



# Criblage d'inhibiteurs potentiels d'HDAC1 : vers une application dans la rechute à l'alcool

Céline Gonzalez

## ► To cite this version:

Céline Gonzalez. Criblage d'inhibiteurs potentiels d'HDAC1 : vers une application dans la rechute à l'alcool. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01299170

**HAL Id: dumas-01299170**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01299170>**

Submitted on 7 Apr 2016

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

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

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 25 septembre 2015

Par Céline Gonzalez

Criblage d'inhibiteurs potentiels d'HDAC1 : vers une application dans la rechute à l'alcool

Laboratoire GRAP, Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances

Directeur : Professeur Mickaël Naassila

JURY

Président : - Pr Mickaël Naassila, professeur

Membres : - Dr Rémi Legastelois, docteur en pharmacie, encadrant  
- Dr Jérôme Jeanblanc, docteur en sciences, co-encadrant  
- Dr Erika Bourguet, maître de conférences

Thèse n°

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'ensemble des membres de mon jury, qui ont accepté d'évaluer mes travaux.

Je tiens à remercier tout particulièrement le professeur Mickaël Naassila, pour son accueil au sein du laboratoire, ses conseils et l'expérience qu'il m'a permis de vivre.

Un grand merci également aux docteurs Jérôme Jeanblanc et Rémi Legastelois, mes maîtres de stage, grâce à qui j'ai pu découvrir le monde de la recherche, faire de nouvelles expériences, ainsi que pour leurs conseils, leur patience et leur pédagogie. Sans oublier leurs excellentes directives pour faire de moi une meilleure oratrice.

Merci au docteur Erika Bourguet, pour sa précieuse expertise dans le domaine de la chimie, pour sa sympathie et sa bonne humeur. Merci de m'avoir permis de vivre cette expérience utile à ma future carrière de pharmacien.

Je voudrais aussi remercier messieurs mes camarades de bureau, Romain Buttolo et Charles-Antoine Papillon, qui ont grandement contribué à rendre ces six mois agréables par leur sympathie et leur amitié, ainsi que Maria del Carmen Gonzalez-Marin, Fabien Coune et Benoît Silvestre de Ferron.

Des remerciements tout particuliers vont à Sophie Lebourgeois, pour son amitié et son aide, et grâce à qui s'occuper de mes chers rats n'a pas été une expérience solitaire.

Je tiens à remercier chaleureusement Elodie Pécourt, pour sa gentillesse et l'aide précieuse qu'elle a bien voulu m'apporter.

Un grand merci au personnel de l'animalerie, Virginie Jeanblanc, Anaïs Jovelet et Ludovic Didier, grâce à qui mes expérimentations animales ont eu lieu dans de très bonnes conditions.

Enfin, merci à mes parents et mes frères, à chaque membre de ma famille, à mes amis, pour leur soutien sans faille depuis que tout cela a commencé.

# Sommaire

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| Remerciements .....                                               | 2  |
| Sommaire .....                                                    | 3  |
| Abréviations .....                                                | 5  |
| Tableaux et figures .....                                         | 7  |
| I- Introduction .....                                             | 9  |
| A. Troubles de la consommation d'alcool .....                     | 9  |
| a. Etat des lieux .....                                           | 9  |
| b. Rechute .....                                                  | 10 |
| c. Traitements existants .....                                    | 12 |
| B. Epigénétique.....                                              | 13 |
| a. Définition.....                                                | 13 |
| b. Mécanisme d'acétylation et de désacétylation des histones..... | 14 |
| c. Les inhibiteurs HDACs.....                                     | 16 |
| d. Effet des iHDACs dans les troubles liés à l'alcool.....        | 18 |
| C. Projet de recherche .....                                      | 20 |
| II- Matériels et méthodes.....                                    | 22 |
| A. Réactifs .....                                                 | 22 |
| B. Animaux.....                                                   | 22 |
| C. Molécules potentiellement inhibitrices HDAC1 .....             | 23 |
| D. Quantification d'activité enzymatique par fluorescence .....   | 23 |
| a. Fonctionnement du kit.....                                     | 23 |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| b. Criblage large .....                                                       | 26 |
| c. Analyse fine .....                                                         | 26 |
| d. Interaction avec la fluorescence .....                                     | 26 |
| E. Validation <i>in vivo</i> .....                                            | 27 |
| a. Auto-administration d'éthanol .....                                        | 27 |
| b. Chirurgie.....                                                             | 27 |
| c. Extinction.....                                                            | 28 |
| d. Injection et rechute.....                                                  | 28 |
| III- Résultats.....                                                           | 30 |
| A. Sélection d'une molécule d'intérêt potentiellement inhibitrice HDAC1 ..... | 30 |
| a. Criblage large.....                                                        | 30 |
| b. Analyse fine.....                                                          | 30 |
| c. Interaction avec la fluorescence .....                                     | 32 |
| d. Sélectivité HDAC1.....                                                     | 33 |
| e. Choix d'une molécule d'intérêt.....                                        | 35 |
| B. Validation <i>in vivo</i> .....                                            | 35 |
| a. Auto-administration d'éthanol .....                                        | 35 |
| b. Extinction .....                                                           | 36 |
| c. Rechute.....                                                               | 37 |
| IV- Discussion.....                                                           | 38 |
| V- Conclusion et perspectives .....                                           | 41 |
| VI-Bibliographie .....                                                        | 42 |
| Annexes .....                                                                 | 46 |

## Abréviations

aCSF : Liquide cérebrospinal artificiel

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

API : Alcoolisation Ponctuelle Importante

BLA : Amygdale basolatérale

Boc : Carbamate de tertibutyle

Cbz : Carbamate de benzyle

CSAPA : Centre de soins, d'Accompagnement et de Prévention en Addictologie

CeA : Amygdale centrale

CeL : Noyau latéral de l'amygdale centrale

CeM : Noyau médial de l'amygdale centrale

DSM : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

DMSO : Diméthylsulfoxyde

FDA : Food and Drug Administration

FR : Fixed Ratio

HAT : Histone acétyltransférase

HDAC : Histone désacétylase

ICMR : Institut de Chimie Moléculaire de Reims

iHDAC : Inhibiteur d'histone désacétylase

NaB : Butyrate de sodium

OFDT : Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

TSA : Trichostatine A

ZBG : Zinc Binding Group

## Tableaux et figures

Figure 1 : Structure de la chromatine

Figure 2 : Acétylation et désacétylation d'un résidu lysine

Figure 3 : Action des HATs et des HDACs sur la chromatine

Figure 4 : Spécificité des HDACs

Figure 5 : La trichostatine A (TSA) présentant les trois domaines du pharmacophore modèle

Figure 6 : Schéma de la réaction du kit

Tableau 1 : Conditions standards de manipulation

Tableau 2 : Concentrations optimales d'enzyme et de substrat

Figure 7 : Implantation de canules dans le noyau central de l'amygdale grâce à l'atlas de Paxinos et Watson

Figure 8 : Pourcentages de fluorescence des molécules testées après criblage large et analyse fine

Figure 9 : Pharmacomodulation pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs

Figure 10 : Pourcentages de fluorescence corrigés des molécules testées

Figure 11 : Inhibition de HDAC1, HDAC3 et HDAC6 par le MS275

Figure 12 : Activité des molécules LM262, LM286 et LM290 sur HDAC1, HDAC3 et HDAC6

Figure 13 : Structure du LM262, choisie comme molécule d'intérêt

Figure 14 : Escalade de la consommation d'alcool des rats lors de la procédure de consommation d'éthanol 20% en libre choix et en accès intermittent

Figure 15 : Nombre d'appuis sur le levier actif lors de la procédure d'auto-administration opérante d'éthanol dans les boîtes de Skinner

Figure 16 : Phase d’extinction – Diminution du nombre d’appuis sur le levier actif par rapport au niveau de base obtenu initialement

Figure 17 : Phase de rechute – Injection du LM262 à J1 et J2 : observation d’une tendance du LM262 à diminuer le niveau de rechute des rats ayant reçu le LM262 par rapport au groupe de rats contrôles

Annexes figure 1 : Cinq familles de molécules synthétisées au sein de l’ICMR

Annexes tableau 1 : Effet des molécules de l’ICMR sur l’activité HDAC1, en pourcentages d’activité brut et corrigé

Annexes figure 2 : Courbes effet-dose HDAC1

Annexes figure 3 : Courbes effet-dose substrat

Annexes figure 4 : Inhibition de l’activité HDAC1 par le MS275 selon les plaques

Annexes figure 5 : Inhibition de l’activité HDAC1 par la TSA, le NaB et le MS275, et détermination de leur IC50 à l’aide de GraphPad Prism

# I- Introduction

## A. Troubles de la consommation d'alcool

### a. Etat des lieux

Deuxième cause de mortalité évitable après le tabac selon l'Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies (OFDT 2014), l'alcool était responsable en 2009 de 49 000 décès (tous âges confondus), que ce soit par cancer (31%), maladie cardiovasculaire (25%), accidents ou suicides (17%), maladie digestive (16%) ou pour d'autres raisons (11%). La consommation d'alcool et son usage problématique s'imposent en France comme un problème de santé publique majeur. Toujours selon l'OFDT, en 2010, 133 000 personnes ont été accueillies dans des CSAPA (Centres de Soins, d'Accompagnement et de Prévention en Addictologie) (Palle et al. 2013). De plus, le nombre d'hospitalisations pour des patients ayant un problème avec l'alcool (diagnostic principal) est toujours en augmentation (147 000 en 2011 contre 93 000 en 2002), ces chiffres ne prenant pas en compte les hospitalisations en établissements psychiatriques. Lorsqu'il s'agit d'un diagnostic associé, les chiffres sont encore plus importants (470 000 en 2011). On estime donc à 20% la proportion de patients hospitalisés ayant un problème avec l'alcool, cette proportion atteignant 30% dans les établissements psychiatriques (Reynaud et al. A paraître).

Cette augmentation des hospitalisations et de la mortalité liées à l'alcool traduit donc une consommation excessive d'alcool dans la population. En 2011, l'OFDT estimait à 44,4 millions des 11-75 ans (population d'environ 49 millions de personnes) le nombre d'expérimentateurs, c'est-à-dire de personnes ayant consommé de l'alcool au moins une fois au cours de leur vie. 41,3 millions d'expérimentateurs sont des consommateurs actuels (ayant consommé dans l'année) et 8,8 millions sont des consommateurs réguliers (trois consommations d'alcool minimum dans la semaine pour les adultes et au moins dix par mois chez les adolescents).

Pourtant, la consommation globale d'alcool est en baisse depuis le début des années 1960 (Palle 2013). Une diminution de moitié de la consommation d'alcool a été observée entre 1961 et 2011, principalement expliquée par la baisse de la consommation de vin. La

proportion de buveurs quotidiens chez les adultes a décru au cours des années 2000, tant chez les hommes que chez les femmes, ce qui explique cette diminution. En revanche, cette tendance s'inverse dans la population adolescente, la proportion des consommateurs réguliers étant en hausse depuis 2008. On peut noter également chez les jeunes un abaissement de l'âge de la première consommation et de la première ivresse (5,8% des collégiens de 11 ans déclarent avoir déjà connu l'ivresse), ainsi qu'un accroissement des comportements de type *binge drinking*.

Le *binge drinking* (ou Alcoolisation Ponctuelle Importante), correspond à l'ingestion de cinq verres d'alcool ou plus en deux heures (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism 2014) ou plus généralement comme l'ingestion d'un maximum de verres en un minimum de temps, afin d'atteindre l'ivresse le plus rapidement possible. Il traduit, selon la cinquième édition du Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux ou DSM-5 (American Psychiatric Association 2013), un usage nocif de la consommation d'alcool. Nocif d'autant plus que les risques de contracter une maladie liée à l'alcool augmentent en fonction de la quantité d'alcool consommée, et non du fait de la régularité de cette consommation (quatre verres consommés par jour pendant une semaine risquent d'entraîner autant de dommages que vingt-huit verres bus en une occasion) (Palle 2013). En plus de ses conséquences sur la santé (diminution des capacités d'apprentissage et de mémorisation, impulsivité accrue, impact sur l'anxiété et l'humeur), cette pratique est responsable chaque année d'accidents de la route, de violences sur autrui, mais également d'un risque de développer une dépendance par la suite. Cette dépendance constitue également un problème de santé publique, source de dommages sanitaires et sociaux pour les individus, que ce soit à titre personnel ou pour la collectivité. Sa prise en charge est complexe du fait de sa chronicité et de son caractère hautement récidivant.

### b. Rechute

Du fait de la complexité des mécanismes liés aux troubles de consommation d'alcool et de l'insuffisance de prise en charge, les chiffres montrent que 70% des patients rechuteront après un an d'abstinence, 90% après quatre ans (Polich 1981; Vaillant et al. 1983) et ce malgré les traitements. En effet, la prise en charge d'un patient présentant des troubles de la

consommation d'alcool est souvent difficile du fait du contexte personnel dans lequel a lieu cette consommation problématique. La prise chronique d'alcool entraîne un effet anxiolytique, qui disparaît à l'arrêt de la consommation. L'anxiété et le stress induits peuvent provoquer la rechute. L'étude des mécanismes impliqués pourrait permettre de comprendre cette proportion très importante de rechute et de mieux la prévenir, en étudiant notamment les mécanismes liés à une structure particulière : l'amygdale.

L'amygdale est une structure cérébrale localisée dans le lobe temporal profond et intégrée au circuit de la récompense (le circuit de la récompense étant un réseau de structures cérébrales impliqué dans l'apprentissage, la motivation, l'affect et sur lequel agissent les drogues). Cette structure est divisée en plusieurs parties, dont le noyau central (CeA, lui-même subdivisé en CeL, noyau latéral de l'amygdale centrale, et CeM, noyau médial de l'amygdale centrale) et le noyau basolatéral (BLA, formé du noyau latéral, basal et basomédial). La CeA est principalement formée de neurones GABAergiques, tandis que la BLA est majoritairement composée de neurones glutamatergiques et d'interneurones inhibiteurs. Entre ces deux structures, la liaison est faite par un réseau de neurones GABAergiques interconnectés, produisant une importante source d'inhibition (Janak et al. 2015).

Les informations environnementales parviennent à l'amygdale grâce au thalamus et au cortex sensoriel, qui se projettent fortement vers la partie latérale de la BLA. Dans la BLA, l'information se transmet donc de la partie latérale vers les parties basale et basomédiale, ainsi que dans la CeA, immédiatement voisine (Janak et al. 2015). La BLA est réciproquement connectée aux régions corticales, plus spécialement au cortex préfrontal, ainsi qu'à l'hippocampe. En revanche, la connexion entre la BLA et la CeA est unidirectionnelle, ce qui pourrait traduire le rôle de la CeA dans la modulation des signaux produits par la BLA et conduisant à l'induction d'un comportement particulier. La CeA et la BLA n'auraient de ce fait pas les mêmes rôles dans le cas de troubles liés à la consommation d'alcool. Il a en effet été montré que l'administration d'alcool n'avait pas les mêmes effets sur ces deux structures (Vilpoux et al. 2009). Elle peut entraîner par exemple une augmentation de l'expression de certaines protéines dans la CeA que l'on ne retrouve pas dans la BLA et inversement.

Il a été démontré un rôle de l'amygdale dans l'induction et l'altération de nombreux comportements, notamment ceux de crainte et d'anxiété (Janak et al. 2015). Ces comportements et déséquilibres seraient eux-mêmes un facteur de risque de rechute lors de troubles addictifs.

### c. Traitements existants

Actuellement, il existe différents traitements des troubles liés à la consommation d'alcool. La prise en charge a différents objectifs que sont le maintien de l'abstinence à long terme et la gestion de la rechute. Cette prise en charge vise à améliorer la qualité de vie du patient et à prévenir les complications dues à une consommation excessive d'alcool, et repose à la fois sur des molécules pharmacologiques et sur les psychothérapies spécifiques et de soutien (par exemple les "Alcooliques Anonymes").

Parmi les molécules actuellement disponibles pour traiter les troubles liés à l'alcool et possédant une AMM (Autorisation de mise sur le marché) dans cette indication, on compte les réducteurs d'appétence que sont l'acamprosate (Aotal®) et la naltrexone (Révia®), ainsi que le disulfirame (Espéral®), médicament à effet antabuse induisant des crises aversives en cas de consommation d'alcool. Le nalméfène (Sélincro®), nouvellement mis sur le marché et possédant l'AMM depuis 2013, démontre des effets positifs sur la diminution de la consommation d'alcool (Paille et al. 2014). Le baclofène, bien que ne possédant pas d'AMM dans le traitement de l'alcoolodépendance, semble permettre une réduction de la consommation, résultats cependant non prouvés. D'autres médicaments sont disponibles pour traiter les manifestations du sevrage alcoolique que sont l'anxiété, la dépression, les troubles psychotiques. Il s'agit entre autres des benzodiazépines comme le diazépam (Valium®), les vitamines B1 et B6 (thiamine et pyridoxine), l'acide folique... (Caulin 2013)

Cependant, ces traitements ne sont pas efficaces chez tous les patients, du fait d'un défaut de prise en charge et d'une forte variabilité individuelle de réponse aux traitements. Comme dit précédemment, cela se traduit par un fort taux de rechute chez les patients essayant d'arrêter leur consommation. Il est donc primordial de trouver de nouveaux traitements efficaces dans la prévention de la rechute, qui cibleraient des mécanismes plus spécifiques.

## B. Epigénétique

### a. Définition

L'épigénétique, qui traduit la relation entre la génétique et l'environnement, se définit comme étant un ensemble de modifications stables de l'expression des gènes pouvant être héréditaires, et ne résultant pas de modifications de la séquence d'ADN (Jaenisch et al. 2003). De plus en plus d'études mettent l'accent sur le rôle de l'épigénétique et l'influence des drogues dans ces mécanismes (Nestler et al. 1997; Nestler 2002; Zwiller 2015).

Le phénotype est donc le résultat de ces mécanismes, qui sont de diverses natures. L'ADN peut être directement modifié par méthylation, ou les histones peuvent être modifiées selon divers mécanismes comme l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation ou l'ubiquitinylation (Spencer et al. 1999). Les histones forment, avec l'ADN, un complexe hautement organisé et très dynamique que l'on appelle la chromatine (figure 1). La sous-unité fondamentale de la chromatine, le nucléosome, est formé d'un octamère d'histones (composé de deux copies des histones H3, H4, H2A et H2B), autour duquel s'enroulent 146 paires de bases d'ADN (Beato et al. 1997; Brenner 2005).

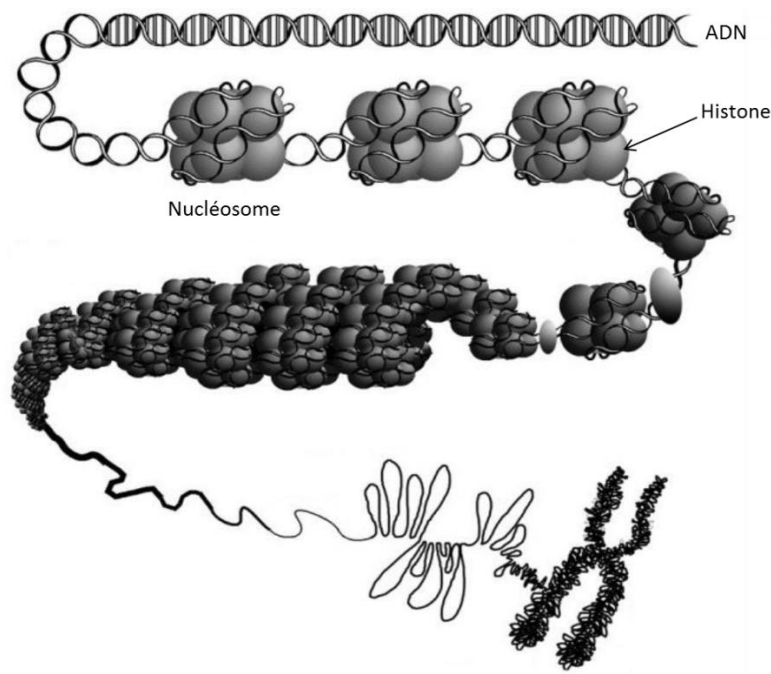


Figure 1. Structure de la chromatine - (Brodeur and Toussaint 2006)

Les mécanismes épigénétiques jouent un rôle sur le degré de compaction de la chromatine. Ils permettent soit de condenser la chromatine en hétérochromatine, forme compactée bloquant la liaison des facteurs de transcription à l'ADN et donc la traduction en protéines, soit de relâcher la chromatine en euchromatine, qui permet alors la transcription des gènes (Jenuwein et al. 2001).

Concernant l'addiction, le mécanisme d'acétylation et de désacétylation des histones semble être le mieux décrit et le plus étudié (Sprow et al. 2014; Kennedy et al 2015; Zwiller 2015), notamment en ce qui concerne les comportements liés à l'addiction à l'alcool (Jeanblanc et al. 2015; Simon-O'Brien et al. 2014; Legastelois et al. 2013).

### b. Mécanisme d'acétylation et de désacétylation des histones

L'acétylation des histones est une modification post-traductionnelle catalysée par des enzymes, les histones acétyltransférases (HATs). A l'inverse, la désacétylation des histones est due à l'activité des histones désacétylases (HDACs). Le mécanisme d'acétylation des histones entraîne le transfert d'un groupe fonctionnel acétyle ( $\text{COCH}_3$ ) provenant de l'acétyl-CoA, principalement au niveau des lysines situées sur la partie N-terminale des histones (Kouzarides 2007) (figure 2).

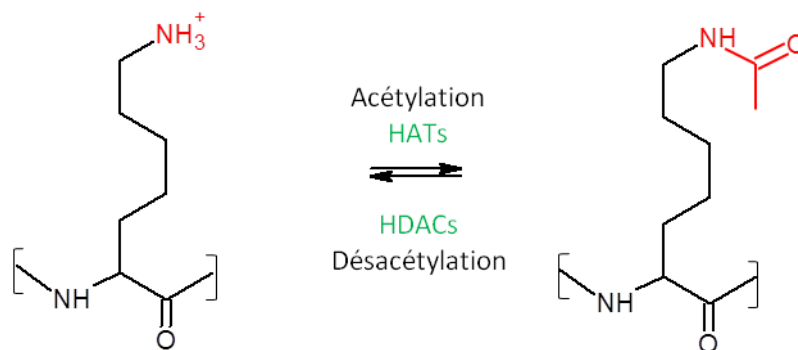


Figure 2. Acétylation et désacétylation d'un résidu lysine - Modifié de (Harrison and Dexter 2013)

La charge positive de la lysine formée par le groupement  $\text{NH}_3^+$  se retrouve neutralisée par le groupement acétyle en devenant un groupement acétate  $\text{NH-COCH}_3$ , réduisant ainsi

l'interaction entre la partie N-terminale des histones et les groupements phosphates négativement chargés de l'ADN. Ce mécanisme permet le relâchement de la chromatine et l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription. A l'inverse, les histones désacétylases enlèvent le groupement acétyle, entraînant la reformation des interactions entre les lysines à charge positive et les phosphates à charge négative, ce qui empêche la transcription des gènes (Kazantsev et al. 2008) (figure 3).

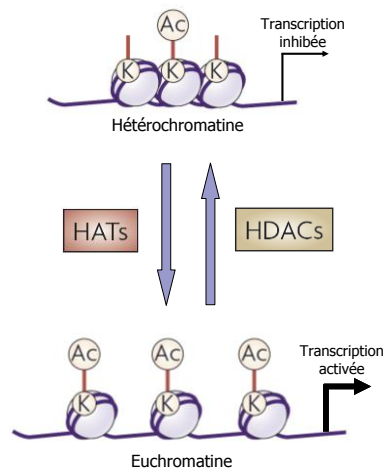


Figure 3. Action des HATs et des HDACs sur la chromatine - Modifié de Kazantsev et Thompson 2008

A ce jour, on compte 18 isoformes des histones désacétylases, réparties en quatre classes (I, II, III et IV). Seules les HDACs de la classe III, ou sirtuines, sont  $\text{NAD}^+$ -dépendantes, les onze autres étant zinc-dépendantes (de Ruijter et al. 2003). Une cartographie des HDACs a été réalisée permettant la localisation des différentes HDACs dans plus de 50 structures cérébrales différentes chez le rat (Broide et al. 2007). Cette cartographie a permis de montrer que la majorité des HDACs des classes I, II et III sont retrouvées dans les structures du circuit de la récompense.

L'étude de l'effet de l'acétylation et de la désacétylation des histones se fait notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteurs des histones désacétylases (iHDACs). L'inhibition de ces enzymes permet d'élucider leur implication dans les diverses pathologies auxquelles elles sont associées.

### c. Les inhibiteurs HDACs

L'importance des inhibiteurs HDACs est de plus en plus manifeste en thérapeutique (Tsapis et al. 2007). Ils agissent en inhibant l'activité des histones désacétylases, augmentent l'acétylation des histones et par conséquent favorisent la transcription des gènes. Les inhibiteurs HDACs sont classés en plusieurs familles selon leur structure : les acides carboxyliques, les acides hydroxamiques, les benzamides et les peptides cycliques (Dokmanovic et al. 2007). Les inhibiteurs des HDACs de classe I, II et IV fonctionnent généralement en chélatant l'ion zinc contenu dans le site actif de l'enzyme, ce qui cause un dysfonctionnement dans le système de transfert de charge et bloque l'accès au site actif de façon réversible.

Le premier inhibiteur HDAC découvert, en 1980, est le butyrate de sodium (NaB). Il peut entraîner une altération de l'expression des gènes et bloquer la prolifération cellulaire, et présente un intérêt dans le traitement de cancers (Davie 2003). Il s'agit d'un acide carboxylique. Il présente une efficacité modérée ( $IC_{50}$  de l'ordre du millimolaire) et inhibe la plupart des HDACs (HDACs des classes I et IIa) (Harrison et al. 2013). L'acide valproïque et le phényle butyrate sont des analogues du butyrate de sodium et présentent une activité similaire.

Le chef de file des inhibiteurs de la famille des acides hydroxamiques est la trichostatine A (TSA). Elle présente une meilleure efficacité étant donné que son  $IC_{50}$  avoisine le nanomolaire. Cependant, l'utilisation de ce composé a été restreinte du fait de sa forte toxicité. Il s'agit d'un inhibiteur à large spectre, ciblant l'intégralité des classes I et II (Khan et al. 2008; Harrison et al. 2013).

Parmi les inhibiteurs HDACs de type benzamide et possédant un groupement carbamate, le MS275 semble plus sélectif de HDAC1 (Nishioka et al. 2008). Il entraîne des effets cytotoxiques sur la croissance cellulaire (Jaboin et al. 2002).

Les inhibiteurs les plus sélectifs sont les peptides cycliques ou plus exactement des cyclodepsipeptides. Les plus connus sont la romidepsine (FK228) et le largazole. La romidepsine a pour intérêt majeur d'inhiber fortement HDAC1 et 2, à de faibles

concentrations, après avoir été réduite en redFK228, et a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement du lymphome cutané en 2009 (Behera et al. 2015). Le largazole quant à lui est plus actif après avoir été réduit en largazole thiol (il peut de cette façon chélater l'ion zinc) et est un inhibiteur des HDACs de classe I (Kim et al. 2014). Ces molécules sont considérées comme des pro-drogues.

Ces inhibiteurs peuvent être classés en fonction de leur spécificité, selon qu'ils sont à large spectre comme le butyrate de sodium et la TSA ou plus spécifiques comme le MS275 ou la romidepsine (figure 4) (Harrison et al. 2013). Cette spécificité s'expliquerait selon leur structure moléculaire.

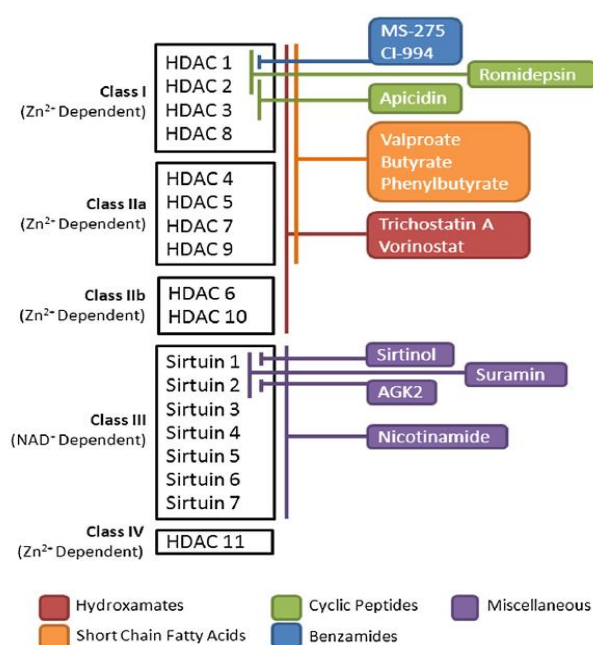


Figure 4. Spécificité des iHDACs. HDAC : histone désacétylase;

NAD<sup>+</sup> : nicotinamide; Zn<sup>2+</sup> : zinc - (Harrison and Dexter 2013)

L'étude structurale de ces inhibiteurs HDACs par l'équipe de Chavan et al. a permis de définir un pharmacophore modèle, pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs. Ce pharmacophore modèle se compose d'un domaine de reconnaissance (tête) formé généralement d'une région hydrophobe très souvent aromatique, d'un domaine de liaison ou espaceur, linéaire ou aromatique et enfin d'un groupe de liaison à l'ion zinc, le ZBG (Zinc

Binding Group). L'inhibiteur HDAC déjà connu correspondant à ce modèle est la TSA (figure 5).

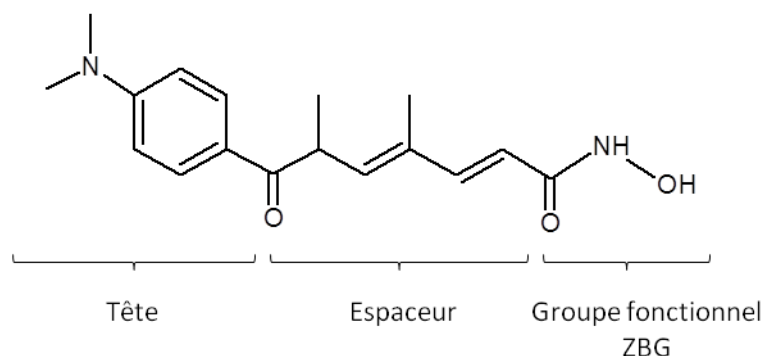


Figure 5. La trichostatine A (TSA) présentant les trois domaines du pharmacophore modèle

Un nouveau type de groupement fonctionnel pouvant chélater l'ion zinc a depuis peu été conçu à Reims. Il s'agit d'un ZBG de type alkyl ou arylsulfonylhydrazide ( $R-SO_2-NH-NH-CO-R'$ ), qui du fait de la complexation entre l'atome d'azote du sulfonamide, l'atome d'oxygène du carbonyle et/ou l'un des atomes d'oxygène du groupement  $SO_2$  avec l'ion zinc, permettrait une diminution de la toxicité, une meilleure sélectivité et une meilleure stabilité (Augé et al. 2003; Rouffet et al. 2009). 39 molécules ont été synthétisées au sein de l'ICMR sur ce modèle.

#### d. Effet des iHDACs dans les troubles liés à l'alcool

L'alcool, administré de façon aiguë, aurait un effet inhibiteur HDAC, ce qui peut expliquer qu'une prise aiguë d'alcool entraîne une augmentation de la transcription des gènes par augmentation de l'acétylation des histones (Pandey et al. 2008). Cependant, chez les personnes dépendantes à l'alcool, cet effet est diminué et serait associé à une augmentation de l'activité des histones désacétylases ainsi qu'à une diminution de l'acétylation des histones H3 et H4 dans les régions amygdaliennes du cerveau (Pandey et al. 2008; Alaux-Cantin et al. 2013).

L'étude des troubles liés à la consommation d'alcool est réalisée à l'aide de divers modèles animaux, qui permettent de modéliser des comportements pour en étudier les mécanismes. Ainsi, le comportement de *binge drinking* peut être induit chez l'animal selon un protocole établi et utilisé au sein du laboratoire. Pour cela, l'appétence de rats envers

l'alcool est augmentée par la mise à disposition de deux bouteilles, l'une contenant de l'eau et l'autre une solution d'alcool, en libre choix et en accès intermittent. Cette expérience permet d'observer l'escalade de la consommation d'alcool, ainsi que la perte de contrôle de la consommation. Les animaux sont ensuite placés dans des boîtes de Skinner, dans le cadre d'une procédure d'auto-administration opérante d'alcool, où ils doivent appuyer sur un levier pour obtenir de l'alcool, ce qui permet d'observer cette fois la motivation à consommer ainsi que la recherche d'alcool ou *seeking* (Carnicella et al. 2014). A l'issue de cette expérience, l'animal s'administre de fortes quantités d'alcool, pouvant être supérieures à 1g d'éthanol/kg en 15 minutes, ce qui correspond à ce que l'on retrouve chez l'homme après *binge drinking* (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism 2014).

La rechute peut également être modélisée chez l'animal. Suite à l'induction d'un comportement de type *binge drinking*, l'animal est de nouveau placé dans les boîtes de Skinner, mais l'appui sur le levier actif n'entraîne plus la libération d'éthanol. Il va de cette façon « éteindre » son comportement (phase d'extinction), c'est-à-dire qu'il arrête d'appuyer sur le levier. L'induction de la rechute se fait ensuite par ré-activation du levier entraînant la libération d'éthanol (phase de ré-acquisition). La mise à disposition soudaine d'alcool conduit l'animal à appuyer de nouveau sur le levier, parfois à des niveaux encore plus élevés qu'avant l'extinction (Jeanblanc et al. 2015).

Pour induire une dépendance à l'alcool, le seul modèle permettant d'obtenir chez le rat un état proche de ce que l'on observe chez l'Homme alcoolodépendant est une procédure dite d'inhalation chronique et intermittente de vapeurs d'alcool. Lors de cette procédure, l'animal est placé dans des chambres où il inhale des vapeurs d'éthanol, par intermittence, jusqu'à présenter des signes physiques de dépendance (Simon-O'Brien et al. 2014).

Grâce à ces modèles de *binge drinking* et de dépendance à l'alcool, le butyrate de sodium a été étudié chez l'animal. Son administration chez le rat dépendant a entraîné une diminution de la consommation excessive d'alcool, mais pas chez le rat non-dépendant. Elle a également entraîné une diminution de l'escalade de la consommation lors de la procédure de mise à disposition d'alcool en accès intermittent, ainsi qu'un effet préventif sur la rechute (Simon-O'Brien et al. 2014).

Le MS275, un inhibiteur plus spécifique de l'isoforme HDAC1, mais qui inhiberait aussi d'autres isoformes (HDAC2, HDAC3, HDAC9) (Khan et al. 2008) malgré ce qui a été décrit par Harrison et Dexter (Harrison and Dexter 2013), a également été testé chez le rat non dépendant lors d'une procédure de type *binge drinking* (auto-administration opérante d'alcool pendant 15 minutes), puis de rechute (Jeanblanc et al. 2015) et a entraîné une diminution de la motivation à consommer de l'alcool ainsi qu'une diminution du niveau de rechute, ce qui confirme l'intérêt thérapeutique potentiel de cibler les mécanismes épigénétiques impliqués dans la consommation excessive d'alcool et renforce l'intérêt d'étudier spécifiquement les différentes isoformes HDACs (Al Ameri et al. 2014).

Une molécule synthétisée au sein de l'ICMR, EBGA8-2 ( $\text{Me-SO}_2\text{-NH-NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO-O-CH}_2\text{-Ph}$ ), possédant une structure correspondant au pharmacophore modèle établi par l'équipe du Dr Bourguet, a déjà été testée au laboratoire et a entraîné une diminution de la consommation d'alcool chez le rat ainsi qu'un effet sur le mécanisme de rechute (résultats non publiés). Cette molécule serait également plus spécifique de l'isoforme HDAC1. C'est pourquoi il semble d'autant plus intéressant d'étudier et de tester les nouvelles molécules synthétisées à Reims et potentiellement inhibitrices uniquement de l'isoforme HDAC1.

### C. Projet de recherche

Dans la continuité des travaux ayant permis de montrer l'effet d'inhibiteurs HDACs à large spectre comme le butyrate de sodium, puis d'inhibiteurs plus sélectifs comme le MS275, sur la consommation d'alcool et la rechute, il s'est avéré intéressant de tester de nouvelles molécules potentiellement inhibitrices d'une isoforme HDAC particulière, l'HDAC1, et d'étudier leur effet sur l'amygdale, structure cérébrale impliquée dans le mécanisme de rechute.

39 molécules ont été synthétisées au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims, selon une structure qui leur donnerait une spécificité pour HDAC1. Dans le cadre de mon projet, j'ai donc effectué dans un premier temps un criblage *in vitro* de ces molécules, afin de sélectionner celles qui seraient les plus inhibitrices de HDAC1, grâce à une méthode de quantification d'activité enzymatique par fluorescence. J'ai testé les molécules sélectionnées sur d'autres isoformes HDACs, à savoir HDAC3 et HDAC6, deux isoformes appartenant à deux

classes différentes, classes I et IIb respectivement (Harrison et al. 2013), selon la même méthode de quantification d'activité enzymatique. Ce test a permis de choisir la molécule la plus spécifique d'HDAC1 parmi les 39 testées.

L'appétence pour l'alcool de 30 rats a été augmentée par mise à disposition de deux bouteilles, l'une contenant de l'eau et l'autre une solution d'alcool, en libre choix et en accès intermittent. Ces rats ont ensuite été soumis à une procédure d'auto-administration opérante d'alcool de type *binge drinking*. Pour permettre l'injection de la molécule et observer son effet sur le comportement lors de la rechute, des canules ont été implantées dans le noyau central de l'amygdale par chirurgie stéréotaxique, puis les rats ont été de nouveau entraînés dans les boîtes de Skinner.

Suite à l'extinction du comportement de recherche d'alcool des rats, le test permettant d'évaluer l'effet de notre molécule d'intérêt sur la rechute a été réalisé sur un petit nombre de rats, ce qui nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires.

Ces recherches ont été menées à la fois afin d'améliorer nos connaissances en recherche fondamentale dans les mécanismes impliqués lors de comportements de consommation excessive d'alcool, mais également en vue de rechercher de nouvelles molécules potentiellement utilisables en thérapeutique, présentant un avantage de sélectivité et donc de réduction d'effets indésirables.

## II- Matériels et méthodes

### A. Réactifs

Les expériences *in vitro* ont été réalisées grâce à trois kits Fluor de Lys® (Enzo®, Villeurbanne, France) : BML-AK511-0001 (HDAC1), BML-AK531-0001 (HDAC3) et BML-AK516-0001 (HDAC6).

Les molécules testées ont été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France) pour les expériences *in vitro*, puis dans une solution de aCSF (liquide céphalorachidien artificiel) (CMA Microdialysis, Solna, Suisse) pour les expériences *in vivo*.

L'éthanol à 96% (VWR Prolabo, Fontenay-sous-bois, France) est dilué à 20% v/v dans de l'eau.

De l'isoflurane pour l'anesthésie des animaux lors des chirurgies a été obtenu de Sigma-Aldrich et la colle vétérinaire utilisée pour refermer les plaies après chirurgie provient de 3M, Beauchamp, France.

### B. Animaux

Les expérimentations ont été réalisées sur trente rats mâles Long-Evans provenant du Centre d'élevage Roger Janvier (Janvier Laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France). Ils étaient âgés de sept-huit semaines et pesaient entre 230 et 250 g à la livraison. Les rats Long-Evans sont connus pour avoir de bonnes capacités d'apprentissage et ont déjà été beaucoup utilisés dans la recherche sur l'addiction aux drogues, notamment à l'alcool.

Les rats ont été hébergés dans des cages individuelles (NexGen Ecoflo, Allentown), avec accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, sur des portoirs ventilés avec une température contrôlée de  $21\pm1^{\circ}\text{C}$  et une hygrométrie de 50%. Les rats sont soumis à un cycle artificiel jour/nuit 12h/12h (jour entre 8h et 20h). Les rats ont été pesés chaque semaine, et les

expérimentations ont commencé dix jours après leur arrivée (afin de permettre l'acclimatation des animaux à leur nouvel environnement).

L'ensemble des manipulations réalisées sur l'animal est en accord avec les principes éthiques et les guides d'utilisation des animaux de laboratoire (National Institute of Health) adoptés par la Communauté Européenne (directive CEE No 86/609) et a été approuvé par le comité local d'éthique (CREMEAP).

### **C. Molécules potentiellement inhibitrices HDAC1**

Les 39 molécules testées ont été synthétisées au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), par l'équipe du Dr Erika Bourguet. Il s'agit de molécules qui ont en commun un groupement carbamate ( $R-HN-(C=O)O-R'$ ). Ces molécules possèdent toutes un ZBG (Zinc Binding Group) de type sulfonylhydrazide (alkyl ou arylsulfonylhydrazide), groupe fonctionnel chélatant l'ion zinc contenu dans le site catalytique des histones désacétylases et permettant ainsi d'inhiber l'activité de ces enzymes.

Ces molécules sont classées en cinq familles en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaîne du bras espaceur ( $n=1$  ou  $n=2$ ), du groupement ZBG (mésyle ou tosyle) et de la structure du domaine de reconnaissance (pyridine, groupement Cbz ou Boc). (Annexes figure 1)

### **D. Quantification d'activité enzymatique par fluorescence**

#### **a. Fonctionnement du kit**

La réaction se déroule de la façon suivante (figure 6) : le substrat acétylé est mis en présence de l'enzyme HDAC, qui entraîne la désacétylation de ce substrat. L'ajout de Developer et son interaction avec le substrat désacétylé permet la formation d'un fluorophore. Une fois excité à 360 nm, le fluorophore émet une fluorescence à 460 nm détectée dans un lecteur de plaques à fluorométrie (Tecan Infinite M200 PRO). La fluorescence émise par le substrat désacétylé est donc corrélée à l'efficacité de l'enzyme. La présence d'un inhibiteur HDAC entraîne une diminution de la fluorescence émise.

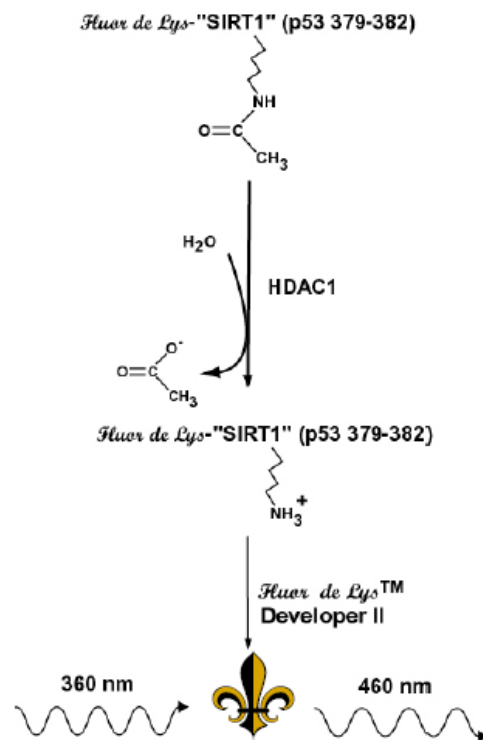


Figure 6. Schéma de la réaction du kit BML-AK511-0001 - Enzo life sciences

Des puits contrôles ont été définis (blancs, contrôles positifs, contrôles négatifs). La TSA est utilisée dans les puits contrôles positifs ; les puits contrôles négatifs ne contiennent pas d'inhibiteur et émettent la fluorescence maximum. Les blancs ne contiennent qu'une solution tampon avec le substrat et émettent la fluorescence minimale. La quantité de réactif mise dans chaque puits est fixe. La réaction se déroule dans un volume fixe de 50  $\mu\text{L}$ . On ajoute finalement 50  $\mu\text{L}$  de Developer, pour un volume final dans chaque puits de 100  $\mu\text{L}$  (tableau 1).

| Echantillon             | HDAC Assay Buffer<br>II | HDAC (diluée) | Inhibiteur | Substrat Fluor de<br>Lys |
|-------------------------|-------------------------|---------------|------------|--------------------------|
| Blanc (pas<br>d'enzyme) | 25 µL                   | 0             | 0          | 25 µL                    |
| Contrôle négatif        | 10 µL                   | 15 µL         | 0          | 25 µL                    |
| Contrôle positif        | 0                       | 15 µL         | 10 µL      | 25 µL                    |
| Echantillon             | 0                       | 15 µL         | 10 µL      | 25 µL                    |

Tableau 1. Conditions standards de manipulation

Les conditions optimales de concentrations d'enzyme et de substrat pour HDAC1 ont été définies après réalisation de courbes effet-dose HDAC et effet-dose substrat (Annexes figures 2 et 3), à partir d'une fourchette de concentrations recommandée par les fabricants du kit. Les concentrations ainsi définies correspondent aux concentrations intermédiaires recommandées, les conditions optimales pour HDAC3 et HDAC6 ont été choisies pour les mêmes concentrations intermédiaires et ont permis d'obtenir une quantité de fluorescence intermédiaire, c'est-à-dire ni trop basse (difficile à interpréter), ni trop élevée (risque d'observer un plateau qui masquerait le niveau de fluorescence réel) (tableau 2).

|          | Plaque HDAC1 | Plaque HDAC3 | Plaque HDAC6 |
|----------|--------------|--------------|--------------|
| Substrat | 5 µM         | 3 µM         | 5 µM         |
| Enzyme   | 0,3 µg/puits | 10 ng/puits  | 0,4 µg/puits |

Tableau 2. Concentrations optimales d'enzyme et de substrat

Le MS275 a été testé dans toutes les plaques afin de vérifier le bon fonctionnement du kit et la bonne reproductibilité de l'expérience. Il a de cette façon été utilisé comme contrôle interne. Le tracé de sa courbe d'activité a permis le calcul de son IC<sub>50</sub> (Annexes figure 4).

Le butyrate de sodium (NaB) et la TSA ont également été testés, pour permettre le calcul de leur IC<sub>50</sub> et la comparaison de ces données avec celles de la littérature. Cette comparaison montre une adéquation de ces résultats avec ceux de la littérature, prouvant de nouveau le bon fonctionnement du kit Fluor de Lys® (Annexes figure 5).

## b. Criblage large

Un premier criblage de toutes les molécules a été réalisé, pour chaque molécule selon une fourchette de concentrations très large (six concentrations différentes) afin de pouvoir observer dans quelle zone de concentration la molécule est efficace sur HDAC1. Chaque concentration a été mesurée dans un puits unique. Ce criblage a été réalisé afin d'optimiser le nombre de plaques à utiliser.

## c. Analyse fine

Afin d'améliorer la précision et de pallier les variations de fluorescence pouvant exister dans les puits du fait des imprécisions lors de la manipulation, les molécules identifiées lors du criblage large comme étant intéressantes (c'est-à-dire celles répondant aux critères de sélection choisis suite au criblage large) ont été analysées de façon plus précise, après ajustement des concentrations dans la zone d'efficacité de la molécule. Chaque concentration a été testée dans deux puits et la moyenne de la fluorescence obtenue calculée.

## d. Interaction avec la fluorescence

Sachant que les molécules pourraient avoir une interaction avec le fluorophore (ou signal fluorescent), un test supplémentaire a été réalisé. Pour ce faire, et selon les recommandations des fabricants du kit pour détecter une interaction, un « spike » de Standard Désacétylé (substrat déjà désacétylé), dont la concentration a été choisie après réalisation d'une courbe d'étalonnage et produisant une quantité de fluorescence connue, a été ajouté dans chaque puits. Cette fluorescence supplémentaire a ensuite été lue dans le lecteur de plaques à fluorométrie. La différence entre la fluorescence obtenue après ajout du « spike » et la fluorescence initiale dans les puits contrôles permet de définir un standard interne, qui doit être identique dans tous les puits si les molécules n'interagissent pas avec le signal fluorescent. Ce standard interne permet alors de définir si les molécules augmentent ou diminuent le signal fluorescent.

## E. Validation in vivo

### a. Auto-administration d'éthanol

Afin d'augmenter l'appétence des rats pour l'alcool, deux bouteilles ont été mises à leur disposition, l'une contenant de l'eau et l'autre contenant de l'éthanol à 20%, pendant des sessions de 24h, un jour sur deux (les lundis, mercredis et vendredis) durant près de quatre semaines. En dehors de ces sessions, les rats n'ont accès qu'à l'eau. Après chaque session, les bouteilles d'eau et d'éthanol sont pesées afin d'évaluer la quantité d'éthanol consommée par kilo en 24h. A cette quantité est soustraite la perte de liquide due à l'installation des bouteilles et l'évaporation (définie par pesée de bouteilles d'eau et d'éthanol installées dans des cages vides).

Les rats ont ensuite été entraînés à travailler pour obtenir l'éthanol. Pour cela, ils ont été placés dans des boîtes de Skinner (Bioseb, France), où ils doivent appuyer sur le levier actif (le levier inactif ne permet pas la libération d'éthanol) pour obtenir une récompense (0,1 mL d'éthanol à 20%). L'appui sur le levier actif et l'obtention de cette récompense s'accompagne d'un stimulus lumineux. Ce premier entraînement s'est effectué lors de deux sessions de nuit, pendant 16h, avec un *Fixed Ratio* (FR) de 1 (un appui = une récompense). A l'issue de cette phase d'entraînement, les rats ont continué leur apprentissage dans les boîtes de Skinner lors de sessions de jour de plus en plus courtes (15 minutes à l'issue de l'apprentissage) avec un travail de plus en plus important à fournir (FR3 : trois appuis pour obtenir une récompense).

Le nombre d'appuis sur les leviers actif et inactif est comptabilisé et enregistré par le logiciel PackWin (Bioseb, France) et permet de suivre l'évolution de l'apprentissage des rats.

### b. Chirurgie

Des canules (12mm) ont été implantées dans le noyau central de l'amygdale, en bilatéral, après plus d'un mois d'apprentissage dans les boîtes de Skinner. L'implantation a été faite grâce à un cadre de chirurgie stéréotaxique à l'aide des coordonnées de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos et al. 2013) (figure 7), qui permettent de cibler directement ces structures.

Durant la chirurgie, les rats ont été anesthésiés en continue avec de l'isoflurane. Les canules ont été fixées à la boîte crânienne avec du ciment dentaire.

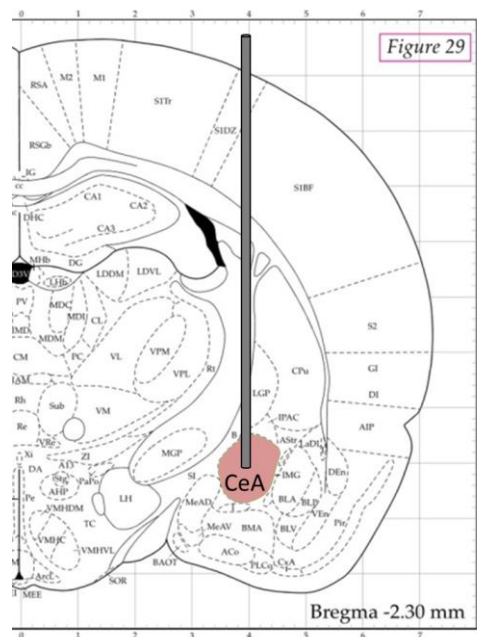


Figure 7. Implantation de canules dans le noyau central de l'amygdale grâce à l'atlas de Paxinos et Watson

### c. Extinction

Après quelques jours pour permettre aux rats de s'adapter, ils ont de nouveau été soumis au protocole d'auto-administration. Après que les rats aient retrouvé le niveau moyen d'appuis sur le levier actif qu'ils avaient atteint avant la chirurgie, une extinction du comportement de recherche de drogue a été induite, c'est-à-dire que l'appui sur le levier actif ne permet plus la libération d'alcool. Cette phase dure jusqu'à ce que les rats diminuent drastiquement leur nombre d'appuis sur le levier actif (inférieur à 20% du nombre d'appuis avant extinction).

### d. Injection et rechute

La molécule (500  $\mu$ M) est injectée dans le noyau central de l'amygdale de six rats grâce à une pompe pousse-seringues (Harvard 11 Plus Advanced, Phymep, France) et des seringues Hamilton de 25  $\mu$ L (1702N, Bonaduz, Suisse). Six autres rats ont reçu de l'aCSF. 0,5  $\mu$ L de chaque solution ont été injectés en une minute, en bilatéral. Puis la phase de rechute est induite. Les rats ont alors eu de nouveau accès à l'alcool dans les boîtes de Skinner lors de

sessions de 15 minutes, ce qui induit une rechute traduite par une augmentation conséquente du nombre d'appuis sur le levier actif.

### III- Résultats

#### A. Sélection d'une molécule d'intérêt potentiellement inhibitrice HDAC1

##### a. Criblage large

Les 39 molécules ont été testées pour HDAC1 afin de faire une première sélection des molécules intéressantes, donc des molécules qui entraîneraient la plus forte inhibition d'HDAC1.

Quatre types d'effet ont ainsi pu être observés : certaines molécules n'ont pas montré d'effet aux doses testées, d'autres ont présenté un effet biphasique en « U » ou en « U inversé ». Une quinzaine de molécules ont, comme attendu, entraîné une inhibition de l'activité de HDAC1. De façon plus surprenante, cependant, certaines molécules ont entraîné une forte hausse de la fluorescence pouvant traduire une augmentation de l'activité de HDAC1 (Annexes tableau 1).

##### b. Analyse fine

Sur les 39 molécules testées, dix ont été sélectionnées pour être testées de nouveau, de façon plus précise (Annexes tableau 1). Les inhibiteurs choisis pour être testés en analyse fine étaient ceux qui présentaient l'activité inhibitrice sur HDAC1 la plus efficace. Une molécule à effet biphasique a également été testée de nouveau, ainsi que deux activateurs, qui pourraient présenter un intérêt dans le cadre d'une autre étude. L'analyse fine a permis, pour les inhibiteurs et les activateurs sélectionnés, de confirmer l'effet observé lors du criblage. Pour la molécule à effet biphasique, en revanche, cette analyse plus précise a révélé qu'elle n'a, en réalité, pas d'effet aux doses testées.

Grâce au criblage large et à l'analyse fine, un classement de toutes les molécules a pu être réalisé en fonction de leur action sur l'activité d'HDAC1, de celles qui sont inhibitrices à celles qui semblent au contraire avoir une action plus « activatrice » sur HDAC1 (figure 8).

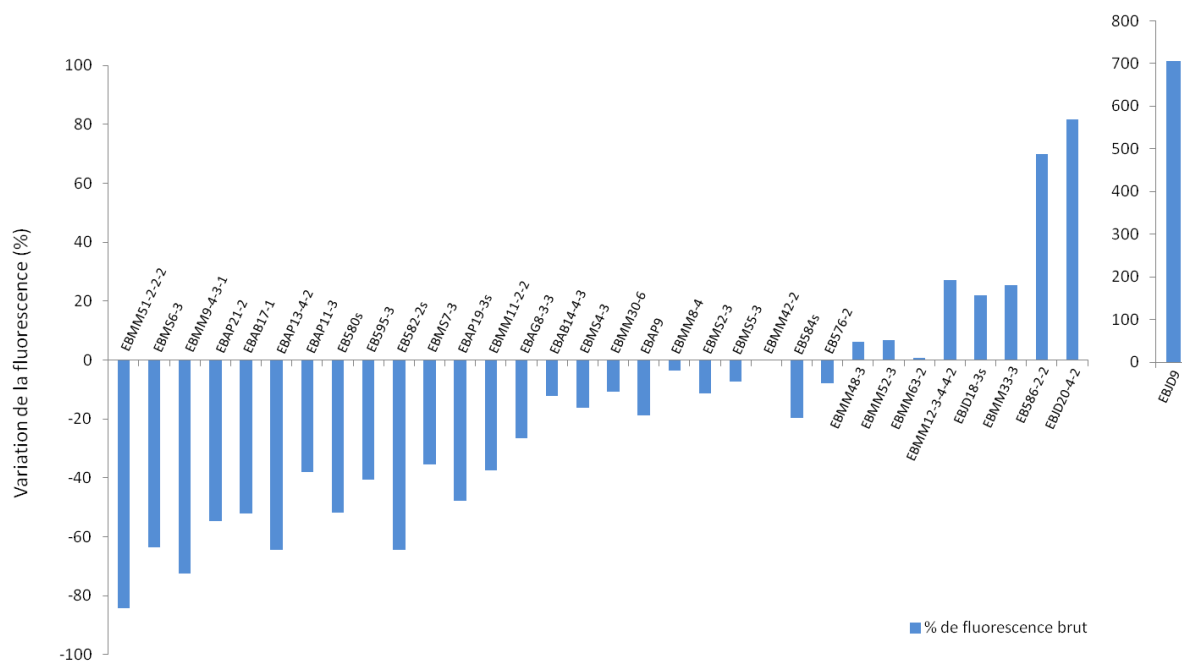


Figure 8. Pourcentages de fluorescence des molécules testées après criblage large et analyse fine. Les molécules ayant un pourcentage de fluorescence négatif semblent inhibitrices, celles ayant un pourcentage de fluorescence positif semblent activatrices.

Ces analyses ont également permis de dégager une structure (longueur de chaîne et groupement fonctionnel) qui semble avoir la plus grande efficacité, étant donné que toutes les molécules de cette « famille » inhibent HDAC1. Il s'agit des molécules dont le groupement fonctionnel ZBG est un alkylsulfonylhydrazide ( $-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{CH}_3$ ) et ayant un nombre d'atomes de carbone de la chaîne du bras espaceur de 2.

A partir de cette structure moléculaire, de nouveaux inhibiteurs ont été synthétisés au sein de l'ICMR par ajout d'une « tête » de type cyclodepsipeptide, sur le modèle de certains inhibiteurs HDACs (redFK228, largazole thiol), et devant conférer aux inhibiteurs à la fois une meilleure efficacité et une meilleure sélectivité pour HDAC1. Trois nouvelles molécules ont de cette façon été synthétisées au sein de l'ICMR, le LM262 ( $\text{X}=\text{O}$ ), le LM286 ( $\text{X}=\text{S}$ ) et le LM290 ( $\text{X}=\text{CH}=\text{CH}$ ) (figure 9).

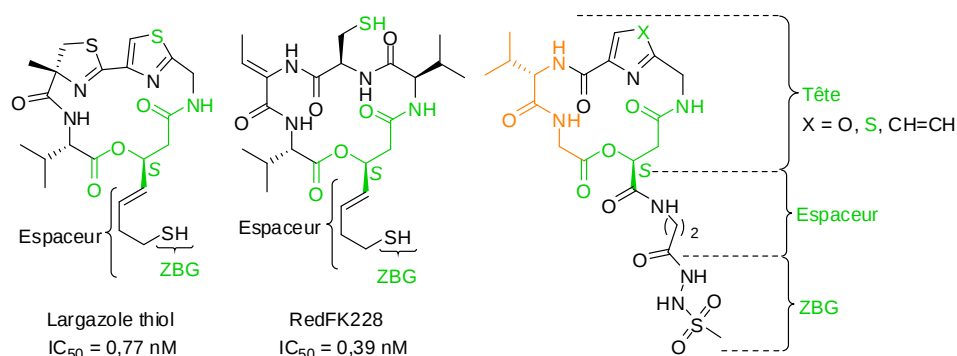


Figure 9. Pharmacomodulation pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs. Les zones vertes sont les parties en commun entre les peptides cycliques déjà connus et les nouvelles molécules synthétisées et les zones en orange sont les éléments testés en pharmacomodulation qui ont permis d'améliorer la sélectivité (Létévé, rapport d'avancement 2014)

### c. Interaction avec la fluorescence

La plupart des molécules présentent une interaction avec le signal fluorescent. Certaines augmentent le signal produit par le « spike » de Standard Désacétylé, et d'autres le diminuent, ce qui induit un biais lors de l'évaluation de l'activité des molécules sur HDAC1. Nous avons donc effectué une correction de la fluorescence brute obtenue initialement, à l'aide du standard interne. L'activité réelle sur HDAC1 des molécules qui diminuent le signal fluorescent, sous-estimée, est donc en réalité plus élevée en ce qui concerne les activateurs et plus faible pour les inhibiteurs. Au contraire, celle des molécules qui l'augmentent, surestimée, est en réalité plus basse pour les activateurs et plus élevée pour les inhibiteurs (figure 10).

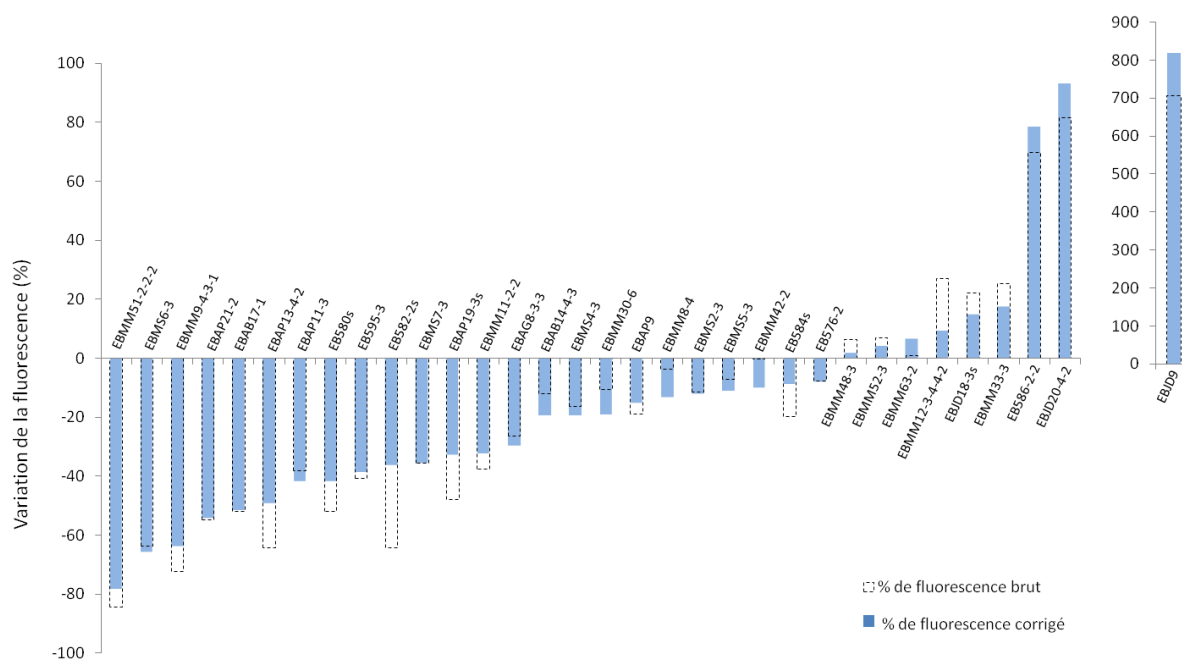


Figure 10. Pourcentages de fluorescence corrigés des molécules testées

#### d. Sélectivité HDAC1

Les molécules sélectionnées à l'issue de l'analyse fine ont été testées pour HDAC3 et HDAC6. Les résultats montrent que certaines ne sont pas sélectives, tandis que d'autres inhibent soit HDAC3, soit HDAC6.

En ce qui concerne le MS275, testé également en tant que contrôle interne pour HDAC3 et HDAC6, les résultats montrent qu'il inhibe les trois isoformes, avec une efficacité plus élevée pour HDAC1 ( $IC_{50} = 8 \mu M$ ) que pour HDAC3 ( $IC_{50} = 80 \mu M$ ) et HDAC6 ( $IC_{50} = 1 mM$ ) (figure 11). Ces résultats sont plus ou moins en adéquation avec ceux retrouvés dans la littérature, étant donné que, s'il inhibe effectivement l'activité de HDAC1 et HDAC3, il ne montre pas de sélectivité pour HDAC6 (Khan et al. 2008).

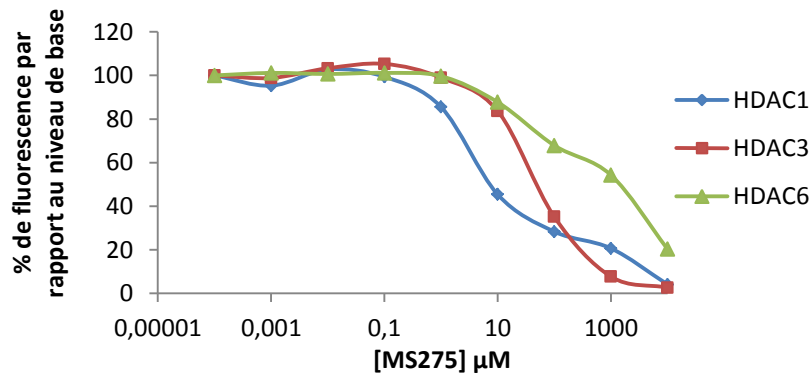


Figure 11. Inhibition de HDAC1, HDAC3 et HDAC6 par le MS275

Les nouveaux inhibiteurs de type cyclodépsipeptides ont été testés pour HDAC1, HDAC3 et HDAC6 (figure 12). Le LM262 semble inhiber HDAC1 et HDAC3, mais pas HDAC6. Le LM286 semble inhiber les trois isoformes avec la même efficacité. En revanche, le LM290 n'inhibe aucune des trois HDACs aux doses testées.

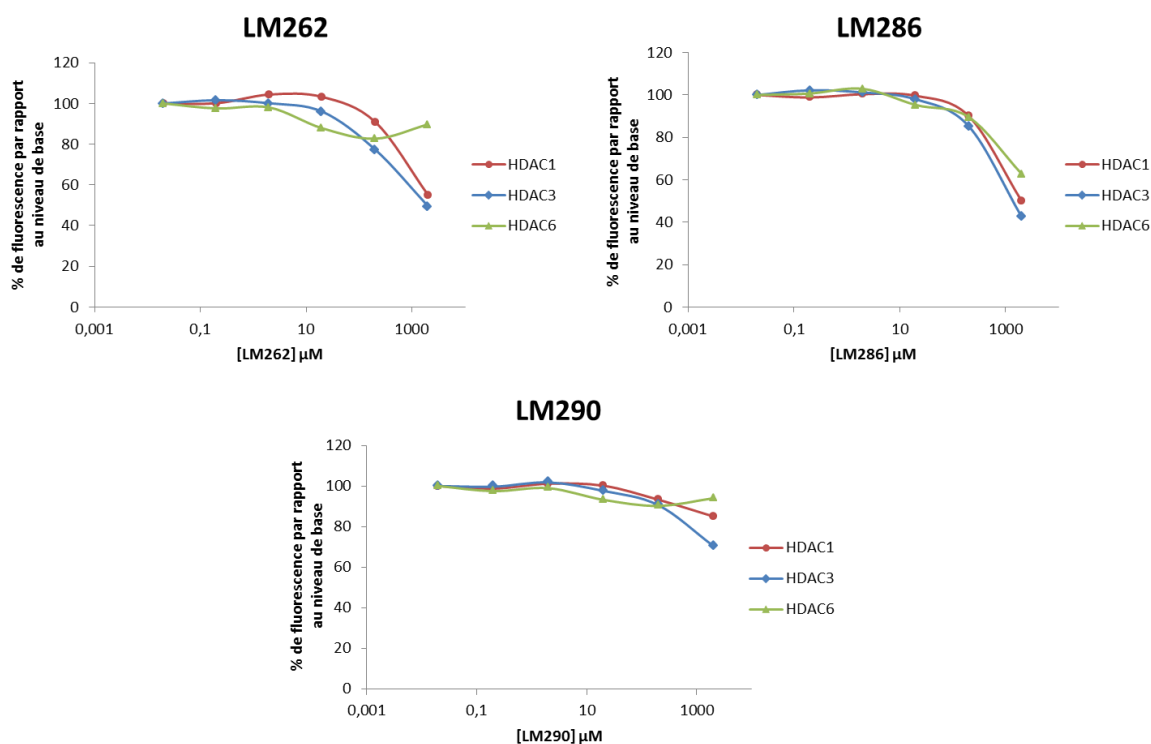


Figure 12. Activité des molécules LM262, LM286 et LM290 sur HDAC1, HDAC3 et HDAC6



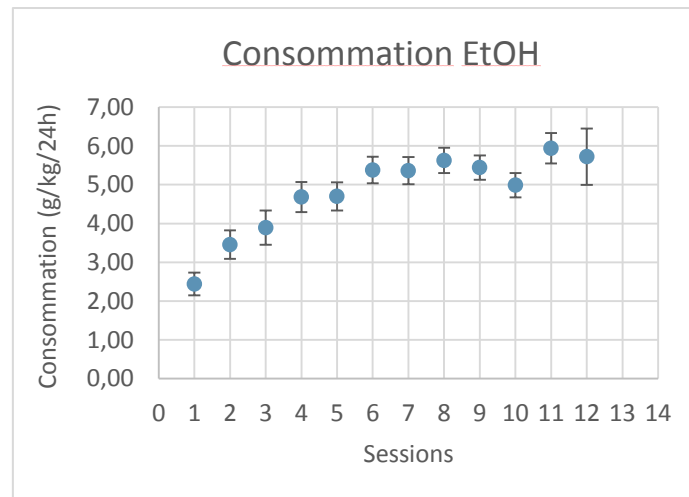


Figure 14. Escalade de la consommation d'alcool des rats lors de la procédure de consommation d'éthanol 20% en libre choix et en accès intermittent

Suite à leur apprentissage dans les boîtes de Skinner, les rats ont atteint un niveau stable d'appuis sur le levier actif, qui correspond à une consommation d'éthanol de 0,92g/kg/15 minutes (figure 15).

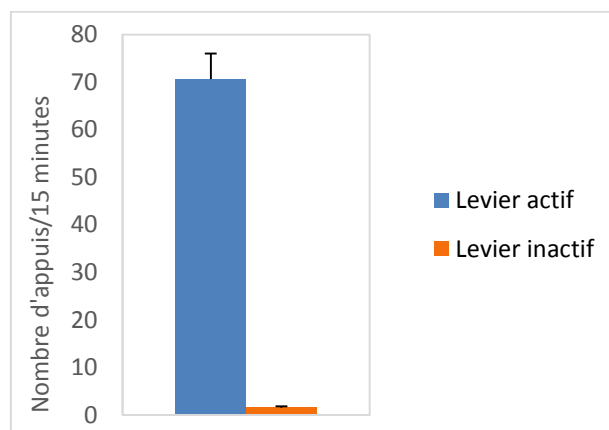


Figure 15. Nombre d'appuis sur le levier actif lors de la procédure d'auto-administration opérante d'éthanol dans les boîtes de Skinner

### b. Extinction

Lors de la phase d'extinction, les rats ont diminué leur nombre d'appuis sur le levier actif jusqu'à atteindre un nombre d'appuis inférieur à 20% du nombre d'appuis obtenu avant l'extinction (figure 16).

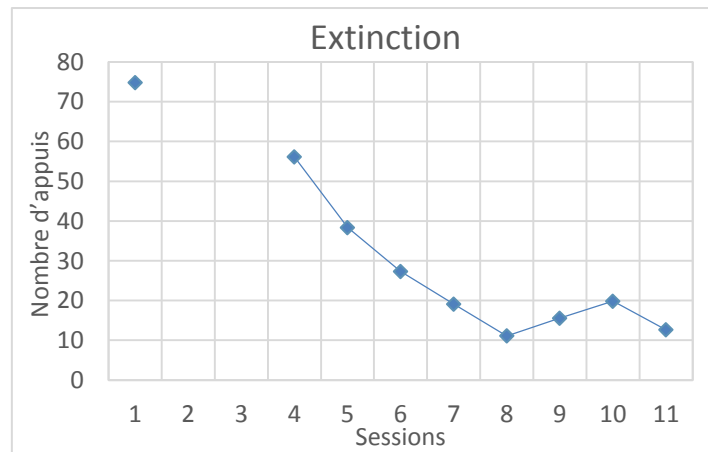


Figure 16. Phase d'extinction – Diminution du nombre d'appuis sur le levier actif par rapport au niveau de base obtenu initialement

### c. Rechute

Suite à la phase d'extinction, six rats ont reçu une injection de LM262 deux jours consécutifs. Les premiers résultats obtenus signeraient une tendance du LM262 à diminuer le niveau de rechute chez les rats ayant reçu le LM262 par rapport au groupe de rats contrôles après une première injection (J1). Cet effet serait accentué suite à une deuxième injection (J2), puis s'atténuerait par absence d'injection (J3, J4 et J5) (figure 17).

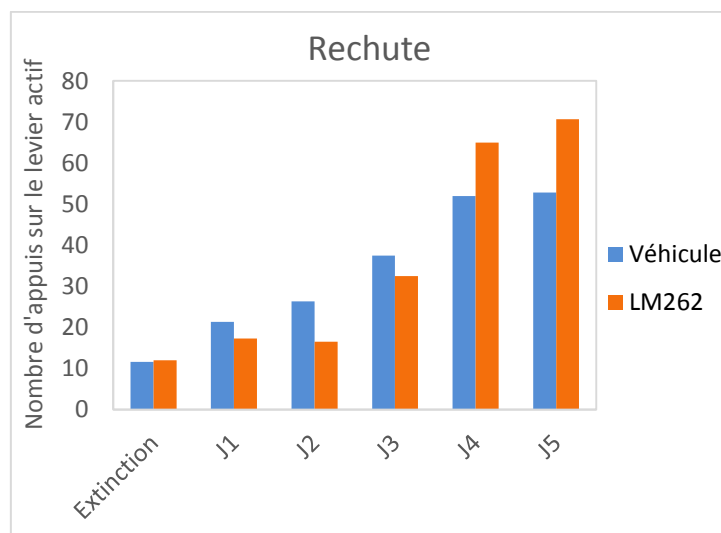


Figure 17. Phase de rechute – Injection du LM262 à J1 et J2 : observation d'une tendance du LM262 à diminuer le niveau de rechute des rats ayant reçu le LM262 par rapport au groupe de rats contrôles

## IV- Discussion

Le projet s'est déroulé en deux étapes majeures. Une première étape au cours de laquelle les nouvelles molécules synthétisées au sein de l'équipe de Reims ont été testées *in vitro*, afin d'identifier une molécule qui serait la plus sélective possible de l'isoforme HDAC1, isoforme potentiellement impliquée dans le mécanisme de rechute dans le cadre de troubles de la consommation d'alcool. La molécule sélectionnée est le LM262, une molécule dont la structure est basée à la fois sur celle du MS275 et à la fois sur celle des peptides cycliques, connus pour être plus sélectifs des isoformes HDACs de la classe I. Elle a présenté plus d'intérêt du fait de sa plus forte activité sur HDAC1 après ajout de la tête de type peptide cyclique, de son absence d'activité sur HDAC6, cependant elle est inhibitrice d'HDAC3. Ces résultats montrent que cette molécule serait inhibitrice des isoformes HDACs de la classe I. Il serait donc intéressant dans le cadre d'autres études de tester le LM262 sur les isoformes HDACs des autres classes, afin de déterminer plus précisément le spectre d'activité de cette molécule et la réalité de sa sélectivité.

Des expériences ont été réalisées pour déterminer la cytotoxicité de sept de ces nouvelles molécules et notamment la toxicité liée au ZBG. Il est en effet indispensable qu'elles soient le moins toxique possible, étant donné leur portée thérapeutique potentielle. Les expériences ont été faites par mise en présence des molécules avec différentes lignées cellulaires cancéreuses. Exceptée l'une de ces molécules, elles n'ont pas entraîné d'effet cytotoxique, ce qui confirme leur intérêt dans le traitement de pathologies impliquant les histones désacétylases, comme les troubles liés à la consommation d'alcool.

Il serait intéressant de vérifier par d'autres méthodes l'action réelle des nouvelles molécules de l'ICMR sur les enzymes HDACs et notamment HDAC1. Pour cela, il existe différentes méthodes, comme par exemple le marquage par radioactivité, ou l'immunohistochimie, qui permet l'observation directe des niveaux d'acétylation des histones dans les structures cérébrales. Une expérience utilisant cette deuxième méthode est actuellement en cours au laboratoire pour le LM262. La molécule a été micro-injectée dans les ventricules cérébraux de huit rats, à une concentration de 50  $\mu$ M pour les quatre

premiers et 500  $\mu$ M pour les quatre suivants. Quatre rats contrôles ont reçu une micro-injection d'aCSF. Les cerveaux ont ensuite été coupés en tranches de 50  $\mu$ m à l'aide d'un vibratome (Leica VT1200S, Leica Biosystems, Nanterre, France). Les coupes seront ensuite marquées par un anticorps anti-H4K12 (Histone H4 acétylée sur la lysine 12). De la même façon, et dans le cadre d'une autre étude, il pourrait être intéressant de vérifier l'action des molécules identifiées comme ayant une activité "activatrice" sur HDAC1, pour vérifier si elles permettent bien d'augmenter l'efficacité des HDACs et donc la désacétylation des histones. L'effet d'activation HDAC des molécules "activatrices" est d'autant plus intéressant que ce type de molécules pourrait avoir une action neuroprotectrice (D'Mello 2009).

L'effet du MS275 a été testé *in vitro*, pour HDAC1, 3 et 6. Dans la littérature, cet inhibiteur est décrit comme étant plus spécifique d'HDAC1 dans certaines publications (Nishioka et al. 2008) et actif sur plusieurs isoformes dans d'autres (Khan et al. 2008). Cependant, il n'est pas décrit comme inhibiteur d'HDAC6. Nos résultats montrent qu'il inhibe également cette isoforme, ce qui pourrait remettre en cause les connaissances actuelles sur sa sélectivité. Il serait donc intéressant de tester l'effet du MS275 sur l'activité d'autres isoformes HDACs afin de confirmer ces résultats et de vérifier sa sélectivité.

Les premiers résultats obtenus suite aux expériences *in vivo* et l'injection du LM262 révéleraient une tendance de cette molécule à diminuer le niveau de rechute chez le rat. Afin de confirmer cet effet, la molécule d'intérêt devra être testée chez un nombre plus important de rats. A l'issue de ces nouvelles expériences, nous espérons observer un niveau d'appuis significativement diminué suite à l'injection de la molécule LM262 par rapport au groupe contrôle, ainsi qu'une augmentation du niveau d'acétylation dans le noyau central de l'amygdale due à l'action du LM262 sur HDAC.

Pour élargir ces recherches, il serait intéressant de tester l'effet de la molécule LM262 lors de la rechute, après injection dans le noyau basolatéral de l'amygdale. Ces expériences pourraient servir d'expériences contrôle, étant donné que l'acétylation des histones dans l'amygdale en réponse à la prise d'alcool diffère entre l'amygdale centrale et l'amygdale basolatérale. Aucune augmentation des niveaux d'acétylation ne devrait être observée dans le noyau basolatéral de l'amygdale lors de cette expérience contrôle.

Il serait également intéressant de tester le LM262 sur d'autres mécanismes liés à des troubles de la consommation d'alcool. Le butyrate de sodium a en effet entraîné une diminution de la consommation excessive d'alcool chez le rat (Simon-O'Brien et al. 2014). Un effet du LM262 sur la consommation d'alcool constituerait un intérêt thérapeutique supplémentaire.

## V- Conclusion et perspectives

Mes recherches ont permis l'identification d'une molécule d'intérêt, à savoir le LM262, qui inhibe l'activité de HDAC1 et HDAC3, deux isoformes HDACs de la classe I. Cette molécule a été testée *in vivo*, chez le rat, dans un modèle préclinique de rechute à l'alcool, dans le cadre de recherches sur les troubles liés à la consommation d'alcool.

Trouver un iHDAC encore plus spécifique d'HDAC1 présente un intérêt majeur dans la recherche fondamentale afin d'étudier plus précisément le mécanisme de rechute, et permettrait de limiter les effets indésirables d'un potentiel traitement. Le LM262 semble intéressant du fait de son action sur les HDACs de classe I, et l'approfondissement des recherches sur son fonctionnement pourrait permettre de trouver un iHDAC spécifique uniquement de l'isoforme HDAC1. Des expériences feront suite à celles déjà entreprises, afin d'approfondir les connaissances acquises sur cette molécule :

- Détermination des niveaux d'acétylation induits par le LM262, grâce à une méthode immunohistochimique
- Détermination de l'activité du LM262 sur d'autres isoformes HDACs
- Cytotoxicité du LM262
- Effet du LM262 sur le mécanisme de rechute, chez un groupe de rats plus important
- Effet du LM262 sur la consommation d'alcool.

## VI-Bibliographie

- Al Ameri, Mouza, Shamma Al Mansouri, Alyazia Al Maamari, and Amine Bahi. 2014. "The Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Valproic Acid Reduces Ethanol Consumption and Ethanol-Conditioned Place Preference in Rats." *Brain Research* 1583 (October): 122–31. doi:10.1016/j.brainres.2014.07.051.
- Alaux-Cantin, Stéphanie, Vincent Warnault, Rémi Legastelois, Béatrice Botia, Olivier Pierrefiche, Catherine Vilpoux, and Mickaël Naassila. 2013. "Alcohol Intoxications during Adolescence Increase Motivation for Alcohol in Adult Rats and Induce Neuroadaptations in the Nucleus Accumbens." *Neuropharmacology* 67 (April): 521–31. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.12.007.
- American Psychiatric Association. 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.
- Augé, Franck, William Hornebeck, Martine Decarme, and Jean-Yves Laronze. 2003. "Improved Gelatinase a Selectivity by Novel Zinc Binding Groups Containing Galardin Derivatives." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (10): 1783–86.
- Beato, M., and K. Eisfeld. 1997. "Transcription Factor Access to Chromatin." *Nucleic Acids Research* 25 (18): 3559–63.
- Behera, Jagannath, Venkatesan Jayprakash, and Barij Nayan Sinha. 2015. "Histone Deacetylase Inhibitors: A Review on Class-I Specific Inhibition." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 15 (9): 731–50.
- Brenner, Carmen. 2005. "Le Rôle Des Méthyltransférases de l'ADN Dans La Régulation Transcriptionnelle."
- Brodeur, Joëlle, and Martin Toussaint. 2006. "Compaction de La Chromatine." *Biologie Moléculaire*.
- Broide, Ron S., Jeff M. Redwine, Najla Aftahi, Warren Young, Floyd E. Bloom, and Christopher J. Winrow. 2007. "Distribution of Histone Deacetylases 1-11 in the Rat Brain." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 31 (1): 47–58.
- Carnicella, Sebastien, Dorit Ron, and Segev Barak. 2014. "Intermittent Ethanol Access Schedule in Rats as a Preclinical Model of Alcohol Abuse." *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* 48 (3): 243–52. doi:10.1016/j.alcohol.2014.01.006.
- Caulin, Charles. 2013. *Vidal Recos 2014*.
- Chavan, A. V., and R. R. Somani. 2010. "HDAC Inhibitors - New Generation of Target Specific Treatment." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 10 (13): 1263–76.
- Davie, James R. 2003. "Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate." *The Journal of Nutrition* 133 (7): 2485S – 2493S.

- De Ruijter, Annemieke J. M., Albert H. van Gennip, Huib N. Caron, Stephan Kemp, and André B. P. van Kuilenburg. 2003. "Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family." *The Biochemical Journal* 370 (Pt 3): 737–49. doi:10.1042/BJ20021321.
- D'Mello, Santosh R. 2009. "Histone Deacetylases as Targets for the Treatment of Human Neurodegenerative Diseases." *Drug News & Perspectives* 22 (9): 513–24. doi:10.1358/dnp.2009.9.1428871.
- Dokmanovic, Milos, Cathy Clarke, and Paul A. Marks. 2007. "Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives." *Molecular Cancer Research: MCR* 5 (10): 981–89. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0324.
- Harrison, Ian F., and David T. Dexter. 2013. "Epigenetic Targeting of Histone Deacetylase: Therapeutic Potential in Parkinson's Disease?" *Pharmacology & Therapeutics* 140 (1): 34–52. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.05.010.
- Jaboin, Jerry, Jason Wild, Habib Hamidi, Chand Khanna, Chong Jai Kim, Robert Robey, Susan E. Bates, and Carol J. Thiele. 2002. "MS-27-275, an Inhibitor of Histone Deacetylase, Has Marked in Vitro and in Vivo Antitumor Activity against Pediatric Solid Tumors." *Cancer Research* 62 (21): 6108–15.
- Jaenisch, Rudolf, and Adrian Bird. 2003. "Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals." *Nature Genetics* 33 Suppl (March): 245–54. doi:10.1038/ng1089.
- Janak, Patricia H., and Kay M. Tye. 2015. "From Circuits to Behaviour in the Amygdala." *Nature* 517 (7534): 284–92. doi:10.1038/nature14188.
- Jeanblanc, Jerome, Sandrine Lemoine, Virginie Jeanblanc, Stéphanie Alaux-Cantin, and Mickaël Naassila. 2015. "The Class I-Specific HDAC Inhibitor MS275 Decreases Motivation to Consume Alcohol and Relapse in Heavy Drinking Rats." *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, March. doi:10.1093/ijnp/pyv029.
- Jenuwein, T., and C. D. Allis. 2001. "Translating the Histone Code." *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532): 1074–80. doi:10.1126/science.1063127.
- Kazantsev, Aleksey G., and Leslie M. Thompson. 2008. "Therapeutic Application of Histone Deacetylase Inhibitors for Central Nervous System Disorders." *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (10): 854–68. doi:10.1038/nrd2681.
- Kennedy, Pamela J., and Eric Harvey. 2015. "Histone Deacetylases as Potential Targets for Cocaine Addiction." *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, May.
- Khan, Nagma, Michael Jeffers, Sampath Kumar, Craig Hackett, Ferenc Boldog, Nicholai Khramtsov, Xiaozhong Qian, et al. 2008. "Determination of the Class and Isoform Selectivity of Small-Molecule Histone Deacetylase Inhibitors." *The Biochemical Journal* 409 (2): 581–89. doi:10.1042/BJ20070779.
- Kim, Bumki, Heekwang Park, Lilibeth A. Salvador, Patrick E. Serrano, Jason C. Kwan, Sabrina L. Zeller, Qi-Yin Chen, et al. 2014. "Evaluation of Class I HDAC Isoform Selectivity of

- Largazole Analogues." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 (16): 3728–31. doi:10.1016/j.bmcl.2014.07.006.
- Kouzarides, Tony. 2007. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128 (4): 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Legastelois, Rémi, Béatrice Botia, and Mickaël Naassila. 2013. "Blockade of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization by Sodium Butyrate: Descriptive Analysis of Gene Regulations in the Striatum." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 37 (7): 1143–53. doi:10.1111/acer.12088.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. 2014. "Drinking Levels Defined."
- Nestler, E. J., and G. K. Aghajanian. 1997. "Molecular and Cellular Basis of Addiction." *Science (New York, N.Y.)* 278 (5335): 58–63.
- Nestler, Eric J. 2002. "From Neurobiology to Treatment: Progress against Addiction." *Nature Neuroscience* 5 Suppl (November): 1076–79. doi:10.1038/nn945.
- Nishioka, Chie, Takayuki Ikezoe, Jing Yang, Seisho Takeuchi, H. Phillip Koeffler, and Akihito Yokoyama. 2008. "MS275, a Novel Histone Deacetylase Inhibitor with Selectivity against HDAC1, Induces Degradation of FLT3 via Inhibition of Chaperone Function of Heat Shock Protein 90 in AML Cells." *Leukemia Research* 32 (9): 1382–92. doi:10.1016/j.leukres.2008.02.018.
- OFDT. 2014. "Synthèse Thématique : Alcool." Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies.
- Paille, François, and Hervé Martini. 2014. "Nalmefene: A New Approach to the Treatment of Alcohol Dependence." *Substance Abuse and Rehabilitation* 5: 87–94. doi:10.2147/SAR.S45666.
- Palle, C. 2013. "Alcool." OFDT, Drogues et addictions, données essentielles.
- Palle, C. and Rattanatrav M. 2013. "Les Centres de Soins, D'accompagnement et de Prévention En Addictologie, Situation En 2010 et Évolution Entre 2005 et 2010."
- Pandey, Subhash C., Rajesh Ugale, Huaibo Zhang, Lei Tang, and Anand Prakash. 2008. "Brain Chromatin Remodeling: A Novel Mechanism of Alcoholism." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (14): 3729–37. doi:10.1523/JNEUROSCI.5731-07.2008.
- Paxinos, George, and Charles Watson. 2013. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7ème édition.
- Polich, J. M. 1981. "Epidemiology of Alcohol Abuse in Military and Civilian Populations." *American Journal of Public Health* 71 (10): 1125–32.
- Reynaud, and François Paille. A paraître. "Les Diagnostics Des Troubles Liés À L'alcool Dans Les Hôpitaux Français." *PMSI et Alcool*
- Rouffet, Matthieu, Clément Denhez, Erika Bourguet, Frédéric Bohr, and Dominique Guillaume. 2009. "In Silico Study of MMP Inhibition." *Organic & Biomolecular Chemistry* 7 (18): 3817–25. doi:10.1039/b910543c.

- Simon-O'Brien, Emmanuelle, Stéphanie Alaux-Cantin, Vincent Warnault, Romain Buttollo, Mickaël Naassila, and Catherine Vilpoux. 2014. "The Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate Decreases Excessive Ethanol Intake in Dependent Animals." *Addiction Biology*, July. doi:10.1111/adb.12161.
- Spencer, V. A., and J. R. Davie. 1999. "Role of Covalent Modifications of Histones in Regulating Gene Expression." *Gene* 240 (1): 1–12.
- Sprow, Gretchen M., Jennifer A. Rinker, and Todd E. Thiele. 2014. "Histone Acetylation in the Nucleus Accumbens Shell Modulates Ethanol-Induced Locomotor Activity in DBA/2J Mice." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 38 (9): 2377–86. doi:10.1111/acer.12502.
- Tsapis, Michael, Michèle Lieb, Fabio Manzo, Pattabhiraman Shankaranarayanan, Raoul Herbrecht, Patrick Lutz, and Hinrich Gronemeyer. 2007. "HDAC Inhibitors Induce Apoptosis in Glucocorticoid-Resistant Acute Lymphatic Leukemia Cells despite a Switch from the Extrinsic to the Intrinsic Death Pathway." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (7-8): 1500–1509. doi:10.1016/j.biocel.2007.03.009.
- Vaillant, G. E., W. Clark, C. Cyrus, E. S. Milofsky, J. Kopp, V. W. Wulsin, and N. P. Mogielnicki. 1983. "Prospective Study of Alcoholism Treatment. Eight-Year Follow-Up." *The American Journal of Medicine* 75 (3): 455–63.
- Vilpoux, Catherine, Vincent Warnault, Olivier Pierrefiche, Martine Daoust, and Mickael Naassila. 2009. "Ethanol-Sensitive Brain Regions in Rat and Mouse: A Cartographic Review, Using Immediate Early Gene Expression." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33 (6): 945–69. doi:10.1111/j.1530-0277.2009.00916.x.
- Zwiller, Jean. 2015. "[Epigenetics and drug addiction: a focus on MeCP2 and on histone acetylation]." *Médecine Sciences: M/S* 31 (4): 439–46. doi:10.1051/medsci/20153104019.

## Annexes

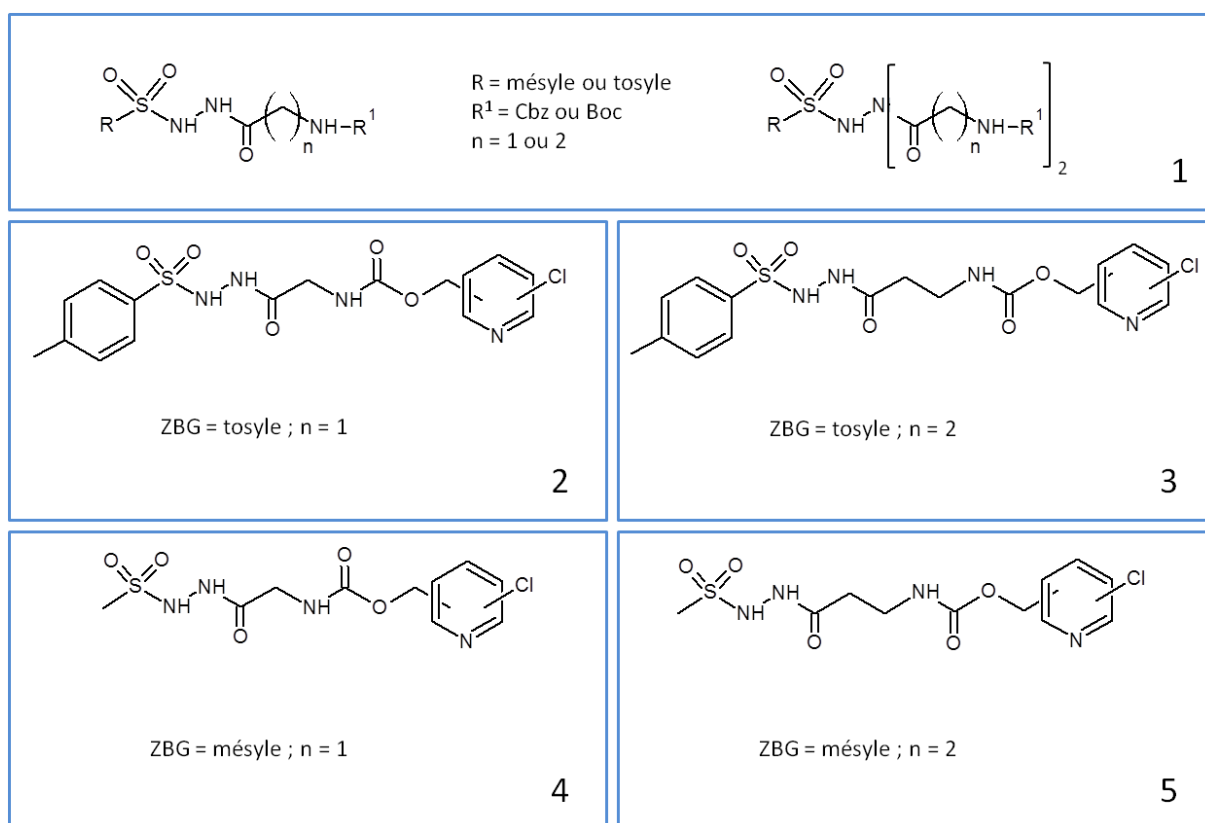


Figure 1. Cinq familles de molécules synthétisées au sein de l'ICMR

| Famille  | Code           | Pourcentage<br>d'activité brut (%) | Pourcentage<br>d'activité corrigé<br>(%) | Effet sur l'activité<br>HDAC1 |
|----------|----------------|------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>1</b> | EBMM8-4        | 3,72                               | 13,19                                    | Effet biphasique              |
|          | EBMM9-4-3-1    | 27,41                              | 63,67                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBMM11-2-2     | 37,54                              | 32,69                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBMM12-3-4-4-2 | 27,10                              | 9,38                                     | Activateur                    |
|          | EB576-2        | 7,90                               | 7,90                                     | Sans effet                    |
|          | EBAB17-1       | 52,05                              | 51,40                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBJD9          | 706,34                             | 812,17                                   | Activateur                    |
|          | EBAP9          | 18,93                              | 15,29                                    | Inhibiteur                    |
| <b>2</b> | EBMM30-6       | 10,70                              | 18,95                                    | Effet biphasique              |
|          | EBMM33-3       | 25,36                              | 17,59                                    | Activateur                    |
|          | EBMM63-2       | 0,82                               | 6,40                                     | Effet biphasique              |
|          | EBMM48-3       | 6,25                               | 1,64                                     | Activateur                    |
|          | EBMM51-2-2-2   | 84,34                              | 78,35                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBMM42-2       | 0,17                               | 9,88                                     | Activateur                    |
|          | EBMM52-3       | 6,77                               | 4,34                                     | Activateur                    |
| <b>3</b> | EB595-3        | 40,65                              | 38,87                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBMS2-3        | 11,42                              | 11,91                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBMS4-3        | 16,27                              | 19,34                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBMS5-3        | 7,30                               | 11,35                                    | Inhibiteur                    |
|          | EBMS6-3        | 63,62                              | 65,72                                    | Inhibiteur                    |

|          |            |       |       |            |
|----------|------------|-------|-------|------------|
|          | EBMS7-3    | 35,53 | 35,85 | Inhibiteur |
| <b>4</b> | EBJD18-3s  | 22,00 | 14,72 | Activateur |
|          | EBJD20-4-2 | 81,59 | 93,73 | Activateur |
|          | EB586-2-2  | 69,79 | 79,01 | Activateur |
|          | EBAG14-4-3 | 12,13 | 19,41 | Sans effet |
|          | EBAG8-3-3  | 26,48 | 29,64 | Inhibiteur |
| <b>5</b> | EBAP11-3   | 38,13 | 41,77 | Inhibiteur |
|          | EBAP13-4-2 | 64,32 | 49,11 | Inhibiteur |
|          | EBAP19-3s  | 47,83 | 33,11 | Inhibiteur |
|          | EB580s     | 51,91 | 41,72 | Inhibiteur |
|          | EBAP21-2   | 54,75 | 54,26 | Inhibiteur |
|          | EB582-2s   | 64,38 | 36,47 | Inhibiteur |
|          | EB584s     | 19,72 | 9,04  | Inhibiteur |

Tableau 1. Effet des molécules de l'ICMR sur l'activité HDAC1, en pourcentages d'activité brut et corrigé. Les molécules en rouge ont été testées en analyse fine

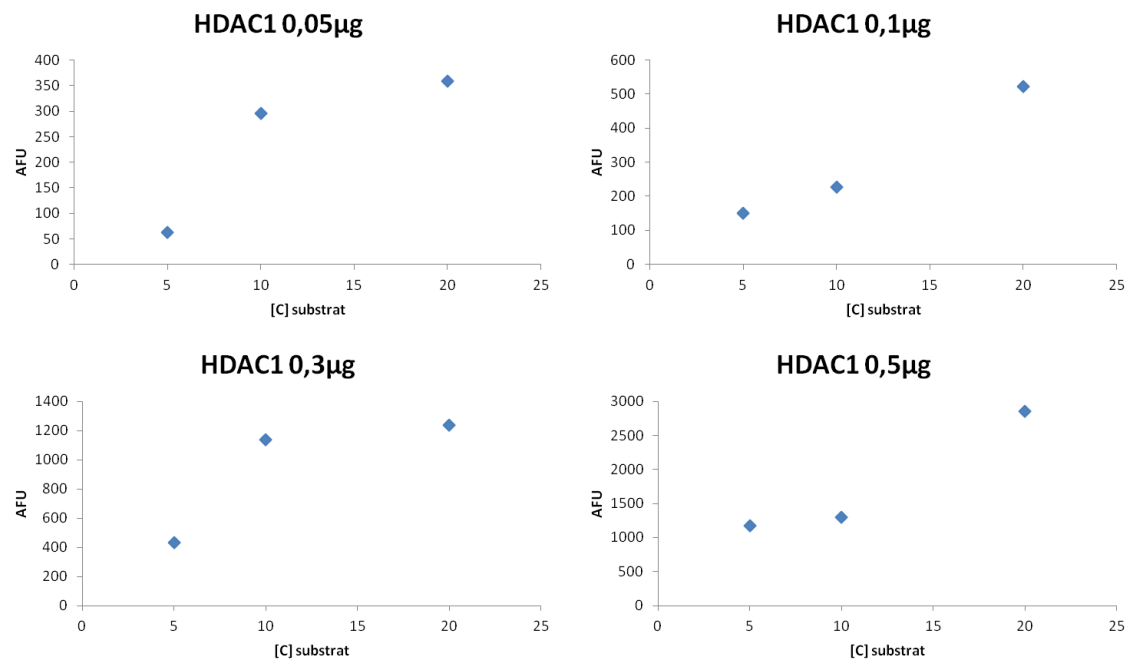


Figure 2. Courbes effet-dose HDAC1

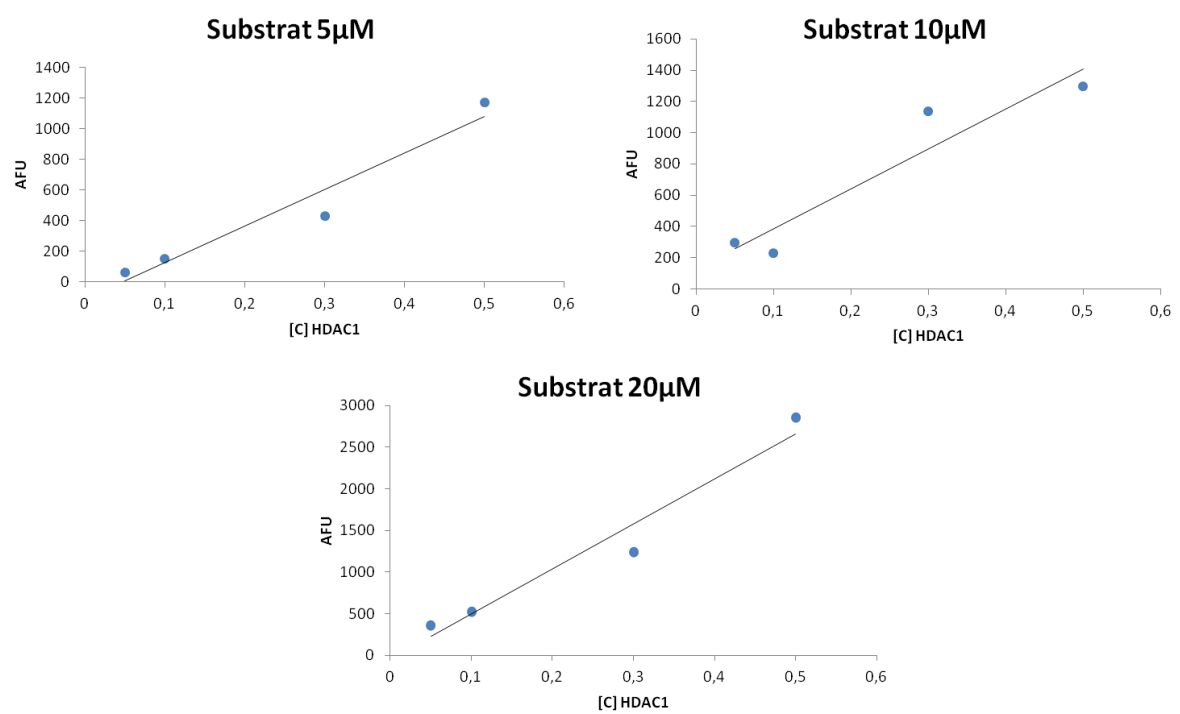


Figure 3. Courbes effet-dose substrat

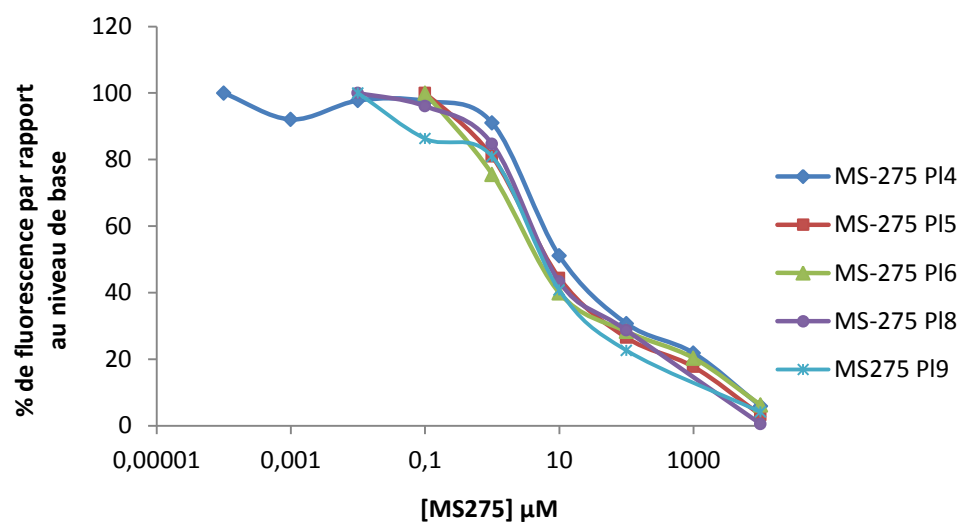
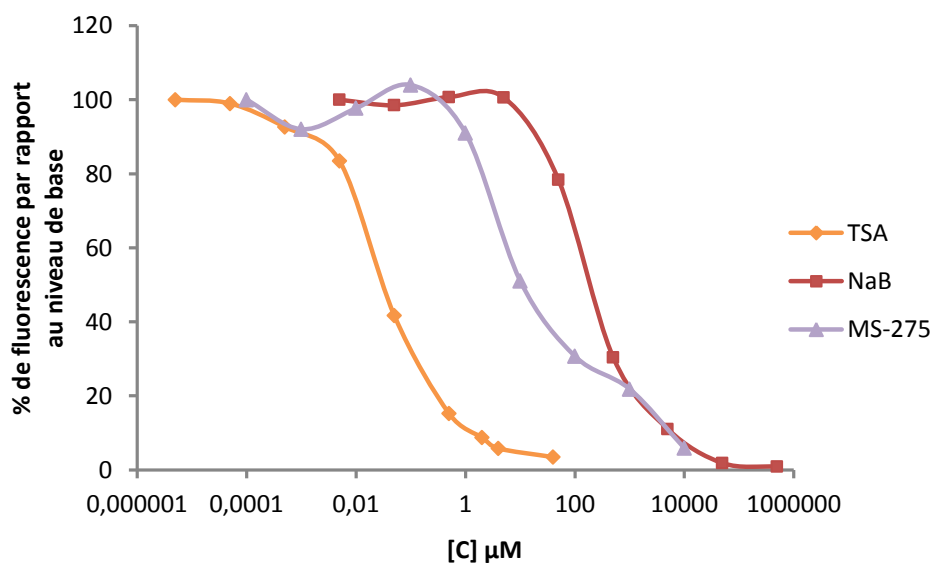


Figure 4. Inhibition de l'activité HDAC1 par le MS275 selon les plaques. Son  $IC_{50}$  est de 8  $\mu M$ , pour une  $IC_{50}$  dans la littérature de 181 nM (Khan et al. 2008)



|                         | GRAP  | Littérature |
|-------------------------|-------|-------------|
| $IC_{50}$ TSA $\mu M$   | 0,039 | 0,002       |
| $IC_{50}$ MS275 $\mu M$ | 8     | 0,2-2,2     |
| $IC_{50}$ NaB $\mu M$   | 308   | 300         |

Figure 5. Inhibition de l'activité HDAC1 par la TSA, le NaB et le MS275, et détermination de leur  $IC_{50}$  à l'aide de GraphPad Prism

Gonzalez, Céline  
Criblage d'inhibiteurs potentiels d'HDAC1 : effet sur un modèle préclinique de rechute à l'alcool

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie  
Université de Picardie Jules Verne  
2015

Mots clefs: alcool, rechute, acétylation/désacétylation des histones, iHDACs, rats

#### RESUME

L'implication des mécanismes épigénétiques est clairement établie dans les troubles de la consommation d'alcool, notamment le mécanisme particulier d'acétylation et de désacétylation des histones. L'exposition à l'alcool est capable d'altérer ces mécanismes épigénétiques et de précédentes études du laboratoire ont montré que l'administration d'inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) entraîne une diminution de la consommation d'alcool et freine la rechute.

Dans la présente étude, nous avons cherché à identifier une molécule encore plus spécifique de l'isoforme HDAC1 à partir de 39 molécules récemment synthétisées par l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims et potentiellement inhibitrices HDACs. Par une technique de quantification de l'activité d'HDAC par mesure de fluorescence, nous avons sélectionné une molécule candidate dont la spécificité envers HDAC1 était supérieure à celle du MS275, jusqu'alors la molécule de référence pour l'inhibition spécifique d'HDAC1. Cette molécule est actuellement en phase de test pour étudier son effet *in vivo*, chez le rat, dans un modèle de rechute à l'alcool.

Key words: alcohol, relapse, histones acetylation/deacetylation, iHDACs, rats

#### SUMMARY

The implication of epigenetics mechanisms is clearly established in alcohol-use disorders, notably the histone acetylation and deacetylation pathway. Exposition to alcohol is able to alter these epigenetics mechanisms and previous works in our lab showed that the administrations of broad spectrum histone deacetylase (HDAC) inhibitors lead to a diminution of the consumption of alcohol and slow down the relapse.

In this study, we were looking for a molecule more specific to the HDAC1-isoform, testing 39 molecules recently synthesized by the Institut de Chimie Moléculaire de Reims and potentially HDAC inhibitors. Using quantification of HDAC activity by fluorescence, we have selected one candidate with specificity to HDAC1 superior to the MS275's one, which was the reference for HDAC1 inhibition. This molecule is currently in the *in vivo* phase test, in a alcohol-relapse model using rats.

JURY Président : Pr Mickaël Naassila

Membres : Dr Jérôme Jeanblanc, Dr Rémi Legastelois, Dr Erika Bourguet