days without siRNA (mock transfection), with HDAC8 siRNA #1 or with HDAC8 siRNA #2. Cells were lysed in protein extraction buffer 24 h after the last transfection, and lysates were subjected to immunoblot analysis of HDAC8, HDAC1, HDAC3, α -tubulin, and β -actin expression.

Fig. 5

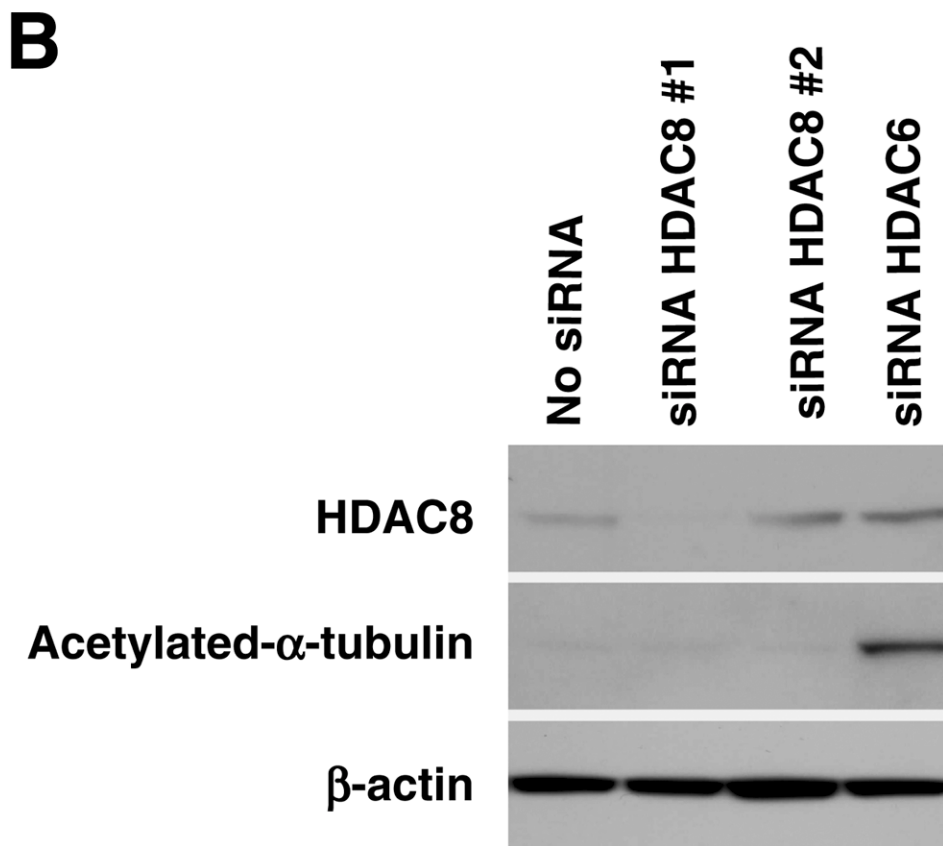
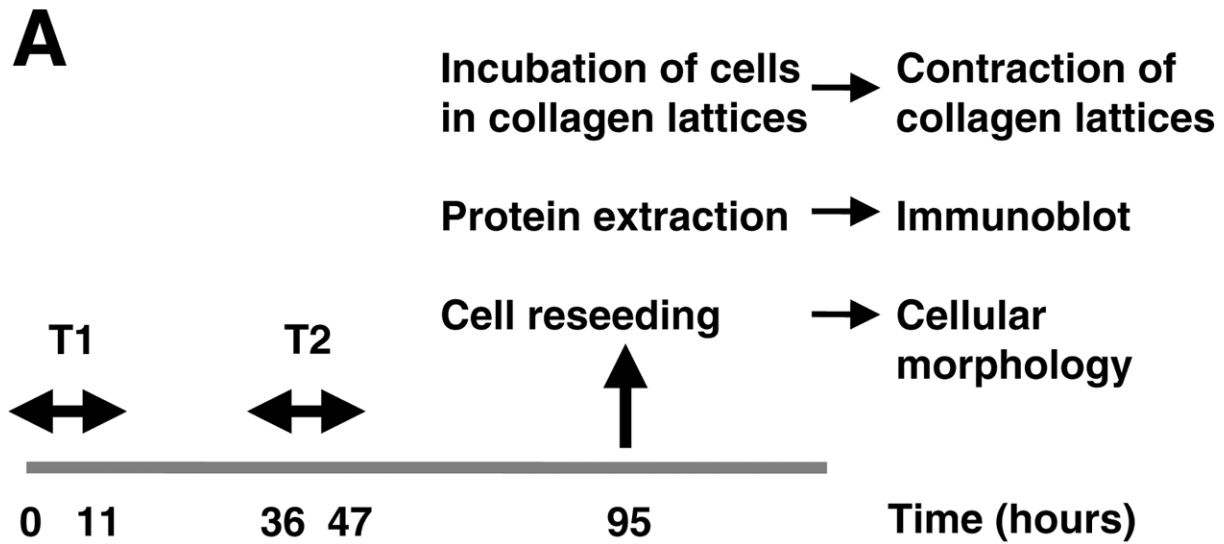
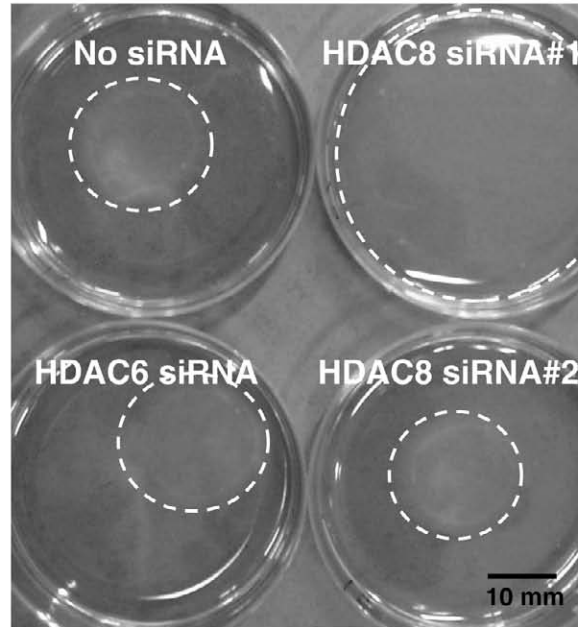


Figure 5. Schematic representation of the experimental protocol (A) used to assess the impact of HDAC8 expression silencing by RNA interference on the morphology and contraction capability of HSMCs in a collagen contraction assay. HSMCs were transfected twice over 2 days without siRNA, with HDAC8 siRNA #1, with HDAC8 siRNA #2, or with HDAC6 siRNA. Forty-eight hours after the second transfection, cells were incubated in collagen solution and assayed for collagen gel contraction or lysed in protein extraction buffer, and lysates were subjected to immunoblot analysis of HDAC8, acetylated- α -tubulin, and β -actin expression (B) or reseeded onto plastic dishes to assess cellular morphology.

Fig. 6

A



B

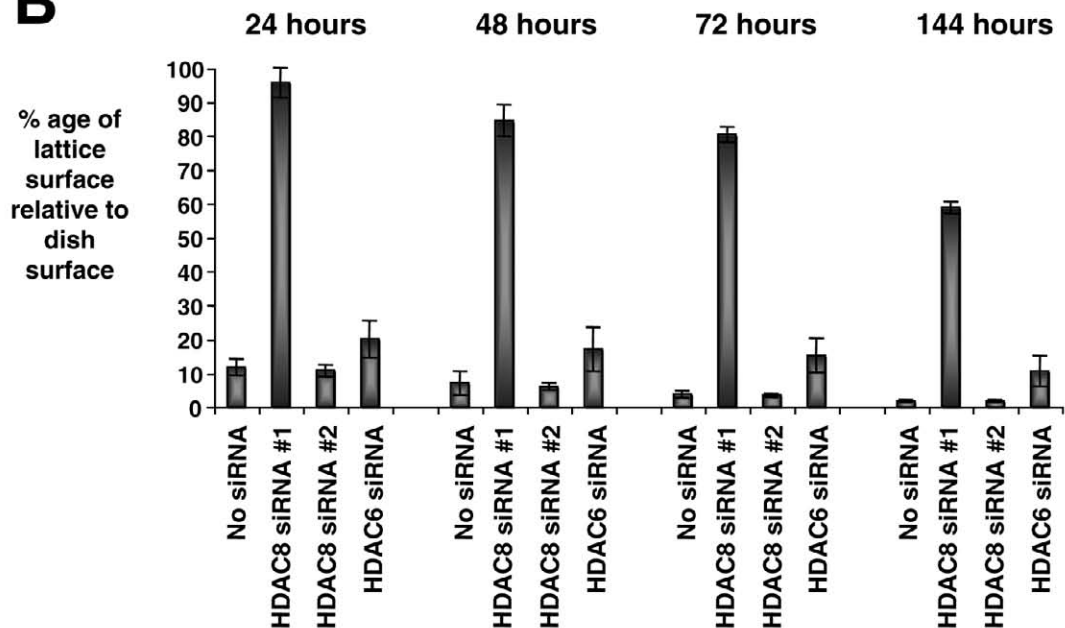


Figure 6. HDAC8 silencing by RNA interference impairs the capacity of HSMCs to contract type I collagen lattices. HSMCs transfected with or without siRNAs for HDAC8 or HDAC6 were added to a collagen solution. Samples of the cell/collagen mixtures were placed in plastic dishes and incubated at 37°C. Relaxation of the polymerized gels was initiated 1 h after incubation. Gel contraction was allowed to proceed for 144 h. A minimum of three lattices was assayed per experimental condition. **A)** Representative image of collagen lattices photographed 24 h after relaxation of the polymerized lattices. White, dashed circular lines show the circumference of the collagen gels. **B)** The area of the gels was measured at defined time intervals. The area of contracted lattices was calculated as a percentage of the surface of the dish. Mean values are expressed \pm SD of the mean. Experiments were performed at least three times, and similar results were obtained.

Fig. 7

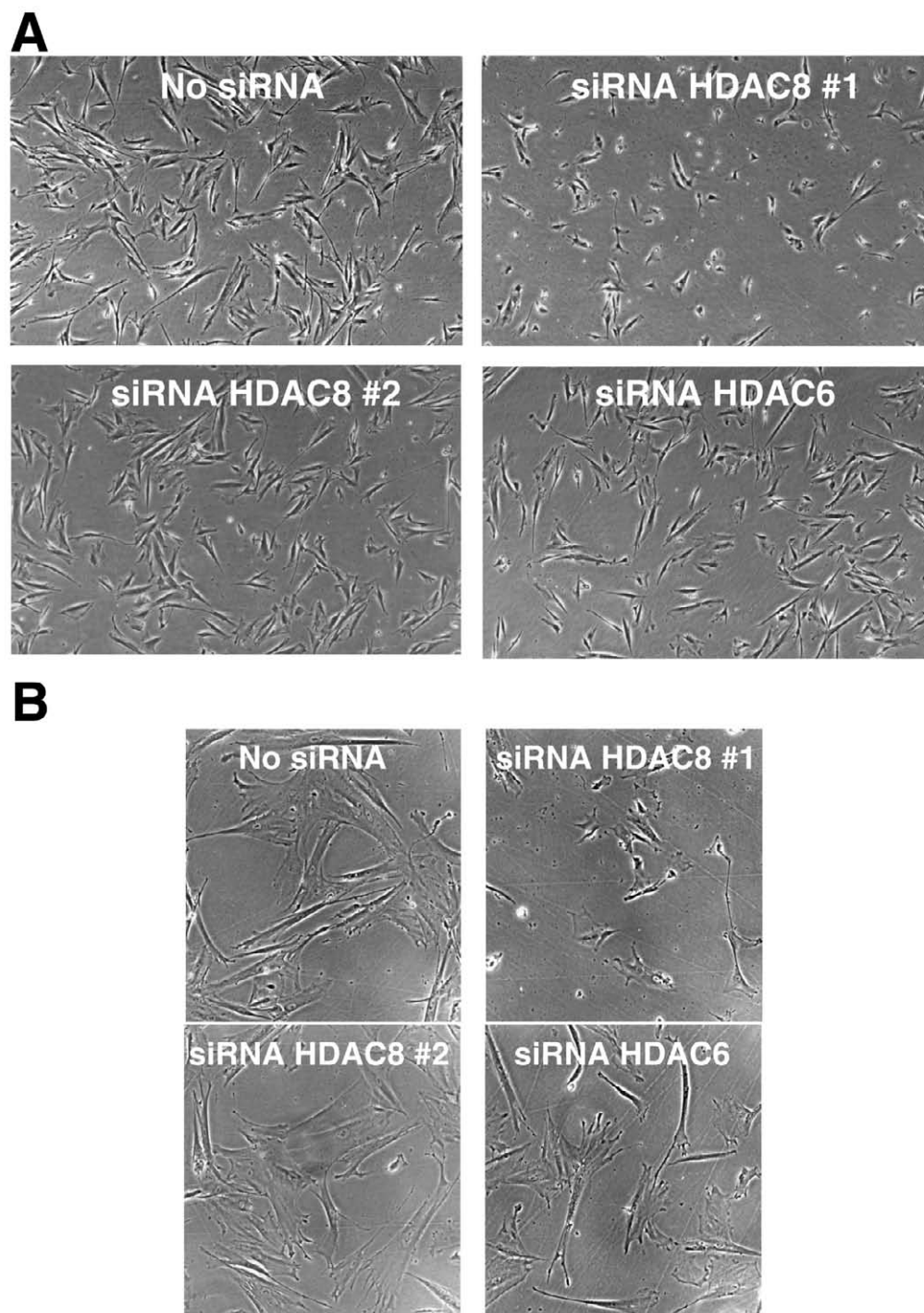


Figure 7. Alterations of the morphology of HSMCs following HDAC8 silencing by RNA interference. HSMCs were transfected twice over 2 days without siRNA (mock transfection), with HDAC8 siRNA #1, with HDAC8 siRNA #2, or with HDAC6 siRNA. Cells were trypsinized 48 h after the second transfection and reseeded onto plastic dishes to assess cellular morphology. Photomicrographs of the cells were taken at different time-points after reseeding. **A)** Representative low magnification photomicrographs of transfected HSMCs, as indicated, 48 h after replating. **B)** Representative high magnification photomicrographs of transfected HSMCs, as indicated, 48 h after replating.

6.3. Annexe 3 : Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal musculature in severe colorectal motility disorders, (*Neurogastroenterology and motility*)

Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal musculature in severe colorectal motility disorders

T. WEDEL,* G. J. J. M. VAN EYS,† D. WALTREGNY,‡ W. GLÉNISSON,‡ V. CASTRONOVO‡ & J.-M. VANDERWINDEN§

*Department of Anatomy, University of Luebeck, Luebeck, Germany

†Department of Molecular Genetics, University of Maastricht, Maastricht, The Netherlands

‡Metastasis Research Laboratory, University of Liège, Liège, Belgium

§Institute of Neurophysiology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

Abstract Histopathological studies of gastrointestinal motility disorders have mainly focused on enteric nerves and interstitial cells of Cajal, but rarely considered the enteric musculature. Here we used both classical and novel smooth muscle markers and transmission electron microscopy (TEM) to investigate muscular alterations in severe colorectal motility disorders. Full-thickness specimens from Hirschsprung's disease, idiopathic megacolon, slow-transit constipation and controls were stained with haematoxylin/eosin (HE) and Masson's trichrome (MT), incubated with antibodies against smooth muscle α -actin (α -SMA), smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC), smoothelin (SM) and histone deacetylase 8 (HDAC8) and processed for TEM. Control specimens exhibited homogeneous immunoreactivity for all antibodies. Diseased specimens showed normal smooth muscle morphology by HE and MT. While anti- α -SMA staining was generally normal, immunoreactivity for SMMHC, HDAC8 and/or SM was either absent or focally lacking in Hirschsprung's disease (80%), idiopathic megacolon (75%) and slow-transit constipation (70%). Ultrastructurally, clusters of myocytes with noticeably decreased myofilaments were observed in all diseases. SMMHC and the novel smooth muscle markers SM and HDAC8 often display striking abnormalities linked to the smooth muscle contractile apparatus unnoticed by both routine stain-

ings and α -SMA, suggesting specific defects of smooth muscle cells involved in the pathogenesis of gastrointestinal motility disorders.

Keywords colorectal motility disorders, histone deacetylase 8, smooth muscle α -actin, smooth muscle myosin heavy chain, smoothelin, ultrastructure.

INTRODUCTION

Gastrointestinal (GI) motility disorders encompass a broad spectrum of conditions which may require surgical treatment after failure of conservative therapeutic approaches. Congenital, degenerative or inflammatory enteric neuropathies and alterations of interstitial cells of Cajal (ICC) have been extensively investigated in these GI motility disorders.^{1–3}

Conversely, abnormalities of the effector itself, the enteric musculature, have been considered only occasionally in GI motor dysfunctions. In patients with chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO), muscular lesions have been characterized by a vacuolated degeneration of myocytes and subsequent fibrosis and classified as visceral myopathies.^{4–7} Fibrosis or vacuolation have also been reported in a subset of patients with idiopathic megacolon^{8,9} and in segmental jejunal dilatation.¹⁰ In rare cases, atrophy and disappearance of myocytes have been associated with an inflammatory injury and attributed to an enteric type of leiomyositis.^{11–13}

However, in most studies the histological evaluation of the intestinal musculature was limited to conventional staining techniques (e.g. haematoxylin/eosin, trichrome). Aware of this, Smith *et al.*¹⁴ and Gattuso *et al.*⁹ have carried out an assessment of the smooth muscle phenotype in patients with functional

Address for correspondence

Thilo Wedel MD, Department of Anatomy, University of Kiel, Otto-Hahn-Platz 8, Building 2, Floor 1, Room 106, D-24118 Kiel, Germany.

Tel: +49 431 880 2489; fax: +49 431 880 2699;

e-mail: t.wedel@anat.uni-kiel.de

Received: 28 October 2005

Accepted for publication: 15 February 2006

intestinal obstruction and idiopathic megacolon using specific immunomarkers and reported abnormal staining patterns for β -actin, myosin light chain kinase or smooth muscle actin in subgroups of patients. A recent study confirmed a deranged expression of smooth muscle α -actin (α -SMA) in a fairly large series of patients with CIPO.¹⁵

In this study, we have investigated the distribution of two classical and two novel smooth muscle cells immunomarkers, namely α -SMA, smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC), smoothelin (SM) and histone deacetylase 8 (HDAC8), in colorectal motility disorders. While α -SMA and SMMHC are well-known components of the smooth muscle contractile apparatus widely used for the immunohistochemical labeling of smooth muscle cells,¹⁶ SM and HDAC8 have been only very recently identified as specific markers for smooth muscle cells.

Smoothelin is a cytoskeleton-associated protein specifically expressed in terminally differentiated, contractile smooth muscle cells.^{17,18} SM has been used to monitor the phenotypic differentiation of smooth muscle cells, mainly in the vascular system.^{19,20} However, to the best of our knowledge, no study on SM in human GI disorders has been reported so far.

Histone deacetylase 8 belongs to a family of enzymes originally identified as key regulators of nucleosomal histone acetylation involved in the control of transcription regulation.²¹ Although initial observations suggested that the main activity of HDACs is the deacetylation of nucleosomal histones, HDACs also regulate the activity of non-histone nuclear proteins²² and are also present in the cytoplasm where they deacetylate the cytoskeletal protein α -tubulin.^{23,24} We have recently reported that HDAC8 is exclusively expressed by cells showing smooth muscle differentiation including visceral smooth muscle cells.²⁵ In addition, we have demonstrated that HDAC8 is a smooth muscle cytoskeleton-associated HDAC essential for smooth muscle cell contractility.²⁶

Here we show that antibodies raised against smooth muscle cytoskeleton-associated proteins, in particular the novel smooth muscle markers SM and HDAC8, unravel striking alterations of the muscularis propria in the absence of other detectable lesions, e.g. fibrosis or inflammation. In addition to light microscopical evaluation, transmission electron microscopy (TEM) was performed to assess the morphology of smooth muscle cells at ultrastructural level.

The data underscore that, besides the well-established defects of the enteric nervous system (ENS) and ICC, alterations of the smooth muscle contractile apparatus itself represent a prevalent pathological correlate in human GI motility disorders.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples

Full-thickness biopsies or resected colonic segments were obtained from patients with idiopathic megacolon ($n = 8$), slow-transit constipation ($n = 13$) and Hirschsprung's disease ($n = 10$). Age-matched control specimens of colon ($n = 12$) were obtained from patients with diseases unrelated to GI motility disorders (Table 1). The use of human tissues was approved by the Medical Institutional Ethics Committees of the Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium, and of the Faculty of Medicine, University of Luebeck, Germany.

Preparation of samples for histology and immunohistochemistry

Immediately after surgery specimens were fixed overnight in fresh 4% paraformaldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at 4 °C, cryopreserved in graded solutions of sucrose (10%, 20%, 30%, overnight each), embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles, Elkhart, IN, USA), snap-frozen and stored at -80 °C. Full-thickness sections (15- μ m thick) were cut on a cryostat, mounted onto

Table 1 Description of patients and histopathological features (ENS, ICC)

Diagnosis	Tissue	Number	Age (years)	Histopathology ENS/ICC
Control group	Colon	12	Neonatal-81	No abnormality
Hirschsprung's disease	Colon	10	Neonatal-19	Aganglionosis deficiency of ICC ²⁷
Idiopathic megacolon	Colon	8	2-58	Hypoganglionosis deficiency of ICC ²⁸
Slow-transit constipation	Colon	13	21-62	Hypoganglionosis deficiency of ICC ^{28,29}

ENS, enteric nervous system; ICC, interstitial cells of Cajal.

slides coated with 0.1% poly-L-lysine and stored at -20°C until use.

Routine histology

Haematoxylin/eosin staining was used to evaluate the quality of the sections before immunostaining and the general histological appearance, in particular to rule out inflammatory infiltrations or vacuolar degeneration of the intestinal musculature. In addition, the distribution and amount of connective tissue was assessed by Masson's trichrome (MT) staining to exclude fibrotic changes.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was carried out at room temperature using the avidin-biotin-complex (ABC) system (Vectastain ABC Elite) according to the instructions of the supplier (Vector, Burlingame, CA, USA). Briefly, sections were incubated with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity, rinsed three times in 10 mmol L^{-1} Tris in 0.15 mol L^{-1} sodium chloride, pH 7.4 (Tris-buffered saline, TBS), containing 0.1% (v/v) Triton X-100 (TBS-TX), incubated for 20 min in 10% normal horse serum (NHS) (Hormonologie Laboratoire, Marloie, Belgium) in TBS-TX to reduce background staining, incubated with the primary antibody (Table 2) diluted in TBS containing 1% NHS for 24 h, rinsed in TBS for 10 min, incubated with biotinylated donkey anti-mouse or donkey anti-goat IgG (1 : 200, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) for 30 min, rinsed in TBS and incubated with ABC conjugated with horseradish peroxidase for 1 h. The peroxidase activity was revealed for 5 min with a solution containing 0.2 mg mL^{-1} 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma,

Hamburg, Germany) and 0.03% v/v H_2O_2 in 0.05 mol L^{-1} TBS. For immunofluorescence stainings, slides were incubated in the dark for 1 h at room temperature in TBS containing secondary antibodies coupled to FITC (1 : 200, Jackson Immuno Research). Nuclear counterstaining was carried out with $5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ TOTO-3 (T-3604; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in 0.05 mol L^{-1} Tris-HCl (pH 7.4), containing 0.5 mg mL^{-1} ribonuclease A (type 1-AS from bovine pancreas) for 2 h.

Optimal working dilutions had been previously determined empirically by serial dilutions for each antibody used. Omission of one of the primary or secondary antibodies resulted in the absence of the corresponding labelling. Previous control immunohistochemical experiments using various normal human tissues have shown complete abolishment of anti-HDAC8 labelling, when anti-HDAC8 antibody had been preincubated with a molar excess of the corresponding peptide prior to the use of antibody in the immunoperoxidase assay.²⁵

Prior to the immunohistochemical study with antibodies listed in Table 2, all specimens have been subjected to an histopathological examination of the ENS, ICC and intramural lymphocyte distribution, using primary antibodies directed against Protein Gene Product (PGP) 9.5 (1 : 2000, rabbit polyclonal; Ultraclear, Isle of Wight, UK), human Kit (1 : 1000, goat polyclonal, SC39; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and CD3 (1 : 50, mouse monoclonal; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to visualize the enteric nerve plexus, ICC and T-lymphocytes, respectively, according to the protocol described above.

Transmission electron microscopy

Specimens were cut into small blocks (ca. 5 mm border length) containing the muscularis propria and fixed by

Table 2 Antibodies used for labelling smooth muscle cells

Antibody	Species	Source	Dilution	Binding site
Anti-smooth muscle α -actin, Cy3 conjugated (α -SMA)	Mouse monoclonal	Sigma C-6198	1 : 1000	N-terminal synthetic decapeptide of smooth muscle α -actin
Anti-smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC)	Mouse monoclonal	Sigma M-7786	1 : 1000	Myosin heavy chain polypeptides of 204 and 200 kDa
Anti-smoothelin (R4A) (SM)	Mouse monoclonal	van der Loop <i>et al.</i> (1996)	1 : 100	Polypeptide of c. 60 kDa (cytoskeleton-associated protein)
Anti-histone deacetylase 8 (HDAC8)	Goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology (sc-11544, N20)	1 : 1000	Peptide mapping at the amino terminus of human HDAC8

immersion in 0.1 mol L⁻¹ cacodylate buffer containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde at pH 7.4 for 24 h. After postfixation in 1% OsO₄, 'en bloc' staining with 2% uranylacetate and dehydration in graded alcohols the specimens were embedded in Araldite. Semithin sections (0.5 μm) were cut and stained with methylene blue and azure II. Ultrathin sections (70–90 nm) were cut from the regions of interest, stained with lead citrate and uranyl acetate and examined in a transmission electron microscope (EM 109, Zeiss, Jena, Germany).

RESULTS

Controls

General histology, ENS and ICC Haematoxylin/eosin and MT staining confirmed the normal histomorphology of control specimens. No signs of degeneration, fibrosis or lymphocytic infiltration were observed and

enteric nerves and ICC were normally distributed, as expected in normal tissues.

Smooth muscle markers Smooth muscle α-actin, SMMHC, SM and HDAC8 immunoreactivity decorated all smooth muscle structures within the colonic wall, namely the longitudinal and circular layer of the muscularis propria, the muscularis mucosae, subepithelial myofibroblasts and the tunica media of blood vessels (Fig. 1A, B, data shown for SM and HDAC8). The cytoplasm of smooth muscle cells consistently appeared uniformly stained sparing out the nuclei (Fig. 1C, D, data shown for HDAC8).

Patients with colorectal motility disorders

General histology, ENS and ICC Neither fibrotic, inflammatory nor degenerative alterations of smooth muscle layers were detected on haematoxylin/eosin and MT staining (Table 3). The distribution of CD3-

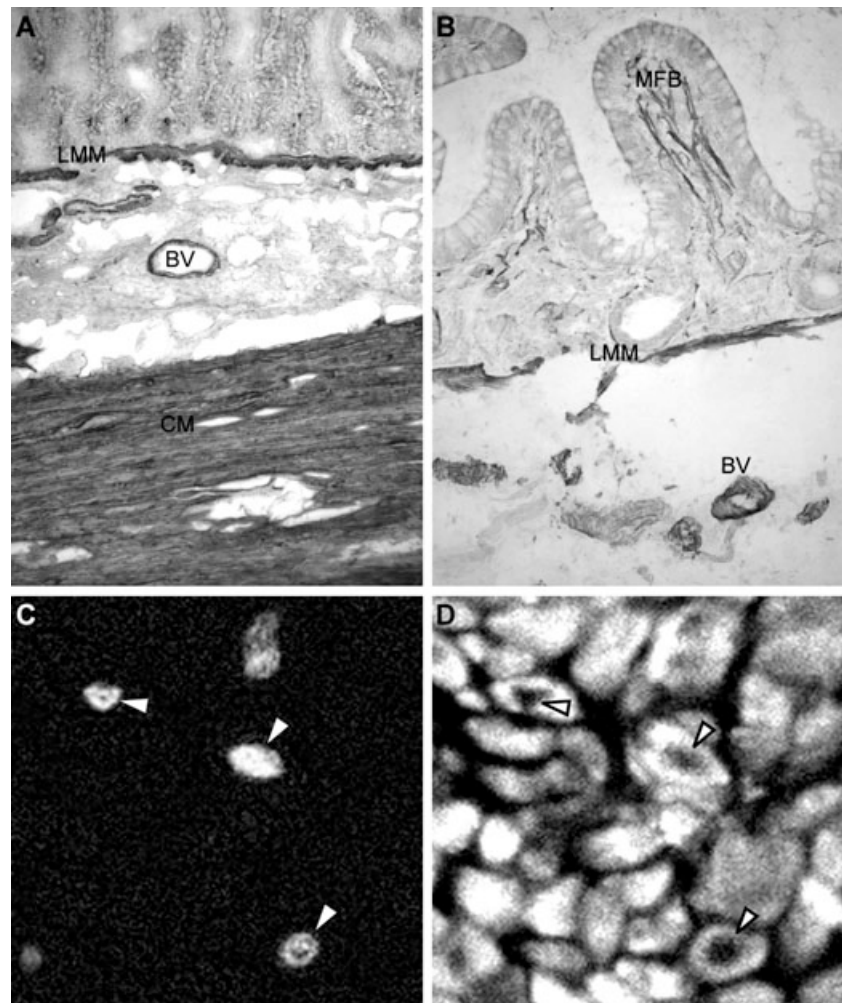


Figure 1 Immunoreactivity of smooth muscle markers in control specimens (colon). (A) Homogeneous smoothelin (SM) immunoreactivity of the lamina muscularis propria (CM, circular muscle layer), submucosal blood vessels (BV) and the lamina muscularis mucosae (LMM). Non-immunoreactive areas within the circular muscle layer corresponded to connective tissue septa. (B) Histone deacetylase 8 (HDAC8) immunoreactivity showing labelling of submucosal BV, LMM and subepithelial myofibroblasts (MFB). (C, D) Double immunofluorescence with FITC-labelled HDAC8 (C) and TOTO-3 nuclear counterstain (D). HDAC8-immunoreactivity was restricted to the cytoplasmic compartment of smooth muscle cells sparing out the nuclei (arrowheads). Original magnification: A, ×10; B, ×20; C and D, ×120.

Table 3 Overview of routine histology and immunostaining patterns of smooth muscle markers in patients with colorectal motility disorders

Diagnosis	Case	Smooth muscle HE/TC	Smooth muscle markers				
			α -SMA-ir	Smoothelin-ir	HDAC8-ir	SMMHC-ir	
Hirschsprung's disease	1	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	2	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	3	Normal	Normal	Normal	Lack (LM)*	Normal	
	4	Normal	Normal	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)
	5	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM)*
	6	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*
	7	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*
	8	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*
	9	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*
	10	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*
Idiopathic megacolon	1	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	2	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	3	Normal	Normal	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*
	4	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (LM)*	Lack (LM)*	Lack (CM + LM)*
	5	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (LM)*	Lack (LM)*	Lack (CM + LM)
	6	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*
	7	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)
	8	Normal	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*
Slow-transit constipation	1	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	2	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	3	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	4	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	
	5	Normal	Normal	Normal	Normal	Lack (LM)*	Normal
	6	Normal	Normal	Lack (CM* + LM)	Normal	Normal	Normal
	7	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Normal	Normal	Lack (CM + LM)*
	8	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)
	9	Normal	Normal	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)
	10	Normal	Normal	Lack (CM)	Lack (CM)	Lack (CM)	Lack (CM)
	11	Normal	Normal	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*
	12	Normal	Lack (LM)*	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*	Lack (CM + LM)*
	13	Normal	Lack (LM)*	Lack (CM + LM)	Lack (CM + LM)	Lack (LM)*	Lack (CM + LM)*

*, focal lack; TC, Masson's trichrome; HE, haematoxylin/eosin; CM, circular muscle layer; LM, longitudinal muscle layer; ir, immunoreactivity.

immunoreactive lymphocytes was confined to the lamina propria mucosae and lymphoid follicles and was similar to that of controls. In particular, no lymphocytic infiltration of smooth muscle layers nor of the enteric nerve plexus was observed. In specimens with Hirschsprung's disease, aganglionosis was confirmed in the distal colon, while a relative loss of myenteric nerve cells (oligoneuronal hypoganglionosis) was observed in idiopathic megacolon and to a lesser extent in slow-transit constipation (Table 1). In all groups a deficiency of ICC (Table 1) was noticed (for details see previous studies on enteric nerves and ICC²⁷⁻²⁹).

Smooth muscle markers Whereas all diseased specimens showed normal α -SMA immunoreactivity except

for one case of idiopathic megacolon and two cases of slow-transit constipation, the other smooth muscle markers frequently resulted in altered immunostaining patterns. The percentage of abnormally stained specimens after incubation against smoothelin, HDAC8 or SMMHC was 80%, 75% and 70% in Hirschsprung's disease, idiopathic megacolon and slow-transit constipation respectively (Table 3).

In the vast majority of cases lack of immunostaining was observed in both muscle layers, while defects limited to either the circular or the longitudinal muscle layer were less frequently found (Table 3, Figs 2-4). Roughly half of the affected specimens showed a complete lack of immunoreactivity of the corresponding muscle layer. The remaining specimens exhibited a focal or patchy loss of immunostaining

characterized by scattered 'islets' of remaining immunoreactive smooth muscle cells (Figs 2 and 4).

Noteworthy, in all specimens, regardless of the type of the underlying colorectal motility disorder and the pattern of altered immunostaining, intestinal blood vessels and the lamina muscularis mucosae were consistently normally labelled, thereby ruling out staining artefacts caused by improper tissue handling or poor fixation.

Alterations with a variable frequency were detected by the different smooth muscle markers applied. In all but three specimens, α -SMA immunoreactivity was normal. In contrast, the other markers, SM, SMMHC and HDAC8, identified alterations in a much larger

number of cases (23 of 31, 75%), with a similar sensitivity (Table 3).

The patterns of abnormal immunoreactivity were not always concordant between markers in a given patient: e.g. a specimen of Hirschsprung's disease stained normal for α -SMA, but showed a complete lack of immunoreactivity for SM, a focal absence for HDAC8 in both muscle layers and a focal lack for SMMHC confined to the circular muscle layer (Fig. 2). Occasionally, different patterns of abnormal immunoreactivity were also observed in different colonic segments obtained from the same patient, e.g. aganglionic vs ganglionic segment in a case of Hirschsprung's disease (compare Figs 2 and 3).

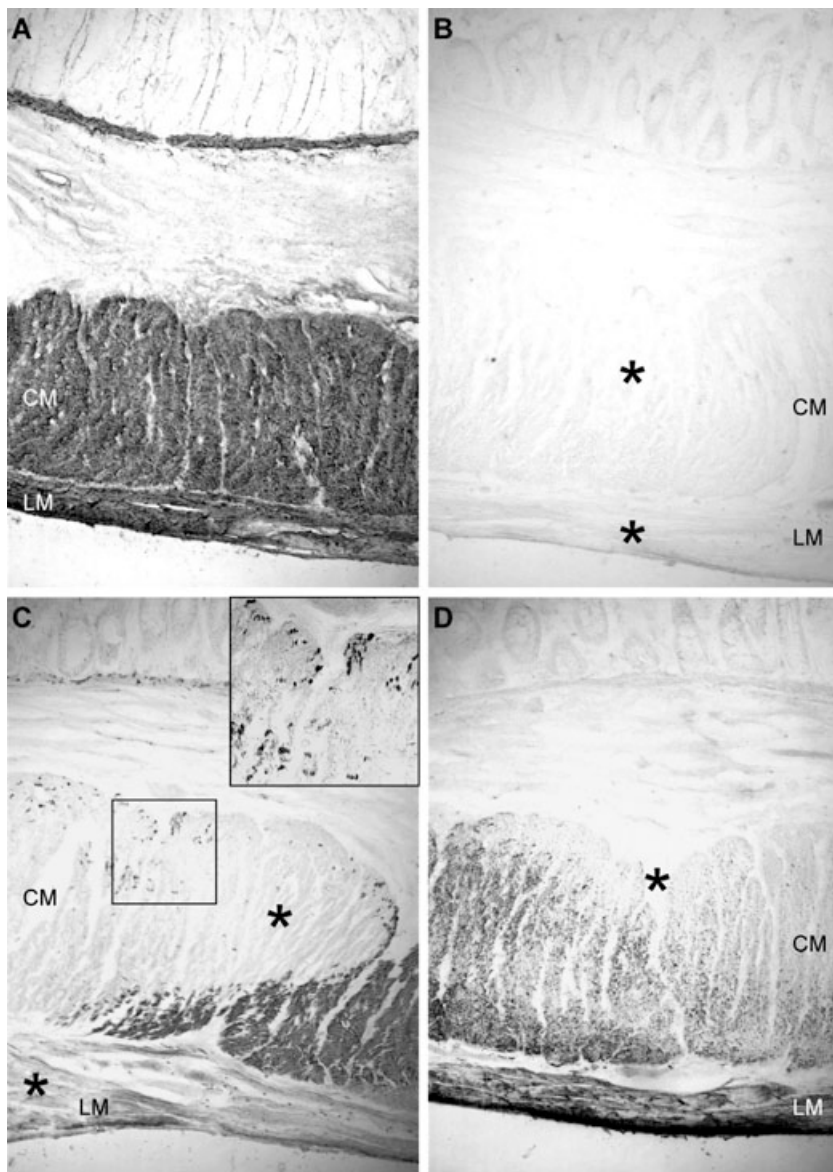


Figure 2 Immunoreactivity of smooth muscle α -actin (α -SMA) (A), smoothelin (SM) (B), histone deacetylase 8 (HDAC8) (C), smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) (D) in the aganglionic segment of Hirschsprung's disease. While α -SMA-immunoreactivity showed no staining abnormalities, SM immunoreactivity was completely absent, HDAC8 immunoreactivity was focally lacking in both muscle layers and SMMHC immunoreactivity exhibited focal defects confined to the circular muscle layer (asterisks). Note the patchy pattern of remaining immunoreactivity highlighted in the insert of C. Original magnification: $\times 10$.

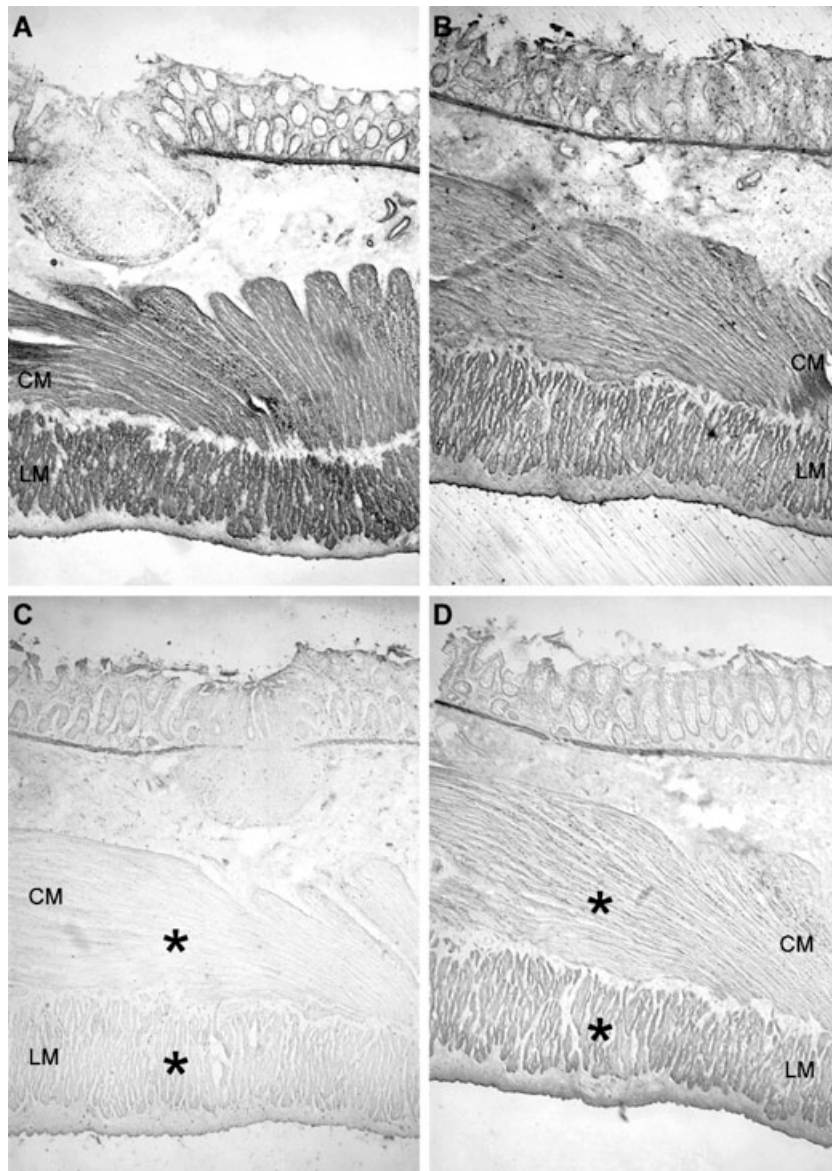


Figure 3 Immunoreactivity of smooth muscle α -actin (α -SMA) (A), smoothelin (SM) (B), histone deacetylase 8 (HDAC8) (C), smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) (D) in the ganglionic segment of Hirschsprung's disease. While α -SMA and SM immunoreactivity showed no abnormality, HDAC8 and SMMHC immunostaining were completely absent (asterisks) in both the circular (CM) and longitudinal (LM) muscle layer. The persistence of immunoreactivity for HDAC8 and SMMHC in the lamina muscularis mucosae was noted. Original magnification: $\times 5$.

Transmission electron microscopy

Controls Smooth muscle cells from control specimens were closely packed into bundles separated by small interstitial gaps. Myofilaments were uniformly and densely distributed throughout the cytoplasm and were regularly anchored by well discernible dense bodies (Fig. 5).

Patients with colorectal motility disorders In all types of colorectal motility disorders investigated (Hirschsprung's disease, idiopathic megacolon and slow-transit constipation), alterations of smooth muscle cells were detected at ultrastructural level. In Hirschsprung's disease, the interstitial spaces were

considerably widened and filled with increased amounts of connective tissue. Myocytes displayed multiple protrusions of their cellular borders and frequently showed a lack of myofilaments, in particular in perinuclear areas (Fig. 6). Smooth muscle cells of specimens from idiopathic megacolon also showed irregular cell borders, however, the interstitial spaces appeared less widened than in Hirschsprung's disease. Clusters of myocytes were characterized by a less electron-dense cytoplasm due to a considerable decrease of myofilaments (Fig. 7). Specimens obtained from slow-transit constipation displayed a highly heterogeneous pattern of electron density of smooth muscle cells readily discernible at overview magnification. Myocytes with a less densely packed

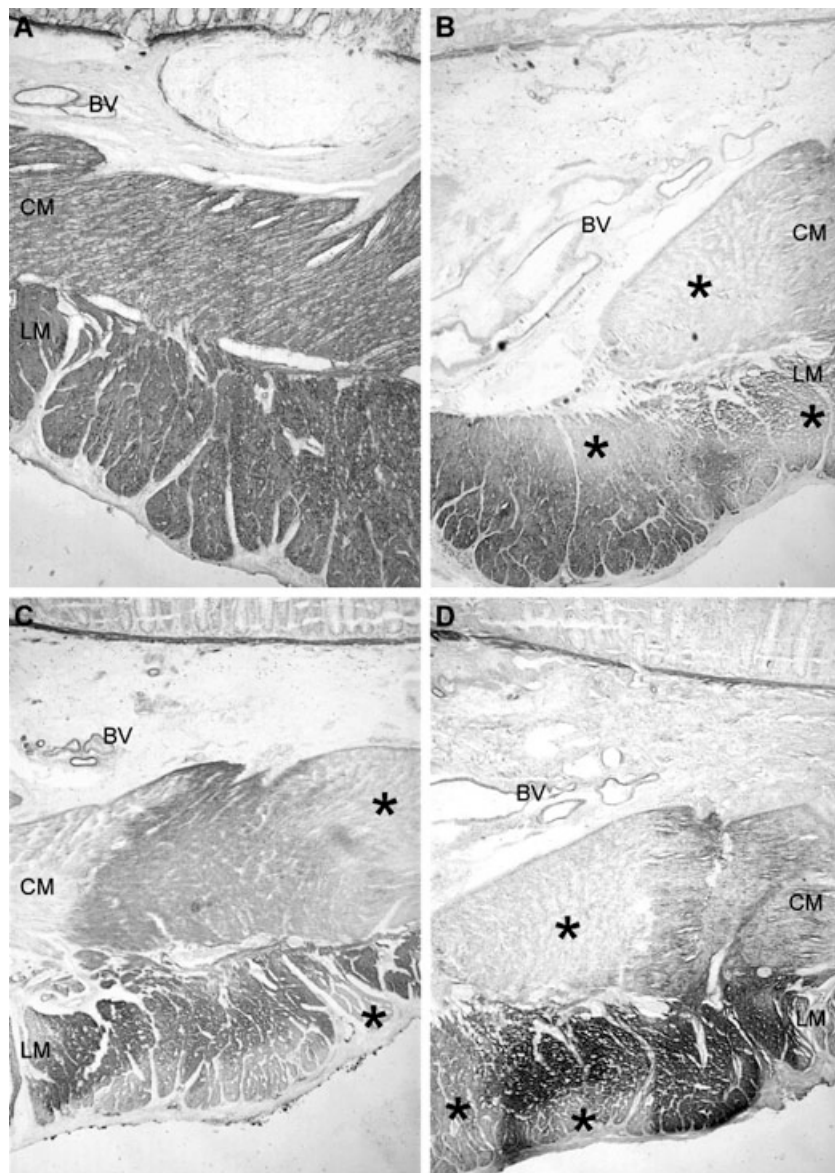


Figure 4 Immunoreactivity of smooth muscle α -actin (α -SMA) (A), smoothelin (SM) (B), histone deacetylase 8 (HDAC8) (C), smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) (D) in idiopathic megacolon. Whereas α -SMA immunoreactivity showed no staining abnormalities, immunoreactivity for SM, HDAC8 and SMMHC exhibited focal lacks (asterisks) within both the circular (CM) and longitudinal (LM) muscle layer. Note that the lamina muscularis mucosae and submucosal blood vessels (BV) remained labelled. Original magnification: $\times 5$.

myofilamentous apparatus were diffusely scattered throughout smooth muscle bundles or grouped into clusters. The reduction of myofilaments was either confined to bulbous protrusions of the cellular border or affected the entire cytoplasm (Fig. 8). The data obtained by TEM reflect representative descriptive findings for each of the groups examined, as TEM is primarily a tool optimized for a subtle qualitative – rather than a gross quantitative – assessment.

DISCUSSION

Most defects of enteric smooth muscle in GI motility disorders reported so far consisted of myocytic vacuo-

lation and fibrosis identified by conventional histological staining techniques. All specimens investigated in the present study exhibited an unremarkable morphology without any sign of smooth muscle degeneration or fibrous replacement. In contrast, striking abnormalities of the expression profile of smooth muscle markers were revealed in a number of patients with severe colorectal motility disorders. These alterations most likely reflect deficiencies of the smooth muscle cell contractile apparatus itself, clearly distinct from major degenerative processes previously described in visceral myopathies^{4–10} or inflammatory injuries.^{11–13}

Most affected cases displayed abnormal immunostaining patterns for SMMHC, SM and/or HDAC8, but

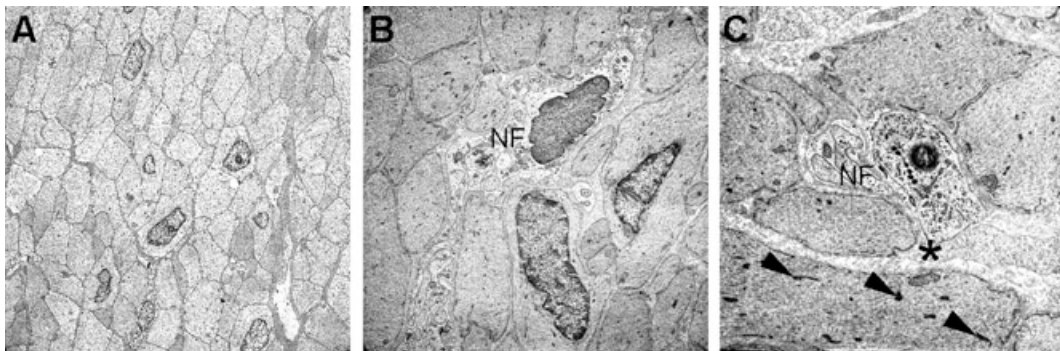


Figure 5 Smooth muscle ultrastructure in control specimens: (A) overview magnification showed tightly packed bundles of normally configured smooth muscle cells. (B, C) The cellular borders were unruffled and smoothly shaped. Cytoplasmic myofilaments are homogeneously distributed and anchored to the cytoskeleton by clearly discernible dense bodies (arrowheads). Smooth muscle cells were separated from each other by a basal lamina and narrow connective tissue gaps (asterisk). NF, nerve fibre strand with glial cell envelope. Original magnification: A, $\times 1100$; B, $\times 3000$; C, $\times 7000$.

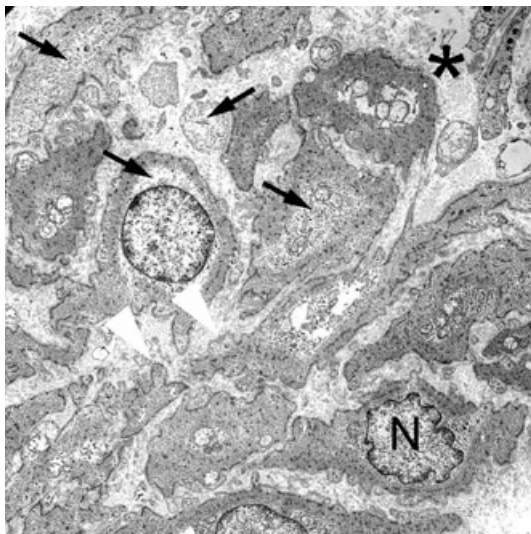


Figure 6 Smooth muscle ultrastructure in Hirschsprung's disease. The cellular borders of smooth muscle cells displayed multiple bulbous protrusions (white arrowheads), in some instances nuclei were also affected (N). Parts of the cytoplasm, including the perinuclear regions, were almost devoid of myofilaments (arrows). The interstitial spaces were considerably widened and filled with abundant connective tissue (asterisk). Original magnification: $\times 3000$.

usually not for α -SMA. SMMHC is a component of the major contractile hexamer protein myosin and contains sites for ATP hydrolysis and actin binding.³⁰ Although SMMHC is a widely recognized smooth muscle phenotype marker, only few studies have evaluated its distribution in GI motility disorders.^{9,14} Expression of SMMHC is typical of differentiated contractile smooth muscle cells and is lost in proliferating dedifferentiated smooth muscle cells, unresponsive to contractile agonists.³¹ Therefore, the observed loss of SMMHC

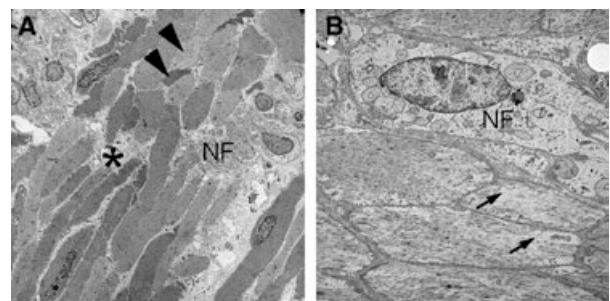


Figure 7 Smooth muscle ultrastructure in idiopathic megacolon. (A) Overview magnification showed bundles of smooth muscle cells with irregular cellular borders and a myofilament apparatus of heterogeneous electron density ranging from electron-lucent to highly electron-dense cytoplasmic content (arrowheads). (B) Higher magnification revealed areas with considerable reduction of myofilaments scattered throughout the cytoplasm (arrows). NF, nerve fibre strand with glial cell envelope. Original magnification: A, $\times 1100$; B, $\times 3000$.

immunoreactivity strongly suggests a phenotypic alteration of smooth muscle cells associated with an impairment of their contractile capacity.

Smoothelin is a novel smooth muscle marker exclusively expressed in differentiated contractile smooth muscle cells and is a cytoskeleton-associated protein involved in smooth muscle cell contraction, presumably by its interaction with actin.³² SM concentration decreases rapidly during passages of cultured smooth muscle cells and its expression is lower in poorly contractile smooth muscle cells (e.g. veins, embryonic vessels).^{17,19} SM identifies terminally differentiated contractile smooth muscle cells reliably in a number of species and tissues outside the GI tract.^{17,19,20} Loss of SM exerts a negative impact on contractile properties of smooth muscle cells and may

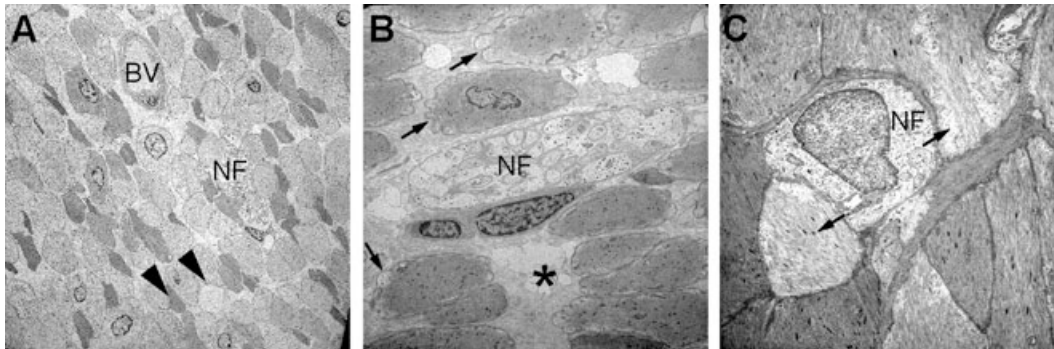


Figure 8 Smooth muscle ultrastructure in slow-transit constipation. (A) Overview magnification showed bundles of smooth muscle cells exhibiting an highly heterogeneous electron density (arrowheads). (B) The cellular borders of smooth muscle cells were characterized by multiple bulbous protrusions containing less myofilaments (arrows). The interstitial gaps between adjacent smooth muscle cells were focally widened. (C) Higher magnification illustrating smooth muscle cells containing abnormal loosely packed myofilaments (arrows). NF, nerve fibre strand with glial cell envelope; BV, blood vessel. Original magnification: A, $\times 1100$; B, $\times 3000$; C, $\times 7000$.

therefore also account for disturbances of GI motility. Recently, we showed that disruption of SM isoform A expression generated by gene targeting in mice led to irregular slow wave patterns, impaired contraction of intestinal smooth muscle and hampered intestinal transport.³³ Because expression of both SMMHC and SM ceases while expression of α -SMA is maintained, it seems likely that smooth muscle cells switch from a contractile to a synthetic phenotype, in line with a decrease of contractility and a disturbed transit.

The recent demonstration that, HDAC8 is specifically associated with the smooth muscle phenotype, has shed new light on its involvement in the biology of smooth muscle cells, including in the GI tract.²⁵ Epitope-tagged HDAC8 overexpressed in murine fibroblasts forms cytoplasmic stress fibre-like structures that co-localize with α -SMA. HDAC8 has been found to co-purify and associate with α -SMA both *in vitro* and *in vivo*.²⁶ Furthermore, HDAC8 silencing by RNA interference strongly inhibits the capacity of human smooth muscle cells to contract collagen lattices, suggesting that HDAC8 plays a role in the regulation of smooth muscle cytoskeleton dynamics, possibly through a predominantly cytoplasmic deacetylase activity.²⁶

The present study confirms that HDAC8 immunoreactivity is confined to the cytoplasm of visceral and vascular smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts. HDAC8 immunoreactivity proved convenient to visualize smooth muscle cells in pathological sections of the human GI tract. Moreover, HDAC8 immunoreactivity readily detects smooth muscle alterations in various GI motility disorders, even when the expression of other smooth muscle

markers appears unremarkable. The mechanisms accountable for the altered HDAC8 expression pattern remain to be elucidated.

Due to its abundance in vascular and intestinal musculature α -SMA is the most widely used smooth muscle marker. However, this actin isoform did not compare favourably with the other smooth muscle immunomarkers to identify alterations of enteric smooth muscle. The distribution of α -SMA immunoreactivity appeared unsuspecting in most cases, while other markers exhibited striking abnormalities. Among the few cases in which α -SMA immunoreactivity appeared abnormal, the lack displayed a focal pattern and involved either the entire muscularis propria or was confined to the longitudinal muscle layer.

In a large series of CIPO, Knowles *et al.*¹⁵ reported a lack of α -SMA immunostaining in the jejunal circular muscle layer in 24% of cases, suggesting that α -SMA could serve as a biomarker for CIPO. Gamba *et al.*³⁴ questioned the predictive value of α -SMA, as it was occasionally also absent in paraffin-embedded archival material of normal jejunum. Cryosections, as all the material used in the present study, might be more suitable to maximize the preservation of epitopes. While the debate on the true distribution of α -SMA immunostaining in the muscle layer of small intestine remains to be settled, we emphasize that the distribution of α -SMA immunostaining was consistently homogenous in all specimens of normal human colon investigated in this study.

As a number of defects identified here were either focal or limited to one of the muscle layers, classical techniques to study protein or gene expression in

tissues, e.g. Western blotting and polymerase chain reaction, would not be able to identify them. Microdissection techniques could be engaged, but the minute amounts of material harvested, the scarcity and the overall suboptimal quality of material available in such infrequent human diseases make this approach, although tempting in theory, fairly impractical.

Taken together, the data reveal that a considerably large subgroup of patients with severe colorectal motility disorders is characterized by either focal or extensive alterations in the immunostaining pattern of both classical and recently identified smooth muscle markers. It is not clear yet whether these defects correspond to a distinct pathophysiological entity or represent steps towards a myocytic degeneration and fibrous replacement of the smooth musculature, as described in visceral myopathies.

Additional TEM examination confirmed alterations of the smooth muscle cell contractile apparatus in chronic stages of colorectal motility disorders at ultrastructural level. The findings were distinct from severe degenerative lesions (e.g. fibrotic transdifferentiation or replacement of smooth muscle cells, cytoplasmic inclusion bodies, vacuolar myocytic degeneration), and consisted of a remarkable decrease of myofilaments either in perinuclear or subplasmalemmal areas or throughout the entire cytoplasm. Noticeably, the reduction of myofilaments did not uniformly affect all smooth muscle cells, but appeared instead confined to clusters of myocytes.

Although it may be tempting to correlate directly the ultrastructural findings with the abnormal staining pattern of smooth muscle markers (in particular the focal and patchy loss of immunoreactivity), it should be kept in mind that TEM is not able to discriminate different components of the contractile apparatus as achieved by the immunohistochemical assessment of selective smooth muscle markers. Yet, our TEM observations indicate that alterations are not only confined to the reduced expression of smooth muscle markers but also involved clearly discernible changes of the ultrastructural morphology of the enteric musculature, in particular of its contractile apparatus.

Whether the loss of expression of smooth muscle markers and the decrease of myofilaments are the cause or the consequence of disturbed GI tract motility remains to be determined. Chronic functional obstruction, e.g. in idiopathic megacolon and Hirschsprung's disease, may *per se* affect the smooth muscle phenotype and the expression of contractile proteins. Reduction of α -SMA expression has been reported in chronically dilated segments in Hirschsprung's dis-

ease.³⁵ Hypertrophy of intestinal segments induced by partial lumen occlusion in healthy laboratory animals led to a reduced SMMHC mRNA expression and a lowered shortening velocity of the hypertrophic tissue.³⁶ Experimental partial bladder obstruction also induces regional alterations of the expression of myosin isoforms along with changes in contractility.³⁷

Although alterations of the intestinal musculature secondary to chronic bowel wall distension may be evoked in some disorders, such tentative explanation is not applicable to all colorectal motility disorders assessed in the present study: specimens from patients with slow-transit constipation also exhibited an abnormal immunostaining pattern, although they were not clinically characterized by colonic dilatation nor functional obstruction. To address this issue, further studies should include patients operated on for intestinal mechanical obstruction (e.g. ileus due to peritoneal adhesions) to assess expression of contractile proteins and ultrastructural features of the enteric musculature in the dilated bowel segment proximal to the obstruction site.

In conclusion, we have demonstrated that severe colorectal motility disorders are associated with a defective expression of proteins directly associated or interacting with the smooth muscle contractile apparatus. The novel smooth muscle markers, SM and HDAC8, assessed here for the first time in GI motility disorders, proved suitable to unravel functionally relevant alterations of the smooth muscle cell phenotype which were unnoticed by other methods. Thus, a comprehensive appraisal of the enteric musculature, in addition to the assessment of the ENS and ICC, may contribute to further characterize the spectrum of histopathological correlates underlying GI motility disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the staff members at the Department of Surgery (Director: Prof. Dr H.-P. Bruch), University of Luebeck, Luebeck, Germany, Departments of Gastroenterology (Prof. Dr G.E.E. Boeckxstaens), Pediatric Gastroenterology and Surgery (Prof. Dr M.A. Benninga), Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands and Department of Pediatric Surgery (Director: Prof. Dr M.-H. De Laet), Hôpital Universitaire des Enfants Reine Fabiola, Brussels, Belgium, for sharing surgical material from their patients and to Perrine Hague, Huy Nguyen-Tran (Brussels, Belgium) and Kathy Budler, Klaus Nohroudi (Luebeck, Germany) for skilful technical assistance.

GRANT SUPPORT

This study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG We 2366/3-1) and the Research Foundation of the University of Luebeck (J20-2003) to TW, the Centre Anti-Cancéreux de l'Université de Liège and the Léon Frédéricq Foundation to DW, the Fondation Médicale Reine Elisabeth and the Fondation Universitaire David et Alice Van Buuren to JMV, the National Fund for Scientific Research (Belgium) and TELEVIE to DW and JMV. DW and JMV are Research Associate and Senior Research Associate, respectively, of the National Fund for Scientific Research (Belgium).

REFERENCES

- Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16** (Suppl. 1): 55–9.
- De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G, Cremon C, Stanghellini V, Corinaldesi R. New insights into human enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil* 2004; **16** (Suppl. 1): 143–7.
- Rumessen JJ, Vanderwinden JM. Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond. *Int Rev Cytol* 2003; **229**: 115–208.
- Schuffler MD, Lowe MC, Bill AH. Studies of idiopathic intestinal pseudoobstruction. I. Hereditary hollow visceral myopathy: clinical and pathological studies. *Gastroenterology* 1977; **73**: 327–38.
- Mitros FA, Schuffler MD, Teja K, Anuras S. Pathologic features of familial visceral myopathy. *Hum Pathol* 1982; **13**: 825–33.
- Alstead EM, Murphy MN, Flanagan AM, Bishop AE, Hodgson HJ. Familial autonomic visceral myopathy with degeneration of muscularis mucosae. *J Clin Pathol* 1988; **41**: 424–9.
- Moore SW, Schneider JW, Kaschula RO. Unusual variations of gastrointestinal smooth muscle abnormalities associated with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Pediatr Surg Int* 2002; **18**: 13–20.
- Fitzgibbons PL, Chandrasoma PT. Familial visceral myopathy. Evidence of diffuse involvement of intestinal smooth muscle. *Am J Surg Pathol* 1987; **11**: 846–54.
- Gattuso JM, Kamm MA, Talbot JC. Pathology of idiopathic megarectum and megacolon. *Gut* 1997; **41**: 252–7.
- Cheng W, Lui VC, Chen QM, Tam PK. Enteric nervous system, interstitial cells of Cajal, and smooth muscle vacuolization in segmental dilatation of jejunum. *J Pediatr Surg* 2001; **36**: 930–5.
- Ruuska TH, Karikoski R, Smith VV, Milla PJ. Acquired myopathic intestinal pseudo-obstruction may be due to autoimmune enteric leiomyositis. *Gastroenterology* 2002; **122**: 1133–9.
- Nezelof C, Vivien E, Bigel P *et al.* [Idiopathic myositis of the small intestine. An unusual cause of chronic intestinal pseudo-obstruction in children]. *Arch Fr Pediatr* 1985; **42**: 823–8.
- Ginies JL, Francois H, Joseph MG, Champion G, Coupris L, Limal JM. A curable cause of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction in children: idiopathic myositis of the small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; **23**: 426–9.
- Smith VV, Milla PJ. Histological phenotypes of enteric smooth muscle disease causing functional intestinal obstruction in childhood. *Histopathology* 1997; **31**: 112–22.
- Knowles CH, Silk DB, Darzi A *et al.* Deranged smooth muscle alpha-actin as a biomarker of intestinal pseudo-obstruction: a controlled multinational case series. *Gut* 2004; **53**: 1583–9.
- Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; **103**: 2787–96.
- van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1996; **134**: 401–11.
- Rensen SS, Thijssen VL, De Vries CJ, Doevendans PA, Detera-Wadleigh SD, van Eys GJ. Expression of the smoothelin gene is mediated by alternative promoters. *Cardiovasc Res* 2002; **55**: 850–63.
- Christen T, Verin V, Bochaton-Piallat M *et al.* Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery. *Circulation* 2001; **103**: 882–8.
- Maeng M, Mertz H, Nielsen S, van Eys GJ, Rasmussen K, Espersen GT. Adventitial myofibroblasts play no major role in neointima formation after angioplasty. *Scand Cardiovasc J* 2003; **37**: 34–42.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; **370**: 737–49.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S *et al.* Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; **107**: 137–48.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 2002; **417**: 455–8.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003; **11**: 437–44.
- Waltregny D, De LL, Glenisson W *et al.* Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. *Am J Pathol* 2004; **165**: 553–64.
- Waltregny D, Glénisson W, Tran SL *et al.* Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle α -actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB J* 2005; **19**: 966–8.
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Liu H, Descamps D, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ. Interstitial cells of Cajal in human colon and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1996; **111**: 901–10.
- Wedel T, Spiegler J, Soellner S *et al.* Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 2002; **123**: 1459–67.

- 29 Wedel T, Roblick UJ, Ott V *et al.* Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002; **45**: 54–62.
- 30 Babu GJ, Warshaw DM, Periasamy M. Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microsc Res Tech* 2000; **50**: 532–40.
- 31 Jarrousse C, Lods N, Michel F, Bali JP, Magous R. Cultured gastrointestinal smooth muscle cells: cell response to contractile agonists depends on their phenotypic state. *Cell Tissue Res* 2004; **316**: 221–32.
- 32 Niessen P, Clement S, Fontao L *et al.* Biochemical evidence for interaction between smoothelin and filamentous actin. *Exp Cell Res* 2004; **292**: 170–8.
- 33 Niessen P, Rensen S, van Deursen J *et al.* Smoothelin-A is essential for functional intestinal smooth muscle contractility in mice. *Gastroenterology* 2005; **129** (5): 1592–601.
- 34 Gamba E, Carr NJ, Bateman AC. Deficient alpha smooth muscle actin expression as a cause of intestinal pseudo-obstruction: fact or fiction? *J Clin Pathol* 2004; **57**: 1168–71.
- 35 Fromont-Hankard G, Lafer D, Masood S. Altered expression of alpha-smooth muscle isoactin in Hirschsprung's disease. *Arch Pathol Lab Med* 1996; **120**: 270–4.
- 36 Lofgren M, Fagher K, Wede OK, Arner A. Decreased shortening velocity and altered myosin isoforms in guinea-pig hypertrophic intestinal smooth muscle. *J Physiol* 2002; **544**: 707–14.
- 37 Mannikarottu AS, Hypolite JA, Zderic SA, Wein AJ, Chacko S, Disanto ME. Regional alterations in the expression of smooth muscle myosin isoforms in response to partial bladder outlet obstruction. *J Urol* 2005; **173**: 302–8.

**6.4. Annexe 4 : Histone deacetylase 4 is required for
TGF β -induced myofibroblastic differentiation, (*BBA
Molecular Cell Research*)**

Available online at www.sciencedirect.com

Biochimica et Biophysica Acta xx (2007) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/bbamcr

Histone deacetylase 4 is required for TGF β 1-induced myofibroblastic differentiation

Wendy Glenisson^a, Vincent Castronovo^a, David Waltregny^{a,b,*}

^a Metastasis Research Laboratory, University of Liège, Belgium

^b Department of Urology, University of Liège, Belgium

Received 23 February 2007; received in revised form 8 May 2007; accepted 30 May 2007

Abstract

Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) is a crucial cytokine triggering myofibroblastic (MF) differentiation, a process involved in tissue healing as well as in pathologic conditions such as fibrosis and cancer. Together with cell shape modifications, TGF β 1-mediated differentiation of fibroblasts into myofibroblasts is characteristically associated with the neo-expression of smooth muscle α -actin (α -SMA), a cytoskeletal protein that enhances their contractile activity. Several cellular differentiation programs have been linked to epigenetic regulation of gene expression, including gene methylation and histone acetylation. Herein, we sought to investigate the role of histone deacetylases (HDAC) in TGF β 1-induced MF differentiation. We found that TSA, a global inhibitor of class I and class II HDACs, prevented α -SMA transcript and protein expression and morphological changes mediated by TGF β 1 in cultured human skin fibroblasts. In order to identify the HDAC(s) participating in MF differentiation, the impact of specific HDAC silencing (HDAC1 through HDAC8) using RNA interference was investigated in fibroblasts exposed to TGF β 1. Among the eight HDACs tested, silencing of HDAC4, HDAC6, and HDAC8 expression impaired TGF β 1-induced α -SMA expression. HDAC4 silencing most efficiently abrogated α -SMA expression and also prevented TGF β 1-mediated morphological changes. Forced down-regulation of HDAC4 stimulated the expression of 5'-TG-3'-Interacting Factor (TGIF) and TGIF2 homeoproteins, two known endogenous repressors of the TGF β signaling pathway, but not of the inhibitory Smad7. Collectively, these data suggest that HDAC4 is an essential epigenetic regulator of MF differentiation and unveil HDAC4 as a potential target for treating MF-related disorders.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Histone deacetylase; TGF β 1; TSA; Myofibroblast; α -SMA; TGIF; Smad7

1. Introduction

Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) is the prototype of a large family of growth factors that regulate a wide range of biological processes, exerting their functions both during embryogenesis, in terms of organogenesis and morphogenesis, and in the adult organism, where they orchestrate complex phenomena such as inflammation, tissue repair and neoplastic transformation/progression [1]. TGF β 1 broad activities include, among others, context-specific inhibition or stimulation of cell proliferation, control of extracellular matrix (ECM) synthesis and degradation, control of epithelial-to-mesenchymal transi-

tion, mediation of cell and tissue responses to injury, control of carcinogenesis, and modulation of immune functions. Remarkably, TGF β 1 is sufficient to induce the generation of granulation tissue and angiogenesis *in vivo* and is the prominent growth factor able to stimulate the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, a process termed myofibroblastic (MF) differentiation that contributes to the pathobiology of chronic fibrotic disease [2–4].

The observation that mesenchymal cells are capable of transforming into myofibroblasts during tissue repair and under several pathologic conditions, including fibrocontractive diseases (e.g. Dupuytren's disease or hypertrophic scars), fibrosis (e.g. cirrhosis), and stromal reactions to tumor growth and invasion, has been extensively documented [5,6]. One of the main features of myofibroblasts is represented by an important contractile apparatus [7], and in particular by the neo-expression of the smooth muscle α -actin (α -SMA) isoform [8]. Myofibro-

* Corresponding author. Metastasis Research Laboratory, Pathology Building, B23, level -1, University Hospital of Liège, B-4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 366 4358; fax: +32 4 366 2975.

E-mail address: David.Waltregny@ulg.ac.be (D. Waltregny).

blasts are indeed morphologically and biochemically intermediate between fibroblasts and smooth muscle cells and are recognized to play a central role in closing the wound tissue, through their capacity to produce a strong contractile force [6,9–11]. In fact, in addition to being a well-accepted marker of myofibroblast differentiation, α -SMA has been shown to be sufficient to enhance fibroblast contractile activity [12,13].

TGF β 1-mediated MF differentiation is accompanied by changes in the expression of many genes, including cytoskeletal proteins (e.g. α -SMA), ECM proteins (e.g. collagens type I and III, fibronectin, and proteoglycans such as versican), and proteins inhibiting ECM degradation (e.g. PAI-1, Timp-1) [5,6]. TGF β 1 exerts its biological activities mainly through transcriptional regulation of diverse genes. Upon binding of this growth factor to its transmembrane serine/threonine kinase receptors, coregulatory proteins Sma- and Mad-related proteins Smad2 and Smad3 are phosphorylated by the receptors, form heterodimers with Smad4, and migrate into the nucleus to form multisubunit transcriptional complexes regulating target gene transcription [14–16]. TGF β 1 is able to mediate diverse responses because of the interaction of Smad complexes in the nucleus with different partner proteins that may be specific to a particular cell type and for a given set of environmental conditions [17]. Previously it has been suggested that the total cellular levels of Smad transcriptional co-activators and co-repressors factors play a critical role in controlling and fine-tuning the biological responses to TGF β [16]. These regulatory co-factors may function by recruiting histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) activity to the target promoter [17–19]. Thus, some of TGF β -driven MF differentiation-associated gene expression changes appear to be regulated epigenetically, through modifications of DNA methylation and histone acetylation levels. Recent data have also pointed at a role of HATs and HDACs in modulating the acetylation levels – and consequently the transcriptional activity – of Smad proteins [20].

In mammalian cells, HDACs constitute a family of 18 enzymes that regulate gene expression by modifying the acetylation level of nucleosomal histones and nonhistone proteins, including several transcription factors and tumor suppressors. These enzymes are usually separated into 3 classes on the basis of their similarity to various yeast histone deacetylases: (i) class I members (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8, and HDAC11), which are homologous to the yeast RPD3 protein (ii) class II HDACs (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, and HDAC10), which have similarities to yeast HDA1 and, (iii) sirtuin (SIRT) proteins, which are homologous to the yeast SIR2 protein and require nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) as a cofactor [21]. To date, 7 human SIRT homologues have been uncovered. Accumulating evidence suggests that histone deacetylase family members are involved in numerous important biological activities, ranging from hormone-induced gene regulation to cell proliferation, differentiation, apoptosis and senescence [21]. Previous reports have suggested that global suppression of HDAC activities by inhibitors targeting both class I and class II HDACs, inhibits both angiogenesis [22,23] and TGF β 1-induced fibrogenesis [24–26], two important processes occurring during wound healing.

The present study was aimed at (i) determining the influence of global HDAC inhibition on TGF β 1-mediated MF differentiation and (ii) identifying the HDAC(s) participating in this process. TSA was found to prevent α -SMA transcript and protein expression and morphological changes mediated by TGF β 1 in primary human skin fibroblasts. Among the eight first HDAC members tested, RNA interference-mediated silencing of HDAC4 most efficiently abrogated TGF β 1-induced phenotypic transformation. HDAC4 silencing was associated with an increased expression of 5'-TG-3'-Interacting Factor (TGIF) and TGIF2, two homeodomain proteins known to repress TGF β activities. Altogether, these data indicate that HDAC4 is a required epigenetic mediator of MF differentiation driven by TGF β 1.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines, reagents, and treatments

Primary human skin fibroblasts were established by outgrowth of normal skin biopsies as previously described [27]. Different batches of these cells were randomly selected for the experiments outlined below. Cells were maintained in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% decomplemented (heat-inactivated) fetal bovine serum (FBS; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL) and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere. Cells were sub-cultured by trypsinization (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA) in phosphate-buffered saline (Dulbecco's PBS (DPBS) without calcium, magnesium, and sodium bicarbonate). Cells were reseeded at a ratio of 1:3 and used between passages 7 and 14. Absence of mycoplasma infection was routinely checked. All tissue culture reagents were obtained from Invitrogen (Merelbeke, Belgium) unless otherwise specified.

Cells were treated with trichostatin A (TSA) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) at a final concentration of 50, 200, or 500 nM in DMSO every 24 h and/or TGF β 1 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) at a final concentration of 2.5 ng/mL in PBS every 24 h. Control conditions consisted of cells incubated with vehicles alone. Twenty-four hours after initial plating, cells were incubated with DMEM containing 1% FBS and the appropriate drug or vehicle upon start of the experiment.

2.2. Small interfering RNA (siRNA) transfection

The siRNAs used in this study were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) and Dharmacon (Lafayette, Colorado, USA) and were all made of 2 complementary nucleotide strands containing 21 bases. The sequences of the oligonucleotides are provided in Table 1; most of them have been utilized in previous studies [27–29]. Each pair of oligonucleotides was received annealed at a concentration of 100 μ M in 50 mM Tris pH 7.5–8.0, 100 mM NaCl. Cells were transfected at a starting confluence between 40% and 50%. Calcium phosphate-mediated transfection was performed in 6-well plates with a final concentration of 40 nM of each siRNA, unless otherwise specified.

After 16 h of transfection, cells were rinsed twice with PBS, incubated in 10% FBS medium with or without TGF β 1 (2.5 ng/mL in PBS). Medium was changed every 24 h and cells were collected following 48 h of treatment. Mock transfections with transfection reagent alone served as negative control. Controls also included three different RNA duplexes: a scrambled HDAC4 siRNA (scHDAC4 siRNA) whose sequence corresponded to the reverse, and subsequently modified (inversion of 4 bases), sequence of the HDAC4#2 siRNA, a siRNA directed against GL3 luciferase [30], and a negative control siRNA designed by, and purchased from, Eurogentec (OR-0030-neg05).

2.3. Antibodies

Anti-HDAC4 antibody was raised against a synthetic peptide corresponding to residues surrounding amino acid 10 of human HDAC4 (Cell Signaling #2072). Anti-smooth muscle α -actin (α -SMA, clone 1A4) antibody was from

Table 1
siRNA oligonucleotide sequences used

siRNA designation	Target mRNA	siRNA oligonucleotide sequence
HDAC1	HDAC1	5'-AAGCCGGUCAUGUCCAAAGUA-3' 5'-UACUUUGGACAUGACCGGCUU-3'
HDAC2	HDAC2	5'-GCCUCAUAGAAUCCGCAUGTT-3' 5'-CAUGCGGAUUCUAUAGAGGCTT-3'
HDAC3	HDAC3	5'-AAUCAGAACUCACGCCAGUAU-3' 5'-AUACUGGCGUGAGUUCUGAUU-3'
HDAC4#1	HDAC4	5'-GACGGGCCAGUGGUCACUGTT-3' 5'-CAGUGACCACUGGCCCGUCTT-3'
HDAC4#2	HDAC4	5'-CGACAGGCCUCUGUAUGAUU-3' 5'-UCAUACACGAGGCCUGUCGUU-3'
HDAC4#3	HDAC4	5'-GAAUGUACGACGCCAAAGAUU-3' 5'-UCUUUGGCGUCGUACAUCUUU-3'
scHDAC4#2	None	5'-AGUCUGGUCCCGUGAAAGCUU-3' 5'-GCUUUCACGGGACCAGACUUU-3'
HDAC5	HDAC5	5'-AACAGCAUGACCACCUGACAA-3' 5'-UUGUCAGGUGGUAUGCUGUU-3'
HDAC6	HDAC6	5'-CUGCAAGGGAUGGAUCUGATT-3' 5'-CUGCAAGGGAUGGAUCUGATT-3'
HDAC7	HDAC7	5'-GGACAAGAGCAAGCGAAGUTT-3' 5'-ACUUCGCUUGCUCUUGUCCTT-3'
HDAC8	HDAC8	5'-UGAGCCCCACCGAAUCCAATT-3' 5'-UUGGAUUCGGUGGGGCGUCATT-3'
GL3 Luc	GL3 Luciferase	5'-CUUACGCUGAGUAUCUUGAUU-3' 5'-UCGAAAGUACUCAGCGUAAGUU-3'
EGT	None	Eurogentec non disclosed sequence (Cat N° OR-0030-Neg05)

Dako (Glostrup, Denmark) and anti- α -tubulin (clone B512), anti- β -actin (clone AC15) monoclonal antibodies were from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Human osteosarcoma SaOS-2 cells transfected with a flag-tagged human HDAC4 expression vector (kindly provided by Dr. E. Verdin, Gladstone Institutes of Virology and Immunology, UCSF, CA, USA) using FUGENE 6™ transfection reagent were used as positive controls in the immunoblot experiments.

2.4. Western blot analysis

After rinses in PBS, *in vitro* grown subconfluent cells were scrapped in 1% SDS containing phosphatase inhibitors (1 mM Na₃VO₄) and Complete® protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Protein lysates were cleared by centrifugation at 10,000×g for 1 min in 20 μ m columns (Machery-Nagel, Postfach, Düren, Germany). The shredded lysates were retrieved and frozen at -80 °C until use in immunoblot assays. The protein concentration was measured using a bicinchoninic acid determination kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein lysates were resolved by size on 7.5%, 10% or 12% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose (Biorad, Hercules, CA, USA) or polyvinylidene difluoride (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) membranes. Equal protein loading and transferring was examined by Coomassie gel staining (data not shown) and β -actin normalization. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (20 mM Tris base (pH 7.6), 150 mM NaCl) containing 0.1% or 0.05% Tween-20 (TBS-T), and probed with the following primary antibodies: anti-HDAC4, anti- α -SMA, anti- α -tubulin and anti- β -actin. After washing in TBS-T, membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and developed using enhanced chemiluminescence detection system (ECL detection kit; Amersham Corp., Arlington Heights, IL), according to the instructions of the manufacturer. Membranes were exposed to Kodak X-Omat AR films.

2.5. Immunoperoxidase detection of smooth muscle α -actin (α -SMA)

Detection of smooth muscle α -actin (α -SMA) protein in human cells was performed with the use of an immunoperoxidase technique and the ABC

Vectastain Elite kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) according to the supplier's directions with some modifications. Primary human skin fibroblasts were seeded and grown onto poly-L-lysine-coated glass slides, washed with PBS, and then fixed with freshly prepared 3% paraformaldehyde for 10 min. Cells were permeabilized with 0.25% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in PBS for 10 min and washed with PBS again. After blocking of the endogenous peroxidase activity with 1.5% hydrogen peroxide in methanol for 30 min, the slides were heated for antigen retrieval in a water-bath at 95 °C in citrate buffer, allowed to cool down, and then incubated with 1% normal horse serum in PBS for 30 min. Mouse anti- α -SMA antibody at a dilution of 1:400 was incubated overnight at 4 °C, followed by biotinylated horse anti-mouse and the avidin–biotin–peroxidase complex. Washes were performed 3 times with PBS after each incubation step. Peroxidase activity was developed by a solution of 3–3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Vel, Leuven, Belgium) dissolved in PBS and 0.03% H₂O₂. The DAB solution was filtered and applied to the sections for 3 min. Finally, Carazzi's hematoxylin was used to counterstain the slides that were then dehydrated and mounted. Experiments in which the first antibody was omitted in the assay were used as controls. Photomicrographs of the slides were taken with a Zeiss microscope.

2.6. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA), according to the manufacturer's protocol. For cDNA synthesis, 0.5 to 2 μ g of total RNA were reverse transcribed in a 20- μ L reaction mixture containing 0.2 μ g of random hexamers (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), 2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Eurogentec, Seraing, Belgium), 1× first-strand buffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) (Invitrogen), 10 mM dithiothreitol (Invitrogen), and 100 units of SuperScript™ II RNase H reverse transcriptase (Invitrogen). The RT reaction was performed at 42 °C for 50 min before a 15-min inactivation step at 70 °C. Reactions not containing the reverse transcriptase were used as controls. Quantitative real-time PCR was performed using the ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR was performed using the TaqMan® PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems). The sequences of the primers and probes for the human HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, and α -SMA genes were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems)[31]. Taqman® primers and probes for the human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -actin, 18S RNA, cyclophilin A, 5'-TG-3'-interacting factor (TGIF, also termed TGF- β -interacting factor), 5'-TG-3'-interacting factor 2 (TGIF2), and Sma and Mad-related protein 7 (SMAD7) genes were purchased from Applied Biosystems. All sets of primers and probes were selected to work under similar cycling conditions. cDNA samples (100 ng each) were mixed with 100 nM of each primer and TaqMan® Universal PCR Master Mix containing 1× PCR buffer, 5.5 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs mix, 100 nM probe and 1 unit of AmpliTaq Gold® thermostable DNA polymerase (Applied Biosystems) in a total volume of 25 μ L. Taqman® real-time PCR was performed for each target cDNA and transcript expression levels were normalized to those of GAPDH, 18S RNA, or cyclophilin A. All samples were run as triplicates. Acquired data were analyzed using the Sequence Detector software (Applied Biosystems).

2.7. Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

In order to assess any potential cytotoxicity associated with TSA treatment or siRNA transfection of the cells, LDH activity in culture supernatants (triplicate per each condition) was determined using the fluorescent-base CytoTox-One homogenous membrane integrity assay (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.8. Statistical analysis

Expression ratios were associated with their standard errors. An asymptotically Normal test was used to test for differences in expression ratios between two different experimental conditions. Unless otherwise specified, expression

ratios were compared with those of TSA-untreated cells or mock-transfected cells. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Trichostatin A, a global class I and class II HDAC inhibitor, prevents TGF β 1-mediated MF differentiation

To first examine the potential implication of HDACs in the process of TGF β 1-induced fibroblast-to-myofibroblast differentiation, human skin fibroblasts were exposed to TGF β 1 and/or trichostatin A (TSA) for 24 and 48 h. Morphological changes were then assessed and relative amounts of α -SMA transcript and protein levels were evaluated by real time Taqman[®] RT-PCR and Western blot/immunocytochemistry, respectively. As shown in Fig. 1A, TGF β 1 treatment resulted expectedly in a markedly increased production of α -SMA by fibroblasts, as determined by Western blot analysis. In contrast, TSA down-regulated the abundance of α -SMA in cells either exposed to TGF β 1 or not, and completely suppressed the TGF β 1-induced

overexpression of this cytoskeletal protein. The efficiency of HDAC inhibition by TSA was verified by analyzing the amount of acetylated α -tubulin, which was clearly augmented in the TSA-treated cells, in agreement with previous studies [28,32].

TGF β 1 not only can trigger the expression of α -SMA, one of the major markers of MF differentiation, but also can induce morphological changes that are intermediate between those featured by fibroblasts and smooth muscle cells. With the use of immunocytochemistry to detect α -SMA in fibroblasts treated with or without TGF β 1 for 48 h, we observed that the majority of the TGF β 1-treated cells expressed α -SMA that exhibited a cytoplasmic cable-like distribution and displayed typical MF morphology with cellular hypertrophy (Fig. 1B). In contrast, only a very small proportion of the fibroblasts not exposed to exogenous TGF β 1 exhibited such MF features. Importantly, TSA treatment fully prevented the induction of TGF β 1-mediated MF changes and reverted the small MF-like sub-population present in the TGF β 1-non-treated condition to a fibroblastic phenotype. None of the TSA-treated fibroblasts displayed evident α -SMA expression. We thus concluded that

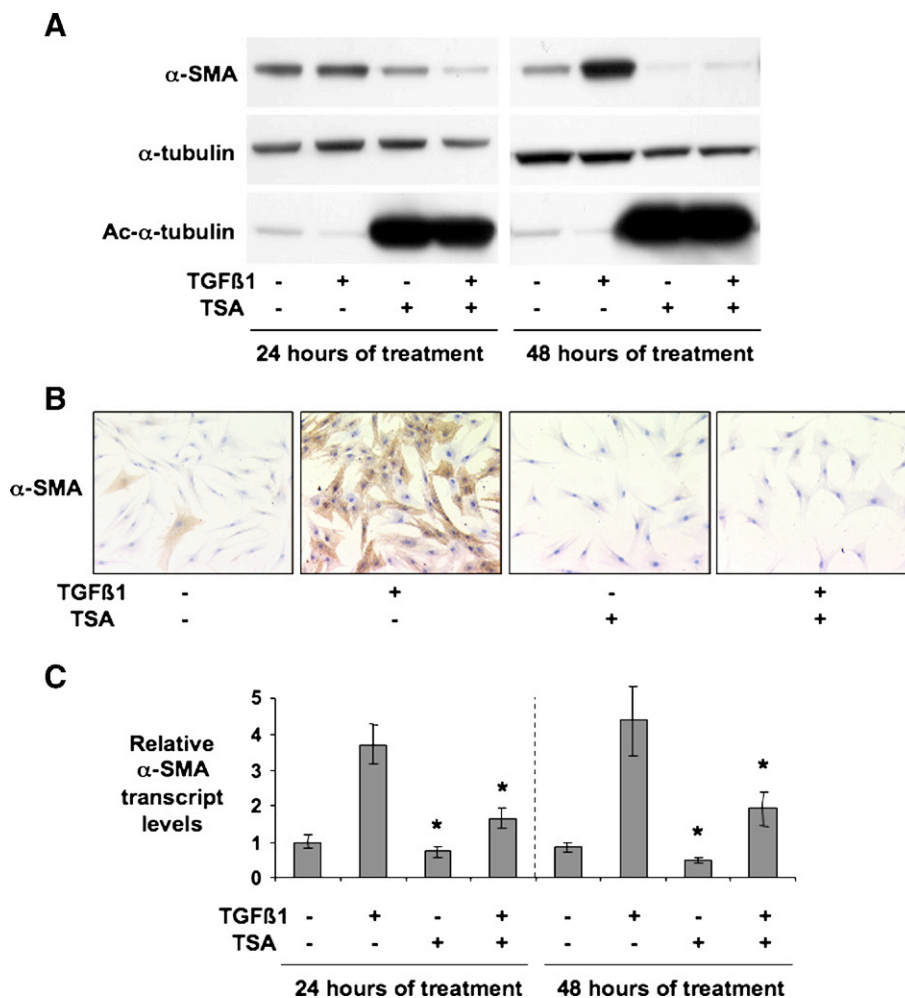


Fig. 1. Trichostatin A (TSA), a global class I and class II HDAC inhibitor, prevents TGF β 1-mediated myofibroblastic differentiation. After 24 or 48 h treatment of human primary fibroblasts with TGF β 1 (2.5 ng/mL), TSA (500 nM) or their respective vehicle (PBS and DMSO), the relative abundance of α -SMA transcript and protein was assessed using immunoblot (A), immunocytochemistry (B) and real time RT-PCR (C), as described in Materials and methods. Each experiment was repeated at least twice and consistent results were observed. Statistically significant reductions in relative α -SMA transcript levels ($p < 0.05$) between TSA-treated and TSA-untreated conditions, either in absence or in presence of TGF β 1, are indicated as an asterisk.

TSA, an inhibitor of class I and class II HDACs, was able to prevent TGF β 1-mediated MF differentiation of human skin fibroblasts *in vitro*, as assessed morphologically as well as biochemically by analyzing cellular α -SMA abundance.

Since HDACs play a key role in the regulation of gene transcription by modifying core histone acetylation levels, we next asked whether TSA was able to influence α -SMA mRNA steady-state abundance in fibroblasts treated with or without TGF β 1. As shown in Fig. 1C, while TGF- β 1 treatment induced a ± 3 –4 fold increase in α -SMA mRNA steady-state levels (normalized to GAPDH mRNA levels), TSA treatment resulted in decreased levels of the transcript at both 24 and 48 h time points (2 fold decrease after 48 h of treatment; $p < 0.05$). TGF β 1-mediated increase in α -SMA mRNA levels was significantly impaired when the cells were concomitantly exposed to TSA ($p < 0.05$). Similar results were obtained when other reference genes, including cyclophilin A, β -actin, and 18S RNA, were used for normalizing α -SMA transcripts levels in the RT-PCR experiments (data not shown). Therefore, global inhibition of class I and class II HDAC activities was shown to repress α -SMA expression possibly at the transcriptional level. This repressive activity exerted by TSA was dose-dependent (Fig. 2A) and was not due to a cytotoxic effect. Indeed, when

fibroblasts were relieved from TSA after 48 h of treatment, TGF β 1 was still able to induce α -SMA transcript expression (Fig. 2A). Furthermore, TSA treatment did not significantly increase lactate dehydrogenase (LDH) activity levels in culture supernatants (Fig. 2B).

3.2. Influence of specific HDAC silencing on TGF β 1-mediated β -SMA induction

We next sought to determine which HDAC(s) might be involved in the process of TGF β 1-mediated MF differentiation. To this end, fibroblasts were transfected with siRNAs directed against most class I and class II HDACs (HDAC1 through HDAC8) for 16 h and then treated with TGF β 1 for 48 h. The capacity of each siRNA to silence its target HDAC was checked by real time RT-PCR analysis. Each siRNA transfection was found to reduce by at least 70% the amount of the corresponding HDAC mRNA, with the exception of HDAC8 (Fig. 3A). In addition, TGF β 1 treatment of the cells did not substantially affect the mRNA level of all the HDACs tested (less than 20% variation; data not shown).

Fold inductions of α -SMA transcript expression by TGF β 1 (± 3 –4 fold) were similar in fibroblasts transfected without

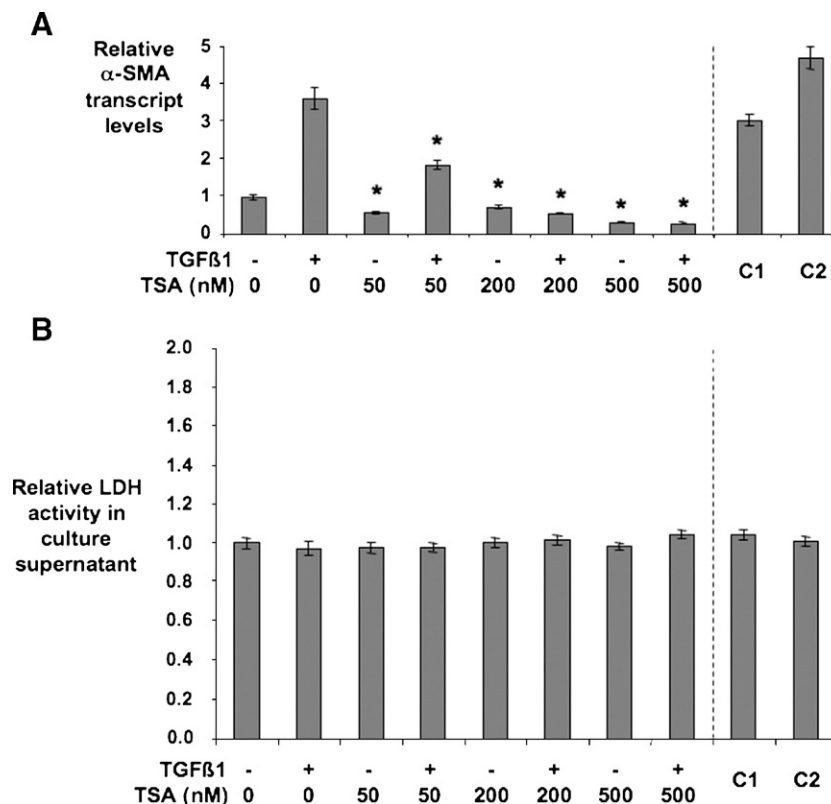


Fig. 2. TSA represses α -SMA transcript expression by human primary fibroblasts in a dose-dependent manner without triggering cellular toxicity. Human primary fibroblasts were treated with TGF β 1 (2.5 ng/mL) and/or TSA at various concentrations (0, 50, 200, and 500 nM) for 48 h. Fibroblasts were also treated either with TGF β 1 (2.5 ng/mL) and DMSO (condition C1) or with TGF β 1 (2.5 ng/mL) and TSA (500 nM) (condition C2) for 48 h, and then further for 48 h in both conditions with TGF β 1 (2.5 ng/mL) and DMSO (no TSA). (A) The relative abundance of α -SMA transcripts was assessed in the different experimental conditions using real time RT-PCR, as described in Materials and methods. (B) Lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture supernatants was determined using a fluorescent-based membrane integrity assay to evaluate potential cytotoxicity associated with TSA treatment of the cells. Each experiment was performed twice and consistent results were observed. Data were expressed as means \pm standard deviation. Statistically significant differences in α -SMA transcript levels and in LDH activity levels between TSA-treated and TSA-untreated conditions, either in absence or in presence of TGF β 1, are indicated as an asterisk ($p < 0.05$).

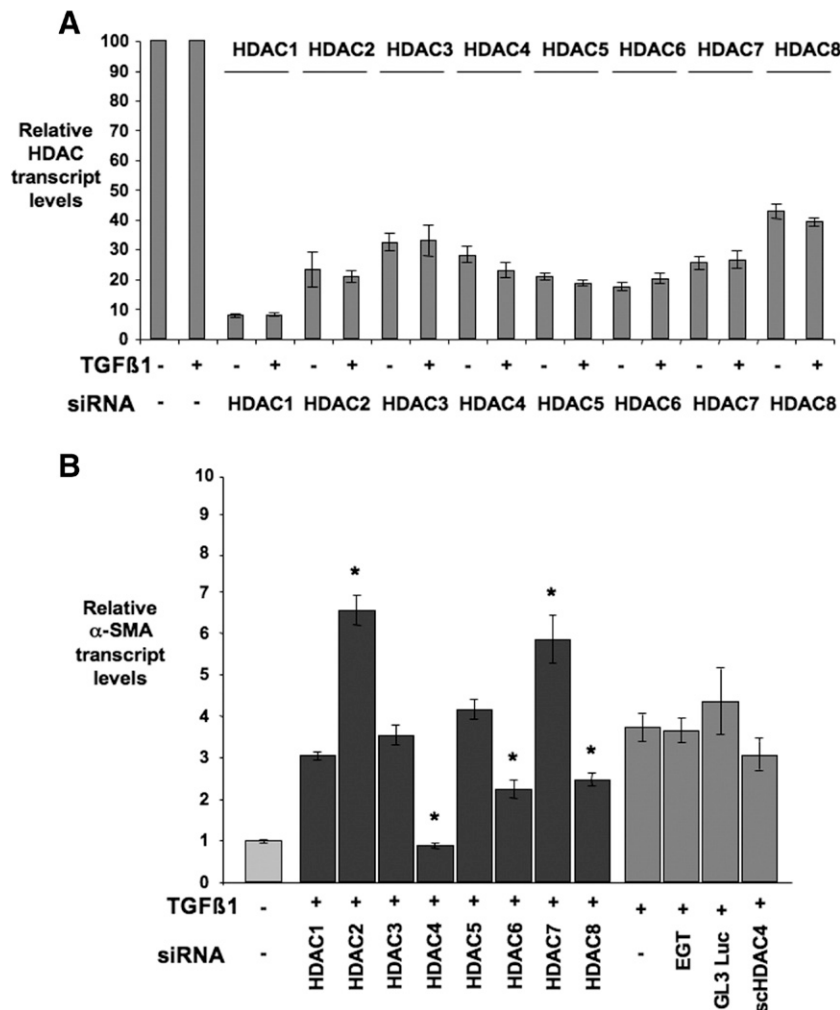


Fig. 3. Screening of the influence of specific HDAC silencing on TGFβ1-mediated myfibroblastic differentiation. Primary human fibroblasts were transfected with siRNAs directed against each of the 8 first members of the HDAC family (HDAC1 through HDAC8) and then treated with or without TGFβ1 (2.5 ng/mL in PBS) for 48 h. Mock transfections with transfection reagent alone served as negative control. Controls also included three different RNA duplexes: a scrambled version of HDAC4 siRNA (scHDAC4 siRNA), a siRNA directed against GL3 luciferase (GL3 Luc), and Eurogentec (EGT) negative control siRNA. The relative transcript levels of each HDAC (A) as well as those of α-SMA (B) (normalized to GAPDH transcript levels) were assessed by real time RT-PCR, as described in Materials and methods. Each experiment was repeated at least twice and consistent results were observed. Data were expressed as mean ratios ± standard deviation. Statistically significant differences in relative α-SMA transcript levels between control cells (mock-, EGT siRNA-, GL3 Luc siRNA-, and scHDAC4 siRNA-transfected cells) and cells transfected with each specific HDAC siRNA are indicated as an asterisk ($p < 0.05$).

siRNA (mock) or transfected with siRNAs directed against HDAC1, HDAC3, HDAC5 or with various control siRNAs (EGT negative control siRNA, GL3 luciferase siRNA, or a scrambled HDAC4 siRNA) ($p > 0.05$). A weaker TGFβ1-mediated α-SMA induction (± 2 fold) was observed in HDAC6- and HDAC8-silenced cells ($p < 0.05$) while a stronger α-SMA transcript induction (± 6 – 7 fold) was found in HDAC2- and HDAC7-silenced, TGFβ1-treated fibroblasts ($p < 0.05$) (Fig. 3B). Among the HDACs investigated, it appeared that HDAC4 silencing most efficiently abrogated TGFβ1-induced α-SMA overexpression. Thus, while global inhibition of class I and class II HDACs by TSA lead to a complete prevention of TGFβ1-mediated α-SMA induction, the specific silencing of a number of these HDACs yielded various effects on α-SMA abundance (stronger, weaker, or similar induction). Since HDAC4 silencing resulted in the most profound blocking of

α-SMA induction – similar to that obtained when fibroblasts were treated with TSA – we further attempted to characterize the impact of HDAC4 in TGFβ1-mediated MF differentiation.

3.3. HDAC4 is necessary for TGFβ1-mediated MF differentiation

We first evaluated the toxicity of HDAC4 RNA interference using 3 different siRNAs directed against human HDAC4 mRNA. Measurements of LDH activity levels in culture supernatants following transfection of the cells with these siRNAs showed no cytotoxic effect of the siRNAs as compared with mock-, scrambled HDAC4 siRNA, and EGT negative control siRNA transfections (data not shown). In addition, no induction of 2', 5'-oligoadenylate synthase-1 (OAS-1) transcript expression was observed following siRNA transfections (data

not shown), indicating that the small double-stranded RNAs did not trigger any interferon response by the transfected cells.

Among the 3 HDAC4 siRNAs tested, HDAC4 siRNA#2 and HDAC4 siRNA#3 most efficiently down-regulated HDAC4 transcripts in fibroblasts while the silencing effect of HDAC4 siRNA#1 was more modest ($p < 0.05$) (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, TGF β 1-mediated α -SMA transcript induction was prevented in fibroblasts transfected with the most efficient HDAC4 siRNAs (#2 and #3) ($p < 0.05$) while it was only modestly repressed in fibroblasts transfected with the less efficient HDAC4 siRNA#1 ($p < 0.05$). In addition, HDAC4 silencing did not significantly decrease the transcript levels of HDAC1 through HDAC8 (Fig. 5A) ($p > 0.05$). Similar results were observed when 2 reference genes, GAPDH and β -actin, were used for normalizing α -SMA transcripts levels in the RT-PCR experiments (data not shown).

At the protein level, immunoblot analysis showed that silencing of HDAC4 using HDAC4 siRNAs #2 and #3 prevented the induction of α -SMA expression mediated by TGF β 1 (Fig. 5B). This repressive effect was weaker in HDAC4 siRNA#1-transfected cells. Immunocytochemical detection of α -SMA

confirmed the immunoblot data and further showed that HDAC4 silencing using HDAC4 siRNAs #2 and #3 fully prevented the induction of MF morphologic changes mediated by TGF β 1 (Fig. 6). Therefore, these results indicated that HDAC4 is required for efficient TGF β 1-mediated MF differentiation.

3.4. HDAC4 silencing induces the expression of TGIF and TGIF2, two endogenous inhibitors of the TGF β 1 signaling pathway

Since histone deacetylases are usually associated with repression of gene expression, we next sought to investigate whether HDAC4 silencing would result in the induction of known endogenous inhibitors of the TGF β pathway, including Smad7 [33–37], 5'-TG-3'-interacting factor (TGIF), and 5'-TG-3'-interacting factor 2 (TGIF2). As shown in Fig. 7, TGF β 1 slightly upregulated the transcripts of these inhibitors. No significant increase in Smad7 mRNA levels was observed in HDAC4-silenced TGF β 1-treated fibroblasts ($p > 0.05$). In contrast, HDAC4 silencing in fibroblasts resulted in increased levels of TGIF and TGIF2 transcripts, whether cells were exposed to TGF β 1 or not ($p < 0.05$).

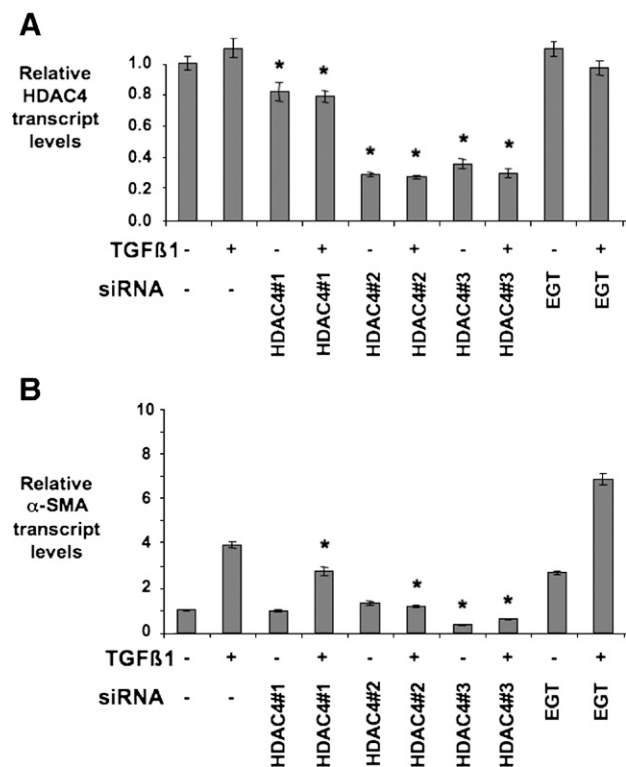


Fig. 4. HDAC4 is necessary for TGF β 1-mediated myofibroblastic differentiation. Primary human fibroblasts were transfected with 3 different siRNAs directed against HDAC4 and then treated with or without TGF β 1 (2.5 ng/mL in PBS) for 48 h. Mock transfections with transfection reagent alone and transfections with Eurogentec negative control siRNA served as negative controls. The relative levels of HDAC4 (A) and α -SMA (B) transcripts (normalized to GAPDH transcript levels) were assessed by real time RT-PCR, as described in Materials and methods. Each experiment was repeated at least twice and consistent results were observed. Statistically significant reductions in relative HDAC4 and α -SMA transcript levels between mock-transfected cells and cells transfected with each of the other siRNAs, either in absence or in presence of TGF β 1, are indicated as an asterisk ($p < 0.05$).

4. Discussion

With the exception of a subset of myofibroblasts residing in specific normal human tissues [31], most myofibroblasts are thought to arise locally from resident fibroblasts as a consequence of tissue injury and acquire some of the contractile proteins normally expressed by smooth muscle cells such as α -SMA. These hypertrophic stromal cells typically contain numerous smooth muscle actin stress fibers that contribute to the generation of isometric mechanical force required for wound contraction and closure [13,38]. Chronic myofibroblast activation has been associated with a number of pathological conditions associated with tissue remodeling, including hypertrophic scarring, interstitial fibrosis, and stromal response to certain neoplasias. TGF β 1 is commonly considered as a master molecule for the general MF activation program. Other cytokines and growth factors, such as platelet-derived growth factor and tumor necrosis factor- α , do also bear profibrotic activity, but do not induce α -SMA in fibroblasts [3].

In this study, we have shown that inhibition of class I and class II HDAC activities by TSA abrogates TGF β 1-mediated *de novo* α -SMA transcript and protein expression and morphological changes characteristic of MF differentiation in human skin fibroblasts. These findings are consistent with those of a previous study by Rombouts et al., who have reported that TSA suppresses the inductive effect of TGF β 1 on α -SMA mRNA abundance in rat skin fibroblasts [24]. TSA treatment has also been shown to interfere with other biological processes mediated by TGF β 1, such as the epithelial-to-mesenchymal transition of human renal proximal tubular epithelial cells [39] and the repression of the interferon α -induced MHC II transactivator (CIITA) gene in mouse microglial cells [40]. Thus, the results of our current study not only suggest that global HDAC inhibition may be a useful approach to prevent TGF β 1-

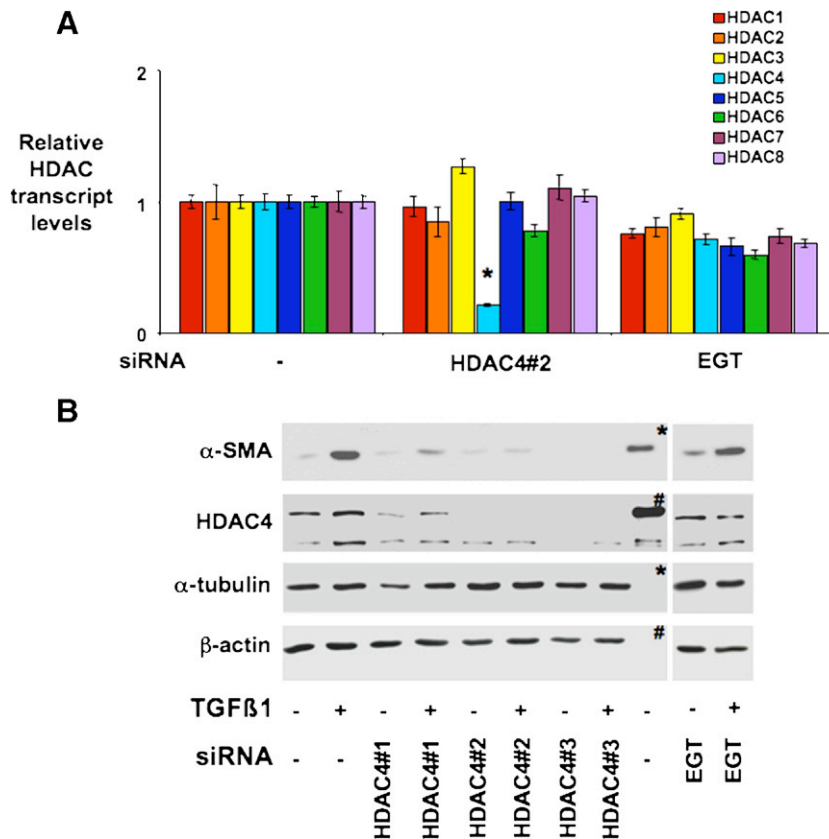


Fig. 5. (A) HDAC4 silencing does not significantly modify the transcript levels of HDAC1 through HDAC8 in primary human fibroblasts. Primary human fibroblasts were transfected with a siRNA directed against HDAC4 (HDAC4 siRNA#2). Mock transfections with transfection reagent alone and transfections with Eurogentec negative control siRNA served as negative controls. The relative transcript levels of HDAC1 through HDAC8 (normalized to GAPDH transcript levels) were assessed by real time RT-PCR, as described in Materials and methods. Data were expressed as mean ratios \pm standard deviation. Statistically significant reductions in relative HDAC transcript levels between cells transfected with HDAC4#2 siRNA and both mock- and EGT siRNA-transfected cells are indicated as an asterisk ($p < 0.05$). (B) TGF β 1 fails to induce α -SMA protein expression in the absence of HDAC4 in primary human fibroblasts. Primary human fibroblasts were transfected with 3 different siRNAs directed against HDAC4 and then treated with or without TGF β 1 (2.5 ng/mL in PBS) for 48 h. Mock transfections with transfection reagent alone and transfections with Eurogentec (EGT) negative control siRNA served as negative controls. The relative levels of α -SMA, HDAC4, α -tubulin, and β -actin were assessed by immunoblot, as described in Materials and methods. Lanes marked by an * (α -SMA and α -tubulin) were loaded with total protein extracts from primary human smooth muscle cells. Lanes marked by a # (HDAC4 and β -actin) were loaded with total protein extracts from Saos2 cells transfected with a flag-tagged human HDAC4 expression vector. Experiments were repeated at least twice and consistent results were observed.

induced MF differentiation but also add weight to the growing evidence indicating that TGF β 1 mediates its biological functions at least in part by epigenetic mechanisms of gene regulation involving histone deacetylase activities.

The negative impact of TSA on TGF β 1-mediated MF differentiation obviously represents the net effect of the cumulative inhibitory activity of the drug on all sensitive HDACs present within the fibroblasts. In order to investigate the involvement of individual HDACs in this process, we have evaluated the impact of specific HDAC gene silencing by RNA interference on α -SMA gene expression by fibroblasts treated with TGF β 1. Silencing of each of the eight first members of the histone deacetylase family resulted in diverse effects on α -SMA transcript abundance. On one hand, forced downregulation of HDAC4, HDAC6, and HDAC8 repressed TGF β 1-mediated α -SMA transcript levels; the most profound repression was observed with HDAC4 silencing, which resulted in an almost complete failure of TGF β 1-treated fibroblasts to overexpress α -SMA transcript and protein. Thus, at least 3 different HDACs may operate to drive or promote TGF β 1-mediated myofibro-

blastic differentiation. On the other hand, while knockdown of HDAC1, HDAC3, and HDAC5 had no effect on α -SMA transcript expression, silencing of HDAC2 and HDAC7 substantially potentiated the induction of α -SMA transcript in response to TGF β 1 exposure. The differential effects of each specific HDAC silencing on α -SMA expression are not unexpected and are in keeping with the results of previous reports on TGF β 1-responsive genes. Indeed, prior studies have shown opposed effects of different HDAC inhibitors on the expression of one single gene (e.g. TSA/sodium butyrate versus valproic acid on Timp-1 expression [41]) as well as divergent impacts of one single HDAC inhibitor on the expression of different genes (e.g. TSA on type I collagen versus PAI-1 [26]). Sirtuins have not been considered in this study. However, these class III HDAC's may also prove in the future to be involved in the MF differentiation program. Indeed, it has been very recently shown that SIRT1, through its capacity to promote the deacetylation of Smad7 (and subsequently its ubiquitin/proteasome-mediated degradation), attenuates TGF β 1-induced apoptosis of murine mesangial cells [20].

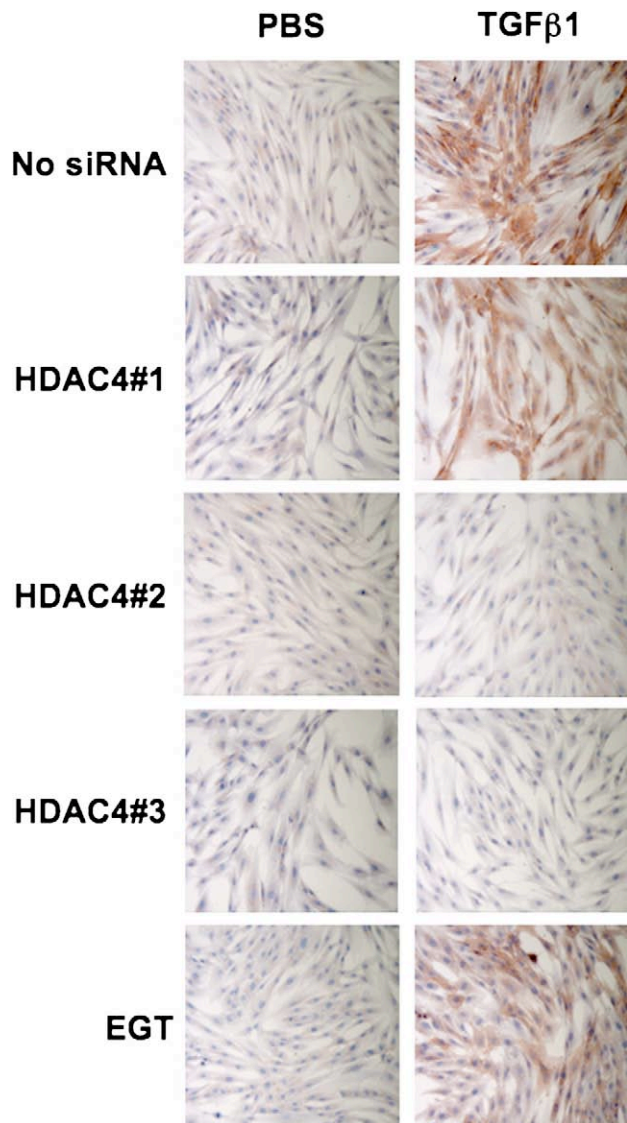


Fig. 6. HDAC4 silencing prevents TGF β 1-mediated induction of myofibroblastic morphologic changes in primary human fibroblasts. Primary human fibroblasts were transfected with 3 different siRNAs directed against HDAC4 and then treated with TGF β 1 or vehicle (PBS). Mock transfections with transfection reagent alone and transfections with Eurogentec (EGT) negative control siRNA served as negative controls. Expression of α -SMA was assessed by immunocytochemistry, as described in Materials and methods. Experiments were repeated at least twice and consistent results were observed.

Our data have clearly indicated that HDAC4 is essential for TGF β 1-mediated MF transdifferentiation, as assessed phenotypically. Remarkably, under our experimental conditions, HDAC4 silencing was almost as efficient as TSA to prevent the induction of α -SMA gene expression by TGF β 1. In fact, it may not be intriguing that HDAC4 is necessary for MF differentiation. This HDAC indeed represents a major contributor to several other differentiation programs, including those related to osteoblasts [42], chondrocytes [43], and muscle cells [44–48]. Whether common pathways are affected during these differentiation processes remains to be elucidated.

Since HDAC activities are generally associated with transcriptional repression and the stimulation of α -SMA expression

by TGF β 1 is repressed by HDAC4 silencing, we have reasoned that HDAC4 silencing may exert its negative regulation on α -SMA expression by inducing endogenous repressing activities of the TGF β pathway. In other words, HDAC4 may be necessary to silence the expression of TGF β pathway repressors to enable α -SMA expression. In addition, it has been previously observed that the inhibitory effect of TSA on TGF β 1-mediated α -SMA transcription is cycloheximide-sensitive, i.e. requiring *de novo* protein synthesis of a putative TGF β pathway repressor [24]. Other potential mechanisms by which HDAC4 silencing may negatively affect the expression of α -SMA encompass

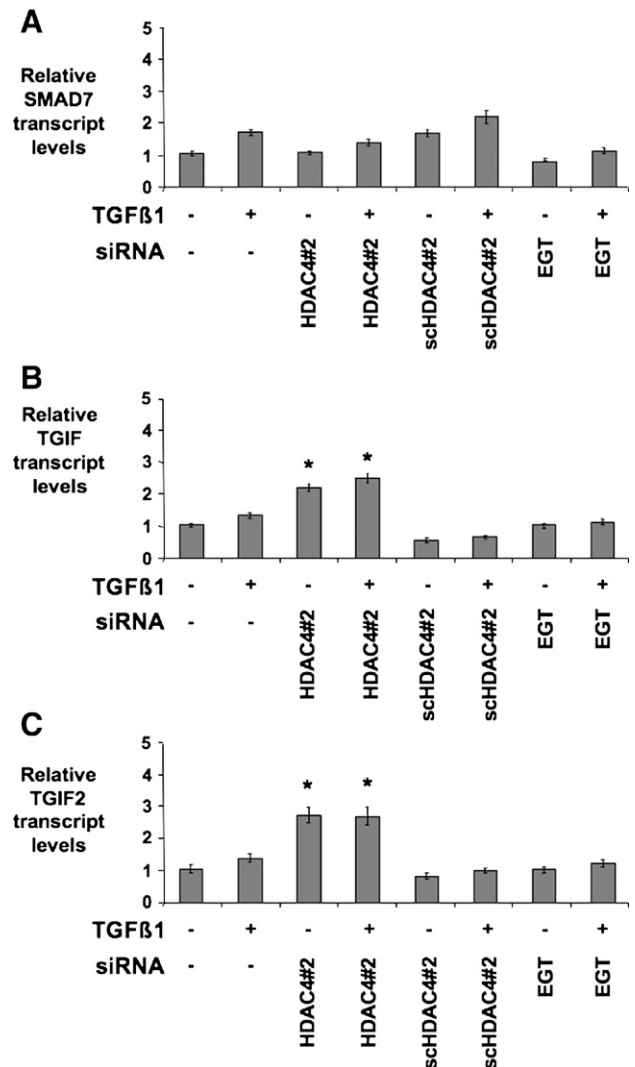


Fig. 7. HDAC4 silencing induces the expression of TGIF and TGIF2, two endogenous inhibitors of the TGF β 1 signaling pathway, in primary human fibroblasts. Primary human fibroblasts were transfected with a siRNA directed against HDAC4 (HDAC4 siRNA#2), with transfection reagent alone, with Eurogentec negative control siRNA, or with a scrambled HDAC4 siRNA (scHDAC4#2 siRNA), and then treated with TGF β 1 or vehicle (PBS). The relative levels of Smad7, TGIF, and TGIF2 transcripts were assessed by real time RT-PCR analysis, as described in Materials and methods. Data were expressed as mean ratios \pm standard deviation. Statistically significant increases in relative Smad7, TGIF, and TGIF2 transcript levels between cells transfected with HDAC4#2 siRNA and mock-, scrambled HDAC4#2 siRNA, and EGT siRNA-transfected cells are indicated as an asterisk ($p < 0.05$). Experiments were repeated at least twice and consistent results were observed.

direct hyperacetylation – and subsequent stabilization and/or increased activity – of transcriptional corepressors of the α -SMA gene and HDAC4 deacetylase activity-independent effects. A number of TGF β pathway repressors have been characterized and include the well known inhibitory Smad7 protein [33,37] as well as TGIF and TGIF2. The latter are DNA-binding homeoproteins, which share two major blocks of similarity encompassing the homeodomain and a conserved carboxyl terminal repression domain and act as TGF β specific Smad transcriptional corepressors through direct interactions with Smad2, Smad3, the Sin3 corepressor complex and HDAC1 [49–51]. TGIF may also be a component of a ubiquitin ligase complex that mediates the degradation of Smad2 in response to TGF β signaling [52]. Previous studies have shown that (i) Smad7 inhibits α -SMA expression in different cell types [53,54], (ii) ectopic expression of TGIF markedly suppresses Smad-mediated activation of TGF β 1-responsive promoter activity and completely blocks TGF β 1-induced α -SMA expression in cultured rat and mesangial cells [55] and (iii) TSA upregulates the expression of both TGIF and Smad7 transcripts in TGF β 1-treated rat fibroblasts [24]. Therefore, we have been interested to find out whether HDAC4 silencing would result in an upregulation of these TGF β pathway repressor molecules. We have found that Smad7, TGIF, and TGIF2 transcript abundance was increased in response to TGF β 1 treatment, which is in agreement with previous studies suggesting that these proteins may act as negative feedback effectors to desensitize TGF β 1 action [24,56,57]. However, when fibroblasts were transfected with HDAC4 siRNAs, TGIF and TGIF2, but not Smad7 transcript levels were significantly upregulated, suggesting that (i) HDAC4 is involved in the regulation of the two homeodomain proteins and (ii) HDAC4 silencing mediates its inhibitory effects on TGF β 1-mediated phenotypic changes through TGIF and TGIF2 induction. In addition, to our knowledge, these are the first data to indicate that TGIF and TGIF2 expression may be regulated by a HDAC. It will take another study to dissect the precise mechanisms whereby HDAC4 regulates TGIF and TGIF2 expression.

Overall, the data presented in the current study point at a necessary role for HDAC4 in the phenotypic transition of fibroblasts to myofibroblasts mediated by TGF β 1, thereby unveiling HDAC4 as a potential target for treating MF differentiation-related pathological conditions.

Acknowledgments

The authors thank Sandrine Pierard and Pascale Welle-Heneaux for their technical assistance.

Grant sponsors: National Fund for Scientific Research (Belgium), Centre Anti-Cancéreux de l'Université de Liège, Fondation Léon Frédéricq, TELEVIE, and the Interuniversity Attraction Pole.

References

[1] F. Verrecchia, A. Mauviel, Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation, *J. Invest. Dermatol.* 118 (2002) 211–215.

[2] A.B. Roberts, M.B. Sporn, R.K. Assoian, J.M. Smith, N.S. Roche, L.M. Wakefield, U.I. Heine, L.A. Liotta, V. Falanga, J.H. Kehrl, Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 4167–4171.

[3] A. Desmouliere, A. Geinoz, F. Gabbiani, G. Gabbiani, Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts, *J. Cell Biol.* 122 (1993) 103–111.

[4] L. Ronnov-Jessen, O.W. Petersen, Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia, *Lab. Invest.* 68 (1993) 696–707.

[5] G. Gabbiani, The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases, *J. Pathol.* 200 (2003) 500–503.

[6] D.W. Powell, R.C. Mifflin, J.D. Valentich, S.E. Crowe, J.I. Saada, A.B. West, Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) C1–C9.

[7] G. Gabbiani, G.B. Ryan, G. Majne, Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction, *Experientia* 27 (1971) 549–550.

[8] O. Skalli, P. Ropraz, A. Trzeciak, G. Benzoni, D. Gillesse, G. Gabbiani, A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation, *J. Cell Biol.* 103 (1986) 2787–2796.

[9] F. Grinnell, Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction, *J. Cell Biol.* 124 (1994) 401–404.

[10] L. Ronnov-Jessen, O.W. Petersen, M.J. Bissell, Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction, *Physiol. Rev.* 76 (1996) 69–125.

[11] G. Serini, G. Gabbiani, Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation, *Exp. Cell Res.* 250 (1999) 273–283.

[12] B. Hinz, G. Celetta, J.J. Tomasek, G. Gabbiani, C. Chaponnier, Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 2730–2741.

[13] B. Hinz, G. Gabbiani, C. Chaponnier, The NH2-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo, *J. Cell Biol.* 157 (2002) 657–663.

[14] C.H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature* 390 (1997) 465–471.

[15] R. Derynck, Y. Zhang, X.H. Feng, Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses, *Cell* 95 (1998) 737–740.

[16] D. Wotton, J. Massague, Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 254 (2001) 145–164.

[17] J. Massague, D. Wotton, Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system, *EMBO J.* 19 (2000) 1745–1754.

[18] K. Izutsu, M. Kurokawa, Y. Imai, K. Maki, K. Mitani, H. Hirai, The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling, *Blood* 97 (2001) 2815–2822.

[19] J. Long, I. Matsuura, D. He, G. Wang, K. Shuai, F. Liu, Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9791–9796.

[20] S. Kume, M. Haneda, K. Kanasaki, T. Sugimoto, S. Araki, K. Isshiki, M. Isono, T. Uzu, L. Guarente, A. Kashiwagi, D. Koya, SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 151–158.

[21] E. Verdin, Histone Deacetylases: Transcriptional Regulation and other Cellular Functions, Human Press, Totowa, New Jersey, 2006.

[22] M.S. Kim, H.J. Kwon, Y.M. Lee, J.H. Baek, J.E. Jang, S.W. Lee, E.J. Moon, H.S. Kim, S.K. Lee, H.Y. Chung, C.W. Kim, K.W. Kim, Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes, *Nat. Med.* 7 (2001) 437–443.

[23] C.F. Deroanne, K. Bonjean, S. Servotte, L. Devy, A. Colige, N. Clausse, S. Blacher, E. Verdin, J.M. Foidart, B.V. Nusgens, V. Castronovo, Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling, *Oncogene* 21 (2002) 427–436.

[24] K. Rombouts, T. Niki, P. Greenwel, A. Vandermonde, A. Wielant, K. Hellems, P. De Bleser, M. Yoshida, D. Schuppan, M. Rojkind, A. Geerts,

- Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF-beta(1)-induced fibrogenesis in skin fibroblasts, *Exp. Cell Res.* 278 (2002) 84–197.
- [25] D.C. Rishikof, D.A. Ricupero, H. Liu, R.H. Goldstein, Phenylbutyrate decreases type I collagen production in human lung fibroblasts, *J. Cell. Biochem.* 91 (2004) 740–748.
- [26] A.K. Ghosh, Y. Mori, E. Dowling, J. Varga, Trichostatin A blocks TGF-beta-induced collagen gene expression in skin fibroblasts: involvement of Sp1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2007) 420–426.
- [27] D. Waltregny, W. Glenisson, S.L. Tran, B.J. North, E. Verdin, A. Colige, V. Castronovo, Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility, *FASEB J.* 19 (2005) 966–968.
- [28] C. Hubbert, A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.F. Wang, T.P. Yao, HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase, *Nature* 417 (2002) 455–458.
- [29] F. Dequiedt, H. Kasler, W. Fischle, V. Kiermer, M. Weinstein, B.G. Herndier, E. Verdin, HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis, *Immunity* 18 (2003) 687–698.
- [30] B.J. North, B.L. Marshall, M.T. Borra, J.M. Denu, E. Verdin, The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase, *Mol. Cell* 11 (2003) 437–444.
- [31] D. Waltregny, L. de Leval, W. Glenisson, S. Ly Tran, B.J. North, A. Bellahcene, U. Weidle, E. Verdin, V. Castronovo, Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues, *Am. J. Pathol.* 165 (2004) 553–564.
- [32] B. Hu, Z. Wu, S.H. Phan, Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29 (2003) 397–404.
- [33] U. Valcourt, M. Kowanetz, H. Niimi, C.H. Heldin, A. Moustakas, TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial–mesenchymal cell transition, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 1987–2002.
- [34] S.J. Chen, W. Yuan, Y. Mori, A. Levenson, M. Trojanowska, J. Varga, Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3, *J. Invest. Dermatol.* 112 (1999) 49–57.
- [35] S. Kato, S. Ueda, K. Tamaki, M. Fujii, K. Miyazono, P. ten Dijke, M. Morimatsu, S. Okuda, Ectopic expression of Smad7 inhibits transforming growth factor-beta responses in vascular smooth muscle cells, *Life Sci.* 69 (2001) 2641–2652.
- [36] S. Lindert, L. Wickert, I. Sawitza, E. Wiercinska, A.M. Gressner, S. Dooley, K. Breitkopf, Transdifferentiation-dependent expression of alpha-SMA in hepatic stellate cells does not involve TGF-beta pathways leading to coinduction of collagen type I and thrombospondin-2, *Matrix Biol.* 24 (2005) 198–207.
- [37] B. Camoretti-Mercado, D.J. Fernandes, S. Dewundara, J. Churchill, L. Ma, P.C. Kogut, J.F. McConville, M.S. Parmacek, J. Solway, Inhibition of transforming growth factor beta-enhanced serum response factor-dependent transcription by SMAD7, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20383–20392.
- [38] J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown, Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 349–363.
- [39] M. Yoshikawa, K. Hishikawa, T. Marumo, T. Fujita, Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells, *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (2007) 58–65.
- [40] T. Pazmany, T.B. Tomasi, The major histocompatibility complex class II transactivator is differentially regulated by interferon-gamma and transforming growth factor-beta in microglial cells, *J. Neuroimmunol.* 172 (2006) 18–26.
- [41] D.A. Young, O. Billingham, C.L. Sampieri, D.R. Edwards, I.M. Clark, Differential effects of histone deacetylase inhibitors on phorbol ester- and TGF-beta1 induced murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression, *FEBS J.* 272 (2005) 1912–1926.
- [42] J.S. Kang, T. Alliston, R. Delston, R. Derynck, Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3, *EMBO J.* 24 (2005) 2543–2555.
- [43] R.B. Vega, K. Matsuda, J. Oh, A.C. Barbosa, X. Yang, E. Meadows, J. McAnally, C. Pomajzl, J.M. Shelton, J.A. Richardson, G. Karsenty, E.N. Olson, Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis, *Cell* 119 (2004) 555–566.
- [44] T.A. McKinsey, C.L. Zhang, J. Lu, E.N. Olson, Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation, *Nature* 408 (2000) 106–111.
- [45] E.A. Miska, E. Langley, D. Wolf, C. Karlsson, J. Pines, T. Kouzarides, Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 3439–3447.
- [46] C. Karamboulas, A. Swedani, C. Ward, A.S. Al-Madhoun, S. Wilton, S. Boisvenue, A.G. Ridgeway, I.S. Skerjanc, HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage, *J. Cell. Sci.* 119 (2006) 4305–4314.
- [47] J.J. Ellis, T.G. Valencia, H. Zeng, L.D. Roberts, R.A. Deaton, S.R. Grant, CaM kinase II delta C phosphorylation of 14-3-3beta in vascular smooth muscle cells: activation of class II HDAC repression, *Mol. Cell. Biochem.* 242 (2003) 153–161.
- [48] D. Cao, Z. Wang, C.L. Zhang, J. Oh, W. Xing, S. Li, J.A. Richardson, D.Z. Wang, E.N. Olson, Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 364–376.
- [49] T.A. Melhuish, C.M. Gallo, D. Wotton, TGIF2 interacts with histone deacetylase 1 and represses transcription, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32109–32114.
- [50] M. Sharma, Z. Sun, 5'TG3' interacting factor interacts with Sin3A and represses AR-mediated transcription, *Mol. Endocrinol.* 15 (2001) 1918–1928.
- [51] T.A. Melhuish, D. Wotton, The Tgif2 gene contains a retained intron within the coding sequence, *BMC Mol. Biol.* 7 (2006) 2.
- [52] S.R. Seo, F. Lallemand, N. Ferrand, M. Pessah, S. L'Hoste, J. Camonis, A. Atfi, The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation, *EMBO J.* 23 (2004) 3780–3792.
- [53] J. Kopp, E. Preis, H. Said, B. Hafemann, L. Wickert, A.M. Gressner, N. Pallua, S. Dooley, Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21570–21576.
- [54] J.H. Li, H.J. Zhu, X.R. Huang, K.N. Lai, R.J. Johnson, H.Y. Lan, Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 1464–1472.
- [55] C. Dai, Y. Liu, Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004) 1402–1412.
- [56] F. Chen, K. Ogawa, R.P. Nagarajan, M. Zhang, C. Kuang, Y. Chen, Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta, *Biochem. J.* 371 (2003) 257–263.
- [57] S. Itoh, M. Landstrom, A. Hermansson, F. Itoh, C.H. Heldin, N.E. Heldin, P. ten Dijke, Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 29195–29201.