



HAL
open science

Étude des effets du modulateur épigénétique EBJD9 chez le rat mâle jeune adulte, sur la consommation d'alcool et l'acétylation des protéines histones : une étude expérimentale

Hélène Boissière

► **To cite this version:**

Hélène Boissière. Étude des effets du modulateur épigénétique EBJD9 chez le rat mâle jeune adulte, sur la consommation d'alcool et l'acétylation des protéines histones : une étude expérimentale. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02893172

HAL Id: dumas-02893172

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02893172>

Submitted on 8 Jul 2020

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 DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 17 juin 2019

Par Boissière Hélène

**Étude des effets du modulateur épigénétique EBJD9 chez le
rat mâle jeune adulte, sur la consommation d'alcool et
l'acétylation des protéines histones : une étude expérimentale**

JURY

Président : Mr Metzinger Laurent, Professeur des universités

Membres : Mme Bourguet Erika, Maître de conférences

Mr Leflon Arnaud, Pharmacien d'officine

Mr Naassila Mickael, Professeur des universités

Mme Soyez Marion, Pharmacien biologiste

Directrice de thèse : Mme Vilpoux Catherine, Maître de conférences

Thèse n°

Remerciements :

Je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, le docteur Vilpoux Catherine, pour m'avoir fait confiance, pour avoir accepté d'encadrer mon stage au sein du laboratoire GRAP ainsi que de diriger ma thèse. Merci de m'avoir intéressée en cours, et de m'avoir donné envie de faire une thèse expérimentale. Merci d'avoir toujours montré un grand enthousiasme, d'avoir toujours été à l'écoute ainsi que pour tous les conseils que vous m'avez donnés, que ce soit pour la rédaction de ce travail comme pour ma vie professionnelle future. Je garderais un excellent souvenir du temps passé à travailler avec vous.

Merci également au docteur Jeanblanc Jérôme qui a suivi de très près les expériences qui constituent la base de ce travail. Merci pour votre implication, et vos explications. J'ai énormément appris grâce à vous ! Merci vraiment !

Merci au Professeur Naassila Mickaël pour m'avoir fait confiance et permis de réaliser mon stage et ma thèse au sein de son laboratoire, ainsi que pour ses conseils quant à la rédaction de ma thèse. Merci également d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci au docteur Marcq Ingrid, pour avoir contribué à ma thèse en réalisant la cytométrie en flux conjointement au docteur Fouquet Grégory ainsi que pour avoir répondu à mes interrogations sur cette technique analytique.

Merci au docteur Fouquet Grégory, pour m'avoir montré et expliqué en détails la cytométrie en flux, pour m'avoir aidée à mieux comprendre les résultats préliminaires obtenus par cette méthode, pour avoir toujours été disponible à toutes mes questions. Merci pour m'avoir « motivée » dans la rédaction de ma thèse, chaque fois que je te croisais dans un couloir ;) ..

Merci au docteur Bourguet Erika pour avoir accepté de faire partie de mon jury, et également pour être à l'origine de la synthèse d' EBJD9. Ce travail n'existerait pas sans vous !

Merci à Negria Elivazeta pour sa bonne humeur, et pour m'avoir dépannée quelques fois à l'animalerie. J'ai adoré te voir tous les jours à la même heure lorsque j'y descendais. Nos conversations vont me manquer.

Merci à Bertrand Cédric et à Radiant Kévin, pour m'avoir rendu service lorsque je ne pouvais pas venir m'occuper des rats au laboratoire. Merci également à Deschamps Chloé pour nous avoir aidé plus d'une fois lorsque tel ou tel logiciel de statistique ou de bureautique nous donnait du fil à retordre !

Merci à Le Bers Julie et aux animalières Virginie et Anaïs, merci pour votre sourire, votre gentillesse, votre aide aussi. Ça a été un réel plaisir de travailler à l'animalerie grâce à vous. Virginie, merci particulièrement pour ton écoute, et les derniers conseils que tu m'as donnés. Je les garderais précieusement !

Tu es une personne que je n'oublierais pas !

Merci à Houziaux Hinatea, pour avoir d'une part contribué par ton propre stage à ce travail de thèse mais également pour ton sérieux, ta motivation, ton optimisme et ta gentillesse. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites pour la suite de ton cursus.

Merci à Debuyscher Véronique pour ses explications, pour avoir contribué par son travail aux résultats sur l'activité HDAC *in vitro* présentés dans cette thèse et pour sa gentillesse.

Merci au docteur Metzinger Laurent, pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse ainsi que de m'avoir fait découvrir l'épigénétique durant mes premières années de fac, et pour avoir contribué à la naissance de mon intérêt pour la recherche par son option de 2ème année.

Merci à vous, Arnaud et Marion, d'avoir accepté d'être membres de mon jury. Merci aussi pour votre amitié ! Merci Arnaud d'avoir toujours été là pour supporter tous mes doutes et pour avoir toujours trouvé les moyens de me remotiver !

Merci à mes parents, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci d'avoir contribué à ma réussite, de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mes années universitaires et de s'être intéressé à mon travail. Merci également à mes sœurs, soutien moral indéfectible, et surtout toi mimie, pour avoir partagé la majeure partie de mes années de fac, et de m'avoir encouragée au jour le jour ! Je vous aime tous, du plus profond de mon cœur !

Merci à Jonathan, Camille et Manon, Quentin, Alexia, Danielle, Anne, Frédéric, Victoire, pour avoir partagé mes années de fac, en cours, en tp, à la cafette ou même en dehors... Vous avez contribué à ma réussite et je vous en suis vraiment reconnaissante.

Merci à Mathilde, Morgane, Rémi, Émeline, Ghislain, Sylvain, Dan, Blanche, Lætitia, Pierris, Julia, Anthony, Émilie, Milan, Annabelle, Florent, Louison, Alice, Yohann, Matthieu, Jean-Mi, Évelyne, Micka... pour les moments en dehors de la fac qui m'ont permis de souffler (même s'ils se sont faits plus rares avec ce travail à finir) ! Votre amitié et votre soutien compte pour moi ! Merci d'être là !

Merci à toute l'équipe de la pharmacie Gorin, pour m'avoir permis de réaliser mon stage au GRAP afin de réaliser ma thèse, tout en continuant à travailler ! Ma sincère reconnaissance !

Merci à vous, Réjane, Michel et Bébert de me soutenir comme vous le faites depuis que je vous connais et d'être toujours si sincèrement heureux de mes réussites, vous êtes ma famille à présent !

Enfin, merci à la plus incroyable personne que je connaisse, merci d'exister et d'embellir chaque seconde de ma vie qui passe... Merci de me soutenir quoi qu'il arrive dans tout ce que j'entreprends, merci Flo... Je ne sais pas ce que je ferai sans toi.

Liste des abréviations et définitions :

- ADN** : acide désoxyribonucléique : support de l'information génétique.
- ARC** : protéine Arc : participe à la plasticité neuronale.
- ARN** : acide ribonucléique .
- BDNF** : facteur neurotrophique dérivé du cerveau : participe à la plasticité neuronale.
- BHE** : barrière hémato-encéphalique : limite le passage de certaines molécules, de la circulation sanguine au système nerveux central.
- CeA** : Amygdale centrale : structure cérébrale impliquée dans le circuit de la récompense.
- CPF** : cortex préfrontal : structure cérébrale impliquée dans le circuit de la récompense.
- DNMT** : DNA méthyl-transferase : enzyme catalysant la méthylation de l'ADN, dont l'expression s'accroît, chez l'Homme, avec l'alcoolisation chronique.
- Epigénétique** : ensemble des mécanismes qui vont moduler l'expression des gènes sans changer les séquences nucléotidiques.
- EtOH** : éthanol de formule semi-développée $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Alcool des boissons alcoolisées.
- GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase : enzyme impliquée dans la glycolyse.
- GluN2A** : sous-unité 2A du récepteur NMDA.
- GluN2B** : sous-unité 2B du récepteur NMDA.
- HAT** : histone acétyl-transferase : enzyme catalysant l'acétylation des protéines histones et donc favorisant la transcription.
- HD** : High Drinkers : groupe de rats buvant naturellement beaucoup d'alcool.
- HDAC** : histone désacétylase : enzyme catalysant la désacétylation des protéines histones et diminuant la transcription
- .HDACi** : inhibiteur d'histone désacétylase : diminue l'activité HDAC et donc la désacétylation des protéines histones.
- Histones** : protéines formant, avec le double-brin d'ADN, la chromatine.
- HMT** : Histone Methyl Transferase : enzyme catalysant la méthylation des Histones.
- LD** : Low Drinkers : groupe de rats buvant naturellement peu d'alcool.
- MFI** : intensité moyenne de fluorescence : unité de mesure de l'intensité de fluorescence.
- Nacc** : noyau accumbens : structure cérébrale impliquée dans le circuit de la récompense.
- NAD+** : nicotinamide adénine dinucléotide : cofacteur de certaines enzymes.
- NMDA** : acide N-méthyl-D-aspartique : agoniste d'un neurotransmetteur : le glutamate.
- SDL** : striatum dorso-latéral : structure cérébrale impliquée dans le circuit de la récompense.
- SDM**: striatum dorso-médian : structure cérébrale impliquée dans le circuit de la récompense.
- SUD** : **Substances Use Disorders** : ensemble des troubles de la consommation des drogues.
- TUAs** : Troubles de l'Usage d'Alcool.
- URL** : unité relative de lumière : unité de mesure de l'intensité lumineuse.

Résumé :

L'alcool représente un enjeu considérable de santé publique dans l'ensemble de l'Europe et en France en particulier. Les récentes recherches ont permis de mettre en évidence que l'éthanol était entre autre, un perturbateur épigénétique. Parmi les différents mécanismes épigénétiques perturbés par l'éthanol, l'acétylation des protéines histones, que l'éthanol favorise, est la mieux documentée. Cependant, la compréhension des mécanismes par lesquels l'éthanol est un perturbateur épigénétique reste à parfaire. C'est dans ce but que nous avons étudié la molécule EBJD9, supposée d'être un activateur HDAC.

Nos résultats mettent en lumière qu'EBJD9 induit *in vitro* une augmentation de l'acétylation H4K12 et une augmentation de l'activité HDAC totale, et induit *in vivo* une hausse de la consommation d'éthanol chez des rats qui buvaient spontanément peu d'alcool sans montrer d'évolution de la consommation d'éthanol chez des rats qui en buvaient spontanément beaucoup. Cela nous apparaît tout à fait pertinent dans la mesure où les iHDACs ont la propriété de diminuer la consommation d'alcool dans plusieurs modèles animaux.

Les résultats préliminaires (n=3) de la cytométrie en flux, montrent que ces deux groupes de rats diffèrent par leurs niveaux d'acétylation Ac-H4K12. Dans le cortex préfrontal, les bons buveurs présentent une plus forte expression de HDAC2 et une moindre expression d'Ac-H4K12 par rapport aux rats mauvais buveurs, tandis qu'ils présentent une plus faible expression de la sous unité GluN2B du récepteur NMDA. Dans le noyau accumbens, nous observons le même profil pour HDAC2 et Ac-H4K12, mais l'expression de la sous unité GluN2B du récepteur NMDA est plus forte pour les bons buveurs. Il existe également une tendance d'EBJD9 à « normaliser » Ac-H4K12 dans le cortex pré-frontal et le noyau accumbens dans les deux groupes de rats sans modifier l'expression de HDAC2.

Nous avons précédemment montré au laboratoire qu'une augmentation de l'expression de HDAC2 est associée à une augmentation de l'expression de la sous unité GluN2B par action sur son promoteur. Ici nous observons avec EBJD9 une expression de GluN2B dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens qui évolue dans le sens inverse à celui attendu par l'hypothèse qui voudrait qu'EBJD9 module l'activité HDAC2. Dans la mesure où EBJD9 ne module pas HDAC2, nous proposons l'hypothèse qu'EBJD9 développe son effet sur Ac-H4K12 *via* une action sur une enzyme HDAC différente de HDAC2. Ensemble, ces résultats permettent de dire qu'EBJD9 se comporte comme un activateur HDAC, qui ne cible pas HDAC2. Ce travail permet d'enrichir les connaissances actuelles sur les activateurs HDACs dont l'étude est encore très récente. La compréhension de leurs mécanismes d'action pourrait nous en apprendre beaucoup sur les mécanismes d'action de l'éthanol, reconnu comme étant lui-même un activateur HDAC.

Mots clés : éthanol, TUA, épigénétique, HDAC, activateur, histone, acétylation.

Table des matières

1.INTRODUCTION :	8
1)Présentation de la question scientifique.....	8
2)Définition de l'alcool :	8
3)Épidémiologie.....	8
4)Usage et Mésusage.....	9
5) Alcool, Addiction et TUA	12
1.Classification par le DSM-5.....	12
2.Diagnostic de l'addiction à l'alcool :	12
3.Signes physiques du TUA.....	14
4.Addiction à l'alcool.....	15
5.Modélisation de l'addiction à l'alcool.....	15
6.Notion de variabilité individuelle.....	16
6)Alcool et perpétuations épigénétiques.....	17
7)Les HDACs :	19
1.Classification des HDACs :	20
2.Mécanisme d'action :	21
3.HDACs et Alcool :	22
4.HDAC et consommation aiguë d'alcool :	22
5.HDAC et sevrage suite à une consommation chronique :	23
8)Les inhibiteurs HDACs :	24
1.Utilisations médicales des inhibiteurs HDACs :	24
2.L' Entinostat (MS-275) :	24
3.La trichostatin A (TSA) :	25
4.Le butyrate de sodium (NaB) :	25
5.L' alkylsulfonylhydrazide (ASH) :	26
6.La 5-azacitidine (5-AZA) et la Vorinostat (SAHA) :	26
9)EBJD9 :	27
1.Expérience in vitro, sur des cellules SH-SY5Y :	27
2. Expérience ex vivo sur des cellules SH-SY5Y :	28
10)Hypothèses de travail :	29
2.MATERIEL ET METHODES :	29
1)Expérience in vitro sur cellules SH-SY5Y :	30
1.Culture cellulaire :	30
2.Immunomarquage :	30
3.Immunofluorescence :	30
4.Test d'activité des HDACs totales (utilisation du Kit « HDAC-Glo ») :	31
2) Comportement animal :	32

1. Animaux :	32
2. Protocole d'« accès intermittent à de l'éthanol 20% »	32
3. Chirurgie stéréotaxique :	34
4. Injections :	36
1. Double-injections :	36
2. Simple-injection:	37
5. Cytométrie en flux	37
1. Principe de la Cytométrie en flux :	38
2. Préparation des prélèvements cérébraux, choix des anticorps primaires et secondaires, cytométrie :	39
3) Analyses statistiques :	40
3. RESULTATS :	40
1) Expérience in vitro sur culture de cellules SH-SY5Y :	40
2) HDAC Glo : expérience in vitro sur l'activité HDAC totale de cellules SH-SY5Y :	41
3) Expériences comportementales :	43
1. Escalade de consommation par le protocole d'accès intermittent à l'éthanol	43
2. Effet du traitement par EBJD9 sur la consommation d'alcool lors de l'accès intermittent à de l'éthanol 20% :	44
3. Consommations des sous-groupes High Drinkers et Low Drinkers :	46
4. Effet du traitement par EBJD9 sur la consommation d'alcool lors de l'accès intermittent à de l'éthanol 20% dans les sous-groupes High Drinkers et Low Drinkers :	47
1. Effet d'EBJD9 suite à deux injections chez les HD et LD :	47
2. Effet d'EBJD9 suite à une injection chez les HD et LD :	48
4) Cytométrie en flux :	49
1. Expression de HDAC 2 :	49
2. Expression d'Ac-H4K12 :	51
3. Expression de GluN2A et de GluN2B :	52
4. DISCUSSION :	53
1) Expérience in vitro sur les niveaux d'acétylation Ac-H4K12 sur SH-SY5Y et sur l'activité HDACs totale	54
2) Expériences comportementales :	54
1. Protocole d'accès intermittent à de l'éthanol :	54
2. Effet d'EBJD9 sur le comportement :	55
3) Cytométrie en flux :	55
1. Différence entre les sous-groupes High-Drinkers et Low-Drinkers.	56
2. Effet de EBJD9 sur l'expression GluN2B et GluN2A :	56
5. Conclusion :	58
6. BIBLIOGRAPHIE :	59

1. INTRODUCTION :

1) Présentation de la question scientifique

Le travail présenté ici a pour but d'étudier les effets épigénétiques de la molécule EBJD9 sur la consommation d'alcool de rats mâles adultes, et a été réalisé au sein du laboratoire GRAP INSERM UMR 1247 situé au Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS) de l'université d'Amiens, de septembre à juin 2019. La molécule EBJD9 a été synthétisée récemment par des partenaires du laboratoire GRAP d'Amiens, l'équipe - CNRS – UMR 7312 – ICMR - SFR CAP-Santé, situé à l'UFR de Pharmacie de l'université de Reims et en particulier par la Docteure Erika Bourguet (Maître de Conférences – HDR). Cette molécule est en cours de caractérisation dans ces deux laboratoires et des travaux préliminaires proposent qu'EBJD9 soit une molécule activatrice d'une famille d'enzyme, les Histones DésACétylase (HDAC).

Nous présenterons dans cette introduction les prérequis nécessaires à la compréhension du lien entre l'alcool et les mécanismes épigénétiques, les éléments sur le type de modèle animal de consommation excessive d'alcool utilisé ici, les éléments qui nous permettent d'envisager EBJD9 comme un activateur HDAC, et enfin nous exposerons l'ensemble de nos hypothèses de travail.

2) Définition de l'alcool :

Le terme alcool est un terme générique qui regroupe l'ensemble des composés organiques, présentant un groupement hydroxyle OH sur l'un des atomes de carbone, lui-même relié à un autre atome de carbone ou un atome d'hydrogène. L'alcool dans le sens courant est celui que l'on retrouve dans les boissons alcoolisées. Il correspond à l'alcool éthylique ou éthanol (EtOH), de formule semi-développée $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. A température ambiante, c'est un liquide transparent, volatil, miscible à l'eau, inflammable et généralement issu de la fermentation des sucres. L'alcool éthylique est une substance psycho-active ou psychotrope : c'est à dire qu'il va avoir des effets sur le fonctionnement cérébral et sur la pensée. D'abord excitateur à faible dose, il va par la suite ralentir la pensée, et est considéré comme un neuroleptique. C'est également une substance addictogène.

3) Épidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), c'est en Europe, que l'alcool induit les plus hauts taux de morbidité et de décès prématurés (WHO. 2019).

Et pour cause, c'est également la région du monde, où la consommation d'alcool est la plus

importante : parmi les personnes âgées de 15 ans et plus, un peu plus d' 1/5 s'adonne à l'abus d'alcool défini par l'OMS comme la consommation de 5 verres ou plus par occasion et par personne soit l'équivalent de 60g d'alcool pur au moins une fois par semaine. Au sein même de cette Europe, championne du monde de la consommation d'alcool, la France continue de se démarquer : avec ses 11,7 litres d'alcool pur consommé par habitant chaque année, sa population fait partie des trois meilleurs buveurs avec les populations de l' Estonie (15,35) et de la Lituanie (13,61), devançant les populations du Luxembourg (11,22), de l' Irlande (11,46), de la Grande Bretagne (9,81), de la Suisse (9,43), de la Suède (7,18), de l'Allemagne (10,9), de l'Espagne (8,58), du Portugal (10,66) et de l'Italie (7,08). (WHO Alcovision 2016).

Au niveau mondial, en 2016, l'alcool était le premier facteur de décès prématurés et d'invalidité chez les 15-49 ans (Griswold et al. 2018). En Europe et en France métropolitaine, l'alcool représente la seconde cause de décès évitables, juste derrière la consommation de tabac (Guérin et al. 2013), et est également l'un des premiers facteurs de risque de morbidité, avec le tabac, le surpoids et l'hypertension artérielle (Lim et al. 2012)

Une récente étude rétrospective, sur les années 2008 à 2012, réalisée en France métropolitaine et à partir de données recueillies dans divers hôpitaux, a d'ailleurs permis d'estimer :

- qu'un patient hospitalisé avec un TUA (trouble de l'usage d'alcool), avait trois fois plus de chance de décéder qu'un patient qui n'en souffrait pas.
- Que l'espérance de vie d'un patient avec un TUA était réduite de 12,2 ans en moyenne
- que le risque relatif pour un patient ayant un TUA par rapport aux autres patients, et pour un panel varié de pathologies (maladies digestives, cancers (sauf cancer du poumon), maladies cardiovasculaires, démences, maladies infectieuses, traumatismes) était toujours supérieur à 1. (Schwarzinger et al. 2018)

L'alcool représente donc un enjeu considérable de santé publique à travers le monde et particulièrement en Europe et en France.

4) Usage et Mésusage

En 2018, un article publié dans « The Lancet » (Burton et Sheron 2018) et relayé par l'OMS en date du 13-09-2018 (WHO The Lancet. 2019), permet de démontrer qu'il n'existe pas de bon usage de l'alcool, qu'elle qu'en soit la quantité consommée.

C'est à dire que même lorsque l'alcool n'induit pas encore d'effet négatif objectivable sur la santé, il augmente le risque de développer certaines pathologies et ce, quelle qu'en soit la quantité

consommée. La Société Française d'Alcoolologie (SFA) a proposé en 2001 d'organiser chez l'adulte la classification des conduites d'alcoolisation en différentes catégories autour des termes "usage" et "mésusage". (SFA. 2001) Cette classification est réalisée d'après la déclaration de la consommation d'alcool d'un patient. Cette consommation d'alcool est mesurée en nombre de verres. En France, le verre standard contient 10g d'alcool pur, soit 1 Unité d'Alcool (UA). (Fig.1)



Figure 1 : équivalence entre différents verres d'alcool.

Source : <https://www.alcool-info-service.fr> 04/2019

L'usage correspond à une consommation ponctuelle ou répétée, qui demeure contrôlée. L'usage peut être expérimental, occasionnel, régulier voir quotidien. La consommation n'a pas de répercussion négative sur les plans psychoaffectif et/ou social, ni sur le plan somatique.

La notion d'usage a bénéficié de repères de consommation diffusés en France :

- Usage ponctuel : pas plus de 4 verres par occasion
- Usage régulier : depuis 2019, les recommandations officielles pour la consommation régulière d'alcool ont changé : on ne distingue plus de seuils différents pour l'homme et pour la femme : pas plus de 10 verres par semaine, et pas plus de 2 verres par jour, avec 2 jours sans consommation par semaine.

Auparavant, les recommandations étaient telles qu'il ne fallait pas plus de 21 verres par semaine chez l'homme, soit 3 verres par jour et pas plus de 14 verres par semaine chez la femme, soit 2 verres par jour, avec au moins 1 jour sans consommation par semaine.

Mais cette limitation ne prenait en compte que le risque de TUA, et pas les risques purement somatiques, comme c'est à présent le cas. (Alcool-info-services. 2019) On estime que dans le respect de ces seuils, le risque pour la santé est socialement « acceptable », et permet notamment de

limiter le risque de développer une addiction.

Mésusage : Trois catégories de mésusage sont définies :

- ***L'usage à risque*** :

Il s'agit de toute conduite d'alcoolisation ponctuelle ou régulière qui associe une consommation supérieure aux seuils définis ci-dessus et non encore associée à un quelconque dommage médical, psychologique ou social et/ou une dépendance, mais susceptible d'en induire à court, moyen ou long terme. La personne dont le comportement de consommation se situe dans cette catégorie est appelée "consommateur à risque".

L'usage à risque inclut également des consommations égales ou inférieures aux seuils de l'OMS lorsqu'elles sont prises : *dans certaines situations à risque* pour lesquelles cette consommation est déjà dangereuse comme la conduite de véhicules, le travail sur machines dangereuses, à un poste de sécurité..., situations qui requièrent de la vigilance et de l'attention, *en cas de risque individuel particulier*, par exemple la consommation répétée associée à d'autres produits psycho-actifs susceptibles de potentialiser les effets de l'alcool, les pathologies organiques et/ou psychiatriques associées notamment celles qui exigent un traitement médicamenteux, la modification de tolérance du consommateur en raison de son âge, sexe, situation psychologique ou physiologique particulière comme état de fatigue ou grossesse.

- ***L'usage nocif*** :

Il s'agit de toute conduite d'alcoolisation qui associe l'existence d'au moins un dommage d'ordre médical, psychologique ou social induit par l'alcool, sans dépendance. Cette catégorie est donc définie par les dommages induits par la consommation, et non par les seuils ou la fréquence de cette consommation. Les personnes qui se situent dans cette catégorie sont dénommées "consommateurs à problèmes".

- ***L'usage avec dépendance*** :

Il s'agit de toute conduite d'alcoolisation caractérisée par une perte de la maîtrise de la consommation. Cette catégorie ne se définit ni par rapport à un seuil ou une fréquence de consommation, ni par l'existence de dommages induits qui sont cependant extrêmement fréquents. La définition de la dépendance ne comporte pas de critères impliquant que la consommation soit quotidienne ou habituelle. Les personnes dont le comportement se situe dans cette catégorie sont appelées "consommateurs alcoolodépendants".

Parmi les mésusages nous pouvons citer le « **binge-drinking** » ou « **biture expresse** » qui correspond à une alcoolisation massive durant un laps de temps très court, visant à atteindre rapidement un état d'ivresse.

5) Alcool, Addiction et TUA

Les addictions se caractérisent par un comportement automatisé, qui s'impose au sujet « addict », et dont il ne peut pas se soustraire même lorsqu'il a pris conscience de l'effet néfaste de ce comportement sur lui-même et qu'il manifeste la volonté de ne pas le reproduire. Ces comportements répétitifs sont appelés « compulsions ». Ils sont accompagnés de pensées non-voulues, persistantes et dont le sujet ne peut se soustraire appelées « obsessions ». On parle de « perte de contrôle » du comportement. (Modell et al. 1992); pour revue (Vengeliene et al. 2009) Le terme ancien d' « alcoolodépendance » décrit l'addiction à l'éthanol, soit l'alcool des boissons alcoolisées.

1. Classification par le DSM-5

Depuis le DSM-5 (la cinquième édition et dernière en date, du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, parue en 2013), on regroupe sous le terme **TUAs** : les troubles d'usage d'alcool, le mésusage à l'alcool (usage à risque et usage nocif) et l'alcoolodépendance/addiction à l'alcool. On ne sépare donc plus l'abus d'alcool et l'addiction à l'alcool. En effet, il n'existe pas d'éléments suffisamment probants pour établir un stade intermédiaire entre une consommation abusive et l'addiction à l'alcool. (Fitzgerald et Morgan 2012) (O'Brien 2011) Les TUAs sont classés en trois catégories : léger, modéré, grave.

2. Diagnostic de l'addiction à l'alcool :

Le DSM-5 définit les TUAs (Troubles de l'Usage d'Alcool) ainsi qu'un certain nombre de critères qui permettent d'orienter le diagnostic. Celui-ci repose sur deux critères, dont le second est lui-même subdivisé en onze autres :

1. un mode de consommation conduisant à une altération du fonctionnement ou une souffrance cliniquement significatives,
2. la présence « au cours d'une période d'un an » d'au moins 2 des 11 critères suivants :

1. Incapacité de remplir des obligations majeures au travail, à l'école ou à la maison.
2. Usage dans des situations dans lesquelles celui-ci est physiquement dangereux.
3. Usage poursuivi malgré des problèmes sociaux ou interpersonnels persistants ou récurrents, causés ou aggravés par les effets de la substance.
4. Tolérance :
 - Besoin d'augmenter notablement les quantités de substance pour atteindre l'intoxication ou les effets désirés.
 - Effet diminué lors de l'usage continu.
5. Sevrage :
 - Syndrome de sevrage caractéristique de la substance
 - Substance consommée pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.
6. Substance prise en quantité plus importante et pendant une période plus longue que prévue.
7. Désir persistant, effets infructueux pour arrêter ou contrôler l'usage de la substance.
8. Beaucoup de temps passé à se procurer la substance, à la consommer ou à récupérer de ses effets
9. Importantes activités sociales, professionnelles ou de loisir sont arrêtées ou réduites à cause de l'usage de la substance.
10. Usage de la substance poursuivi malgré l'existence de problèmes physiques ou psychologiques persistants ou récurrents.
11. Existence d'un « craving » soit un désir fort ou une pulsion à consommer.

La validation des deux critères principaux, ainsi que le nombre de critères remplis parmi les onze subdivisions du second critère permettent d'établir respectivement l'existence d'un TUA, et le stade de ce dernier (léger, modéré, grave) : On parle de TUA léger lorsque 2 à 3 critères sont positifs, de TUA modéré pour 4 à 5 critères et de TUA grave pour 6 critères positifs ou plus.

On parle de rémission précoce :

Après que tous les critères diagnostic du TUA aient été établis, plus aucun ne l'a été depuis une période au moins égale à trois mois et inférieure à un an, sauf exception possible du craving : « fort désir ou besoin de consommer de l'alcool ».

On parle de rémission prolongée :

Après que tous les critères diagnostic du TUA aient été établis, plus aucun ne l'a été depuis une période au moins égale à un an, sauf exception possible du craving. Il faut préciser si la rémission, lorsqu'elle se produit, a lieu dans un environnement protégé ou non. Le risque de rechute n'étant pas le même, dans les deux cas. Un environnement protégé se caractérise par un accès limité à l'alcool

(prison, hôpitaux, etc...).

Il existe quatre modifications principales par rapport au DMS-IV :

- La fin de la distinction entre l'abus d'alcool et l'addiction à l'alcool comme deux choses parfaitement différentes.
- L'abandon du terme « dépendance » pour parler des SUD (Substances Use Disorders) dont le TUA. En effet, ce terme est réservé aux adaptations du corps à un médicament, qui peuvent amener à l'obligation d'augmenter les doses pour obtenir l'effet recherché et à un syndrome de sevrage en cas d'arrêt brutal.
- La suppression de la réalisation d'actes illégaux comme critère diagnostic.
- L'introduction d'un nouveau critère de diagnostic : la craving qui se définit comme une poussée intrinsèque très forte à consommer.

(Fitzgerald et Morgan 2012) (O'Brien 2011)

3. Signes physiques du TUA

- La tolérance : Au fur et à mesure des consommations, et afin de préserver l'homéostasie, il y a une adaptation du corps à l'alcool (neuroadaptations), qui lui permet de développer une résistance à ces effets qui deviennent donc de moins en moins marqués : on parle de tolérance. Ceci explique que, pour parvenir à retrouver l'effet de la première consommation, il va être nécessaire d'augmenter toujours un peu plus la dose de la substance. Pour demeurer dans un état physique « neutre », égal à celui du sujet naïf (n'ayant jamais consommé la substance), le sujet dépendant doit maintenir un certain niveau de consommation.
- Le syndrome de sevrage : L'absence ou l'insuffisance de la substance induit en quelques heures (4-12 heures) un manque/mal-être physique et mental : on parle de **syndrome de sevrage**. Les symptômes sont opposés pour la majorité aux effets même de la substance. Dans le cas de l'alcool, on va retrouver des troubles psychiatriques : anxiété, cauchemars, insomnie, agitation..., mais également neurovégétatifs : sueurs, tremblements, tachycardie, hypotension... et digestifs : nausées, vomissements, diarrhées... Le syndrome de sevrage à l'alcool lorsqu'il est très important, peut induire ce qu'on appelle un *Delirium Tremens* : hallucinations accompagnées de convulsions.

Le syndrome de sevrage est responsable du « **dark-side** » de l'addiction. Il entraîne en effet un **renforcement négatif** : le comportement de consommation d'alcool est renforcé, par les effets négatifs subis en l'absence de ce comportement. En effet, pour éviter ou soulager ces effets, le sujet est amené à consommer.

4. *Addiction à l'alcool*

Le besoin de consommer peut s'expliquer dans un premier temps, à la volonté d'échapper à un stress pré-existant à la consommation de la substance ; stress qui constitue donc un **facteur de vulnérabilité** à la drogue tout comme la dépression (stress au travail par exemple), mais également à celle de bénéficier d'un aspect récréatif induit par la substance.

En effet, les drogues vont généralement activer le **circuit de la récompense** et favoriser la libération de dopamine, neurotransmetteur associé aux effets positifs ressentis lors des premières consommations.

Le comportement de consommation d'alcool est donc associé à la récompense, ce qui constitue ce qu'on appelle un **renforcement positif** : le comportement étant associé à une sensation positive, il a plus de probabilité d'être répété. A force de répétitions, le **comportement** est **automatisé** et ne demande plus réellement de cognition. Il s'impose de plus en plus, et va même, à l'encontre du propre raisonnement du consommateur : c'est **l'addiction**. L'addiction correspond donc à un apprentissage pathologique d'un comportement.

5. *Modélisation de l'addiction à l'alcool*

Il est possible de modéliser l'addiction à l'alcool avec une population de rats. L'administration d'éthanol peut se faire chez le rat de différentes manières. Elle peut être imposée, par injections intra-péritonéales ou par inhalation de vapeurs d'alcool. Mais, elle peut également être volontaire, dans ce cas on parle d'auto-administration. Celle-ci peut être opérante ou non opérante, selon que le rat ait ou non à fournir un « travail » pour s'auto-administrer l'alcool, en général ce travail correspond à appuyer sur un levier. Dans une auto-administration opérante, l'animal est donc obligé de fournir un travail pour obtenir une dose d'éthanol.

Dans la méthode d'auto-administration non opérante, que nous avons utilisée dans ce travail, l'alcool est le plus souvent fourni par le biais de la boisson, et le rat a le choix entre deux fluides : un biberon d'eau courante et un biberon d'eau additionné d'éthanol. Ce protocole d'auto-administration non-opérante est intéressant pour l'évaluation de la consommation volontaire d'éthanol pur en gramme par kilo de rat et par 24 h, ainsi que la préférence en éthanol par rapport à l'eau : c'est à dire la quantité d'éthanol pur en gramme par kilo de rat et par 24 h sur la quantité de fluides totale consommée par kilo de rat pendant ces mêmes 24 h, exprimée en pourcentage. Par contre, et en raison de l'absence de travail à fournir pour se procurer la dose d'éthanol, ce protocole ne permet pas, à l'inverse de l'auto-administration opérante, d'évaluer la motivation à consommer de l'alcool (plus le travail fourni pour une dose d'éthanol est important, plus la motivation est forte).

La concentration d'éthanol dans le biberon est choisie afin d'une part de ne pas être trop faible, et donc sans effet pharmacologique et d'autre part, afin de ne pas être trop forte, ce qui pourrait amener les rats à ne pas consommer, le goût de l'éthanol étant naturellement assez aversif. Du saccharose peut éventuellement être utilisé, dans certains protocoles d'auto-administrations non-opérantes, pour contrer ce goût et favoriser la consommation.

Dans ce travail de thèse, nous avons procédé à une auto-administration non-opérante particulière dite de l' « accès intermittent à de l'éthanol 20% », qui permet une augmentation rapide et durable de la consommation d'éthanol ainsi que de sa préférence, malgré le goût de l'éthanol et la forte concentration. (Simms et al. 2008)

L' « accès intermittent » correspond à un accès restreint à l'éthanol 20% : il y a trois sessions de 24 h d'accès à l'éthanol par semaine, tandis qu'entre deux sessions, les rats n'ont accès qu'à de l'eau.

6. Notion de variabilité individuelle

La recherche sur le comportement, d'un groupe d'individu d'une même espèce (ici, sur un groupe de jeunes rats adultes mâles Long-Evans) doit prendre en considération la notion de variabilité individuelle. En effet, au sein d'une même espèce, si le comportement de deux individus dans une même situation, est en général plus semblable qu'entre deux individus de deux espèces différentes, il n'en demeure pas moins qu'il n'est pas absolument identique : c'est la variabilité inter-individuelle. Celle-ci s'explique par des différences dans les structures cérébrales à l'âge adulte, elles-mêmes associées à des différences dans le comportement, dans les capacités cognitives et dans les prédispositions à développer des pathologies mentales et des addictions.

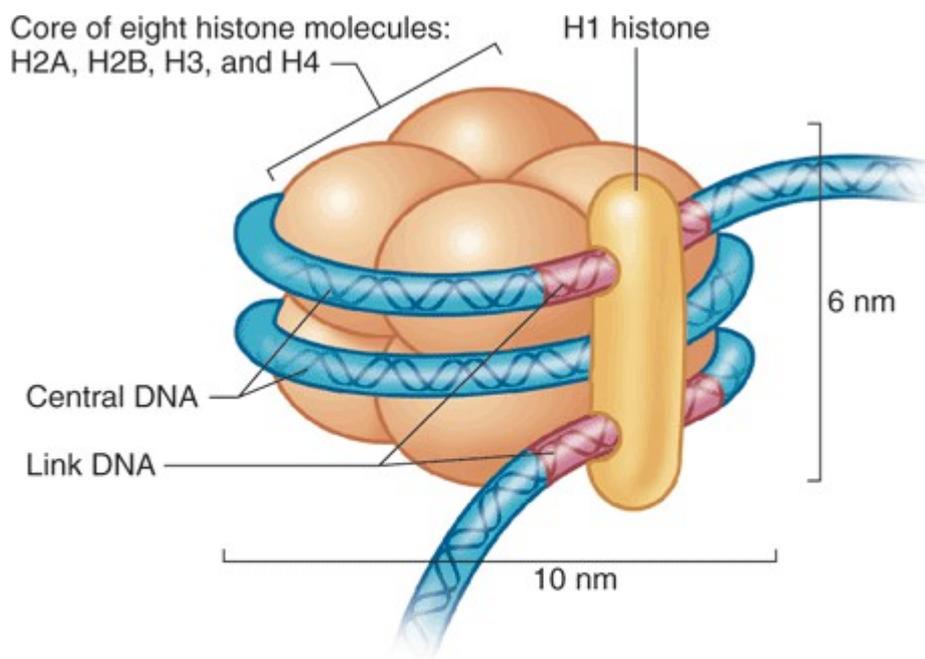
Ces différences dans les structures cérébrales à l'âge adulte s'expliquent à la fois par la génétique et par l'environnement. (Pour revue Gu et Kanai 2014) De plus, un même individu peut dans des conditions identiques et à divers moments, avoir un comportement différent : c'est la variabilité intra-individuelle. Il a été possible de montrer, qu'elle n'était pas négligeable, en ce qui concerne la consommation chronique d'alcool. (Yelland et al. 2008)

Ces éléments permettent de distinguer au sein d'une même population étudiée et pour un même paramètre, deux sous-populations séparées par la médiane. Ces deux sous-groupes peuvent différer, en sus de leur différence phénotypique apparente sur le paramètre étudié, sur un autre trait phénotypique qui n'est pas au départ l'objet de l'étude. Dans ce travail, pour explorer pleinement les effets du traitement par EBJD9, nous avons été amenés à distinguer deux tels sous-groupes.

6) Alcool et perpétuations épigénétiques

Les récentes recherches menées vis-à-vis de l'alcool ont permis de mettre en évidence que l'alcool était un perturbateur épigénétique. Cependant, la compréhension des mécanismes associés à cette perturbation épigénétique est à parfaire, afin d'envisager d'éventuelles pistes thérapeutiques. C'est dans la volonté de mieux comprendre, le lien entre l'épigénétique et l'alcool que ce travail de thèse, et l'expérimentation sur laquelle il repose, ont été réalisés.

Les protéines histones composent, avec l'ADN et certaines autres protéines non-histones, la chromatine. Au sein de cette chromatine, l'ADN est compacté. La chromatine resserrée est dite hétérochromatine. La chromatine relâchée est dite euchromatine. L'unité fonctionnelle de la chromatine est le nucléosome. (Fig.2) Il est constitué d'environ 147 paires de bases, entourant un octamère de protéines histones, lui-même constitué de deux copies de chacune des histones : H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 est séparée de l'octamère.



Source: Janson LW, Tischler ME: *The Big Picture: Medical Biochemistry*:
www.accessmedicine.com

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Figure 2 : Représentation du nucléosome.

Le domaine de l'épigénétique dans sa définition simple, correspond à l'ensemble des mécanismes qui vont moduler l'expression des gènes sans en modifier les séquences nucléotidiques. L'épigénétique va comporter un ensemble de mécanismes visant l'ADN lui-même, certaines

familles d'ARN, ou encore des protéines histones : par exemple la phosphorylation ou encore la méthylation des protéines histones par les HMT ou Histone Méthyl Transferase, l'acétylation des protéines histones par les HATs ou Histone Acétyl-Transferases, ainsi que la méthylation de l'ADN lui-même par les DNMT ou ADN Méthyl Transferase. (Pour revue (Harrison et Dexter 2013)) (Fig.3) Ces différents mécanismes épigénétiques sont tous impliqués dans les effets qu'induisent la consommation aiguë mais aussi chronique et répétée d'alcool. (Pour revue (Subhash C. Pandey, Kyzar, et Zhang 2017)) Pour l'exemple, chez le rat dépendant, Barbier et al, ont pu mettre en évidence que l'alcool réduisait l'activité de PRDM2, une Histone Méthyl Transferase, qui mono-méthyle la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9Me1) au niveau du cortex pré-frontal dorsomedial. Cela s'accompagnait d'une baisse des niveaux de méthylation H3K9Me1 et d'une augmentation de la recherche et de la consommation d'alcool. (Barbier et al. 2017)

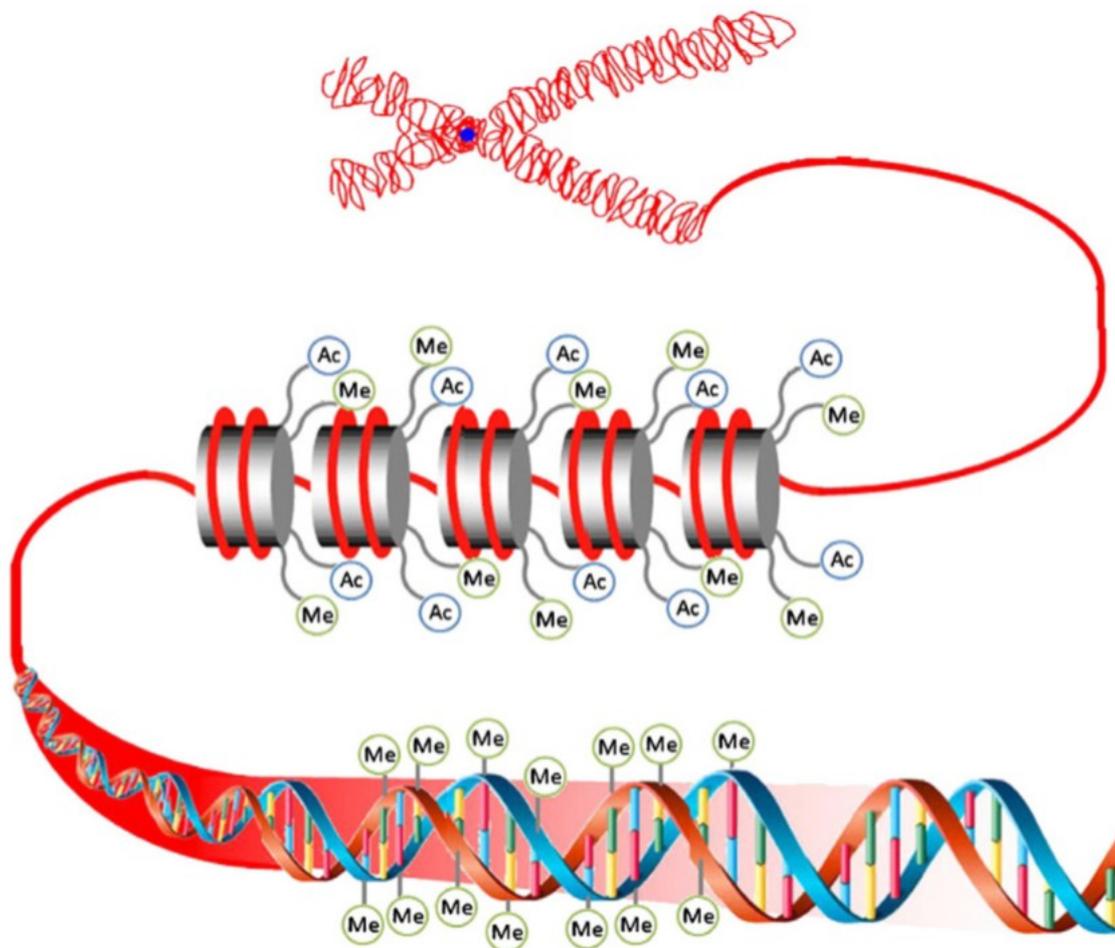


Figure 3 : Différents mécanismes épigénétiques. Le double brin d'ADN est représenté en rouge, les octamères d'histones par des cylindres gris. Les filaments qui s'en détachent sont les queues N-terminales des histones, sur lesquelles nous pouvons voir qu'il y a eu acétylation (Ac) et/ou méthylation (Me). Si on s'attache à regarder le double-brin d'ADN de plus près, on peut voir qu'il est également méthylé. La méthylation de l'ADN est augmentée lors de la consommation chronique d'alcool, l'acétylation des histones avec la consommation aiguë. (Pour revue (Harrison et Dexter 2013))

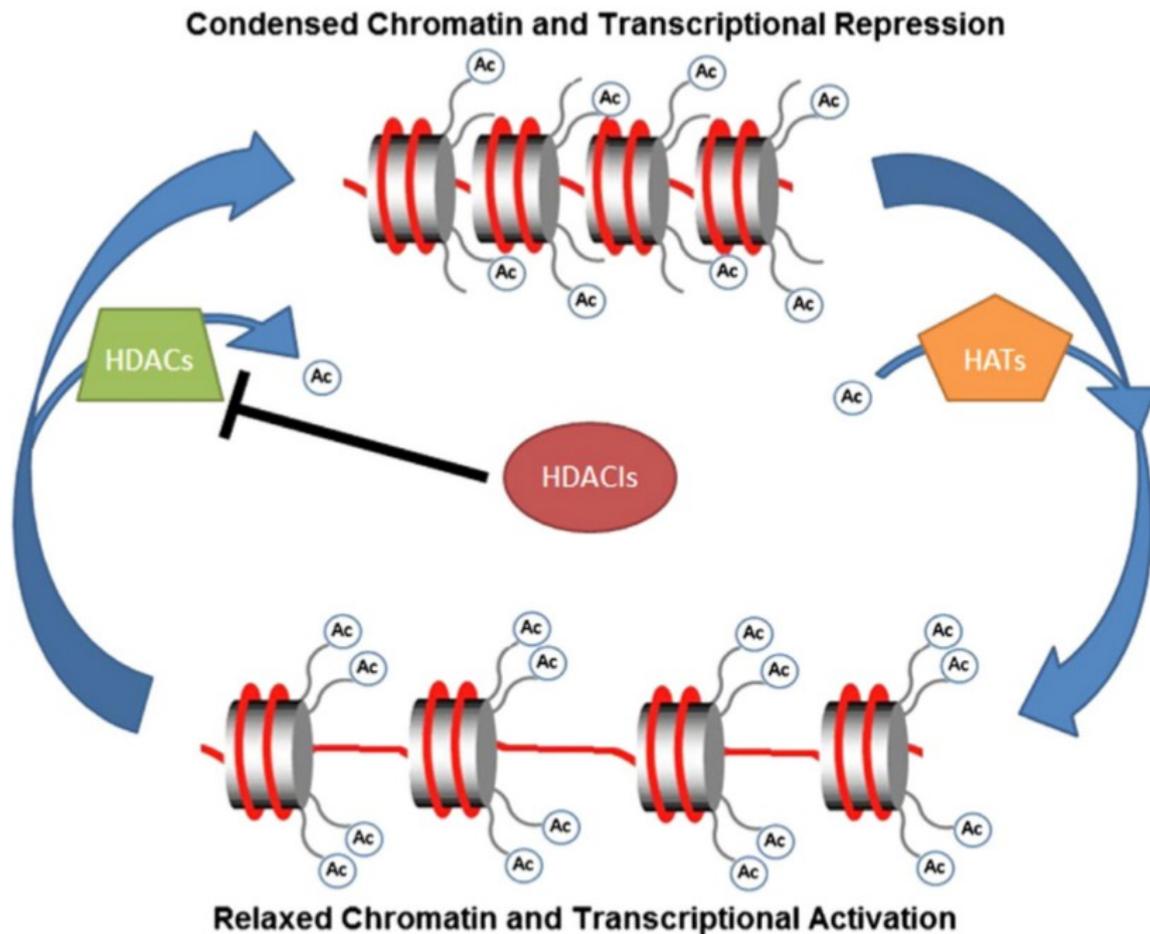


Figure 4 : Acétylation et désacétylation des histones Sur la figure, nous pouvons voir les octamères d'histones représentés par des cylindres gris. Les filaments qui s'en détachent sont les queues N-terminales des histones. Ce sont sur celles-ci que vont se produire les acétylations et les désacétylations. L'enzyme HAT représentée en jaune, va catalyser l'ajout du groupement acétyl sur une lysine de la queue N-terminale, à l'inverse l'enzyme HDAC représentée en vert, va catalyser la désacétylation de cette lysine. Il existe des molécules qui vont empêcher l'action des protéines HDACs et ainsi favoriser l'état d'acétylation des protéines histones. Ces molécules, représentées en rouge, sont appelées HDACis, ou inhibiteurs HDACs. (Harrison et Dexter 2013)

7) Les HDACs :

Une Histone Désacetylase (HDAC) est une enzyme qui va désacétyler les résidus lysines des queues N-terminales des protéines histones. Une HDAC va permettre la (re)condensation de la chromatine et réguler à la baisse, notamment la réplication, la réparation ou encore la transcription de l'ADN en empêchant la fixation des facteurs de transcription. (Fig.4)

Les histones H3 possèdent 5 sites d'acétylation, les histones H2B et H4 possèdent 4 sites d'acétylation et les histones H2A en possèdent en seul. (Pour revue (Legastelois et al. 2017)) Cependant, les histones ne sont pas les seules cibles des HDACs. Beaucoup d'autres cibles leurs sont connues et cela montre qu'elles jouent des rôles variés au niveau de la régulation du métabolisme. (Pour revue (Singh et al. 2015); (Walker et al. 2015); pour revue (Harrison et Dexter 2013))

L'action des enzymes HDAC s'oppose à celle des enzymes Histone Acétyl Transferase (HAT), qui va acétyler les protéines histones, toujours sur les résidus lysine, donc décondenser la chromatine et par là même réguler à la hausse, notamment, la transcription. (pour revue (Harrison et Dexter 2013))

1. Classification des HDACs :

Il existe diverses isoformes des HDACs. Chez l'humain, nous en connaissons actuellement 18. (pour revue (Singh et al. 2015))

Elles sont réparties en 4 grandes classes en fonction de leur analogie et de leurs cofacteurs :

- La première, la classe I, comporte les HDACs 1, 2, 3 et 8.
- La classe II, les HDACs 4,5,6,7,8, 9 et 10. Cette classe se subdivise elle-même en les sous-classes IIa (4,5,6,9) et IIb (6,10).
- La classe III comporte les HDACs dites « sirtuins » au nombre de 7 (il y a donc sirtuin1, sirtuin2, etc...).
- La dernière, la classe IV, ne comporte qu'une isoforme, l'HDAC 11.

Toutes les HDACs nécessitent un cofacteur Zn^{2+} au niveau de leur site d'action, sauf la classe III dont l'activité est régulée par le cofacteur NAD^+ . Les classes I et II sont les mieux connues.

Au niveau cérébral, elles vont être exprimées différemment selon le type cellulaire mais également selon la localisation (noyau ou cytosol).

Les HDACs 1, 2, 9 et 11 sont principalement localisées au niveau du noyau, tandis que HDAC 6 est cytoplasmique. Les HDACs 3,4,5 et 7 vont transiter entre le noyau et le cytoplasme (pour revue (Legastelois et al. 2017))

A l'heure actuelle, nous connaissons des inhibiteurs de HDACs, mais aucun n'a montré de sélectivité pour une unique HDAC. Pour l'exemple, nous pouvons citer la trichostatine (TSA) qui inhibe les classes II et III des HDAC (Agudelo et al. 2011), mais il en existe d'autres. (Pour revue (Harrison et Dexter 2013); (Agudelo et al. 2011)) Les inhibiteurs des HDACs sont classés en différentes familles selon leurs structures chimiques. (Fig.5)

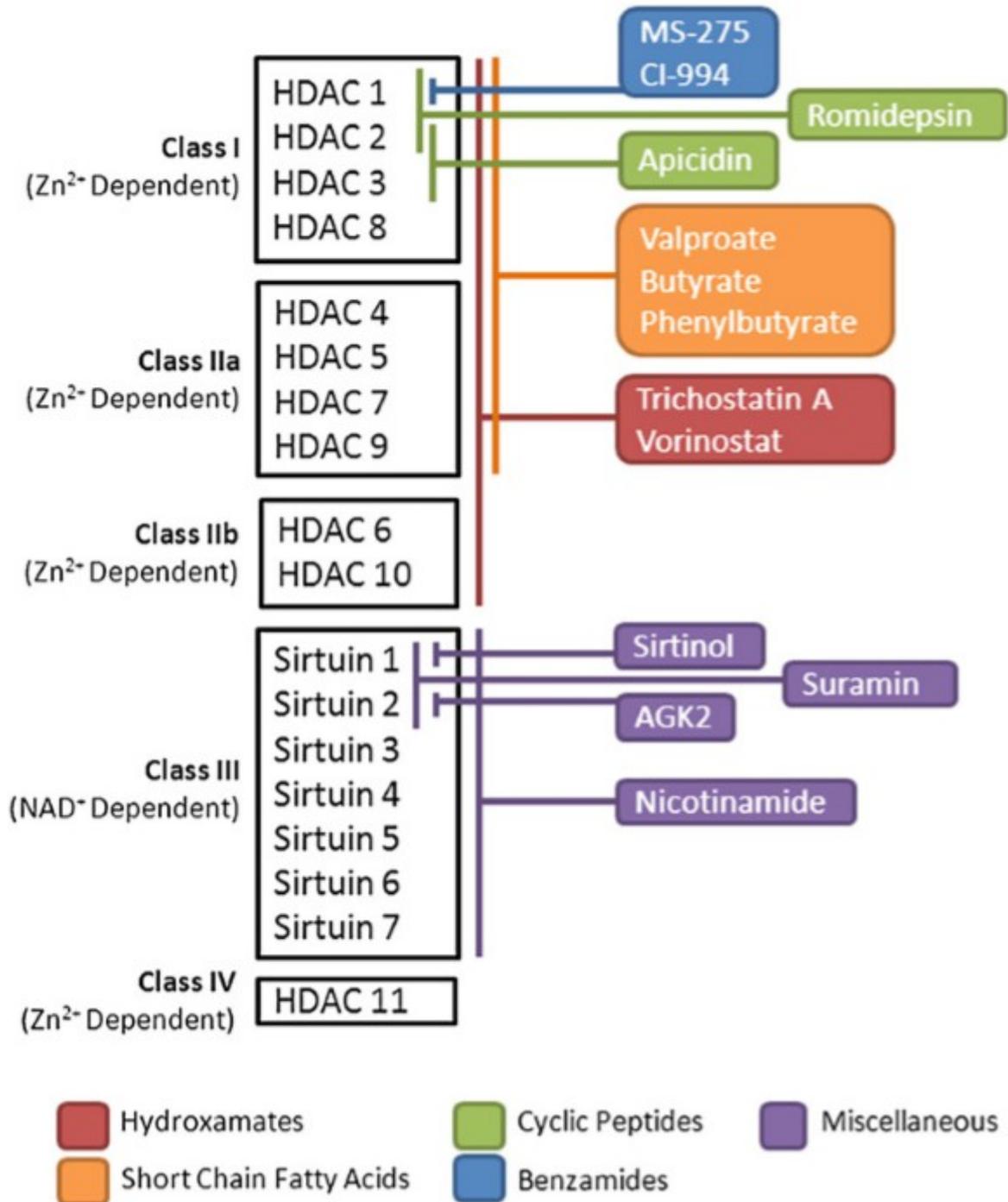


Figure 5 : table des différentes HDACs par famille et inhibiteurs (Harrison et Dexter 2013)

2. Mécanisme d'action :

Sur le mécanisme d'action présent en figure 6, on voit la lysine acétylée dont le groupement acétyl est entouré en jaune. C'est le mécanisme d'action d'une HDAC nécessitant le zinc (entouré en violet). Celui-ci comporterait deux temps :

- une base vient extraire un proton à une molécule d'eau formant une liaison faible avec le Zn²⁺ puis il y a une attaque nucléophile de l'oxygène (en orange).
- Un acide vient céder un proton au groupe partant (en marron) et il s'en suit un clivage de la

liaison amide (en vert clair). (Bourguet et al. 2018)

De ce fait, le résidu lysine de la queue *N*-terminal de l'histone redevient positive et donc disponible pour interagir avec les groupements phosphate négatifs de l'ADN, ce qui fait que la chromatine prend une forme plus resserrée qui diminue l'accès aux facteurs de transcription. A l'inverse, lorsque la lysine est acétylée, la chromatine prend une conformation plus lâche, et donc plus facile d'accès aux facteurs de transcription. (Pour revue (Legastelois et al. 2017))

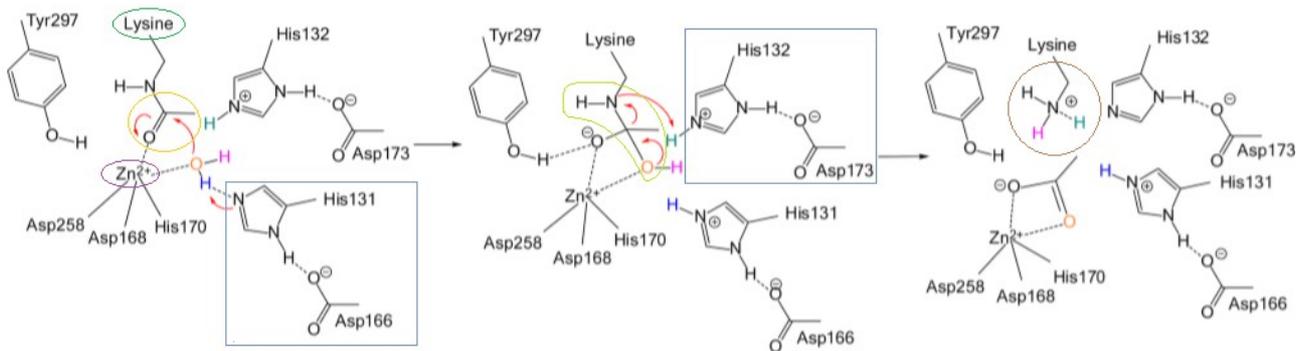


Figure 6 : Mécanisme de désacétylation des protéines histones par les HDACs

(Modifié d'après (Bourguet et al. 2018))

3. HDACs et Alcool :

De multiples études ont montré qu'il existait des altérations épigénétiques après l'exposition à l'alcool, notamment celles qui impliquent l'acétylation et la désacétylation des protéines histones. (Botia et al. 2012) (Barbier et al. 2017)(Pour revue (Berkel et Pandey 2017), pour revue (Jangra et al. 2016)) (Subhash C. Pandey, Kyzar, et Zhang 2017); (Warnault et al. 2013)

4. HDAC et consommation aiguë d'alcool :

Durant une consommation aiguë d'alcool, au sein de l'amygdale étendue, mais également dans d'autres régions du circuit de la récompense, l'alcool augmente le niveau d'acétylation des histones (principalement les H3K9 et H4K14).

Cette acétylation a pour conséquence une « ouverture » de la chromatine, elle-même entraînant une augmentation de la transcription de gènes tel que le BDNF, un peptide diminuant la consommation d'alcool (Jerome Jeanblanc et al. 2013), ou encore du neuropeptide Y (NPY) une molécule « anti-stress » ((Morgan et al. 2002, 2000); (Zhou et al. 2008)), l'ensemble conduisant à un effet anxiolytique. (Pour revue voir (Palmisano et Pandey 2017))

L'effet anxiolytique observé est associé à une augmentation de la DSD (« dendritic spine density »), elle-même associée à une bonne plasticité synaptique et à une augmentation de l'expression de la protéine ARC et du BDNF, principalement au niveau de l'amygdale (mais également dans d'autres régions en culture cellulaire, comme le NAC). (S. C. Pandey et al. 2008) (Subhash C. Pandey, Kyzar, et Zhang 2017)

Au fur et à mesure des consommations répétées, le risque est de passer de cette consommation maîtrisée, raisonnable, et récréative à une consommation de plus en plus importante en terme quantitatif d'une part et de moins en moins volontaire d'autre part. En effet, la consommation passe petit à petit de la recherche affirmée d'un plaisir, à une contrainte de plus en plus marquée d'échapper à une anxiété, en l'absence d'alcool. (Subhash C. Pandey, Kyzar, et Zhang 2017)

5. HDAC et sevrage suite à une consommation chronique :

L'enzyme HDAC (histone désacétylase) dont l'activité conduit à la désacétylation des histones, et donc ferme la chromatine et réduit la transcription, voit son activité diminuée lors de traitements chroniques. (S. C. Pandey et al. 2008) (Subhash C. Pandey, Kyzar, et Zhang 2017). Tandis qu'une étude a permis de voir une augmentation des niveaux des ARNm HDAC1 dans le striatum après une consommation chronique. (Legastelois, Botia, et Naassila 2013)

Pendant un sevrage d'alcool suivant une consommation chronique et répétée, on peut observer une augmentation des comportements de type anxieux chez le rat.

Cette hyper-anxiété est associée à une augmentation de l'activité des HDACs ainsi qu'à une diminution de l'expression génique du facteur neurotrophique BDNF et de la protéine ARC, au niveau de l'amygdale, qui jouent un rôle dans la plasticité synaptique. (You et al. 2014) pour revue voir (Palmisano et Pandey 2017))

Cette augmentation de l'activité des HDACs est liée à une augmentation de la neurodégénération lors de la consommation de drogues. L'alcool induit non seulement une augmentation dose-dépendante de l'expression de l'HDAC2 mais également un fort stress oxydatif. Par ces deux mécanismes, il a un effet neurodégénératif. (Agudelo et al. 2011)

8) Les inhibiteurs HDACs :

1. Utilisations médicales des inhibiteurs HDACs :

L'utilisation la plus développée est celle qui fait des iHDACs des anti-néoplasiques, notamment : Romidepsin, SAHA, LBH589, acide valproïque... Mais elles ont un potentiel également dans les :

- Maladies neurodégénératives : la maladie de Parkinson (pour revue (Harrison et Dexter 2013)), la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington (pour revue (Kyzar et Pandey 2015))
- Maladies inflammatoires : l'asthme (Royce, Ververis, et Karagiannis 2012)
- Maladies psychiatriques : notamment celles qui sont des comorbidités de la dépendance à l'alcool et à d'autres dépendances : le stress, l'anxiété, la dépression (Peña et al. 2014)

Les recherches menées ces dix dernières années indiquent que les inhibiteurs HDAC pourraient avoir un intérêt dans le traitement des dépendances.

Dans le cas de l'alcoolodépendance, les inhibiteurs de la classe I, ainsi que l'ont montré les travaux du laboratoire GRAP, se montrent particulièrement intéressants. (Bourguet et al. 2018) (Legastelois et al. 2017) (Jerome Jeanblanc et al. 2015) (Simon-O'Brien et al. 2015) (Botia et al. 2012) (Legastelois, Botia, et Naassila 2013). Nous rappellerons ci-dessous les principaux inhibiteurs HDACs ayant montré un intérêt dans la dépendance à l'alcool.

2. L'Entinostat (MS275) :

MS275 est un inhibiteur HDACs, sélectif de la classe I. (pour revue (Jérôme Jeanblanc et al. 2018))

Le MS275 permet de limiter la consommation d'alcool chez le rat dépendant, et prévient le comportement de binge-drinking. (Warnault et al. 2013). Jeanblanc et al 2015, ont pu mettre en évidence chez un modèle d'addiction à l'alcool chez le rat, ayant reçu des injections intracérébroventriculaires de MS275, une augmentation de l'acétylation des protéines H4 dans le striatum dorso-latéral et dans le noyau accumbens (qui sont des zones importantes dans le circuit de la récompense). Au niveau comportemental, on notait une baisse de l'auto-administration d'alcool de 75%, une baisse de la motivation de 25% et une baisse de la rechute et de la ré-acquisition du comportement de 50%, même après arrêt du traitement. MS275 n'a montré d'effet que sur le comportement des rats addicts à l'alcool. (Jerome Jeanblanc et al. 2015); (Warnault et al. 2013)

MS275 passe difficilement la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour atteindre l'encéphale, ce qui peut constituer un problème majeur pour le développement d'un médicament. (Hooker et al. 2010) Cependant, une autre étude chez un modèle de rat d'addiction à l'alcool a permis de montrer

que MS275 réduisait de 10% l'auto-administration d'alcool, après deux jours consécutifs d'une injection par jour, intrapéritonéale, et ce malgré la pauvre diffusion à travers la BHE. (Simon-O'Brien et al. 2015) Ces résultats permettent d'imaginer MS275 comme un potentiel épimédicament dans le traitement de l'alcoolodépendance.

3. *La trichostatin A (TSA) :*

La trichostatin A (TSA) est un inhibiteur HDACs connu pour inhiber sélectivement les familles des HDACs II et III. Une étude a permis de montrer sur une culture cellulaire SK-N-MC, traitée par TSA avant un traitement par l'éthanol sur 24 h, une diminution significative de l'expression génique pour HDAC2 en comparaison du traitement par éthanol seul sur 24 h. La TSA inhibe également l'augmentation induite par l'alcool des niveaux d'activité des protéines HDACs ainsi qu'elle réduit le stress oxydatif dû à l'alcool.

L'administration de TSA permet de limiter la consommation d'éthanol, ainsi que le comportement de binge-drinking chez le rat. (Warnault et al. 2013)

Dans d'autres études, menées chez des populations de rats dépendants, pendant le sevrage et au niveau de l'amygdale, la TSA entraîne une baisse de l'activité HDAC nucléaires ainsi qu'une baisse d'expression des protéines HDAC2. La TSA rétablit les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 (H3K8 et H4K9) abaissés lors d'une alcoolisation chronique. Toujours au niveau de l'amygdale, les niveaux d'expression abaissés pour BDNF, et la protéine ARC (importants pour la plasticité synaptique) et du NPY (molécule anti-stress) pendant un sevrage suite à une exposition chronique à l'alcool ont pu être normalisés et on observait parallèlement une amélioration de la densité dendritique. Enfin, le comportement de type anxieux associé à ce sevrage était également corrigé. (Agudelo et al. 2011) (You et al. 2014) (Sakharkar et al. 2014) (S. C. Pandey et al. 2008)

4. *Le butyrate de sodium (NaB) :*

Le butyrate de sodium ou NaB est un inhibiteur HDAC des classes I et IIa.

Dans un modèle de rats rendus dépendant à l'alcool après expositions aux vapeurs d'alcool, Simon-O'Brien et al. 2015 ont pu montrer au niveau de l'amygdale et des régions corticales, une augmentation de l'acétylation des histones H3, ainsi qu'au niveau comportemental, une baisse de l'auto-administration excessive d'alcool de 10%. Cette baisse de la consommation n'était pas visible chez les rats non-dépendants.

Dans cette même étude, il a également été montré que le NaB permettait de limiter l'escalade de la consommation d'alcool dans un accès intermittent à de l'éthanol 20%, qui constitue une méthode

d'alcoolisation volontaire chez le rat, ayant démontrée son efficacité. (Simms et al. 2008) Encore plus intéressant, le NaB empêchait totalement l'augmentation de la consommation d'alcool suite à un sevrage, ce qui en fait une molécule particulièrement intéressante pour prévenir la rechute. (Simon-O'Brien et al. 2015)

Par ailleurs, le NaB s'est montré capable de bloquer des neuroadaptations à long-terme induites par l'éthanol chez des souris sensibilisées par des expositions répétées à l'alcool. (Legastelois, Botia, et Naassila 2013) La sensibilisation joue un rôle important dans l'escalade de la consommation d'alcool et également de la rechute. (Botia et al. 2012) Dans cette étude, NaB induisait une baisse globale de l'activité HDAC dans le striatum 1 à 2 h post-injection. (Legastelois, Botia, et Naassila 2013) Ensemble, ces résultats suggèrent que NaB pourrait être un épimédicament intéressant, pour prévenir l'escalade de la consommation d'alcool, induire une baisse de la consommation lorsqu'elle est déjà forte et aider à l'abstinence (prévention de la rechute).

5. L' alkylsulfonylhydrazide (ASH) :

L'alkylsulfonylhydrazide ou ASH, était supposé être, au vu de sa structure chimique, un inhibiteur potentiel de HDAC de la classe 1. Jeanblanc et al, ont expérimenté ses effets, dans un modèle de rats présentant un phénotype de binge-drinking important, sur l'auto-administration opérante d'alcool et sur la rechute, après abstinence.

L'administration se faisait par injections intra-cérébroventriculaires, et pour mieux étudier la rechute après abstinence : directement dans l'amygdale centrale CeA, dans la mesure où cette région est une zone clé dans la rechute après abstinence d'alcool.

Les injections intra-cérébroventriculaires, ont permis de voir une baisse significative de l'auto-administration opérante d'alcool dose-dépendante, mais pas une baisse de la motivation à consommer de l'alcool. Tandis que les injections dans l'amygdale centrale, n'ont pas permis de diminuer la consommation d'alcool, mais bien la rechute après abstinence (Jérôme Jeanblanc et al. 2018)

6. La 5-azacitidine (5-AZA) et la Vorinostat (SAHA) :

Une étude chez la souris, a permis de montrer que l'injection systémique de 5-AZA permettait de prévenir la consommation excessive d'alcool. En effet, chez des souris dépendantes, on observait une baisse de 20% de l'auto-administration non-opérante d'alcool. (Warnault et al. 2013) La suberoylanilide hydroxamine aussi appelée Vorinostat (SAHA) diminue la motivation des souris

dépendantes à rechercher l'alcool, ainsi que l'auto-administration opérante. SAHA s'est montré également efficace pour prévenir le binge-drinking chez le rat (Warnault et al. 2013)

9) EBJD9 :

EBJD9 est une molécule appartenant à la famille des sulfonylhydrazides, synthétisée en laboratoire (UMR 7312-CNRS (Reims)) et dont la formule chimique, la structure tridimensionnelle et certaines études menées par le laboratoire GRAP *in vitro* présentées ci-dessous, laissent à penser qu'elle pourrait être un activateur HDAC.

1. *Expérience in vitro, sur des cellules SH-SY5Y :*

L'expérience a été réalisée sur des cultures cellulaires de cellules issues de neuroblastome humain SH-SY5Y, qui correspondent à des précurseurs de cellules neuronales. Dans les premières expériences réalisées au laboratoire GRAP, les cultures cellulaires ont été traitées, pendant 24 h ou 48 h, soit avec la molécule EBJD9 à la concentration de 10 μ M, soit avec MS275 à cette même concentration 10 μ M.

MS275 est une molécule connue pour ses propriétés inhibitrices d'HDACs et nous sert donc de témoin interne de la bonne réalisation de l'expérience. Le principe de ces expériences consiste à réaliser une liaison immunofluorescente d'un anticorps dirigé contre la forme acétylée des Histones H4 (Ac-H4), dans les puits de culture des cellules traitées ou non. Par principe, un inhibiteur HDAC va augmenter l'expression de la forme acétylée (et donc l'immunofluorescence des cellules) tandis qu'un activateur HDAC va diminuer cette même forme acétylée, et il en résulte une baisse d'intensité de fluorescence des cellules.

Par rapport au groupe contrôle (cellules SH-SY5Y non traitées), et après 48 h de traitement, les cellules traitées avec EBJD9 étaient associées à une intensité de l'immunofluorescence des histones acétylées H4 (Ac-H4) significativement plus faible ($p < 0.01$) (Fig.7). Cela nous permet de dire que les H4 étaient moins acétylées sur la lysine 12 et tend à démontrer qu'EBJD9 favorise la désacétylation de cette lysine, peut être en activant une HDAC. Ce résultat n'était pas visible après 24 h de traitement. Par rapport au groupe contrôle, les cellules SH-SY5Y ayant reçu MS275, montraient une immunofluorescence significativement plus importante à 48 h ($p < 0.01$) et 24 h ($p < 0.01$). Ce qui permet de confirmer que MS275 est un inhibiteur HDAC et démontre la validité de la méthode. Par ailleurs, la différence entre le groupe MS275 et EBJD9 était très significative ($p < 0.01$) à 48 h et 24 h.

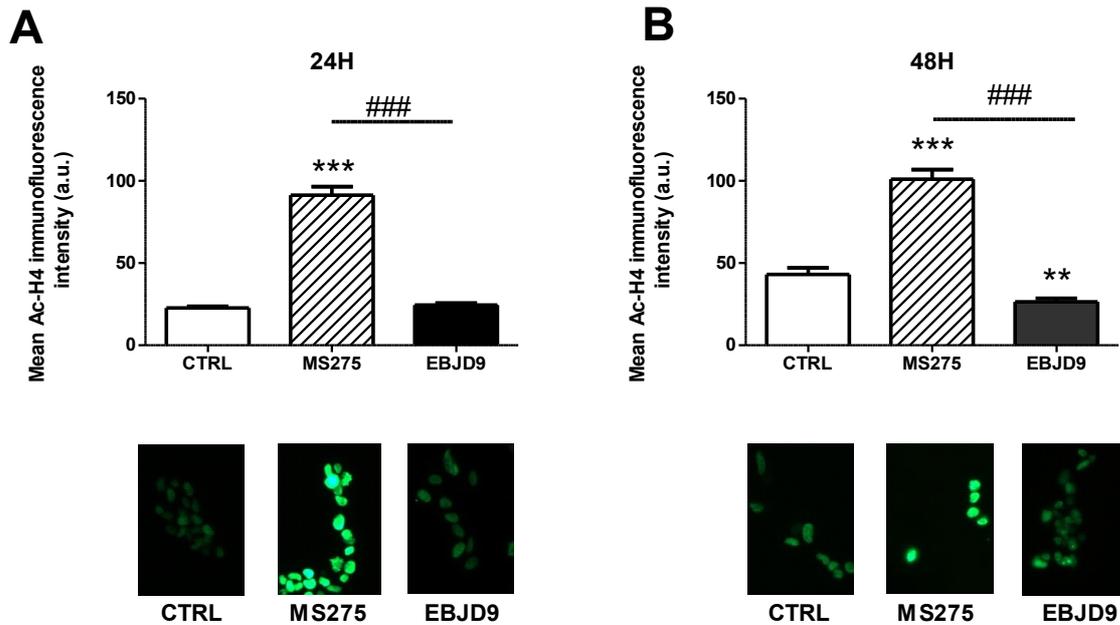


Figure 7 : Intensité de fluorescence Ac-H4K12 sur 24h et 48h, pour CTRL, MS275, EBJD9. Les résultats sont présentés pour A: 24 h de traitement et B : sur 48 h de traitement. Le groupe contrôle correspond aux cellules SH-SY5Y seules, le groupe MS275 a été traité avec 10 μ M et le groupe EBJD9 10 μ M également. Pour chaque groupe, 20 cellules ont été sélectionnées aléatoirement pour l'analyse d'image (logiciel : ImageJ). Les photographies ont été réalisées avec le microscope LEICA DM 4000B light (objectif x20). Pour chaque image, on mesure l'intensité de l'immunofluorescence, qui augmente avec la proportion d'histone H4 acétylée sur la lysine 12 (Ac-H4K12). Les résultats sont présentés sous forme d'intensité de fluorescence moyenne \pm S.E.M, exprimée en unité arbitraire a.u. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$: versus contrôle; ###: $p < 0,001$ MS275 versus EBJD9.

Cette expérience a été répétée sur un nombre plus important de cellules SH-SY5Y au cours de la réalisation de cette thèse au sein du laboratoire GRAP par Hinatea Houziaux, stagiaire.

Ce deuxième travail est présenté dans les résultats et comporte, en plus du précédent, une étude des effets d'un traitement des cellules par l'alcool.

2. Expérience ex vivo sur des cellules SH-SY5Y :

Sur des cellules SH-SY5Y (précurseurs de cellules neuronales) (CTRL), par rapport au groupe contrôle (SH-SY5Y seules), et après 48 h de traitement, le Western Blot montre un niveau d'acétylation H4K12 significativement supérieur pour le groupe MS275 tandis qu'il en montre un significativement inférieur pour le groupe EBJD9. Ce qui tend donc à penser que MS275 va favoriser l'acétylation de H4K12 tandis qu'EBJD9 va défavoriser cette acétylation H4K12, peut être en activant une HDAC. (Fig.8)

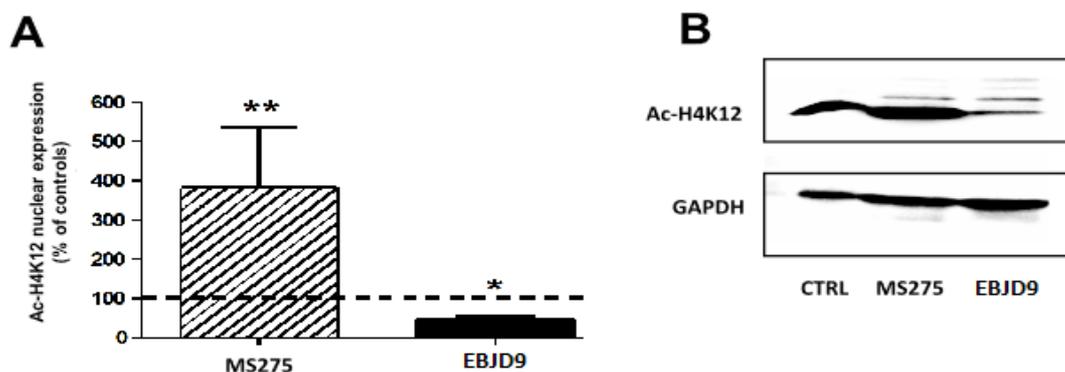


Figure 8 : Western Blot pour l'évaluation des niveaux Ac-H4K12 de cellules SH-SY5Y CTRL, ou ayant reçu MS275 (10 μ M) ou EBJD9 (10 μ M) pendant 48 h. L'expérimentation se fait sur des cellules SH-SY5Y. Certaines ne sont pas traitées et correspondent au groupe CTRL. D'autres reçoivent 10 μ M de MS275 et d'autres encore 10 μ M d'EBJD9 pendant 48 h. Par un Western Blot, on peut évaluer l'expression nucléaire d'Histone H4 acétylée sur la lysine 12 (Ac-H4K12) pour chacun des trois groupes. Le graphique (A) présente les résultats en %, le groupe contrôle étant le 100%. On voit que le niveau d'acétylation de la protéine H4 est significativement supérieur (**) pour le groupe MS275 tant qu'il est significativement inférieur (*) pour EBJD9, par rapport au groupe contrôle. La partie (B) permet de voir le Western Blot et la différence à l'oeil nu entre les trois groupes. L'efficacité du transfert a été testée avec GAPDH (on retrouve une bande de 10 kDa pour Ac-H4K12 et 37 kDa pour GAPDH).

Ensemble, ces résultats tendent à montrer qu'EBJD9 défavorise l'acétylation des protéines histones H4. Notre recherche se base donc sur l'hypothèse que le EBJD9 se comporte *in vivo* comme un activateur d'HDAC.

10) Hypothèses de travail :

Notre travail de recherche visait à tester l'hypothèse des propriétés activatrices HDAC de EBJD9. Dans un premier temps, nous avons approfondi les études *in vitro* et dans un second temps nous avons testé les effets comportementaux de EBJD9 sur la consommation d'alcool de rats. Dans la mesure où les inhibiteurs HDACs diminuent la consommation d'alcool dans plusieurs modèles animaux, notre travail visait à tester si ce potentiel activateur HDAC augmentait cette même consommation.

2. MATERIEL ET METHODES :

La synthèse d'EBJD9 se faisant pour des raisons techniques en petite quantité, et afin d'augmenter les probabilités d'obtenir un résultat malgré cette contrainte, nous choisissons de procéder à des injections intra-cérébroventriculaires plutôt qu'intra-péritonéales.

Nous nous proposons d'observer l'effet de EBJD9 sur d'une part, le comportement vis-à-vis de l'alcool chez le rat mâle adulte ayant préalablement montré une escalade de la consommation d'alcool durant plusieurs semaines, et d'autre part sur les niveaux d'acétylation des protéines histones. Cette seconde étude sera réalisée par cytométrie en flux.

Parallèlement à ces expériences comportementale et biochimique, nous étudierons l'effet de EBJD9 sur le niveau d'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 12 Ac-H4K12 de cultures cellulaires SH-SY5Y et nous réaliserons un test d'activité HDACs totale sur des cellules SH-SY5Y ayant été traitées par EBJD9.

1) Expérience *in vitro* sur cellules SH-SY5Y :

1. Culture cellulaire :

Les cellules SH-SY5Y que nous avons utilisées ici, sont issues d'un neuroblastome humain (Sigma Aldrich 94030304-1 VL). La culture cellulaire a été faite à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture était complet (*i.e.* DMEMF12 medium (Dutcher, P04-41150) contenant 1% de MEM NEAA 100X sans glutamine (Dutcher, P 08-32100), 1% de Penicilline G / Streptomycine (Dutcher P 10-023100) et 10% de serum foetal bovin (Dutcher, 500105MM)).

Chaque plaque de culture, comportait 6 puits. Chaque puit avait en son fond, une lamelle circulaire de verre, à laquelle adhéraient les cellules. A l'intérieur d'un même puit, les cellules étaient réparties équitablement. Chaque puit contenait 100 000 cellules pour 2 mL de milieu DMEMF12. On laissait adhérer les cellules 24 h avant de commencer un traitement.

2. Immunomarquage :

D'après nos résultats préliminaires, EBJD9 est possiblement un activateur d' HDAC. Si tel est effectivement le cas, EBJD9 abaisse donc les niveaux d'acétylation des protéines histones. Afin de le démontrer, nous avons utilisé un anticorps ciblant l'histone H4 acétylée sur la lysine 12 (Ac-H4K12) sur une culture de cellules SH-SY5Y ayant été préalablement traitée avec EBJD9.

Dans le même temps, et afin de vérifier la fiabilité de la méthode, nous utiliserons également cet anticorps sur une culture de cellules SH-SY5Y incubées avec MS275, un iHDACs connu.

3. Immunofluorescence :

Après 24 ou 48 h d'une exposition continue soit à EBJD9 (10 µM), soit à MS275 (10 µM), les

cellules sont lavées avec le tampon phosphate 1X (PBS 1X, pH 7.4, ref 8461.0005, ChemSolute), puis fixée pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde dilué à 4% (4% PFA) dans du PBS 1X. Les cellules sont ensuite post-fixées pendant une nuit, à une température de 4°C, dans du paraformaldéhyde dilué à 1% dans du PBS 1X (1% PFA-PBS 1X).

Pour le marquage, les cellules sont d'abord rincées 3 fois 5 minutes dans du PBS-Triton (PBS 1X, 0.2% Triton, pH 7.4) puis on les perméabilise pendant 30 minutes en contact de PBS-Triton. L'incubation dure une nuit à 4°C, avec un anticorps monoclonal de lapin anti-acétyl-histone H4K12 (Merck Millipore, 04 119), dilué à 1/7500 dans du PBS-Triton.

Les lames sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans du PBS-Triton et mises en contact avec un anticorps secondaire de lapin conjugué avec le fluorochrome Alexa Fluor® 488 (111-545-003 Jackson ImmunoResearch) dilué à 1/2000 dans le PBS 1X- 0.2% Triton- 2% Goat serum (Biowest).

Après trois lavages dans du PBS, les lamelles de verre sont montées entre une lame gélatinisée et une lamelle dans un milieu de montage contenant du DAPI, un marqueur d'ADN (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Life Technologies Prolong Gold P36931).

Les contrôles négatifs pour ce marquage Ac-H4K12, ont été réalisés exactement de la même façon que les groupes EBJD9 et MS275 à la différence que l'anticorps primaire n'a pas été utilisé. Ces contrôles négatifs n'ont pas donné de marquage.

L'immunomarquage a été visualisé avec un microscope optique LEICA DM 4000B, relié à une caméra permettant d'acquérir les images, qui ont toutes été prises avec le même niveau de lumière en utilisant un objectif x20. Les images ont ensuite été analysées par un expérimentateur «aveugle» avec le logiciel IMAGEJ (Institut national de la santé mentale, Bethesda, Maryland, États-Unis). Pour chaque traitement (contrôle, MS275 et EBJD9), vingt cellules ont été choisies au hasard pour l'analyse d'image. L'intensité de fluorescence pour chaque cellule a été enregistrée en unités arbitraires (a.u.) et les résultats ont été présentés comme l'intensité de fluorescence moyenne \pm S.E.M pour chaque condition, exprimée en a.u.

4. Test d'activité des HDACs totales (utilisation du Kit « HDAC-Glo ») :

Le but de cette expérience était d'évaluer les niveaux d'activité des HDACs totales extraites des noyaux issus de cultures cellulaires SH-SY5Y seules (ce groupe sera nommé CRTL), ou ayant été traitées soit par EBJD9 (10 μ M) soit par MS275 (10 μ M) pendant 48 h. La culture cellulaire a été faite de la même manière que citée précédemment (voir : Expérience *in vitro* sur cellules SH-SY5Y : Culture cellulaire). Le kit utilisé a été le HDAC-Glo ref: G6421 PROMEGA. Après 48 h de traitement, les protéines nucléaires des cultures cellulaire ont été extraites (tampon de lyse NP40).

Selon le principe du Kit HDAC-Glo, les HDACs nucléaires que nous avons extraites vont catalyser

le substrat fourni dans le kit. Le produit issu de la catalyse par les HDACs nucléaires subit lui-même une réaction catalysée par un « agent développeur » fourni dans le Kit, qui donnera un produit final luminescent que l'on pourra doser : Ainsi, plus l'activité HDAC sera importante, plus l'intensité de luminescence qui lui sera associée sera importante également. L'intensité de luminescence est exprimée en unité relative de lumière (URL) et lue par le lecteur de plaque TECAN pendant une heure.

2) Comportement animal :

1. Animaux :

Nous avons utilisé 21 rats mâles Long-Evans, fournis par le laboratoire René Janvier. Ces rats étaient des jeunes adultes âgés de 8 semaines (250 grammes) au début des expériences, et ont été sacrifiés à l'âge de 6 mois pour les expériences de cytométrie en flux. Nous avons choisi la souche Long Evans afin de reproduire la méthode d'« accès intermittent à de l'éthanol 20% », qui nous sert de référence pour produire une escalade de la consommation d'alcool chez le rat. (Simms et al. 2008) Chaque rat a été maintenu individuellement dans une cage avec un libre accès à l'eau et à la nourriture durant toute la période d'hébergement.

2. Protocole d'« accès intermittent à de l'éthanol 20% »

Le principe consiste à proposer de façon intermittente de l'alcool en libre accès à des rats. Cette exposition intermittente a pour caractéristique de conduire le rat à consommer de plus en plus d'alcool au cours du temps, selon un profil dit d'« escalade » de la consommation. Cette procédure permet d'obtenir une consommation journalière de l'ordre de 5-7 g/kg/24h, ce qui n'est jamais atteints lorsque le rat est en consommation non intermittente. (Simms et al. 2008)

Un jour sur deux, les rats ont accès à un biberon d'eau courante et à un biberon d'éthanol à 20% (volume/volume). Cette dilution est réalisée à partir d'éthanol 95% et d'eau courante. Le jour suivant, les rats ont accès à deux biberons d'eau. Les jours avec et sans alcool s'alternent donc et chaque semaine, il y a trois sessions avec alcool, de 24 h par semaine. (Fig.9)

Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi	Samedi	Dimanche
						
eau+alcool	eau+eau	eau+alcool	eau+eau	eau+alcool	eau+eau	eau+eau

Figure 9 : Semaine type d'alcoolisation par la méthode d'« accès intermittent à de l'éthanol 20% »

Plus précisément, on met les biberons d'alcool et d'eau le lundi, mercredi et vendredi. On les enlève et pèse le mardi, jeudi et samedi. Ces jours-là, on les remplace par les deux biberons d'eau. Le dimanche est dans la continuité du samedi, et les rats n'ont accès qu'à de l'eau.

La balance utilisée est strictement toujours la même pour toutes les pesées des biberons et est précise au centième de gramme. Les rats sont également pesés régulièrement, à minima une fois par semaine. Régulièrement les placements respectifs des biberons d'eau et d'alcool sont inversés afin de limiter la préférence chez le rat pour l'un des deux emplacements. Cette méthode est utilisée afin de permettre une escalade de la consommation d'alcool chez le rat. Elle a été démontrée comme étant plus efficace qu'une méthode d'accès continu à la consommation d'alcool, ainsi qu'une méthode d'accès intermittent à l'éthanol 10%. (Loi et al. 2010)

Les moyennes des trois sessions par semaine, nous permettrons d'évaluer par rat et pour le groupe :

- la consommation en eau et éthanol 20% (mL/kilo/24h),
- la préférence pour l'alcool, qui correspond au pourcentage de consommation en eau et en éthanol 20% sur la consommation en fluide total,
- la consommation en éthanol pur (g/kilo/24h).

De plus, nous faisons un jour sur deux, la moyenne pour le groupe de la consommation en fluide total (eau et éthanol 20%) (mL/24h)

En tout, nous aurons réalisé 6 semaines d'alcoolisation par la méthode de l'accès intermittent avant d'envisager la chirurgie et les injections d'EBJD9.

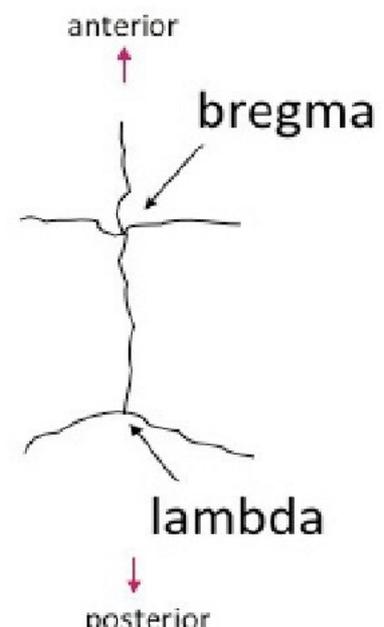
En effet, celui-ci doit avoir pour coordonnées par rapport au Bregma :

Axe antéro-postérieur	- 0,4 mm
Axe latéral	+ ou -1,2 mm (selon le ventricule latéral droit ou gauche)
Axe dorso-ventral	- 2,3 mm

La représentation de la coupe cérébrale précédente, a été faite à -0,4 mm sur l'axe antéro-postérieur par rapport au Bregma. On peut distinguer sur cette représentation, deux masses opaques noires qui sont les ventricules cérébraux latéraux droits et gauche, par lesquels se propageront les produits des différentes injections à l'ensemble du système nerveux central. Nous procédons à une pose de guide-canules afin de cibler le système nerveux central, car nous émettons l'hypothèse selon laquelle EBJD9, s'il est bien un activateur HDAC, aura une action sur le comportement qui ne sera pas dû à un effet périphérique, comme il a été possible de le montrer, en ce qui concerne les inhibiteurs HDACs. (pour revue (Bourguet et al. 2018))

On perce donc le crâne, en le point de coordonnées -0,4/+1,2/0 (ou -0,4/-1,2/0) par lequel passera le guide-canule pour atteindre -2,3 mm sur l'axe dorso-ventral, mais également en 4 autres points (dont deux au niveau de l'os frontal et un par os pariétal).

Ces 4 points supplémentaires permettront de poser 4 vis et d'assurer, avec la pose du ciment dentaire, le maintien en place du guide-canule, comme représentés sur la figure 11.



*Figure 11 : exemple de chirurgie stéréotaxique :
vue du crâne chez le rat après incision, et perforation.*
(source : <http://img2018beauty.pw/bregma-mouse-skull.html> 02/04/19)

4. Injections :

L'ensemble des injections est réalisé à l'aide d'un micro-injecteur paramétré pour délivrer 2µL à la vitesse de 1µL/minute. Chaque injection dure donc deux minutes, et se fait sous anesthésie générale, par l'isoflurane en inhalation. Les rats contrôles reçoivent une injection du véhicule seul. Les rats tests reçoivent une injection de EBJD9 dilué dans le même véhicule à la concentration de 500 µmol/L. Nous avons estimé que 500 µmol/L était la meilleure concentration pour obtenir un résultat avec l'inhibiteur HDAC MS275. Nous faisons l'hypothèse que EBJD9 devrait montrer un effet à cette même concentration.

1. Double-injections :

Les expériences précédentes réalisées au GRAP avait permis de tester les effets comportementaux de deux iHDACs, le NaB (Simon-O'Brien et al. 2015) et le MS275 (Jerome Jeanblanc et al. 2015). Ces deux molécules avaient entraîné une diminution de la motivation à consommer de l'alcool chez les rats dépendants. Aucune de ces deux molécules ne montrait d'effet significatif après une unique injection. Pour chacune de ces molécules, on ne pouvait observer d'effet qu'après deux injections réalisées deux jours de suite. Nous avons donc repris ce schéma de double injection pour tester EBJD9.

Chaque rat reçoit selon son groupe une injection le matin à 11 h, puis une autre le lendemain à 11 h. Les biberons d'éthanol 20% et d'eau sont placés à 14 h (soit donc 3 h après l'injection). Nous réalisons une première mesure des consommations à 16h (soit 2 h après la remise des biberons) et une seconde le surlendemain à 14 h (soit 24 h après la remise).

La mesure « après deux heures », permet d'évaluer le comportement de type « binge drinking » (ou le rat peut consommer un maximum d'alcool en moins de 2 h) et la mesure « après 24 h », permet d'évaluer la consommation sur du moyen terme. Après une semaine sans nouvelle injection, nous inversons les groupes, c'est à dire que les rats du groupe contrôle vont recevoir du EBJD9 et inversement. Cette durée d'une semaine est jugée nécessaire et suffisante, pour que l'ensemble des effets d'EBJD9 ainsi que la molécule elle-même, aient complètement disparu de l'organisme des rats testés, car elle a été montrée suffisante en ce qui concerne les inhibiteurs HDACs.

La nouvelle série d'injections se déroule comme la première : injection à 11 h, ré-injection à 11 h le lendemain et remise des biberons à 14 h. Mesure des consommations à 16 h et le surlendemain à 14 h. (Fig.12)

	Semaine 1			Semaine 3		
	Jour J	Jour J+1	Jour J+2	Jour J	Jour J+1	Jour J+2
11 heures	Injections	Injections		Injections	Injections	
14 heures		 Remises	Mesures		 Remises	Mesures
16 heures		Mesures			Mesures	

Figure 12 : tableau explicatif du schéma des double-injections.

Nous pouvons ainsi comparer la consommation en eau et éthanol 20% pour chaque rat, avec et sans EBJD9, après 2 h et 24 h.

2. Simple-injection:

Nous réalisons également un autre schéma comportant une seule injection. Les groupes sont les mêmes et sont inversés de la même façon à la semaine 3. On remet les biberons trois heures après l'injection soit donc à 14 h, une mesure encore deux heures plus tard (16 h) et une mesure 24 h plus tard (14 h le lendemain). (Fig.13)

	Semaine 1		Semaine 3	
	Jour J	Jour J+1	Jour J	Jour J+1
11 heures	Injections		Injections	
14 heures	 Remises	Mesures	 Remises	Mesures
16 heures	Mesures		Mesures	

Figure 13 : tableau explicatif du schéma des injections uniques.

5. Cytométrie en flux

Le sacrifice des rats se fait par décapitation après anesthésie à l'isoflurane par inhalation. Trois heures avant ce, lui-ci une simple-injection placebo ou EBJD9 selon le rat, est réalisée. Ce temps est jugé nécessaire et suffisant pour que les mécanismes épigénétiques se mettent en place après l'injection. Depuis la veille (14 h), les rats n'ont accès qu'à l'eau, ce qui permet d'assurer que le résultat de l'analyse par cytométrie en flux, ne s'expliquera pas par les mécanismes épigénétiques en lien avec l'alcool.

L'extraction du cerveau du rat est réalisée juste ensuite, et sont prélevés pour la cytométrie en flux les structures droite et gauche suivantes :

- le cortex préfrontal (CPF)
- le noyau accumbens (NAcc)
- le striatum dorso-médian (SDM)
- le striatum dorso-latéral (SDL)

Ces structures interviennent dans le circuit de la récompense, dont on sait qu'il est affecté par la prise d'alcool. Nous les choisissons car nous émettons l'hypothèse selon laquelle un effet épigénétique d'EBJD9 en lien avec la consommation d'alcool, interviendrait au niveau du circuit de la récompense.

1. Principe de la Cytométrie en flux :

La cytométrie en flux est une technique analytique individuelle, quantitative, qualitative et multi-paramétrique. Des cellules sont entraînées par un flux liquidien et passent une à une devant le faisceau d'un laser. Elles absorbent une partie de cette lumière, et en diffuse une autre, en fonction de leurs caractéristiques (taille, granulométrie). Il est possible également, que l'excitation lumineuse induise l'émission d'une fluorescence par la cellule elle-même, ou par un fluorochrome auquel elle est couplée. Ce fluorochrome est alors rattaché à un anticorps secondaire qui va reconnaître un anticorps primaire, lui-même reconnaissant un élément constitutif de la cellule (récepteurs membranaire, enzymes, *etc...*). En fonction de la fluorescence émise, on peut donc déduire la quantité de l'élément constitutif désiré dans chaque cellule. Enfin, la cytométrie permet de discriminer en fonction de la charge de ce qu'on étudie. Les cellules sont ainsi analysées, chacune séparément et comptées. (Fig.14)

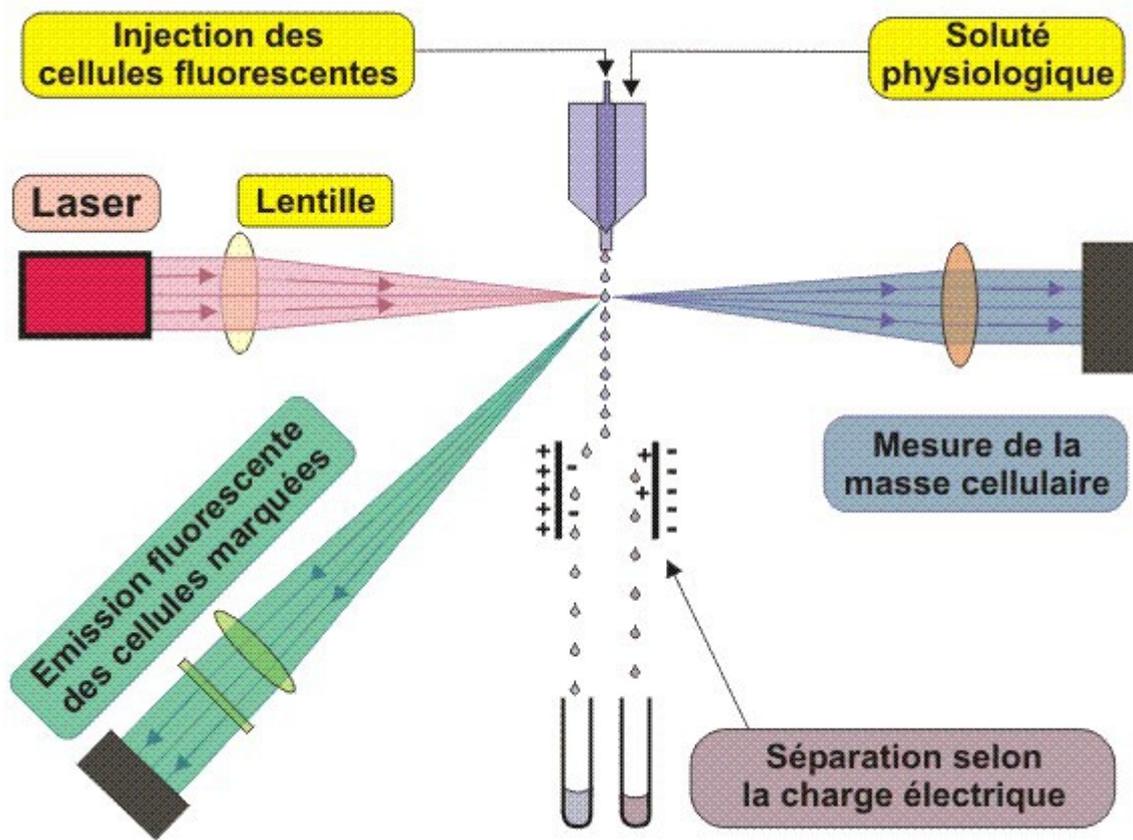


Figure 14 : schéma représentatif de la cytométrie en flux.

(source : florimont.info/premiere/cytometrie.html)

2. Préparation des prélèvements cérébraux, choix des anticorps primaires et secondaires, cytométrie :

Pour pouvoir être analysées séparément les unes des autres, cette technique de la cytométrie en flux demande de dissocier les cellules qui nous intéressent de la matrice extracellulaire, puis de dégrader cette dernière, par différentes enzymes. On peut également dégrader les érythrocytes s'ils sont en quantité trop importante. Après une centrifugation, on récupère les cellules en suspension, sous une autre phase de débris cellulaires.

Ces cellules sont ensuite fixées, puis mise en contact avec un perméabilisant, qui va permettre de rendre la membrane cytoplasmique ainsi que la membrane nucléaire perméables. De cette façon, l'anticorps primaire que nous mettrons par la suite en contact avec nos cellules, pourra se fixer jusque dans le noyau. Ceci est important pour notre recherche, puisque nous nous intéressons aux HDAC acétylées, qui peuvent être présente au sein du noyau.

Dans ce protocole, nous testons 7 anticorps primaires :

- NeuN (anticorps neuronal)
- GluN2A (anticorps pour la sous unité GluN2A du récepteur NMDA)
- GluN2B (anticorps pour la sous unité GluN2B du récepteur NMDA)
- HDAC2 (pour l'activité HDAC)
- Ac-H4K12 (pour les niveaux d'acétylation de H4K12)
- CD11b/c (anticorps pour les cellules gliales)
- MAP2 (anticorps neuronal)

Les anticorps GluN2A et GluN2B sont utilisés car le laboratoire GRAP a montré que la prise aiguë de fortes quantités d'éthanol favorise la désacétylation du promoteur du gène pour la sous-unité GluN2B *via* l'activité de HDAC2, mais pas la sous-unité GluN2A. (Drissi et al. 2019) Cette désacétylation entraîne une augmentation de l'expression de cette sous-unité GluN2B du récepteur NMDA. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que si EBJD9 permet d'augmenter l'activité HDAC2, la sous-unité GluN2B sera exprimée d'avantage. Certains de ces anticorps primaires étaient déjà couplés à un fluorochrome. Mais pas tous, les anticorps secondaires que nous utilisons sont donc couplés à des fluorochromes et dirigés contre les anticorps primaires.

Les anticorps secondaires que nous utilisons sont :

- Alexa Fluor 647
- Alexa Fluor 488

3) Analyses statistiques :

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SigmaStat® (LogiLabo, Paris, France). Pour les expériences de comportement, l'analyse statistique a été réalisée selon les cas avec des ANOVA 1 facteur à mesures répétées (session), des ANOVA 2 facteurs à mesures répétées (type de buveurs ; traitement). Pour les marquages d'immunofluorescence, l'analyse statistique a été réalisée avec une ANOVA à une voie (facteur «traitement») et des comparaisons post-hoc ont été effectuées à l'aide du test de Tukey. Dans tous les cas, le seuil de significativité statistique (risque alpha) a été fixé à $p < 0,05$. Pour les expériences de cytométrie, aucune analyse statistique n'a été menée sur $n=3$ (expériences en cours).

3. RESULTATS :

1) Expérience *in vitro* sur culture de cellules SH-SY5Y :

L'expérience a été réalisée sur des cellules SH-SY5Y soit avec 10 μ M de EBJD9 soit avec 10 μ M d'éthanol 20%. Après 48 h de traitement, on réalise un immunomarquage et on compare les résultats en terme de fluorescence entre les groupes EtOH et EBJD9, et avec le groupe CTRL qui correspond à des cellules SH-SY5Y qui n'ont reçu aucun traitement. Il existe des différences significatives entre le groupe EBJD9 et le groupe contrôle. En effet l'intensité de fluorescence moyenne était plus faible pour le groupe EBJD9 par rapport au CTRL ($p < 0,05$). Le groupe EtOH montre une intensité de fluorescence plus faible par rapport au groupe CTRL ($p < 0,05$) ; et le groupe EtOH montre une intensité de fluorescence moins importante que celle du groupe EBJD9 ($p < 0,05$).

Cela vient d'une part confirmer que l'éthanol est bien un activateur HDAC, et permet d'étayer l'hypothèse selon laquelle EBJD9 est également un activateur HDAC. (Fig. 15)

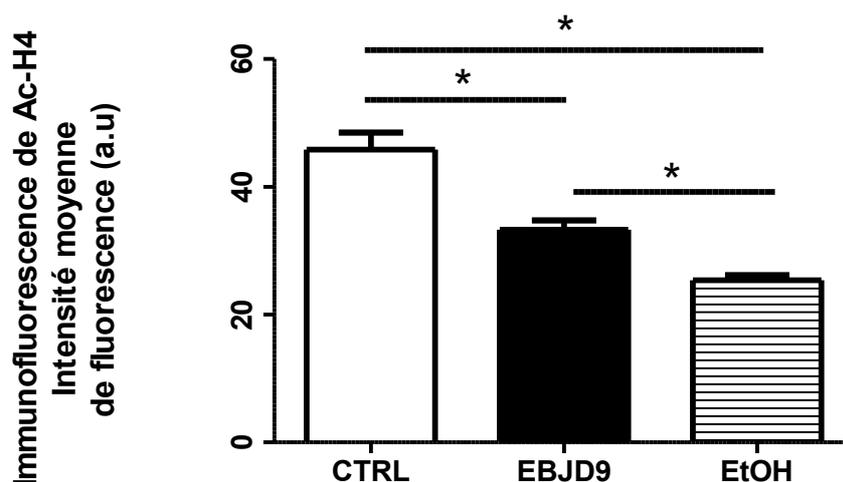


Figure 15 : Intensité de fluorescence de l'immunomarquage des Ac-H4K12 sur des cellules SH-SY5Y après traitements par EBJD9 et EtOH. Les cellules du groupe contrôle sont des cellules SH-SY5Y seules, le groupe EtOH a été traité avec 10 μ M d'éthanol 20% et le groupe EBJD9 avec 10 μ M d'EBJD9 pendant 48 h. Les photos de l'immunofluorescence ont été obtenues avec le microscope LEICA DM 4000B light (objectif x20) couplé au logiciel Mercator® (Explora Nova, La Rochelle). L'analyse d'image a été réalisée avec le logiciel ImageJ. Pour chaque image, on a mesuré l'intensité de l'immunofluorescence, qui augmente avec la proportion d'histone H4 acétylée sur la lysine 12 (Ac-H4K12). Les résultats (ANOVA 1 facteur suivi d'une analyse post-hoc avec un test de Tukey) sont présentés sous forme d'intensité de fluorescence moyenne \pm S.E.M, exprimée en unité arbitraire a.u. *: $p < 0,05$.

2) HDAC Glo : expérience *in vitro* sur l'activité HDAC totale de cellules SH-SY5Y :

Le but de cette expérience était de comparer les activités des HDACs totales (soit un mélange de l'ensemble des familles de HDAC) des noyaux des cellules SH-SY5Y ayant été préalablement traitées par EBJD9 10 μ M ou MS275 10 μ M, par rapport à celles de cellules SH-SY5Y n'ayant subi aucun traitement. 48 h plus tard, on a lysé les cellules, et on a récupéré le contenu du noyau cellulaire. Parmi ce contenu, se trouvent les HDACs nucléaires. Pour juger de leurs niveaux d'activité, on les met en présence d'un substrat qui donne, après désacétylation par une HDAC, un produit luminescent. Après cette étape, on analyse l'intensité de luminescence des contenus cellulaires. L'activité des HDACs est proportionnelle à la luminescence du produit final enregistrée. En effet, plus l'activité HDAC totale est importante, plus le rapport produit luminescent/substrat est important et donc plus l'intensité de luminescence est importante. De cette façon, nous pouvons juger du niveau d'activité des HDACs totales.

Les résultats montrent une intensité de luminescence significativement plus forte pour les cellules ayant été traitées avec EBJD9 pendant 48 h par rapport à celles n'ayant subi aucun traitement ($p < 0,001$), ce qui montre qu'EBJD9 est un activateur d'une ou plusieurs HDAC(s), sans que l'on puisse préciser lesquelles. Le groupe ayant été traité par MS275, inhibiteur HDAC bien connu, montrait une intensité de luminescence significativement plus faible que celle du groupe CTRL ($p < 0,001$) ce qui nous conforte dans la fiabilité de la méthode. (Fig.16)

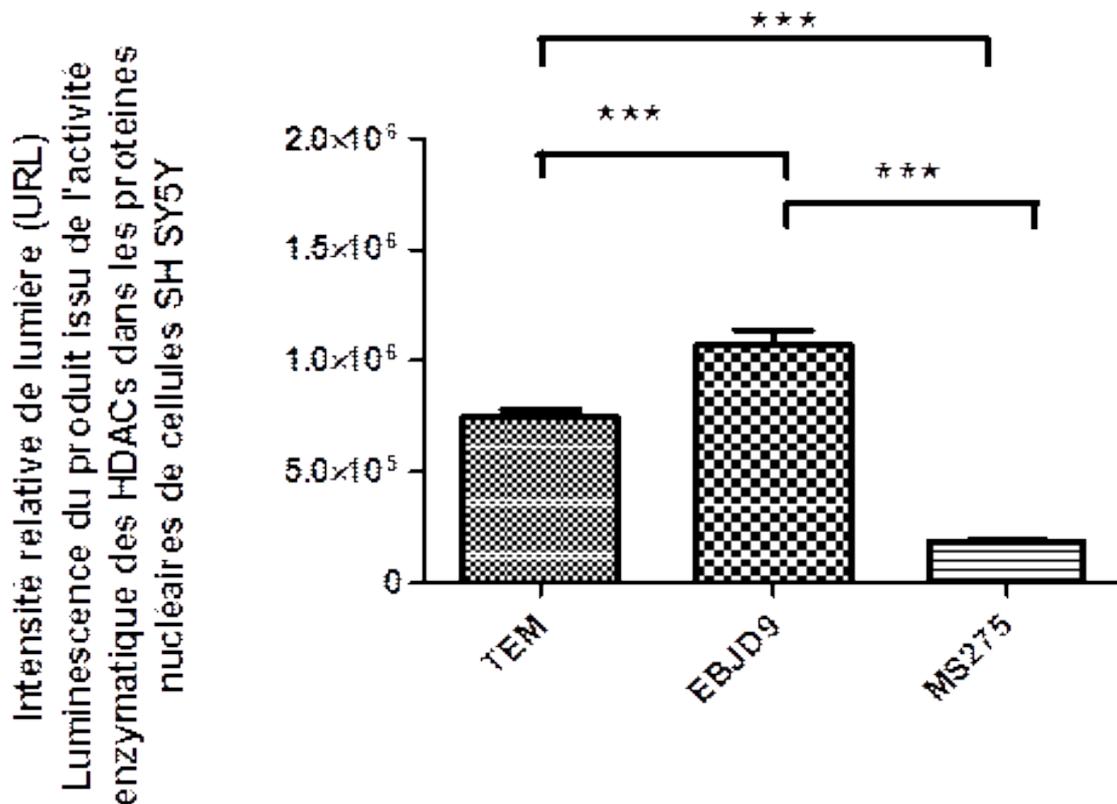


Figure 16 : Luminescence des produits issus des activités HDACs nucléaires pour les traitements EBJD9 et MS275. Des cellules SH-SY5Y sont traitées soit par MS275, soit par EBJD9 à la concentration de 10 μ M. Les cellules SH-SY5Y n'ayant reçu aucun traitement correspondent au groupe témoin (TEM). Après 48 h de traitement, les protéines nucléaires extraites sont mises en contact d'un substrat qui, métabolisé par une HDAC, donne un produit luminescent. La luminescence est alors enregistrée en Unités Relatives de Lumière (URL) pendant plusieurs heures. Le pic d'intensité est à 1335 secondes (20 minutes environ). De cette façon, il est possible de connaître le niveau d'activité des HDACs totales. Par rapport au groupe témoin (SH-SY5Y seules), on peut remarquer que l'intensité de luminescence était très inférieure pour le groupe MS275 (***) tandis qu'elle était supérieure pour EBJD9 (***) . ***: $p < 0,001$.

3) Expériences comportementales :

1. Escalade de consommation par le protocole d'accès intermittent à l'éthanol

Le protocole d'accès intermittent à de l'éthanol 20% a été réalisé pendant 6 semaines complètes à raison de 3 séances d'alcoolisation par semaine. La consommation d'eau était de 68,21 mL/kg/24h durant la première semaine et a baissé significativement à 34,19 mL/kg/24h à la sixième semaine (ANOVA 1 facteur mesures répétées $p < 0,001$ entre semaine 1 et 6). La consommation d'éthanol était de 16,42 mL/kg/24h durant la première semaine et a augmenté significativement à 30,44 mL/kg/24h à la sixième semaine ($p < 0,001$ entre semaine 1 et 6).

La préférence pour l'eau est passée de 80,27 % à 52,74 % ($p < 0,001$) tandis que la préférence

pour l'éthanol est montée de 19,73 % à 47,26 % dans ces 6 semaines ($p < 0.001$). L'augmentation de la préférence en éthanol 20% était significative dès la deuxième semaine ($p = 0,011$). A partir de la 4ème semaine, il n'y a plus d'évolution significative de la préférence en éthanol 20% (entre la quatrième et la sixième semaine $p = 0,600$ et entre la cinquième et la sixième semaine $p = 0,954$), ce qui démontre l'apparition d'une consommation stable, ainsi que décrit dans la littérature. (Simms et al. 2008)

Au cours des 6 semaines du protocole d'accès intermittent à de l'éthanol, la consommation moyenne pour l'ensemble du groupe est passée de 3,28 grammes d'éthanol pur par kilo de rat par 24 heures pour la première semaine, à 6,09 grammes d'éthanol pur par kilo de rat par 24 heures pour la sixième semaine. Cette escalade de consommation est significative (Anova 1 facteur mesures répétées $p < 0.001$ entre la première et la sixième semaine) et l'escalade de consommation était stable à partir de la 3ème semaine (entre la troisième et la sixième semaine $p = 0.511$; entre la quatrième et la sixième semaine $p = 0.542$; entre la cinquième et la sixième semaine $p = 0.992$).

La consommation moyenne totale en fluide durant les 6 semaines d'accès intermittent à l'éthanol était toujours stable, comprise en 20 et 25 mL pour l'ensemble du groupe. On note cependant 3 jours de hautes consommations (jours 8,18,12), pour lesquelles il existait une différence significative ($p < 0,05$) avec les jours de consommations totales en fluides les plus faibles, (15,10,16,14,9). Nous n'avons pas d'explications concernant les modalités d'hébergement pour expliquer ces variations. (Fig.17)

Simms et al. 2008, avait obtenu par la méthode de l'accès intermittent à de l'éthanol 20%, une consommation moyenne en éthanol pur de $5,1 \pm 0,5$ g/kg/24 h après la 5ème semaine d'exposition, ce qui représentait une escalade de la consommation chez le groupe de rats Long-Evans. Il avait également pu constater une baisse significative de la préférence en eau et parallèlement une augmentation significative de la préférence en éthanol 20%. La consommation en fluide totale était également stable.

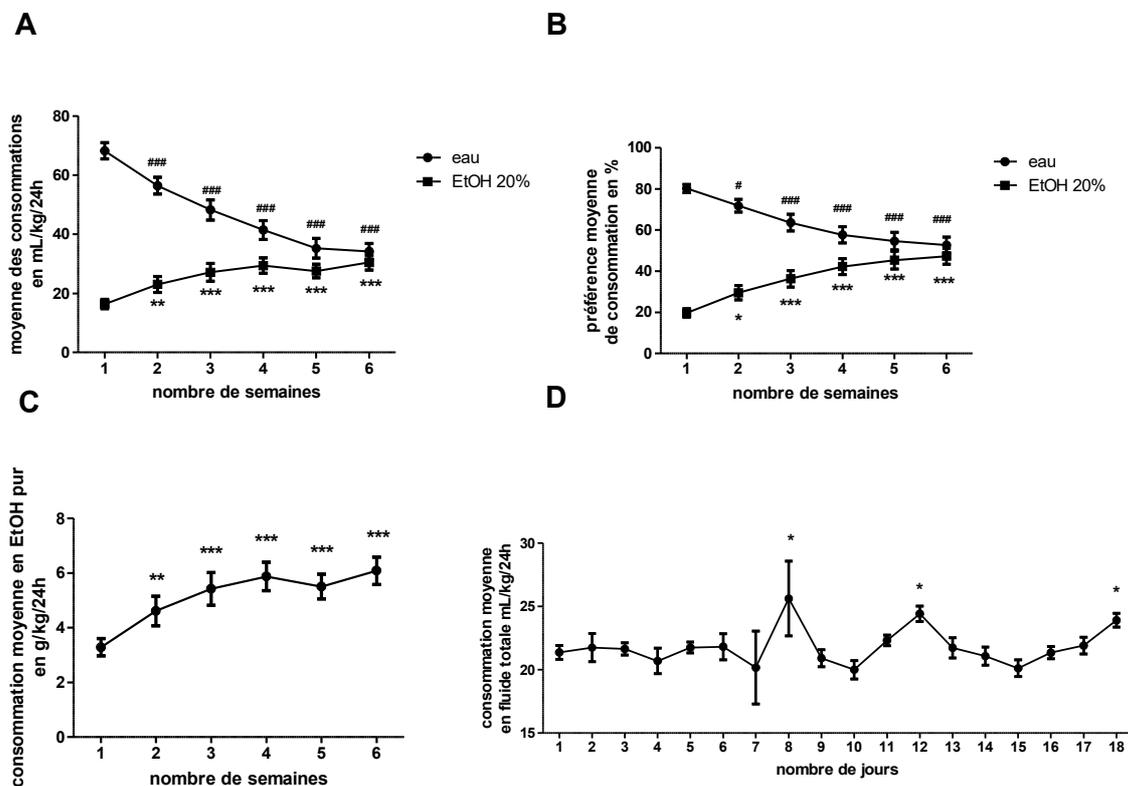


Figure 17 : Évolution de la consommation d'alcool sur les 6 semaines d'accès intermittent à de l'éthanol pour l'ensemble du groupe, dont la consommation en eau et en éthanol 20% (A), la préférence en eau et éthanol (B) la consommation en éthanol pur (C) (Éthanol 20% * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ vs semaine 1) (Eau # : $p < 0,05$; ## : $p < 0,01$; ### : $p < 0,001$ vs semaine 1) et la consommation en fluide totale (D) (* : $p < 0,05$).

2. Effet du traitement par EBJD9 sur la consommation d'alcool lors de l'accès intermittent à de l'éthanol 20% :

Nous avons étudié l'effet de deux injections d'EBJD9 réalisées à 24 h d'écart, la seconde 3 h avant l'accès à l'éthanol (Figure 18A), et l'effet d'une injection de EBJD9 réalisées 3 h avant l'accès à l'éthanol (Figure 18B), sur le comportement de consommation des rats. La consommation a été enregistrée après 2 h et 24 h d'accès à l'éthanol. Ces deux mesures permettent d'étudier deux aspects différents de la consommation d'alcool : le temps court permet d'évaluer un comportement de type binge-drinking, (visant à s'alcooliser rapidement dans le but d'être ivre), la seconde permet d'évaluer une appétence plus générale pour l'alcool. (Fig.18)

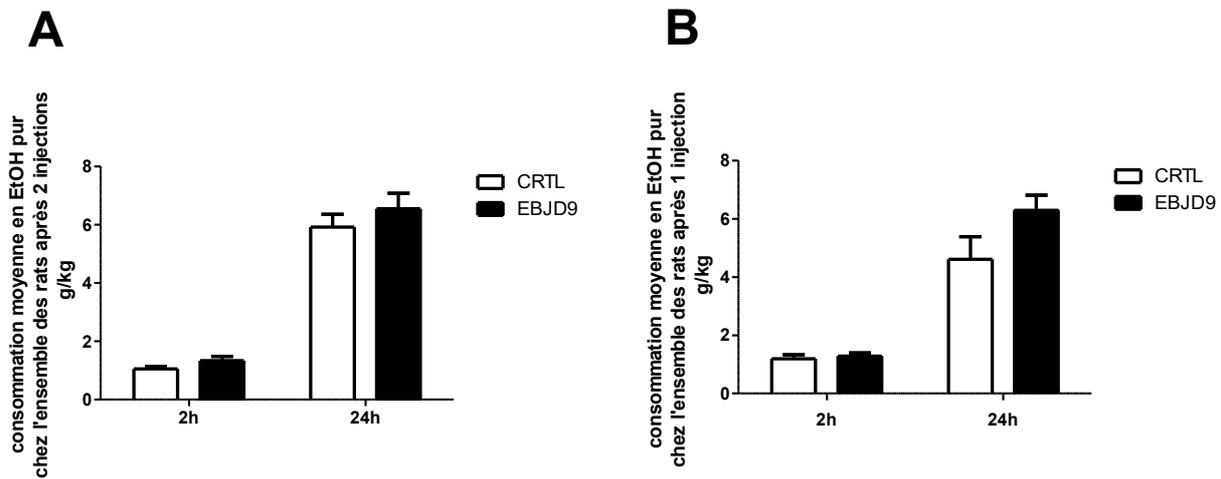


Figure 18 : Effet de deux injections (A) ou d'une injection unique (B) d'EBJD9 sur le comportement de consommation d'alcool de l'ensemble du groupe, après 2 h ou 24 h d'accès à l'éthanol.

La double injection d'EBJD9 n'a pas engendré de modification significative de la consommation d'alcool après 2 ($p=0,098$) ou 24 heures d'accès ($p=0,167$). La simple injection d'EBJD9 n'a pas engendré de modification significative de la consommation d'alcool après 2 ($p=0,829$) ou 24 heures d'accès à l'alcool ($p=0,115$). Cependant, nous avons ré-analysés ces résultats. Nous avons séparé les rats à partir de la médiane des moyennes des consommations sur les deux dernières semaines du protocole d'escalade par la méthode d'accès intermittent à de l'éthanol, ce qui a permis une séparation selon le type de consommation. En effet, de par la variation inter-individuelle spontanée dans la consommation d'alcool, deux sous-groupes sont séparés par la médiane : les « Low Drinkers » (LD) et les « High Drinkers » (HD).

3. Consommations des sous-groupes High Drinkers et Low Drinkers :

Lorsque l'on sépare deux sous-groupes de rats en fonction de leur moyenne de consommation d'alcool sur les deux dernières semaines, on obtient un groupe de rats Low Drinkers (LD) consommant statistiquement moins d'alcool que les High Drinkers (HD) (21,96 mL/kg/jour vs 37,60 mL/kg/jour d'éthanol 20%, $p<0,001$; soit 4,39/kg/j vs 7,52 g/kg/jour d'éthanol pur, $p<0,001$) (Fig.19A et 19C).

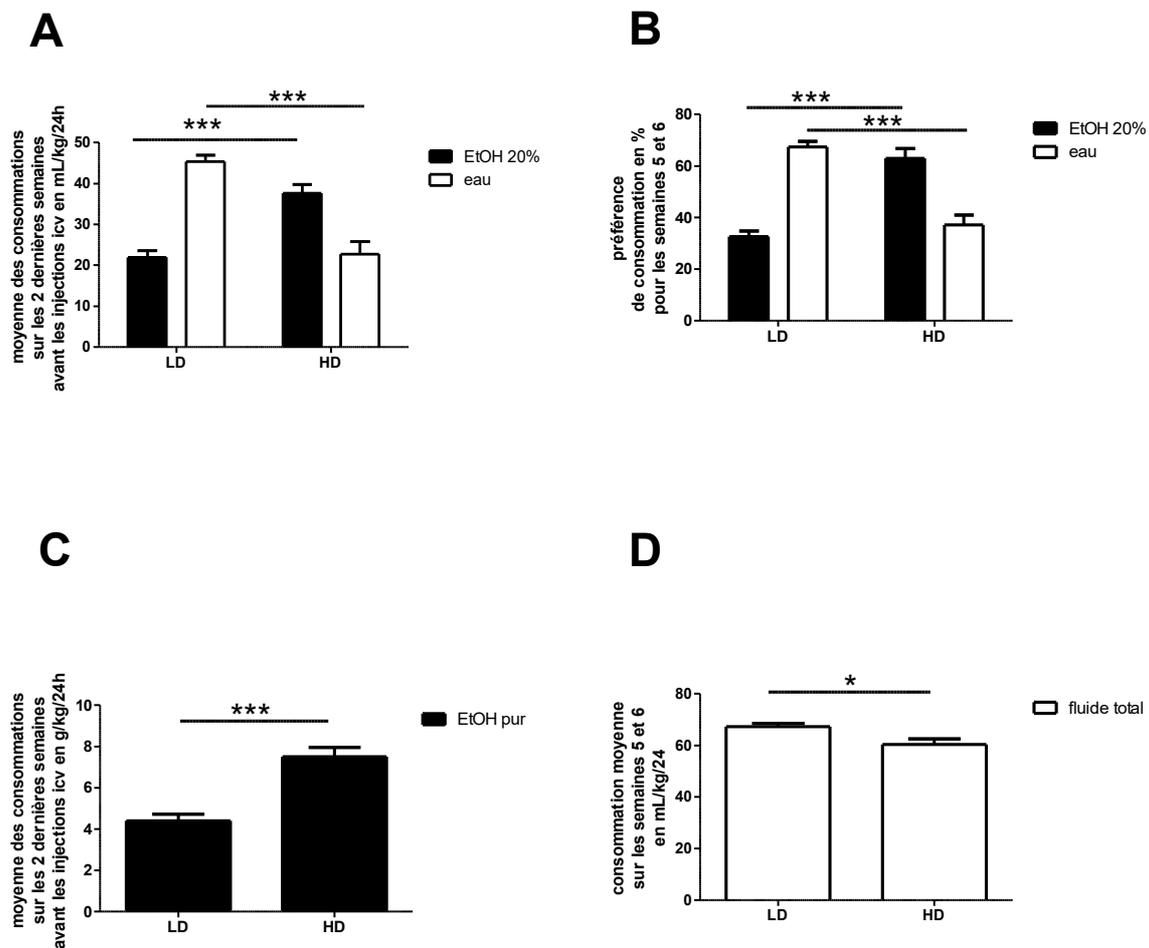


Figure 19 : Différences de consommation entre les sous-groupes High Drinkers (HD) et Low Drinkers (LD) sur les deux dernières semaines d'accès intermittent, pour la consommation en eau (***) et éthanol 20% (***) (A), la préférence (***) (B), la consommation en éthanol pur (C) (***) et la consommation totale de fluide (*:p=0,018) (D).

De même, les préférences des Low Drinkers sont statistiquement différentes des préférences des High Drinkers (préférence en éthanol 32,61% vs 62,90%, $p < 0,001$). Ceci permet de travailler sur deux phénotypes différents de consommation d'alcool. La consommation moyenne totale en fluide est également statistiquement différente (59,06 mL/kg/jour vs 68,61 mL/kg/jour pour les Low Drinkers, $p < 0,05$)

4. Effet du traitement par EBJD9 sur la consommation d'alcool lors de l'accès intermittent à de l'éthanol 20% dans les sous-groupes High Drinkers et Low Drinkers :

Nous avons donc re-analysés les résultats de la réponse à EBJD9 sur la consommation d'alcool après séparation des deux sous-groupes.

1. Effet d'EBJD9 suite à deux injections chez les HD et LD :

Nous avons étudié l'effet de deux injections de EBJD9 réalisées à 24 h d'écart, la seconde 3 h avant l'accès à l'éthanol (Fig.20), sur le comportement de consommation des rats après 2 h (Fig.20A) d'accès intermittent à de l'éthanol 20%. Nous n'avons pas observé d'effet du facteur « type de buveur » $F(1 ; 30) = 2,707$, $p = 0,122$, ni du facteur « traitement par EBJD9 $F(1 ; 30) = 3,144$, $p = 0,098$, ni d'interaction entre les deux facteurs ($F(1 ; 28) = 2,601$, $p = 0,129$). L'analyse post-hoc indique un effet d'EBJD9 sur le groupe de « Low drinker » ($p = 0,031$) et pas sur le groupe de « high drinker » ($p = 0,921$). Au terme de 24 h d'accès à l'éthanol (Fig.20B), nous avons observé un effet du facteur « type de buveur » $F(1 ; 30) = 5,471$, $p = 0,035$, pas d'effet du facteur « traitement par EBJD9 $F(1 ; 30) = 1,713$, $p = 0,212$ et pas d'interaction entre les deux facteurs ($F(1 ; 28) = 5,670$, $p = 0,032$). L'analyse post-hoc indique un effet d'EBJD9 sur le groupe de « Low drinker » ($p = 0,021$) et pas sur le groupe de « high drinker » ($p = 0,461$), et l'EBJD9 augmente la consommation des rats de 43,3 %. **Ainsi, la différence qui existe entre les deux types de buveur « low » et « high » en l'absence de traitement ($p = 0,002$) disparaît sous l'effet du traitement EBJD9.**

Après deux injections contrôles, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers étaient significativement différentes après 24 h (** : $p = 0,002$) mais pas après 2 h ($p = 0,284$) d'accès intermittent à l'éthanol 20%. Après deux injections de EBJD9, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers n'étaient pas significativement différentes ni après 2 h ($p = 0,889$) ni après 24 h d'accès intermittent à l'éthanol 20% ($p = 0,184$).

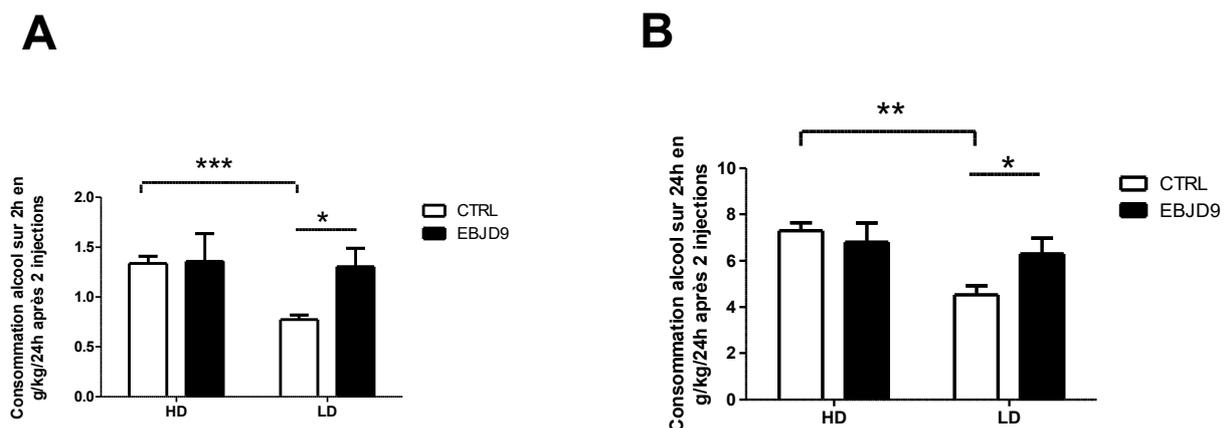


Figure 20 : Effet de deux injections d'EBJD9 sur le comportement de consommation des rats lors de l'accès intermittent à de l'éthanol 20%, après 2 h (A) pour les High Drinkers ($p = 0,921$) et les Low Drinkers (* : $p = 0,031$) ou 24 h (B) pour les High Drinkers ($p = 0,461$) et les Low Drinkers (* : $p = 0,021$). Les deux injections ont été réalisées à 24 h d'écart, la seconde 3 h avant l'accès à l'éthanol. EBJD9 injecté deux fois ne modifie pas la consommation des rats « High Drinkers » après 24 h d'accès mais augmente la consommation des rats « low drinkers ». Après deux injections contrôle, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers étaient significativement différentes après 24 h (** : $p = 0,003$) et après 2 h (***) : $p < 0,001$) d'accès

intermittent à l'éthanol 20%. Après deux injections EBJD9, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers n'étaient pas significativement différentes ni après 2 h ($p=0,869$) ni après 24 h d'accès intermittent à l'éthanol 20% ($p=0,566$).

2. Effet d'EBJD9 suite à une injection chez les HD et LD :

Nous avons étudié l'effet d'une injection de EBJD9 réalisée 3 h avant l'accès à l'éthanol (Fig.21), sur le comportement de consommation des rats après 2 h (Fig.21A) d'accès intermittent à de l'éthanol 20%. Nous avons observé un effet du facteur « type de buveur » $F(1 ; 30)= 4,804$, $p=0,046$, mais pas du facteur « traitement par EBJD9 $F(1 ; 30)=0,488$, $p= 0,496$, et également nous avons observé une interaction entre les deux facteurs ($F(1 ; 28)=11,006$, $p= 0,005$). L'analyse post-hoc indique un effet d'EBJD9 sur le groupe de « Low drinkers » ($p=0,013$) et pas sur le groupe de « High drinkers » ($p=0,085$). De plus, au terme de 24 h d'accès à l'éthanol (Fig.21B), nous avons observé un effet du facteur « type de buveur » $F(1 ; 30)=9,626$, $p= 0,008$, ainsi que du facteur « traitement par EBJD9 $F(1 ; 30)=9,063$, $p= 0,009$ et une interaction entre les deux facteurs ($F(1 ; 28)=23,476$, $p<0,001$). L'analyse post-hoc indique un effet d'EBJD9 sur le groupe de « Low drinker » ($p<0,001$) et pas sur le groupe de « high drinker » ($p=0,216$), EBJD9 augmente la consommation des rats de 215,4 %.

Après une injection contrôle, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers étaient significativement différentes après 24 h ($p<0,001$) et également après 2 h ($p<0,001$) d'accès intermittent à l'éthanol 20%. Après une injection EBJD9, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers n'étaient pas significativement différentes ni après 2 h ($p=0,339$) ni après 24 h ($p=0,762$) d'accès intermittent à l'éthanol 20%. **Ainsi, la différence qui existe entre les deux types de buveur « Low » et « High » en l'absence de traitement disparaît sous l'effet du traitement EBJD9.**

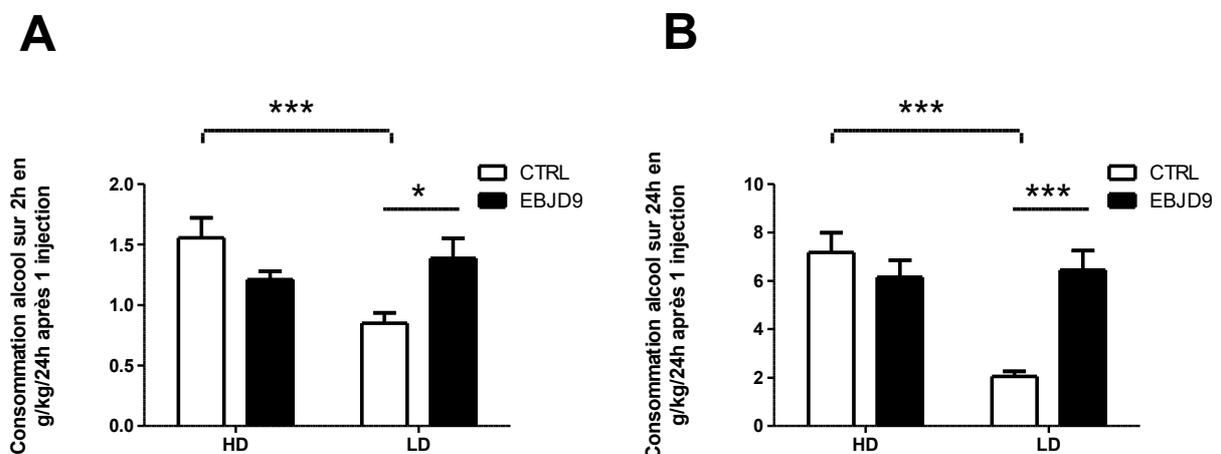


Figure 21 : Effet d'une injection d'EBJD9 sur le comportement de consommation des rats lors de l'accès intermittent à de l'éthanol 20%, après 2 h (A) pour les High Drinkers ($p=0,085$) et pour les Low Drinkers (* : $p=0,013$) ou 24 h (B) pour les High Drinkers ($p=0,216$) et pour les Low Drinkers (***) : $p<0,001$). L'injection a été réalisée 3 h avant l'accès à l'éthanol. Après une injection contrôle, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers étaient significativement différentes après 2 h (***) : $p<0,001$) et après 24 h (***) : $p<0,001$) d'accès intermittent à l'éthanol 20%. Après une injection EBJD9, la consommation des High Drinkers et celle des Low Drinkers n'étaient pas significativement différentes après 2 h ($p=0,339$) et après 24 h d'accès intermittent à l'éthanol 20% ($p=0,762$).

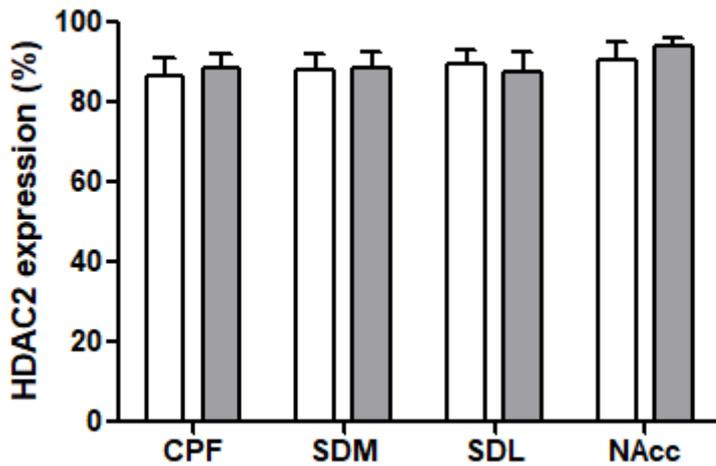
4) Cytométrie en flux :

1. Expression de HDAC 2 :

Nous avons analysé par cytométrie en flux le pourcentage de cellules exprimant HDAC2 dans 4 structures : le cortex pré-frontal (CPF), le noyau accumbens (Nacc), le striatum dorso-latéral (SDL) et le striatum dorso-médian (SDM). Bien qu'il ne soit pas encore possible ($n=3$) de faire des statistiques, il ne semble pas exister de différence entre les Low Drinkers et les High Drinkers concernant le pourcentage de cellules exprimant HDAC2 (Figure 22A).

Nous avons également analysé l'Intensité Moyenne de Fluorescence des cellules (MFI), qui est d'autant plus forte que la quantité de HDAC2 présente dans les cellules est importante. Il semblerait que HDAC2 soit en quantité moindre chez les Low Drinkers par rapport aux High Drinkers, particulièrement au niveau du cortex pré-frontal (CPF), mais on retrouve cette tendance dans le noyau accumbens (Nacc), le striatum dorso-latéral (SDL) et le striatum dorso-médian (SDM). (Fig.22B).

A



B

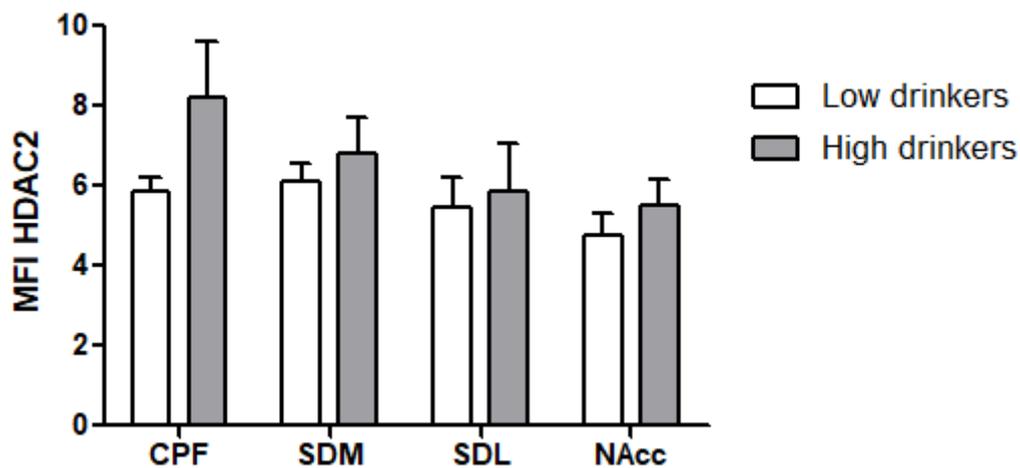


Figure 22: A : Pourcentage de cellules exprimant HDAC2 dans le cortex pré-frontal (CPF), le noyau accumbens (NAcc), le striatum dorso-latéral (SDL) et le striatum dorso-médian (SDM) ($n=3$). B : Intensité moyenne de fluorescence (MFI) des cellules associées à l'activité HDAC2.

Nous avons analysé l'intensité moyenne de fluorescence, dont la valeur grandit avec l'expression de HDAC2 dans les 4 structures cérébrales citées précédemment (pour rappel : cortex pré-frontal, noyau accumbens, striatum dorso-latéral, striatum dorso-médian) après traitement par EBJD9 et nous avons comparé ces intensités à celles obtenues après traitement contrôle, pour chaque structure. Nos résultats préliminaires ($n=3$) suggèrent que EBJD9 ne modifie pas l'expression de HDAC2 dans les 4 structures car il ne semble pas exister de différence significative entre les niveaux d'expression d'HDAC2 pour une même structure selon que le traitement soit EBJD9 ou CRTL. (Figure 23)

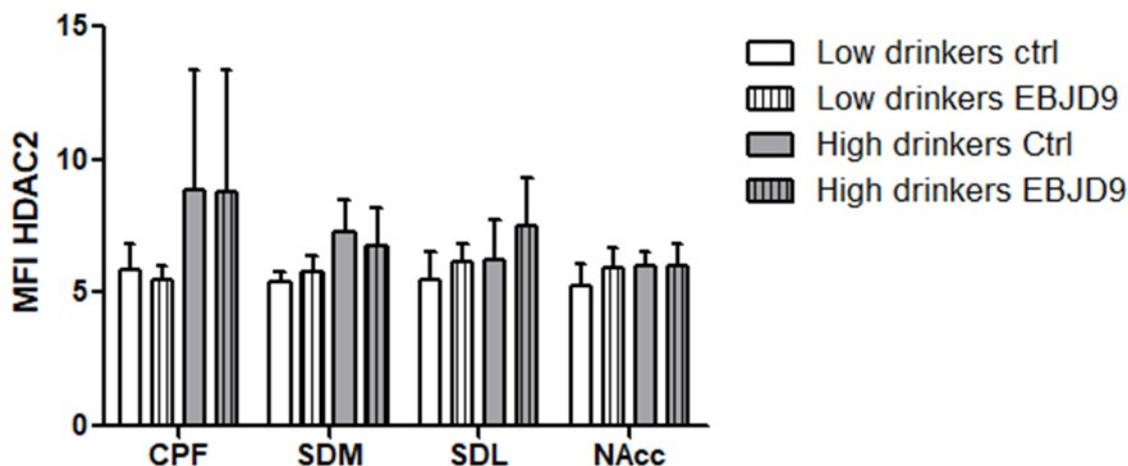


Figure 23 : Intensité moyenne de fluorescence (MFI) qui est d'autant plus forte que l'expression HDAC2 dans les cellules est importante (n=3).

2. Expression d'Ac-H4K12 :

Nous avons analysé le pourcentage de cellules exprimant Ac-H4K12 dans les 4 structures étudiées. Pour chacune d'entre elles, et pour chacun des traitements, il ne semble pas exister de différence entre les Low Drinkers et les High Drinkers (n=3). Ceci paraît concordant avec la nature ubiquitaire de l'expression d'Ac-H4K12 dans les cellules.

Nous avons également analysé l'intensité moyenne de fluorescence (MFI), qui est d'autant plus forte que la quantité d'Ac-H4K12 présente dans les cellules est importante. Dans les conditions « contrôle », bien qu'on ne puisse pas réaliser d'étude statistique (n=3), il semble que l'intensité d'immunofluorescence et donc la quantité d'Ac-H4K12 soit plus importante chez les Low Drinkers que chez les High Drinkers au niveau du CPF et du Nacc. (Fig.24)

Dans ces deux structures, EBJD9 semble avoir pour effet de normaliser Ac-H4K12 : Dans le CPF et chez les Low Drinkers, il semble que EBJD9 fasse diminuer Ac-H4K12, tandis que chez les High Drinkers EBJD9 semble faire augmenter Ac-H4K12. Il ne semble pas y avoir de différence significative dans les niveaux Ac-H4K12 entre les Low Drinkers et les High Drinkers ayant été traités par EBJD9. Au niveau du noyau accumbens, EBJD9 semble abaisser Ac-H4K12 aussi bien chez les High Drinkers que chez les Low Drinkers. Et là encore, il ne semble pas y avoir de différence significative dans les niveaux Ac-H4K12 entre les Low Drinkers et High Drinkers après traitement par EBJD9.

Ces résultats seraient en concordance avec les résultats de l'expérience comportementale : EBJD9 tend au niveau comportemental à rendre la consommation des Low Drinkers et des High

Drinkers similaire alors que les deux sous-groupes avaient des consommations significativement différentes avant le traitement par EBJD9. Ici, EBJD9 tendrait à rendre similaire le niveau d'Ac-H4K12 au niveau du cortex pré-frontal et du noyau accumbens.

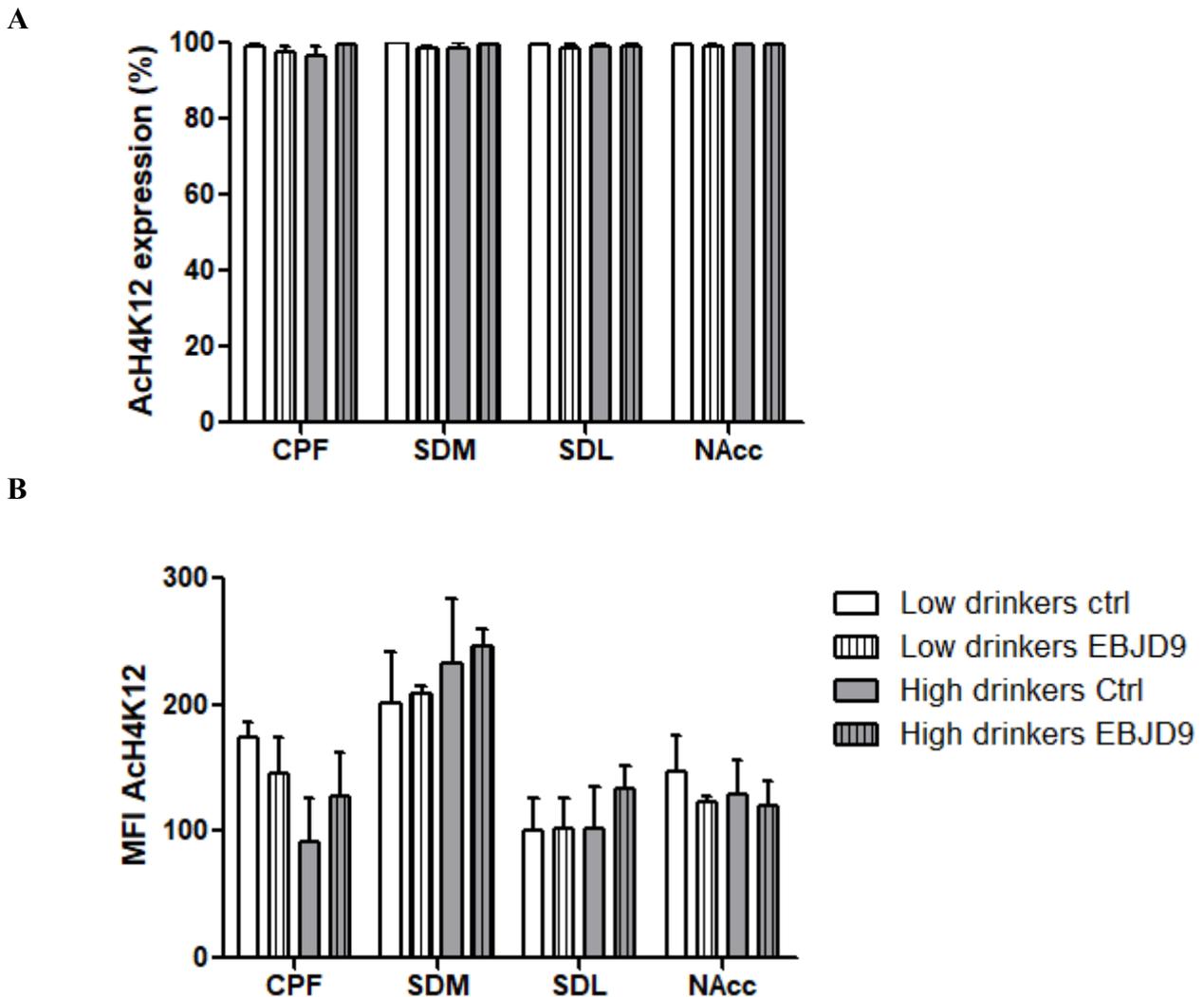


Figure 24: A : Pourcentage de cellules exprimant Ac-H4K12 dans les 4 structures étudiées. Pour chacune d'entre elles, et pour chacun des traitements, il ne semble pas exister de différence entre les Low Drinkers et les High Drinkers ($n=3$). B : Intensité moyenne de fluorescence (MFI), qui est d'autant plus forte que la quantité de Ac-H4K12 présente dans les cellules est importante ($n=3$).

3. Expression de GluN2A et de GluN2B :

Nous avons étudié l'expression de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA dans les 4 structures. Bien qu'il ne soit pas encore possible de faire de statistiques ($n=3$), on note une différence de l'effet « type de buveur » en fonction des régions cérébrales étudiées. Dans le cortex pré-frontal, chez les rats contrôles, il y aurait une expression GluN2B moins forte chez les High Drinkers par rapport aux Low Drinkers, tandis que dans les autres régions étudiées, le striatum et le noyau accumbens, chez les rats contrôles, il y aurait une expression GluN2B plus forte chez les

High Drinkers par rapport aux Low Drinkers. (Fig.25)

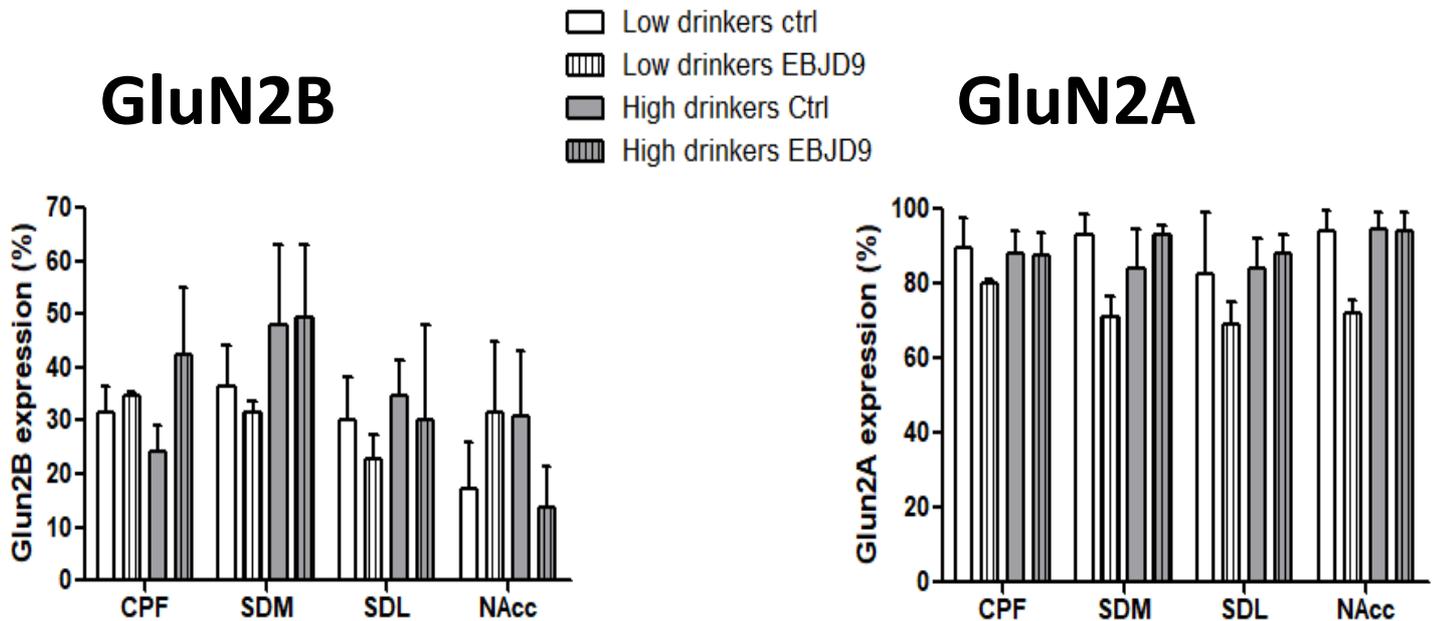


Figure 25 : A : Le premier graphique correspond à l'expression dans les 4 structures étudiées, de la sous-unité GluN2B. Bien qu'il ne soit pas encore possible de faire de statistiques (n=3), il semble pour les rats contrôle et dans le cortex pré-frontal, qu'il y ait une expression GluN2B moins forte chez les High Drinkers par rapport aux Low Drinkers. B : Le second graphique correspond à l'expression dans les 4 structures étudiées, de la sous-unité GluN2A. Bien qu'il ne soit pas encore possible de faire de statistiques (n=3), il semble que EBJD9 abaisse l'expression de GluN2A chez les Low Drinkers dans les 4 structures, mais pas chez les High Drinkers.

4. DISCUSSION :

Dans ce travail, nous avons montré par des expériences *in vitro* qu'EBJD9 présente les propriétés d'un activateur HDAC : il diminue l'acétylation des histones H4 et augmente l'activité enzymatique des enzymes HDAC dites totales, c'est-à-dire de l'ensemble des familles de HDAC. Par nos expériences comportementales, nous avons montré qu'EBJD9 augmente la consommation d'alcool chez des rats présentant un faible niveau de consommation d'alcool, sans modifier celle des rats ayant un fort niveau de consommation spontanée. Enfin, nous avons réalisé des travaux préliminaires de cytométrie en flux avec n=3 rats par groupe, ce qui ne permet pas de faire l'analyse statistique. Cependant, une tendance se dégage montrant des différences de profil épigénétique dans les deux sous-groupes de rats Low Drinkers et High Drinkers, dont certaines pourraient être reliées à leur différence de phénotype comportemental. Nous avons observé une plus faible expression de HDAC2 associée à plus forte acétylation H4K12 dans le cortex pré-frontal et le noyau accumbens chez le groupe de rats Low Drinkers, soit sur la sous-population sur laquelle EBJD9 s'est montré actif.

La forte expression d'Ac-H4K12 a été « corrigée » par l'injection d'EBJD9. Ceci semble démontrer que *in vivo*, dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens, deux régions clés du circuit de la récompense, chez les Low Drinkers, l'effet d'EBJD9 est celui d'un activateur HDAC. De manière intéressante, nous avons noté qu'EBJD9 est sans effet sur l'expression d'HDAC2, qui ne semble donc pas être sa cible.

1) Expérience *in vitro* sur les niveaux d'acétylation Ac-H4K12 sur SH-SY5Y et sur l'activité HDACs totale

Les expériences menées sur les cultures de cellules SH-SY5Y, qui sont des précurseurs neuronaux, nous ont permis de mettre en évidence qu'EBJD9 diminue les niveaux d'acétylation de H4K12 et augmente l'activité des HDACs totales. Nos résultats ont également montré qu'*in vitro* l'éthanol présente un effet activateur HDAC, et permettent d'étayer l'hypothèse selon laquelle EBJD9 est également un activateur HDAC.

2) Expériences comportementales :

1. Protocole d'accès intermittent à de l'éthanol :

Notre protocole d'accès intermittent à de l'éthanol a été réalisé pendant 6 semaines complètes à raison de 3 séances d'alcoolisation par semaine et les rats ont présenté une escalade de la consommation comparable à celle montrée par Simms et al. 2008. Ces auteurs avaient également pu constater une baisse significative de la préférence en eau et une augmentation significative de la préférence en éthanol 20% stabilisé au bout de 6 semaines, ce qui est conforme à nos résultats, tandis que la consommation en fluide totale était relativement stable sur 6 semaines, à quelques exceptions près.

Nous avons reproduit ces conditions expérimentales reconnues pour leur validité dans les tests de traitements de l'addiction. Il est notable que ces conditions soient idéales pour mettre en évidence l'effet anti-addiction de molécules telles que les iHDACs. Cependant, elles n'ont pas démontré leur efficacité pour montrer l'effet que nous attendions et qui constituait notre hypothèse de départ, à savoir une hausse de la consommation avec EBJD9.

En effet, si on réalise une escalade de la consommation afin de pouvoir ensuite objectiver un effet limitant la consommation par les iHDACs, peut-être aurait-il été plus judicieux d'observer l'effet d'EBJD9 avant l'escalade de la consommation, sur des rats présentant un faible niveau de consommation. Une autre stratégie aurait pu être d'administrer EBJD9 pendant le protocole

d'escalade, ce qui aurait peut-être permis une escalade plus rapide que dans les conditions d'un accès intermittent classique. Cette expérience devra être menée au laboratoire afin d'affiner les tests comportementaux concernant EBJD9.

2. Effet d'EBJD9 sur le comportement :

Lorsque les rats, à la fin de la stabilisation de l'escalade de consommation, ont reçu des injections d'EBJD9, en simple ou double injections, nous n'avons pas observé de modification de leur consommation d'alcool. Nous avons formulé l'hypothèse que la forte escalade mise en place conduisait à un effet « plafond » de consommation, ne permettant pas de voir un effet « pro-consommatoire ». Pour tester cette hypothèse, nous avons séparé le groupe en deux sous-groupes en fonction de leur type de consommation et réévalués statistiquement les résultats. Nous avons observé que la double injection d'EBJD9 augmente la consommation des rats Low Drinkers, au point de rendre leur consommation similaire à celle des High Drinkers, aussi bien sur la consommation pendant 2 heures (+ 62,4%) que sur celle de 24 heures (+ 43,3%).

Beaucoup d'études sur les inhibiteurs HDAC ont montré la nécessité d'injecter deux fois l'inhibiteur, à 24 heures d'écart, pour mettre en évidence un effet (Jerome Jeanblanc et al. 2015) (Simon-O'Brien et al. 2015), aussi nous avons repris ce schéma pour tester les effets de EBJD9. Cependant, suite aux résultats obtenus sur la consommation après deux injections, nous avons voulu savoir s'il existait un effet après une unique injection. Nous avons observé une augmentation significative de la consommation d'éthanol aussi bien pendant 2 heures (+ 47,5%) que pendant 24 heures (+ 215,4%) après une unique injection.

Ainsi, nous pouvons conclure à l'efficacité d'EBJD9, aussi bien après une que deux injections, pour modifier le comportement d'alcoolisation des Low Drinkers et le rendre similaire à celui des High Drinkers.

3) Cytométrie en flux :

Au moment de rendre ce travail de thèse, nous ne disposons pas des résultats définitifs de la cytométrie en flux, qui est encore en cours.

1. Différence entre les sous-groupes High-Drinkers et Low-Drinkers

Les résultats préliminaires (n=3 par groupe) de la cytométrie en flux, montrent que les deux

sous-groupes de rats diffèrent par leur niveau d'acétylation dans le cortex préfrontal : Les High Drinkers présentent une plus forte expression de HDAC2 et une moindre expression d'Ac-H4K12 par rapport aux rats Low Drinkers. Chez des rats adolescents exposés à un protocole de binge drinking, ou encore chez des rats sélectionnés génétiquement et alcoolo-préférants, l'exposition à l'alcool entraîne une diminution de l'expression d'Ac-H4K12 et une augmentation de l'expression de HDAC2 (Moonat et al. 2013). Ainsi, au vu de la littérature, la régulation épigénétique observée nous paraît en rapport avec la plus grande quantité d'alcool consommée sur la vie par les rats High Drinkers.

Nous avons analysé l'expression des deux sous unités du récepteur NMDA, dont la modulation est responsable de la plasticité cérébrale NMDA-dépendante. L'expression de la sous unité GluN2A ne semble pas différente chez les High Drinkers et Low Drinkers dans l'ensemble du cortex préfrontal, du striatum et du noyau accumbens. L'expression de la sous unité GluN2B présente une régulation région-dépendante chez les High Drinkers et Low Drinkers. Dans le cortex préfrontal, les High Drinkers présentent une plus faible expression de GluN2B. Dans le noyau accumbens et les deux sous-régions du striatum, c'est l'inverse et l'expression de GluN2B est augmentée. Nous pensons que ces modifications d'expression sont en lien avec des altérations de la plasticité synaptique dans ces structures, induites par le type de consommation d'alcool.

2. Effet de EBJD9 sur l'expression GluN2B et GluN2A :

Les premiers résultats, qui ne permettent pas d'analyse statistique au vu du nombre trop restreint de cerveaux analysés (n=3 pour chaque groupe), donnent à penser que l'effet d'EBJD9 est région-spécifique, et dépend du type de consommation d'alcool. Il ne semble pas y avoir de différence significative dans les niveaux Ac-H4K12 entre les Low Drinkers et les High Drinkers ayant été traités par EBJD9 au niveau du CPF et au niveau du noyau accumbens, ce qui indiquerait qu'EBJD9 « normalise » cette expression, en l'abaissant lorsqu'elle est très élevée (cas des Low Drinkers) et en l'augmentant quand elle est faible (cas des High Drinkers). Ces résultats seraient plutôt en concordance avec les résultats de l'expérience comportementale : EBJD9 tend au niveau comportemental à rendre la consommation des Low Drinkers et des High Drinkers similaire alors que les deux sous-groupes avaient des consommations significativement différentes avant le traitement par EBJD9. Ici, EBJD9 tendrait à rendre similaire le niveau d'Ac-H4K12 au niveau du cortex pré-frontal mais aussi au niveau du noyau accumbens. D'autres travaux ont montré que les effets *in vivo* de modulateurs d'activité HDAC sont régions- spécifiques et « type de buveur » spécifiques. (Simon-O'Brien et al. 2015)

Les résultats préliminaires semblent montrer également que pour une structure cérébrale donnée, il n'existe pas de différence d'expression de HDAC2 dans les cellules selon que le

traitement soit EBJD9 ou CRTL. Drissi et al. 2019, ont montré que le promoteur du gène de la sous unité GluN2B est régulé par l'enzyme HDAC2 : une activité HDAC2 importante va augmenter l'expression de GluN2B. De plus, HDAC2 fait partie des HDACs catalysant la désacétylation de H4K12 (donc faisant baisser le niveau Ac-H4K12). Si EBJD9 influençait l'activité de HDAC2 et par là même le niveau d'acétylation de H4K12, alors le degré d'expression de GluN2B changerait également dans le même sens de variation que l'activité HDAC2. EBJD9 entraîne dans le CPF une diminution du niveau d' Ac-H4K12 chez les Low Drinkers et une augmentation du niveau d' Ac-H4K12 chez les High Drinkers : nous devrions donc constater avec EBJD9 une hausse de GluN2B chez les Low Drinkers et une baisse de GluN2B chez les High Drinkers.

Or dans le CPF, on constate chez les Low Drinkers une légère diminution de GluN2B qui ne semble pas être significative par rapport aux rats Low Drinkers n'ayant pas reçu EBJD9. Tandis que chez les High Drinkers, EBJD9 semble induire une augmentation significative de GluN2B. Ces résultats préliminaires dans l'expression de GluN2B, principalement chez les High Drinkers, semblent être en défaveur d'une implication de HDAC2 dans le mécanisme par lequel EBJD9 module l' Ac-H4K12 dans le cortex pré-frontal.

De même, au niveau du noyau accumbens, EBJD9 semble induire une baisse significative de l' Ac-H4K12 chez les Low Drinkers et une légère baisse de l' Ac-H4K12 chez les High Drinkers par rapport au groupe contrôle. EBJD9 semble également entraîner une hausse de l'expression de GluN2B chez les Low Drinkers et une baisse de l'expression GluN2B chez les High Drinkers. Ces résultats confirmeraient l'idée selon laquelle la modulation d' Ac-H4K12 par EBJD9 dans le noyau accumbens n'implique pas HDAC2. En effet, chez les High Drinkers, la baisse d'Ac-H4K12 associée à celle de l'expression GluN2B est en défaveur de l'implication d'HDAC2. EBJD9 activerait donc une autre HDAC que l'HDAC2 afin de modifier les niveaux Ac-H4K12 au niveau du cortex pré-frontal ainsi que du noyau accumbens.

Au niveau de l'expression de GluN2A qui, d'après les résultats préliminaires du GRAP, n'est pas modifiée par l'augmentation de l'activité de HDAC2, il est intéressant de notifier qu'elle semble être abaissée par EBJD9 chez les Low Drinkers uniquement dans les 4 structures étudiées. Ce qui tend également à penser qu'EBJD9 activerait une autre HDAC dont l'activité aurait pour conséquence une diminution de l'expression de GluN2A. Cela serait d'autant plus cohérent que les résultats des expériences comportementales ne montraient d'effet d'EBJD9 que sur la consommation des Low Drinkers.

Nos résultats semblent montrer qu' EBJD9 aurait une action activatrice HDAC associée à une diminution d'Ac-H4K12 au sein du cortex pré-frontal et du Nacc chez les Low Drinkers, soit la

population de rats sur laquelle EBJD9 s'est montré actif lors des expériences comportementales. Nous avons observé qu'EBJD9 régule l'expression d'ac-H4K12 sans modifier celle de HDAC2. Les modifications dans l'expression de GluN2B sont en défaveur de l'implication de HDAC2 dans les mécanismes par lesquels EBJD9 module Ac-H4K12. Ceci nous incite à proposer que l'effet d'EBJD9 impliquerait l'activité d'une HDAC autre que celle d'HDAC2.

5. Conclusion :

Dans ce travail, nous avons montré qu'EBJD9 est un activateur HDAC et augmente la consommation d'alcool chez des rats présentant un faible niveau spontanée de consommation d'alcool, ce qui montre que les modifications d'activité des HDAC sont bien en lien avec la consommation d'alcool. Pour la première fois, nous disposons d'une molécule activatrice HDAC, et nous montrons que son effet *in vivo* est l'exact opposé de celui des inhibiteurs HDAC : Les iHDAC diminuent la consommation d'alcool, et cet activateur HDAC l'augmente. Pour comprendre pleinement le rôle de la modulation épigénétique, il nous reste à explorer des aspects autres que la simple consommation d'alcool, dont la motivation ou la rechute. Nous avons également montré qu'EBJD9 ne modifie pas la consommation des High Drinkers, et nous supposons que cela soit dû à un effet « plafond » de leur consommation.

Nous avons des résultats préliminaires en ce qui concerne la cytométrie en flux montrant qu'EBJD9 pourrait normaliser l'activité d'une ou plusieurs HDACs dans le cortex pré-frontal ainsi que dans le noyau accumbens. Une étude précédente du GRAP (Drissi et al., 2019) avait montré que le promoteur du gène codant la sous unité GluN2B est contrôlé par HDAC2, et que l'augmentation de l'activité et de l'expression de HDAC2 augmente l'expression de GluN2B.

Ici, nous avons observé qu'EBJD9 module les niveaux d'Ac-H4K12 sans modification ni de l'expression HDAC2 ni de son activité comme le montre l'évolution de l'expression de GluN2B. L'HDAC2 ne serait donc pas impliquée dans l'action d'EBJD9. L'augmentation de l'activité des HDAC(s) impliquée(s) pourrait être associée à une diminution de l'expression de GluN2A provoqué par EBJD9, uniquement chez les Low Drinkers, qui elle-même serait associée à une augmentation de la consommation d'éthanol des Low Drinkers jusqu'à un niveau semblable à celui des High Drinkers. Cette hypothèse reste à explorer.

6. BIBLIOGRAPHIE :

Alcool-info-services. 2019 www.alcool-info-service.fr/Actualites/2-verres-par-jour-pas-tous-les-jours#.XKsWIXduLIU consulté le 08/04/19.

Agudelo, Marisela, Nimisha Gandhi, Zainulabedin Saiyed, Vijaya Pichili, Samikkannu Thangavel, Pradnya Khatavkar, Adriana Yndart-Arias, et Madhavan Nair. 2011. « Effects of Alcohol on Histone Deacetylase 2 (HDAC2) and the Neuroprotective Role of Trichostatin A (TSA): EFFECTS OF ALCOHOL ON HDAC2 AND THE NEUROPROTECTIVE ROLE OF TSA ». *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, mars, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01492.x>.

Barbier, E, A L Johnstone, B B Khomtchouk, J D Tapocik, C Pitcairn, F Rehman, E Augier, et al. 2017. « Dependence-Induced Increase of Alcohol Self-Administration and Compulsive Drinking Mediated by the Histone Methyltransferase PRDM2 ». *Molecular Psychiatry* 22 (12): 1746-58. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.131>.

Berkel, Tiffani D.M., et Subhash C. Pandey. 2017. « Emerging Role of Epigenetic Mechanisms in Alcohol Addiction ». *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 41 (4): 666-80. <https://doi.org/10.1111/acer.13338>.

Botia, Béatrice, Rémi Legastelois, Stéphanie Alaux-Cantin, et Mickaël Naassila. 2012. « Expression of Ethanol-Induced Behavioral Sensitization Is Associated with Alteration of Chromatin Remodeling in Mice ». Édité par Doo-Sup Choi. *PLoS ONE* 7 (10): e47527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047527>.

Bourguet, Erika, Katarzyna Ozdarska, Gautier Moroy, Jérôme Jeanblanc, et Mickaël Naassila. 2018. « Class I HDAC Inhibitors: Potential New Epigenetic Therapeutics for Alcohol Use Disorder (AUD) ». *Journal of Medicinal Chemistry* 61 (5): 1745-66. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00115>. En préparation.

Burton, Robyn, et Nick Sheron. 2018. « No Level of Alcohol Consumption Improves Health ». *The Lancet* 392 (10152): 987-88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31571-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31571-X).

Drissi, Ichrak, Chloé Deschamps, Grégory Fouquet, Rachel Alary, Stéphane Peineau, Philippe Gosset, Harold Sueur, et al. 2019. « Memory and Plasticity Impairment after Binge Drinking in Adolescent Rat Hippocampus: GLUN2A / GLUN2B NMDA Receptor Subunits Imbalance through HDAC2 ». *Addiction Biology*, mai, e12760. <https://doi.org/10.1111/adb.12760>.

Fitzgerald, Brianne, et Betty D. Morgan. 2012. « DSM-5 Changes on the Horizon: Substance Use Disorders ». *Issues in Mental Health Nursing* 33 (9): 605-12. <https://doi.org/10.3109/01612840.2012.704131>.

Griswold, Max G, Nancy Fullman, Caitlin Hawley, Nicholas Arian, Stephanie R M Zimsen, Hayley D Tymeson, Vidhya Venkateswaran, et al. 2018. « Alcohol Use and Burden for 195 Countries and Territories, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 ». *The Lancet* 392 (10152): 1015-35. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31310-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31310-2).

Gu, Jenny, et Ryota Kanai. 2014. « What Contributes to Individual Differences in Brain Structure? » *Frontiers in Human Neuroscience* 8 (avril). <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00262>.

Guérin, Sylvie, Agnès Laplanche, Ariane Dunant, et Catherine Hill. 2013. « Alcohol-Attributable

Mortality in France ». *European Journal of Public Health* 23 (4): 588-93. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckt015>.

Harrison, Ian F., et David T. Dexter. 2013. « Epigenetic Targeting of Histone Deacetylase: Therapeutic Potential in Parkinson's Disease? » *Pharmacology & Therapeutics* 140 (1): 34-52. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.05.010>.

Hooker, Jacob M., Sung Won Kim, David Alexoff, Youwen Xu, Colleen Shea, Alicia Reid, Nora Volkow, et Joanna S. Fowler. 2010. « Histone Deacetylase Inhibitor MS-275 Exhibits Poor Brain Penetration: Pharmacokinetic Studies of [¹¹C]MS-275 Using Positron Emission Tomography ». *ACS Chemical Neuroscience* 1 (1): 65-73. <https://doi.org/10.1021/cn9000268>.

Jangra, Ashok, Chandra Shaker Sriram, Suryanarayan Pandey, Priyansha Choubey, Prabha Rajput, Babita Saroha, Babul Kumar Bezbaruah, et Mangala Lahkar. 2016. « Epigenetic Modifications, Alcoholic Brain and Potential Drug Targets ». *Annals of Neurosciences* 23 (4): 246-60. <https://doi.org/10.1159/000449486>.

Jeanblanc, Jérôme, Erika Bourguet, Diana Sketrienė, Céline Gonzalez, Gautier Moroy, Rémi Legastelois, Mathieu Létévé, Aurélie Trussardi-Régner, et Mickaël Naassila. 2018. « Interest of New Alkylsulfonylhydrazide-Type Compound in the Treatment of Alcohol Use Disorders ». *Psychopharmacology* 235 (6): 1835-44. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4917-5>.

Jeanblanc, Jerome, Sandrine Lemoine, Virginie Jeanblanc, Stéphanie Alaux-Cantin, et Mickaël Naassila. 2015. « The Class I-Specific HDAC Inhibitor MS-275 Decreases Motivation to Consume Alcohol and Relapse in Heavy Drinking Rats ». *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (9): pyv029. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv029>.

Jeanblanc, Jerome, Marian L. Logrip, Patricia H. Janak, et Dorit Ron. 2013. « BDNF-Mediated Regulation of Ethanol Consumption Requires the Activation of the MAP Kinase Pathway and Protein Synthesis ». *European Journal of Neuroscience* 37 (4): 607-12. <https://doi.org/10.1111/ejn.12067>.

Kyzar, Evan J., et Subhash C. Pandey. 2015. « Molecular Mechanisms of Synaptic Remodeling in Alcoholism ». *Neuroscience Letters* 601 (août): 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.051>.

Legastelois, Rémi, Béatrice Botia, et 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. <https://doi.org/10.1111/acer.12088>.

Legastelois, Rémi, Jérôme Jeanblanc, Catherine Vilpoux, Erika Bourguet, et Mickael Naassila. 2017. « Mécanismes épigénétiques et troubles de l'usage d'alcool: une cible thérapeutique intéressante? » *Biologie Aujourd'hui* 211 (1): 83-91. <https://doi.org/10.1051/jbio/2017014>.

Lim, Stephen S, Theo Vos, Abraham D Flaxman, Goodarz Danaei, Kenji Shibuya, Heather Adair-Rohani, Mohammad A AlMazroa, et al. 2012. « A Comparative Risk Assessment of Burden of Disease and Injury Attributable to 67 Risk Factors and Risk Factor Clusters in 21 Regions, 1990–2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 ». *The Lancet* 380 (9859): 2224-60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8).

Loi, Barbara, Carla Lobina, Paola Maccioni, Noemi Fantini, Mauro A. M. Carai, Gian Luigi Gessa, et Giancarlo Colombo. 2010. « Increase in Alcohol Intake, Reduced Flexibility of Alcohol Drinking, and Evidence of Signs of Alcohol Intoxication in Sardinian Alcohol-Preferring Rats Exposed to Intermittent Access to 20% Alcohol: ALCOHOL DEPENDENCE IN SARDINIAN ALCOHOL-

PREFERRING RATS ». *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 34 (12): 2147-54. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01311.x>.

Modell, Jack G., Frederick B. Glaser, Louis Cyr, et James M. Mountz. 1992. « Obsessive and Compulsive Characteristics of Craving for Alcohol in Alcohol Abuse and Dependence ». *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 16 (2): 272-74. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1992.tb01375.x>.

Moonat, Sachin, Amul J. Sakharkar, Huaibo Zhang, Lei Tang, et Subhash C. Pandey. 2013. « Aberrant Histone Deacetylase2–Mediated Histone Modifications and Synaptic Plasticity in the Amygdala Predisposes to Anxiety and Alcoholism ». *Biological Psychiatry* 73 (8): 763-73. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.01.012>.

Morgan, Charles A, Ann M Rasmusson, Sheila Wang, Gary Hoyt, Richard L Hauger, et Gary Hazlett. 2002. « Neuropeptide-Y, Cortisol, and Subjective Distress in Humans Exposed to Acute Stress: Replication and Extension of Previous Report ». *Biological Psychiatry* 52 (2): 136-42. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01319-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01319-7).

Morgan, Charles A, Sheila Wang, Steven M Southwick, Ann Rasmusson, Gary Hazlett, Richard L Hauger, et Dennis S Charney. 2000. « Plasma Neuropeptide-Y Concentrations in Humans Exposed to Military Survival Training ». *Biological Psychiatry* 47 (10): 902-9. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00239-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00239-5).

O'Brien, Charles. 2011. « Addiction and Dependence in DSM-V ». *Addiction* 106 (5): 866-67. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03144.x>.

Palmisano, Martina, et Subhash C. Pandey. 2017. « Epigenetic Mechanisms of Alcoholism and Stress-Related Disorders ». *Alcohol* 60 (mai): 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.01.001>.

Pandey, S. C., R. Ugale, H. Zhang, L. Tang, et A. Prakash. 2008. « Brain Chromatin Remodeling: A Novel Mechanism of Alcoholism ». *Journal of Neuroscience* 28 (14): 3729-37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5731-07.2008>.

Pandey, Subhash C., Evan J. Kyzar, et Huaibo Zhang. 2017. « Epigenetic Basis of the Dark Side of Alcohol Addiction ». *Neuropharmacology* 122 (août): 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.02.002>.

Peña, Catherine J., Rosemary C. Bagot, Benoit Labonté, et Eric J. Nestler. 2014. « Epigenetic Signaling in Psychiatric Disorders ». *Journal of Molecular Biology* 426 (20): 3389-3412. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.016>.

Royce, Simon G, Katherine Ververis, et Tom C Karagiannis. 2012. « Histone Deacetylase Inhibitors: Can We Consider Potent Anti-Neoplastic Agents for the Treatment of Asthma? » 42 (3): 8.

Sakharkar, Amul J., Huaibo Zhang, Lei Tang, Kathryn Baxstrom, Guangbin Shi, Sachin Moonat, et Subhash C. Pandey. 2014. « Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Amygdaloid Histone Acetylation and Neuropeptide Y Expression: A Role in Anxiety-like and Alcohol-Drinking Behaviours ». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 17 (08): 1207-20. <https://doi.org/10.1017/S1461145714000054>.

Schwarzinger, Michaël, Sophie Pascale Thiébaud, Sylvain Baillot, Vincent Mallet, et Jürgen Rehm. 2018. « Alcohol Use Disorders and Associated Chronic Disease – a National Retrospective Cohort Study from France ». *BMC Public Health* 18 (1): 43. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4587-y>.

Simms, Jeffrey A., Pia Steensland, Brian Medina, Kenneth E. Abernathy, L. Judson Chandler, Roy Wise, et Selena E. Bartlett. 2008. « Intermittent Access to 20% Ethanol Induces High Ethanol Consumption in Long-Evans and Wistar Rats ». *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32 (10): 1816-23. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>.

Simon-O'Brien, Emmanuelle, Stéphanie Alaux-Cantin, Vincent Warnault, Romain Buttolo, Mickaël Naassila, et Catherine Vilpoux. 2015. « The Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate Decreases Excessive Ethanol Intake in Dependent Animals: HDAC Inhibition and Alcoholism ». *Addiction Biology* 20 (4): 676-89. <https://doi.org/10.1111/adb.12161>.

Singh, Raushan K., Kyongshin Cho, Satish K. R. Padi, Junru Yu, Manas Haldar, Tanmay Mandal, Changhui Yan, et al. 2015. « Mechanism of *N*-Acylthiourea-Mediated Activation of Human Histone Deacetylase 8 (HDAC8) at Molecular and Cellular Levels ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (10): 6607-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.600627>.

Vengeliene, Valentina, Evelyne Celerier, Lea Chaskiel, Franco Penzo, et Rainer Spanagel. 2009. « Compulsive Alcohol Drinking in Rodents ». *Addiction Biology* 14 (4): 384-96. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2009.00177.x>.

Walker, Deena M, Hannah M Cates, Elizabeth A Heller, et Eric J Nestler. 2015. « Regulation of Chromatin States by Drugs of Abuse ». *Current Opinion in Neurobiology* 30 (février): 112-21. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.11.002>.

Warnault, V, E Darcq, A Levine, S Barak, et D Ron. 2013. « Chromatin Remodeling — a Novel Strategy to Control Excessive Alcohol Drinking ». *Translational Psychiatry* 3 (2): e231-e231. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.4>.

WHO Alcoholvision. 2016 <http://apps.who.int/gho/data/node.main-euro.A1039?lang=en&showonly=GISAH> consulté le 24/03/19.

WHO The Lancet. 2019 www.euro.who.int/fr/health-topics/disease-prevention/alcohol-use/news/news/2018/09/there-is-no-safe-level-of-alcohol,-new-study-confirms consulté le 24/03/19.

WHO. 2019 <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/alcohol-use/data-and-statistics> consulté le 24/03/19.

Yelland, Lisa N., Jaimi P. Burns, D. Noel Sims, Amy B. Salter, et Jason M. White. 2008. « Inter- and Intra-Subject Variability in Ethanol Pharmacokinetic Parameters: Effects of Testing Interval and Dose ». *Forensic Science International* 175 (1): 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.05.011>.

You, Chang, Huaibo Zhang, Amul J. Sakharkar, Tara Teppen, et Subhash C. Pandey. 2014. « Reversal of Deficits in Dendritic Spines, BDNF and Arc Expression in the Amygdala during Alcohol Dependence by HDAC Inhibitor Treatment ». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 17 (02): 313-22. <https://doi.org/10.1017/S1461145713001144>.

Zhou, Zhifeng, Guanshan Zhu, Ahmad R. Hariri, Mary-Anne Enoch, David Scott, Rajita Sinha, Matti Virkkunen, et al. 2008. « Genetic Variation in Human NPY Expression Affects Stress Response and Emotion ». *Nature* 452 (7190): 997-1001. <https://doi.org/10.1038/nature06858>.

Étude des effets du modulateur épigénétique EBDJ9 chez le rat mâle jeune adulte, sur la consommation d'alcool et l'acétylation des protéines histones : une étude expérimentale

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie

Université de Picardie Jules verne

Année universitaire 2018-2019

Mots clés : éthanol, TUA, épigénétique, HDAC, activateur, histone, acétylation.

L'alcool représente un enjeu considérable de santé publique dans l'ensemble de l'Europe et en France en particulier. Les récentes recherches ont permis de mettre en évidence que l'éthanol était entre autre, un perturbateur épigénétique. Parmi les différents mécanismes épigénétiques perturbés par l'éthanol, l'acétylation des protéines histones, que l'éthanol favorise, est la mieux documentée. Cependant, la compréhension des mécanismes par lesquels l'éthanol est un perturbateur épigénétique reste à parfaire. C'est dans ce but que nous avons étudié la molécule EBJD9, soupçonnée d'être un activateur HDAC. Nos résultats mettent en lumière qu'EBJD9 induit *in vitro* une augmentation de l'acétylation H4K12 et une augmentation de l'activité HDAC totale, et induit *in vivo* une hausse de la consommation d'éthanol chez des rats qui buvaient spontanément peu d'alcool sans montrer d'évolution de la consommation d'éthanol chez des rats qui buvaient spontanément beaucoup. Cela nous apparaît tout à fait pertinent dans la mesure où les iHDACs ont la propriété de diminuer la consommation d'alcool dans plusieurs modèles animaux. Les résultats préliminaires (n=3) de la cytométrie en flux, montrent que ces deux groupes de rats diffèrent par leurs niveaux d'acétylation Ac-H4K12. Dans le cortex préfrontal, les bons buveurs présentent une plus forte expression de HDAC2 et une moindre expression d'Ac-H4K12 par rapport aux rats mauvais buveurs, tandis qu'ils présentent une plus faible expression de la sous unité GLUN2B du récepteur NMDA. Dans le noyau accumbens, nous observons le même profil pour HDAC2 et Ac-H4K12, mais l'expression de la sous unité GLUN2B du récepteur NMDA est plus forte pour les bons buveurs. Il existe également une tendance d'EBJD9 à « normaliser » Ac-H4K12 dans le cortex pré-frontal et le noyau accumbens dans les deux groupes de rats sans modifier l'expression de HDAC2. Nous avons précédemment montré au laboratoire qu'une augmentation de l'expression de HDAC2 est associée à une augmentation de l'expression de la sous unité GLUN2B par action sur son promoteur. Ici nous observons avec EBJD9 une expression de GLUN2B dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens qui évolue dans le sens inverse à celui attendu par l'hypothèse qui voudrait qu'EBJD9 module l'activité HDAC2. Dans la mesure où EBJD9 ne module pas HDAC2, nous proposons l'hypothèse qu'EBJD9 développe son effet sur Ac-H4K12 via une action sur une enzyme HDAC différente de HDAC2. Ensemble, ces résultats permettent de dire qu'EBJD9 se comporte comme un activateur HDAC. Ce travail permet d'enrichir les connaissances actuelles sur les activateurs HDACs dont l'étude est encore très récente. La compréhension de leurs mécanismes d'actions pourrait nous en apprendre beaucoup sur les mécanismes d'actions de l'éthanol, reconnu comme étant lui-même un activateur HDAC.

Président : Mr Metzinger Laurent, professeur des universités

Membres : Mme Bourguet Erica, maître de conférences

Mr Leflon Arnaud, pharmacien d'officine

Mr Naassila Mickael, professeur des universités

Mme Soyez Marion, pharmacien biologiste

Directrice : Mme Vilpoux Catherine, maître de conférences