**Introduction**

Histones are the structures around which DNA is wrapped to form nucleosomes, the fundamental subunits of chromatin (24). They are known to undergo extensive post-translational modification through mechanisms such as acetylation, phosphorylation and methylation. This, in turn, affects chromatin structure and DNA expression (1).

Acetylation of lysine residues is a process tightly regulated by the action of two opposing classes of enzymes, histone deacetylases (HDACs) and histone acetyltransferases (HATs). By catalyzing the hydrolysis of acetyllysine into a deacetylated lysine residue and a free acetyl group, HDACs allow for a more compact nucleosome organization. Thus, they act as negative regulators of DNA transcription and gene expression (1). Other non-histone proteins – mostly transcription factors – can also undergo deacetylation through HDAC1 and HDAC2, which influences their stability and function (3, 4).

18 HDACs have been identified in humans and other mammals so far. They are divided in four classes based on their structure and function. Class I HDACs (HDACs 1, 2, 3, and 8) are ubiquitously expressed in almost all tissues and they are the main contributors to histone deacetylation (3,7). In addition to their strong enzymatic activity, they have roles in other processes such as embryogenesis and cell cycle progression. For example, HDAC1 is involved in the regulation of cell cycle progression through its inhibition of p21 (5). Germline deletion of HDAC1 in mice results in early embryonic lethality (6).

Class II HDACs (HDACs 4-7, 9 and 10), show a more tissue-restricted expression and are abundant in the brain and skeletal muscles. They have less enzymatic activity than class I HDACs but have the ability to recruit and form functional complexes with class I HDACs. Class III HDACs, also known as sirtuins, have roles in physiological processes such as aging and inflammation, and also have a role in endochondral ossification (25). Class IV HDAC, with HDAC11 as its sole member, has a different structure and a function not yet fully understood (2).

HDACs from all classes have emerged as important regulators of bone formation. Inhibition of HDACs and SIRTs have negative effects on bone formation and development (2). Numerous studies have shown that class I or II HDAC knockout (KO) mice develop various bone abnormalities, reduced bone density, delayed or absent ossification. For example, HDAC3 KO mice undergo either early lethality or endochondral bone defects, while HDAC4 deletion results in brachdactyly-mental retardation syndrome and HDAC5 is linked to low bone mineral density, lower trabecular bone density and negative regulation of sclerostin levels (8,9,10).

HDAC9 is the least expressed HDAC member in human bone (2). Nonetheless it appears to play a critical role in osteoclast development. Animal studies on mice showed that HDAC9 KO specimens experience a significant reduction in bone mass and elevated bone resorption markers, mainly through increased osteoclast differentiation (11). It is involved in a negative feedback loop with PPARγ/RANKL in the repression of osteoclastogenesis. In the absence of RANKL, HDAC9 prevents PPARγ expression and function, thus preventing osteoclast differentiation (11).

In addition to osteoclastogenesis, there is also evidence of a role for HDAC9 in osteoblastogenesis from MSC cells in mice. First, microRNA-188 (MiR-188) overexpression inhibits BMSC differentiation into osteoblasts, while its deletion is associated with higher osteoblastic bone formation (15). MiR-188 targets HDAC9 mRNA and suppresses HDAC9 expression in mice bone marrow MSC (14). Second, HDAC9 KO mice have less osteoblast numbers than their wildtype counterparts (11).

HDAC9 is also involved in the pathogenesis of multiple other diseases such as cancer, autoimmunity, cardiovascular disease, atherosclerosis and stroke (12). Genome-wide association studies (GWAS) have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) that are associated with the risk of large vessel strokes in European and Chinese Han populations (16, 17). Multiple SNPs have also been associated with abdominal aortic calcifications, while inhibition of HDAC9 in aortic myocytes improves contractility and decreases aortic calcifications (28).

HDAC inhibitors have already found therapeutic applications in a wide array of diseases. They generally exert a broad-spectrum HDAC inhibition and, because of their ubiquitous distribution, result in significant side effects. Valproate, the oldest HDAC inhibitor, increases bone loss and fracture risk as shown in multiple meta-analysis in children and adults (18-20). Vorinostat, approved in 2006 for the treatment of refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), has an inhibitory effect on HDACs class I, II and IV but also promotes bone loss (21). Because of its role in bone metabolism, HDAC9 modulation may be of therapeutic value in the treatment of osteoporosis and other bone diseases.

Osteoporosis and its consequent fragility fractures is a leading cause of morbidity, mortality, hospital admissions and economic cost (30,31). Bone mineral density (BMD) is strongly correlated with the risk of fractures and its measurement is used as a diagnostic tool (23). There is a strong hereditary component to BMD, responsible for over 60 % of its variability (32,33). Thus far, around 70 loci associated with bone mineral density (BMD) and fracture risk have been identified using GWAS. Many of these loci are clustered around the RANK/RANKL/OPG axis, mesenchymal stem cell differentiation pathway and Wnt/beta-catenin signaling pathway (22). Thus far SNPs in HDAC5 are the only variants among the HDAC family that affect BMD at a genome-wide significance level (23). There is, however, evidence to suggest that over- or underexpression of HDAC9 could affect BMD and fracture risk through its modulating activity of PPARγ/RANKL.

CartaGENE is a large population-based biobank that has been prospectively collecting socio-demographic, physiological and biological information on healthy men and women aged 40-69 in Quebec (Canada) since 2010 (34). Its design and methodology have been described in detail elsewhere (34, 35,36). In brief, patients were randomly chosen from four regions (Montreal, Quebec City, Saguenay, Sherbrooke) using government health insurance database. The sample was designed to represent 1 % of the Quebec population between 40 and 69 years of age. It has been designed to investigate the relation between genomics and various chronic diseases such as osteoporosis. Therefore, to identify polymorphisms in HDAC9 that predispose to low BMD and bone fracture, we performed an analysis on the entire CARTaGENE cohort.

Objectifs

À l’aide de la banque de données de CARTaGENE dans laquelle les participants ont subi un génotypage des gènes HDAC et bénéficient d’un suivi de plusieurs années pour la survenue de fractures:

1. Rechercher des polymorphismes (SNP) dans le gène HDAC9 associés à la présence d’ostéopénie/ostéoporose
2. Rechercher des polymorphismes (SNP) dans le gène HDAC9 associés à la survenue de fractures ostéoporotiques (fracture ostéoporotique vs pas de fracture ostéoporotique)
3. Rechercher si un lien existe entre l’expression de SNP dans HDAC9 et les SNP dans tous les autres gènes associés à une maladie osseuse.
4. Rechercher si les SNP de HDAC9 associés aux maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (voir ci-bas) ont une influence sur la survenue d’ostéopénie/ostéoporose/fractures ostéoporotiques

Variables à extraire (se référer au document « Catalogue\_Données\_200616 » sous l’onglet Catalogue\_MASTER)

L’interprétation de chacune des variables est indiquée dans le document.

Variables nécessaires pour

* Présentation des données de base des participants
* Faire les analyses ajustées

|  |  |
| --- | --- |
| AGE |  |
| GENDER |
| ETHNICITYqfrac |
| TABACcourant\_occ\_m |
| ROH3jplus |
| MENOPAUSEglobal\_m |
| HTAglobal\_m |
| IMC |
| OBESITEtaille\_catIDF\_m |
| AVCglobal\_pre\_m |
| ICglobal\_pre\_m |
| DIABETEglobal\_m |
| HYPOTHYROIDIEglobal\_m |
| HYPERTHYROIDEglobal\_m |
| DLPglobal\_m |
| EGFRcat=stade 3,4,5 |
| CKDadvanced\_auto\_rx\_m |
| DIABETEglobal\_m |
| MVASglobal\_m |
| MPOCauto\_rx\_m |
| DMOtscore |
| DMOsi |
| DMOsos |
| DMObua |
| OSTEOglobal\_m |
| OSTEOdmo\_rx\_m |
| NEOall\_auto\_m |
| FXall\_post |
| FXmofplus\_post |
| MCASglobal\_pre\_m |
| AVCatcd\_auto\_m |
| ERTglobal |
| (Médication suivante)  BPS  TERIPARATIDE  VD  CALCIUMpo  CALCITONINE  MTX  CYCLOSPORINE  HGO  THIAZOLIDINEDIONE  INSULINE  IPP  BETABLOQUEUR  FUROSEMIDE  HCTZ  RXantihypertenseur  NITROtimbre  NITROpo  NITROsyst  MIRENA  PROGcontraception  COC  ERT  ERT\_PROG  ESTROns  PROGns  ESTROqfrac  RALOXIFEN  TAMOXIFEN  PROGpo  ANDROGENE  ERTsyst  ESTROsyst  ERTlocal  ERTsyst\_ns  PRTsyst  PRTsyst\_ns  SERM  ANTICHOLINERGIQUEdirect  LEUPROLIDE  ANTIANDROGENE  AROMATASE  ANTIHORMONAL  CORTICOsyst  CORTICOns  CORTICOsyst\_ns  OPIOIDE  AVK  HBPM  HNF  HÉPARINE  VIH  TCA  ANTICONVULSIVANT  IRDN  ISRS  IRSN  SARI  NEUROLEPTIQUEatypique  NEUROLEPTIQUEtypique  NEUROLEPTIQUE  BENZO  BENZOmoyen  BENZOlong  BUSPIRONE  BARBITURIQUE  HYPNOTIQUE  SEDATIFnonantichol  STATINE  SYNTHROID  ANTITHYROIDE |  |
| DECES |  |

**Rechercher des variants (SNP) dans le gène HDAC9 associés à la présence d’ostéopénie/ostéoporose**

Séparer la cohorte en deux selon

**DMObas**: DMOtscore\_cat=ostéopénie,ostéoporose

**DMOnormal :** DMOtscore\_cat=normal, manquant

(DMObas et DMOnormal sont des variables que je créé et qui ne sont pas dans le fichier Catalogue\_Données\_200616)

Exclure les patients avec ostéoporose secondaire, soit :

OSTEOsecondaire=1 (n=2732)

Objectif de l’analyse statistique

1. Rechercher si des SNP dans le gène HDAC9 surviennent à une plus grande fréquence dans le groupe DMObas (DMOtscore\_cat=ostéopénie,ostéoporose).
2. Si un SNP est identifié, faire analyses ajustées pour la présence de confondants
3. Présenter les données démographiques de base des participants selon que « DMObas » ou « DMOnormal »

**Hypothèse :** HDAC9 semble jouer un rôle dans des voies impliquées dans la répression de l’ostéoclastogenèse. Un SNP qui amènerait une protéine dysfonctionnelle pourrait contribuer à ostéoporose/ostéopénie/fracture par inhibition de répression de l’ostéoclastogenèse.

**Rechercher des variants (SNP) dans le gène HDAC9 associés à la survenue de fractures ostéoporotiques (fracture ostéoporotique vs pas de fracture ostéoporotique)**

Séparer la cohorte en deux selon :

**FXmof\_post=1**

**FXmof\_post=0**

(Veut-on inclure les fractures du rameau pubien dans la définition de fracture ostéoporotique? Si oui, on sépare selon)

FXmofplus\_post=1

FXmofplus\_post=0

Exclure les patients avec ostéoporose secondaire, soit :

OSTEOsecondaire=1 (n=2732)

Objectifs de l’analyse statistique

1. Rechercher si des SNP dans le gène HDAC9 surviennent à une plus grande fréquence dans le groupe FXmof\_post=1
2. Si un SNP est identifié, faire analyses ajustées pour la présence de confondants
3. Présenter les données démographiques de base des participants selon que « FXmof\_post=1  » ou « FXmof\_post=0 »

**Hypothèse :** HDAC9 semble jouer un rôle dans des voies impliquées dans la répression de l’ostéoclastogenèse. Un SNP qui amènerait une protéine dysfonctionnelle pourrait contribuer à ostéoporose/ostéopénie/fracture par inhibition de répression de l’ostéoclastogenèse.

**Rechercher si un lien existe entre l’expression de variants de HDAC9 (SNP) et les autres SNP déjà associés à une maladie osseuse.**

Si on trouve un SNP dans le gène HDAC9 qui est associé à ostéopénie/ostéoporose (question 1) ou fracture ostéoporotique (question 2), alors on veut évaluer si ce polymorphisme est exprimé de façon non aléatoire avec d’autres SNP associés avec le même outcome (ostéopénie/ostéoporose/fracture ostéoporotique).

But : Explorer des voies de signalisation potentielles par lesquelles HDAC9 pourrait influencer ostéopénie/ostéoporose/fractures.

* Voir fichier Excel « SNP HDAC et SIRT »
* Voir fichier .txt tiré de l’article de Kim (2018) et al. sur la UK Biobank.

J’ai répertorié tous les SNP identifiés avec soit ostéopénie ou ostéoporose ou fractures. Autrement dit, on veut voir s’il y a un lien entre le HDAC9 et ces SNP déjà connus.

Exclure les patients avec ostéoporose secondaire, soit :

OSTEOsecondaire=1 (n=2732)

**Hypothèse :** En raison de son expression ubiquitaire, on pense que HDAC9 puisse être associé à la survenue de ostéoporose/ostéopénie/fractures via la modulation de l’expression de certains gènes déjà associés à ces issues cliniques.

**Rechercher un lien entre les SNP de HDAC9 associés aux maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (voir ci-bas) et la maladie osseuse**

Analyse sur les SNP suivants, qui sont des polymorphismes de HDAC9 qui sont associés avec soit stroke, maladie coronarienne, anévrysmes intracrâniens, media-intima thickness, athérosclérose, calcifications coronariennes ou tension artérielle systolique :

|  |
| --- |
| rs2107595 |
| rs11984041 |
| rs2023938 |
| rs2389995 |
| rs2240419 |
| rs10230207 |
| rs2023938 |
| rs3791398 |
| rs228769 |
| rs398122390 |
| rs12413112 |
| rs144124002 |
| rs1467568 |
| rs7895833 |
| rs2236319 |
| rs2273773 |
| rs932658 |
| rs3740051 |
| rs7069102 |
| rs7896005 |
| rs112443954 |
| rs2804924 |
| rs352493 |
| rs3760908 |
| rs107251 |

Références : voir document Excel « SNP HDAC et SIRT ».

But : Explorer si une corrélation existe entre les SNP associés aux maladies cardiovasculaire/cérébrovasculaire/TAcentrale et la maladie osseuse.

Exclure les patients avec ostéoporose secondaire, soit :

OSTEOsecondaire=1 (n=2732)

Hypothèse : Il y a probablement des voies communes par lesquelles HDAC9 est impliqué pour la pathogenèse de maladie osseuse et cardiovasculaire. Il est aussi possible qu’un polymorphisme associé à une sur-expression de HDAC9 soit à la fois associé à une protection osseuse mais à plus de maladie cardiovasculaire.

**Méthodologie**

Critères d’inclusion

1. Tous les patients de la banque CARTaGENE pour lesquels OSTEOsecondaire=0.

Critères d’exclusion

Patients dont OSTEOsecondaire=1

Il y aura certainement des critères d’exclusion de nature statistique, à préciser avec l’équipe.

Résultats attendus

Voir ci-haut pour les 4 points d’analyse.

**Points en suspens (À discuter)**

1. Faut-il faire une cohorte de validation? Dans les études de type GWAS, il y a toujours une cohorte de découverte puis une cohorte de validation. Est-ce nécessaire à notre devis d’étude?
2. Qui veut-on définir comme patient ostéoporotique?
   1. OSTEOdmo\_m (DMOtscore plus petit ou égal à -2,5), 0 (Tout le reste)
   2. OSTEOglobal\_m 1 (Ostéoporose auto-déclarée, OSTEOdmo, OSTEOrx), 0 (Tout le reste)

Il y a un risque d’inclure des patients non ostéoporotiques dans le groupe ostéoporose avec OSTEOglobal\_m, mais en même temps n=121 avec OSTEOdmo\_m seulement

1. Avait-on fait des DEXA ou seulement des échos pour déterminer le T-score?
2. Qui veut-on inclure dans la définition de « osteoporose secondaire »? Critères d’exclusion : plusieurs ci-bas sont des critères d’exclusion « usuels », mais qui exclueraient probablement trop de patients :

* Corticostéroides > 7.5 mg/d x 3 mois (quelle dose a été retenue dans cartagène?)
* Anticonvulsivants
* Ménopause prématurée (< 45 ans)
* Alcool excessif (>28/semaine)
* Insuffisance rénale chronique (DFGe < 60)
* Hépatopathie chronique
* Cushing
* Hyperparathyroïdie
* Thyrotoxicose
* Anorexie
* Maladie coeliaque
* Malabsorption
* Arthrite rhumatoïde
* Spondylite ankylosante
* Maladie inflammatoire intestinale
* Ostéomalacie
* Cancer (sauf cancers de la peau non-mélaniques)

Je garderais donc la définition utilisée par LC, soit la variable OSTEOsecondaire qui comporte:

* Diabète insulino-dépendant (DIABETEtype)
* ANTIHORMONAL
* MENOPAUSEprema
* COELIAQUEauto\_m
* FOIEglobal
* ARTHRITEglobal\_m
* MPOCauto\_rx
* CORTICOsyst)

1. Il y aura des critères d’exclusion de nature statistique qu’il faudra préciser (à discuter avec l’équipe de stats)
2. Veut-on exclure les patients qui ne sont pas de descendance européenne? (par souci d’homogénéité de la cohorte)
3. Devrait-on étudier les SNP de HDAC9 pour association avec rigidité artérielle?

**Références**

1. Bannister et al. Cell Research (2011) 21:381-395.
2. Bradley et al. Physiol Rev 2015;95:1359–1381.
3. Gallinari et al. Cell Research (2007) 17:195-211.
4. Glozak et al. *Gene* 2005; **363**:15–23.
5. Zupkovitz et al. *Mol Cell Biol.*2010;30:1171–81.
6. Dovey et al. PNAS May 4, 2010 107 (18) 8242-8247
7. Jin et al. HDAC7 inhibits osteoclastogenesis by reversing RANKL-triggered  BETA-catenin switch. Mol Endocrinol. 2013;27(2):325–335.
8. Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, Knutson SK, Cortez D, Sun ZW, Hiebert SW.Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. Mol Cell 30: 61–72, 2008.
9. Villavicencio-Lorini P, Klopocki E, Trimborn M, Koll R, Mundlos S, Horn D. Phenotypic variant of Brachydactyly-mental retardation syndrome in a family with an inherited interstitial 2q37.3 microdeletion including HDAC4. Eur J Hum Genet 21: 743–748, 2013.
10. Wein et al. [J Bone Miner Res. 2015 Mar; 30(3): 400–411.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&retmode=ref&cmd=prlinks&id=25271055)
11. Jin Z, Wei W, Huynh H, Wan Y. HDAC9 inhibits osteoclastogenesis via mutual suppression of PPARgamma/RANKL signaling. Mol Endocrinol 29: 730–738, 2015.
12. Hu et al. Diabetes Metab J 2020;44:234-244
13. Myocyte enhancer factor-2 interacting transcriptional repressor (MITR) is a switch that promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis of mesenchymal stem cells by inactivating peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2. J Biol Chem 2011;286:10671-80.
14. Cao Q, Rong S, Repa JJ, St Clair R, Parks JS, Mishra N. Histone deacetylase 9 represses cholesterol efflux and alternatively activated macrophages in atherosclerosis development. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014;34:1871-9.
15. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. J Clin Invest 2015;125:1509-22.
16. Prestel et al. Stroke 2019;50:2651-2660.
17. Traylor et al. a meta-analysis of genome-wide association studies. Lancet Neurol 11:951–962
18. Fan et al. Seizure 2019;73:56-63.
19. Zhong et al. Front Neurol 2019;10 :1171.
20. Min et al. BMC Pediatr 2020;20:97.
21. Pratap et al. The histone deacetylase inhibitor, vorinostat, reduces tumor growth at the metastatic bone site and associated osteolysis, but promotes normal bone loss. Mol Cancer Ther. 2020;9(12):3210-20.
22. Estrada et al. Nat Genet 2012;44(5):491-501.
23. Duncan et al. PLoS Genet 2011;7(4) :e1001372.
24. Marino-Ramirez et al. Expert Rev Proteomics 2005;2(5) :719-729.
25. Choi JE, Mostoslavsky R. Sirtuins, metabolism, and DNA repair. Curr Opin Genet Dev 26C: 24–32, 2014.
26. Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2007;25(21):3109–3115.
27. Xiong et al. Exp Mol Med. 2019 Aug 26;51(8):1-15
28. Pham et al. J Biol Chem 2011;286(14):12056-65.
29. Malhotra et al. Nature Genetics 51, 1580–1587(2019)
30. Ioannidis et al. CMAJ 2009;181: 265-71.
31. Papaioannou et al. CMAJ 2010 Nov 23;182(17):1864-73.
32. Sigurdsson et al. J Bone Miner Res 2008 Oct;23(10):1584-90.
33. Duncan et al. J Bone Miner Res 2003 Aug;18(8):1531-8.
34. Awadalla et al. Int J Epidemiol 2013 Oct;42(5):1285-99.
35. Dupuis et al. JAMA Netw Open 2020;3(4):e202377.
36. Desbiens et al. Nephrol Dial Transplant 2020;35:1712-1721.