

Combattre les maladies négligées en ciblant sélectivement leurs enzymes épigénétiques : le cas de la désacétylase 8 (HDAC8) de *Schistosoma mansoni*

Martin Marek¹, Tajith B. Shaik¹, Manfred Jung², Wolfgang Sippl³, Raymond J. Pierce⁴ et Christophe Romier¹

¹ Département de Biologie Structurale Intégrative, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg (UDS), CNRS, INSERM, 67404 Illkirch Cedex, France

² Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

³ Institute of Pharmacy, Martin-Luther University of Halle-Wittenberg, 06120 Halle/Saale, Germany

⁴ Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIL - Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, 59000 Lille, France

Auteur correspondant : Christophe Romier, romier@igbmc.fr

Reçu le 14 décembre 2016

Résumé – La structure de la chromatine chez les eucaryotes et sa modulation par les mécanismes épigénétiques permet de réguler les différents processus nucléaires. Ainsi, la perturbation des mécanismes épigénétiques peut affecter le bon fonctionnement des cellules, et de nombreuses maladies ont pu être reliées à la dérégulation de l'activité d'effecteurs épigénétiques chez l'homme. Cependant, la réversibilité des mécanismes épigénétiques a aussi ouvert la voie au développement de « Médicaments épigénétiques » ou « Epimédicaments ». Nous avons utilisé l'importance des mécanismes épigénétiques chez les organismes eucaryotes pour aider au développement de candidats-médicaments qui affectent spécifiquement les pathogènes responsables de maladies négligées. Notre travail sur la désacétylase 8 de *Schistosoma mansoni* (smHDAC8) a permis d'aboutir à la mise en évidence de premiers candidats-médicaments qui montrent pour l'enzyme pathogène une sélectivité plus élevée que pour ses homologues humains. Ce travail confirme ainsi l'hypothèse du ciblage des enzymes épigénétiques pathogènes et ouvre la voie au développement d'épimédicaments pour la lutte contre les maladies négligées.

Mots clés : Chromatine / épigénétique / désacétylase / inhibition sélective / schistosomiase

Abstract – Chromatin structure in eukaryotes and its modulation by epigenetic mechanisms enable the regulation of the different nuclear processes. Perturbation of epigenetic mechanisms can thus affect the proper functioning of cells, and numerous diseases have been linked to the deregulation of the activity of epigenetic effectors in human. The reversibility of epigenetic mechanisms has allowed the development of “Epigenetic drugs” or “Epidrugs”. In a chemical biology approach, we have made use of the importance of eukaryotic epigenetic mechanisms to find drug leads that specifically affect pathogens responsible for neglected diseases. Our work on histone deacetylase 8 from *Schistosoma mansoni* (smHDAC8) has enabled us to design drug leads that show stronger selectivity for the pathogen enzyme than for its human homologs. Specifically, we have used a structure-based approach to understand the structural specificities of the smHDAC8 enzyme compared to the human enzymes, notably human HDAC8. The structure of smHDAC8 in complex with various pan-HDAC drugs led to the design of inhibitors that make use of all the structural specificities of this enzyme and that can be stabilized in the smHDAC8 catalytic pocket through a pathogen-specific clamp.

Collectively, our results provide the proof of concept that epigenetic enzymes from pathogens can be targeted to develop anti-pathogenic epidrugs in the fight against neglected diseases. Our results also provide information that can be used to develop epidrugs to fight human diseases, including cancer.

Key words: Chromatin / epigenetics / deacetylase / selective inhibition / schistosomiasis

Introduction

Dans le noyau eucaryote, l'information génétique est compactée sous forme de chromatine. L'unité minimale de la chromatine est formée par le nucléosome qui est composé de protéines histones (H2A, H2B, H3 et H4) et d'ADN (Luger *et al.*, 1997). La chromatine n'est pas seulement nécessaire à l'organisation de l'ADN dans le noyau, mais affecte aussi les différents processus nucléaires en permettant ou en empêchant l'accès des effecteurs nucléaires à l'information génétique.

La structure de la chromatine peut être modulée à l'aide de différents mécanismes, dits épigénétiques (Allis & Jenuwein, 2016; Soshnev *et al.*, 2016). En conséquence, la structure de la chromatine et sa modulation par les mécanismes épigénétiques peuvent réguler les autres processus nucléaires, permettant ainsi à la cellule de répondre rapidement à différents stimuli, mais aussi d'opérer des changements sur le long terme. Ces réponses ont une influence directe et essentielle sur l'homéostasie cellulaire et sur le développement des organismes multicellulaires (Chen & Dent, 2014).

Il apparaît ainsi évident qu'une perturbation des mécanismes épigénétiques et de la structure de la chromatine peut affecter fortement le bon fonctionnement des cellules. De fait, un nombre grandissant de maladies est lié à la dérégulation de l'activité d'effecteurs épigénétiques, y compris de nombreux cancers (You & Jones, 2012; Morgan & Shilatifard, 2015). Cependant, la « réversibilité » de certains mécanismes épigénétiques offre la possibilité de développer des « Médicaments épigénétiques » ou « Épiprimédicaments » qui peuvent permettre de restaurer ou tout au moins d'atténuer les effets délétères de certaines dérégulations épigénétiques.

D'ailleurs, plusieurs épimédicaments sont déjà approuvés dans le traitement de certaines maladies, et de nombreuses autres molécules sont à l'étude dans différentes phases cliniques (Brien *et al.*, 2016). Ainsi, la thérapie épigénétique est amenée à avoir un développement important dans les prochaines années. Ceci implique à la fois d'approfondir nos connaissances, encore souvent superficielles, sur les mécanismes fondamentaux épigénétiques, et d'utiliser ces nouvelles connaissances dans le cadre d'études

de médecine translationnelle pour développer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'importance des mécanismes épigénétiques chez les eucaryotes ouvre aussi la voie au développement d'épiprimédicaments pouvant aider à combattre les maladies humaines causées par les pathogènes eucaryotes, comme dans le cas des maladies tropicales dites négligées qui affectent principalement les pays pauvres et dont le traitement ne présente qu'un intérêt économique limité pour les compagnies pharmaceutiques. Pourtant la forte mortalité associée à ces maladies mais aussi les incapacités de travail imposées par ces maladies affectent fortement l'économie mondiale.

Les traitements contre les maladies négligées sont extrêmement restreints ou inexistantes et les phénomènes de résistance à ces traitements sont en progression, d'où la nécessité de développer de nouveaux médicaments. Les parasites responsables de maladies négligées possèdent en général un cycle cellulaire complexe avec des changements morphologiques importants et un hôte intermédiaire en plus de son hôte final, l'homme. Ces parasites sont donc amenés à s'adapter à des environnements variés et à mettre en place des programmes développementaux différents. La thérapie épigénétique apparaît donc comme une approche viable contre ces pathogènes (Ouassiss & Ouassiss, 2006; Dissous & Greveling, 2011; Andrews *et al.*, 2012; Pierce *et al.*, 2012; Lancelot *et al.*, 2013, 2015; Marek *et al.*, 2015).

L'existence d'épiprimédicaments approuvés pour la lutte contre d'autres maladies doit permettre de faciliter et d'accélérer grandement le développement de médicaments anti-pathogènes, et ainsi de bénéficier indirectement des investissements humains et financiers effectués pour le traitement d'autres maladies. Un goulot d'étranglement important de cette approche consiste cependant à modifier les épimédicaments pour les rendre plus sélectifs contre les cibles parasitaires tout en diminuant ou en abolissant leurs interactions avec leurs cibles humaines pour éviter des effets secondaires.

Dans le cadre de deux projets internationaux financés par l'Union Européenne (SEtTREND, *Schistosoma Epigenetics - Targets, Regulation, New Drugs*, <http://settrend.cebio.org/>; A-ParaDDisE, *Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics*,

<http://a-paradise.cebio.org/>), nous avons étudié la faisabilité d'une stratégie épigénétique antiparasitaire par modification d'épimédicaments. Cette approche a d'abord été testée dans le cas de la schistosomiase, seconde maladie parasitaire après la malaria, en termes de morts annuelles, qui est causée par des vers de genre *Schistosoma* (Hotez & Kamath, 2009). Cette approche a ensuite été étendue à d'autres maladies : la malaria, la maladie de Chagas et la leishmaniose.

Cet article de revue décrit le travail réalisé sur une des cibles majeures des projets SETTReND et A-ParaDDisE, à savoir l'histone désacétylase 8 du pathogène *Schistosoma mansoni* (smHDAC8) (Chakrabarti *et al.*, 2015; Marek *et al.*, 2015). Cette étude a nécessité le travail collaboratif de plusieurs équipes au sein des consortiums SETTReND et A-ParaDDisE. Il a permis d'établir une validation de la stratégie épigénétique dans le traitement des maladies causées par les pathogènes et a posé les bases d'études ultérieures sur d'autres cibles épigénétiques parasitaires. Ce travail a aussi permis de mieux comprendre les aspects d'inhibition sélective des histones désacétylases, aspect essentiel dans la lutte contre les maladies parasitaires mais aussi contre le cancer.

L'acétylation/désacétylation des lysines cible des épimédicaments

Plusieurs mécanismes épigénétiques collaborent à la modulation de la structure de la chromatine, tels que l'écriture, la lecture et l'effacement de marques épigénétiques, la méthylation de l'ADN, le remodelage ATP-dépendant de la chromatine, l'utilisation de variants d'histones, et les ARN non-codants longs (Soshnev *et al.*, 2016). L'implication des marques épigénétiques est l'un des mécanismes épigénétiques les plus étudiés à ce jour. C'est un phénomène réversible qui implique différentes enzymes pouvant être la cible d'épimédicaments.

Les marques épigénétiques sont des groupements chimiques ou même de petites protéines qui vont être attachés de manière covalente, mais cependant réversible, à différents résidus des protéines cibles. Parmi ces marques, on retrouve bien entendu la phosphorylation des sérines et des thréonines, mais aussi l'acétylation des lysines, la (mono-, di-, tri-) méthylation des lysines, la (mono-, di-) méthylation des arginines, ainsi que la mono-ubiquitinylation et la sumoylation des lysines (Zentner & Henikoff, 2013).

L'acétylation des protéines est une modification post-traductionnelle majeure (Drazic *et al.*, 2016). Chez les histones, l'acétylation/désacétylation des lysines a été montrée comme jouant un rôle important pour le passage de la chromatine d'un état répressif (lysines non acétylées ; chromatine peu permissive aux

processus nucléaires) à un état actif (lysines acétylées ; chromatine permissive aux processus nucléaires) (Allis & Jenuwein, 2016). Cela provient notamment du fait que les charges positives portées par les lysines non acétylées sont censées favoriser les interactions entre les nucléosomes, générant ainsi une chromatine plus compacte. La perte de charge due à l'acétylation va donc aboutir à un décompactage de la chromatine.

Les enzymes responsables de l'acétylation des lysines sont communément appelées Histone AcétylTransférases (HAT). Les enzymes responsables de la désacétylation sont de deux sortes : les sirtuines, qui utilisent le NAD comme cofacteur, et les histones désacétylases (HDAC) qui sont dépendantes du zinc (Seto & Yoshida, 2014). Il est important de noter que, malgré leur nom, les HAT et les HDACs n'ont pas obligatoirement pour cible les protéines histones mais peuvent agir sur d'autres cibles nucléaires ou même cytoplasmiques. Ainsi l'HDAC6 va être responsable de la désacétylation de la tubuline, tandis que l'HDAC8 va désacétyler la protéine Smc3 du complexe cohésine. Par contre, les HDAC 1, 2 et 3 font partie de grands complexes protéiques qui ciblent les nucléosomes (Seto & Yoshida, 2014).

Les protéines HDAC sont particulièrement étudiées car leur inhibition permet de traiter différentes maladies, notamment des cancers, leur potentiel thérapeutique étant cependant plus large, s'étendant vers les maladies neurodégénératives et les désordres immunitaires (Falkenberg & Johnstone, 2014). D'ailleurs, des quelques épimédicaments actuellement approuvés pour le traitement de maladies, la plupart ciblent les HDAC (Vorinostat (SAHA), Romidepsin, Belinostat, Panobinostat, Chidamide). Ces anti-HDAC sont cependant peu, voire non sélectifs vis-à-vis d'une HDAC particulière, ce qui restreint leur utilisation thérapeutique. De nombreuses études sont en cours actuellement pour pallier ce problème et trouver des inhibiteurs sélectifs des onze différentes HDAC humaines.

Dans la stratégie de modification d'épimédicaments humains pour combattre les maladies parasitaires, le problème de sélectivité se pose avec encore plus d'acuité puisqu'il devient nécessaire dans cette approche de trouver des inhibiteurs des enzymes pathogènes qui perdent leur sélectivité pour l'ensemble des enzymes humaines, y compris leur orthologues directs.

L'histone désacétylase 8 est importante pour *Schistosoma mansoni*

Une des premières questions qui se pose lors d'une recherche de nouveaux médicaments est de trouver des protéines qui puissent être des cibles thérapeutiques

valides. Si cette approche est déjà compliquée chez l'Homme, elle l'est encore plus chez les parasites pour lesquels beaucoup de protéines sont de fonction inconnue, et pour lesquels les approches génétiques sont limitées ou encore impossibles.

De plus, même si les protéines parasitaires sont homologues à certaines protéines humaines intéressantes sur le plan thérapeutique, il n'est pas évident que ces protéines parasitaires le soient aussi pour le traitement des infections pathogènes. D'autre part, si les protéines humaines et parasitaires sont très proches en termes de structure primaire ou tridimensionnelle, notamment au niveau de leurs sites actifs potentiels, trouver des inhibiteurs sélectifs pour les protéines parasitaires pourra être très compliqué.

Dans le cas de notre étude sur les vers pathogènes du genre *Schistosoma*, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à leurs protéines HDAC pour tenter d'appliquer une stratégie de dérivation d'épimédicaments. Nos travaux préliminaires de traitement de schistosomes *Schistosoma mansoni* avec des inhibiteurs généraux des HDAC a montré que les vers étaient très sensibles à ces traitements (Oger *et al.*, 2008; Dubois *et al.*, 2009; Pierce *et al.*, 2011), indiquant qu'une approche ciblant les HDAC pouvait être développée.

Une analyse des taux de transcrits de différentes HDAC à tous les stades de la vie du parasite a montré que ces HDAC étaient exprimées à tous les stades de vie. Notamment, le taux de transcrits de l'homologue supposé de la HDAC8 humaine de *Schistosoma mansoni* (appelée par la suite smHDAC8) était le plus important, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme (Oger *et al.*, 2008). Par des techniques de RNAi, nous avons pu montrer qu'une baisse de 50 % du niveau de smHDAC8 chez les vers faisait diminuer de 50 % le taux d'infection de souris ainsi que la quantité d'œufs pondus par les vers chez ces mêmes souris (Marek *et al.*, 2013), indiquant que smHDAC8 était une cible valide pour des approches de traitement antiparasitaire.

Par la suite, nous avons établi un protocole de purification de smHDAC8 (Marek *et al.*, 2013, 2016), ce qui nous a permis d'entreprendre sa caractérisation biochimique en comparaison avec la HDAC8 humaine (hHDAC8). Ces caractérisations ont montré une activité désacétylase similaire pour les deux enzymes, et ont aussi permis de constater par des analyses mutationnelles que des résidus, catalytiquement importants chez hHDAC8, l'étaient aussi chez smHDAC8, indiquant que smHDAC8 est très certainement l'orthologue de hHDAC8 chez *S. mansoni* (Marek *et al.*, 2013).

hHDAC8 et smHDAC8 sont proches au niveau de leur structure primaire, notamment pour les résidus qui forment leurs sites actifs. De fait, un seul change-

ment est observé, celui de la méthionine 274 (M274) de hHDAC8 par une histidine (H292) chez smHDAC8. La caractérisation du mutant smHDAC8-H292M révéla cependant que ce mutant était catalytiquement aussi actif que la protéine sauvage, montrant ainsi que la différence entre les deux sites actifs se trouve au niveau physico-chimique mais non au niveau fonctionnel (Marek *et al.*, 2013).

Structure et spécificités structurales de smHDAC8

Nous avons poursuivi nos études en tentant de déterminer la structure tridimensionnelle de smHDAC8 par diffraction des rayons X. Les protéines HDAC sont en général des enzymes peu stables et qui, du fait d'une assez grande flexibilité, notamment au niveau de leur site actif, sont très peu enclines à cristalliser. C'est la raison pour laquelle la plupart des structures de HDAC ont été déterminées en présence d'inhibiteurs qui stabilisent ces protéines.

Dans le cas de smHDAC8, nous avons pu obtenir des cristaux de cette protéine en absence d'inhibiteur. La détermination de la structure de cette protéine montra en fait la présence d'une molécule de L-tartrate fixée au zinc catalytique, qui jouait un rôle stabilisateur de la protéine sans pour autant être un inhibiteur de smHDAC8 (Marek *et al.*, 2013).

La structure de smHDAC8 est très proche de celle de son orthologue humain, hHDAC8. Elle adopte un repliement de type arginase, commun à toutes les HDAC, composé d'un feuillet β central pris en sandwich entre plusieurs hélices α (Figure 1A). Les longues insertions observées dans la séquence primaire de smHDAC8 par rapport à celle de hHDAC8 correspondent à des boucles à la surface de smHDAC8 qui sont plus longues que chez la protéine humaine. Le rôle de ces boucles allongées reste cependant inconnu.

Au niveau du site actif, le remplacement de la méthionine 274 de hHDAC8 par une histidine dans smHDAC8 (H292) est observé, comme attendu (Figure 1B). Un tel remplacement n'apparaît pas influencer sur l'architecture du site actif, mais seulement sur ses propriétés physico-chimiques (remplacement d'un résidu hydrophobe par un résidu chargé). Beaucoup plus surprenante a été l'observation qu'un résidu phénylalanine (smHDAC8 F151), dont la chaîne latérale est toujours tournée vers le site actif dans les nombreuses structures de hHDAC8 (F152) résolues à ce jour, était dans le cas de smHDAC8 dans une conformation complètement différente, insérée dans une poche hydrophobe spécifique, la détournant ainsi du site actif (Figure 1B).

Ceci est rendu possible par le fait que certains résidus, qui diffèrent entre smHDAC8 et hHDAC8

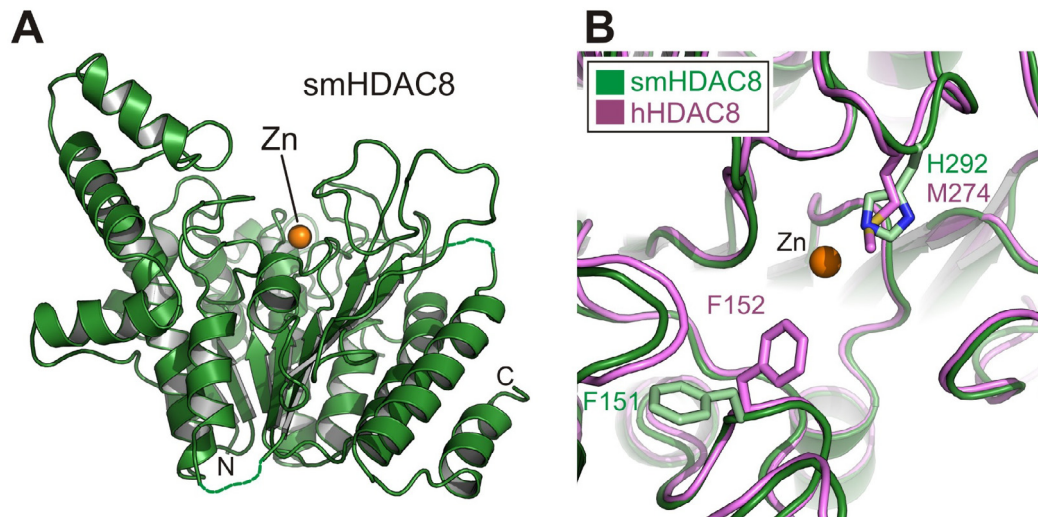


Fig. 1. Structure cristallographique de HDAC8 de *Schistosoma mansoni*

A. Structure en ruban de l'enzyme HDAC8 de *Schistosoma mansoni* (smHDAC8; coloriée en vert). Les brins des feuillettes β de smHDAC8 sont représentés comme des flèches, les hélices α comme des solénoïdes. Le zinc catalytique est montré sous forme de sphère orange à la base du site actif. **B.** Vue de dessus du site actif de smHDAC8 (coloriée en vert) superposée à celui de la HDAC8 humaine (hHDAC8; coloriée en violet). Les résidus différents ou montrant une conformation différente ainsi que le zinc catalytique sont représentés et annotés.

et sont positionnés en dehors du site actif, créent une poche hydrophobe spécifique dans laquelle smHDAC8 F151 peut se placer. En fait, cette phénylalanine est absolument conservée dans toutes les HDAC humaines. Cependant, dans les différentes structures de HDAC humaines résolues à ce jour, la chaîne latérale de cette phénylalanine est toujours tournée vers le site actif (Marek *et al.*, 2013).

Ce résultat est bien entendu très important car ce changement conformationnel a un impact conséquent sur le site actif de smHDAC8 qui devient plus étendu. Ce site est donc à même d'accommoder des inhibiteurs plus volumineux. Ainsi, les différences structurales observées entre smHDAC8 et hHDAC8 étaient plus importantes que ce qui pouvait être déduit de sa structure primaire, ouvrant des perspectives plus larges pour la conception d'inhibiteurs sélectifs de smHDAC8.

Structures de smHDAC8 en complexe avec des inhibiteurs non sélectifs

Pour obtenir les premières informations structurales sur l'inhibition de smHDAC8, nous avons par la suite résolu la structure de cette enzyme en complexe avec différents inhibiteurs non spécifiques des HDAC, notamment l'épimédicament Vorinostat (SAHA) (Figure 2) et l'inhibiteur M344. SAHA et M344, comme la vaste majorité des inhibiteurs de

HDAC, possèdent un groupement hydroxamate qui lie spécifiquement le zinc catalytique. C'est ce que nous constatons dans les structures smHDAC8/SAHA et smHDAC8/M344, comme observé précédemment dans les structures de HDAC humaines en complexe avec des inhibiteurs à hydroxamate.

Cependant, ces structures de smHDAC8 inhibée ont révélé que, selon l'inhibiteur utilisé, la chaîne latérale de la phénylalanine F151 pouvait soit rester dans sa poche hydrophobe, comme observé pour la structure non inhibée de smHDAC8, soit être tournée vers le site actif, comme on le voit dans les HDAC humaines, montrant une flexibilité accrue au niveau du site actif qui n'est pas présente chez les HDAC humaines (Marek *et al.*, 2013).

Ces structures ont donc permis de déterminer qu'il était nécessaire de concevoir des inhibiteurs qui se fixeraient de manière à imposer à F151 que sa chaîne latérale reste dans sa poche hydrophobe pour conserver un site actif plus large. L'autre aspect étant bien entendu de concevoir ces inhibiteurs pour qu'ils puissent aussi interagir avec l'histidine H292, spécifique de smHDAC8.

Nouveaux inhibiteurs à sélectivité augmentée

Nos données structurales ont permis de lancer une recherche informatique pour trouver des fragments chimiques qui répondraient le mieux à ces impératifs.

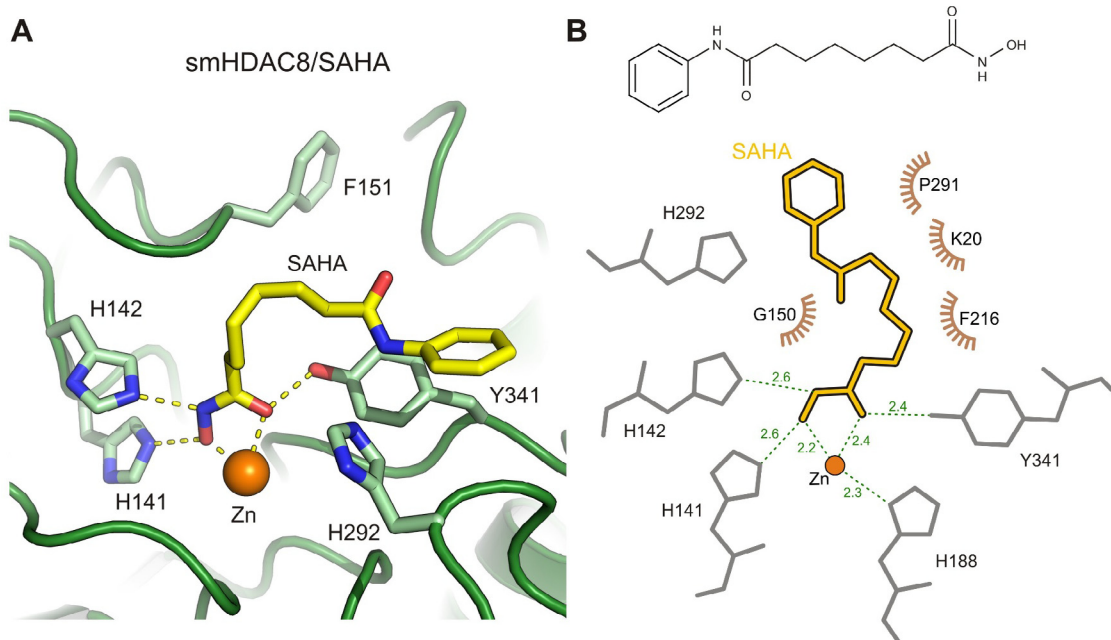


Fig. 2. Fixation de l'épimédicament SAHA à smHDAC8

A. Structure de l'épimédicament SAHA fixé à smHDAC8. Code couleur pour la molécule de SAHA : carbone, jaune; oxygène, rouge; azote, bleu. Les résidus de smHDAC8 impliqués dans l'interaction avec SAHA et ceux donnant des spécificités structurales à cette enzyme sont représentés et annotés. **B.** Représentation schématique de la fixation de SAHA à smHDAC8. Les chiffres indiquent les distances en Angströms entre les atomes.

Cette recherche a abouti à la mise en évidence de quelques molécules plus volumineuses pouvant se fixer dans le site actif élargi de smHDAC8 (Kannan *et al.*, 2014). Ces molécules ont montré une capacité à inhiber smHDAC8 comme ce qui avait été observé avec l'inhibiteur SAHA (Figure 3A). Par contre, elles avaient quasiment perdu leur faculté d'inhibition de HDAC majeures chez l'homme, à savoir hHDAC1 et hHDAC3. Enfin, elles montraient une inhibition moindre de hHDAC6 et hHDAC8 comparé à SAHA, sans pour autant perdre totalement leur activité inhibitrice sur ces enzymes.

La résolution de la structure de smHDAC8 en complexe avec deux de ces molécules, J1038 et J1075, a montré des modes de fixation différents pour ces deux inhibiteurs (Figures 3B, 3C). J1038 induit le repositionnement de la chaîne latérale de F151 vers le site actif mais interagit par liaison hydrogène avec la chaîne latérale de H292, utilisant ainsi une spécificité structurale de smHDAC8. Dans le cas de J1075, son volume empêche la chaîne latérale de F151 de se tourner vers le site actif et celle de la tyrosine 341 d'adopter une conformation compatible avec son rôle catalytique. Par contre, J1075 n'interagit pas avec H292.

Ainsi, les deux fragments étudiés répondaient en partie aux caractéristiques souhaitées de fixation dans le site actif de smHDAC8, et montraient une inhibi-

tion plus sélective pour smHDAC8 sans pour autant montrer une inhibition forte de cette enzyme ni une diminution drastique de l'inhibition de certaines HDAC humaines. L'ensemble des informations recueillies sur ces inhibiteurs a cependant permis de progresser vers des inhibiteurs encore plus sélectifs.

Vers des inhibiteurs plus sélectifs

Par la suite, toute une série de composés chimiques a été établie en tenant en compte des spécificités des fragments J1038 et J1075. La partie la plus aboutie concerne les composés issus de la molécule J1038. En modifiant cette molécule et en y adjoignant des groupements chimiques additionnels, nous avons pu générer une grande bibliothèque de composés. Ces composés ont montré une inhibition plus forte de smHDAC8 (de l'ordre du nM) et une inhibition fortement décrite de hHDAC6. Par contre, hHDAC8 reste fortement inhibée par ces composés. À noter cependant que, pour certains composés, l'inhibition de smHDAC8 était meilleure que celle de hHDAC8, permettant ainsi d'obtenir des composés montrant pour la première fois une légère sélectivité pour smHDAC8 (Marek *et al.*, 2013; Kannan *et al.*, 2014).

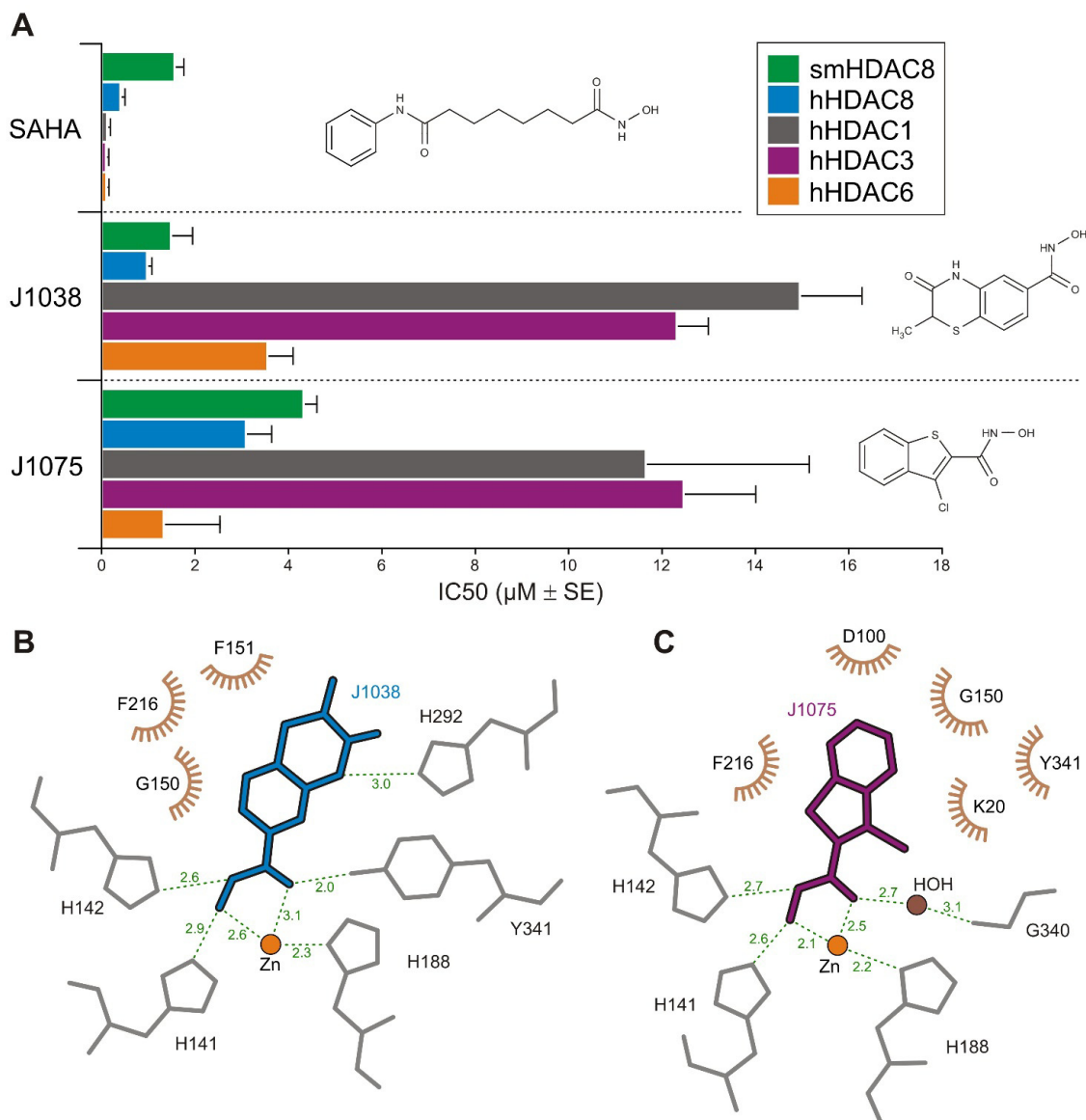


Fig. 3. Inhibition de smHDAC8 par J1038 et J1075

A. Inhibition de smHDAC8 et de plusieurs HDAC humaines par mesure de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀ en μM) par SAHA, J1038 et J1075. J1038 et J1075 n'inhibent quasiment plus hHDAC1 et hHDAC3, mais conservent une activité inhibitrice pour hHDAC6, hHDAC8 et smHDAC8. **B, C.** Représentation schématique de la fixation de J1038 (**B**) et J1075 (**C**) à smHDAC8. Les chiffres indiquent les distances en Angströms entre les atomes. HOH représente une molécule d'eau.

Pour comprendre les bases moléculaires de cette inhibition accrue pour smHDAC8, nous avons résolu la structure de cette enzyme avec le composé le plus simple de cette série d'inhibiteurs, TH31. Cette structure a révélé que cet inhibiteur est capable d'utiliser l'ensemble des spécificités structurales de smHDAC8 pour se fixer (Figures 4A, 4B). Notamment, comme pour J1038, en plus de la liaison au zinc par son groupe hydroxamate, TH31 interagit avec H292 à tra-

vers une liaison hydrogène avec le groupement amide de l'inhibiteur.

Cependant, au contraire de J1038, TH31 n'induit pas un déplacement de la chaîne latérale de F151 vers le site actif qui reste dans la poche hydrophobe spécifique de smHDAC8, ce qui permet à la chaîne latérale de la lysine K20 de se tourner vers le site actif et d'interagir, comme H292, avec le groupement amide de TH31 (Figures 4A, 4B). Ainsi, l'interaction

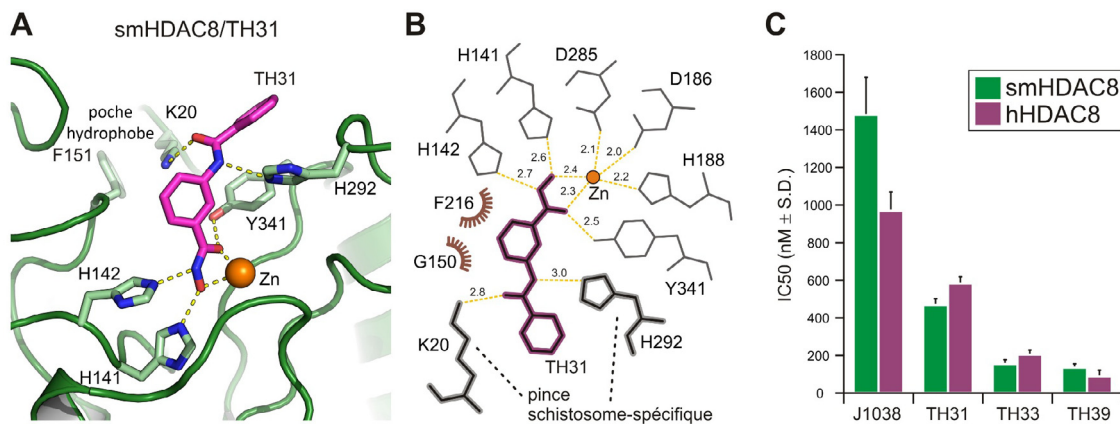


Fig. 4. Inhibition de smHDAC8 par TH31

A. Structure de l'inhibiteur TH31 fixé à smHDAC8. Code couleur pour TH31 : carbone, violet ; oxygène, rouge ; azote, bleu. Les résidus de smHDAC8 impliqués dans l'interaction avec TH31 et ceux donnant des spécificités structurales à cette enzyme sont représentés et annotés. B. Représentation schématique de la fixation de TH31 à smHDAC8. La pince schistosome spécifique K20-H292 stabilise l'inhibiteur dans le site actif. Les chiffres indiquent les distances en Angströms entre les atomes. C. Inhibition de smHDAC8 et de hHDAC8 par mesure de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀ en nM) par J1038, TH31, TH33 et TH39. Les inhibiteurs de la série TH montrent une plus forte inhibition des deux enzymes. TH31 et TH33 montrent pour la première fois une légère sélectivité pour smHDAC8 en contraste avec tous les autres inhibiteurs testés auparavant.

de cet inhibiteur avec smHDAC8 fait non seulement appel à l'interaction connue du groupement hydroxamate avec le zinc catalytique, mais aussi d'une pince schistosome-spécifique K20-H292 qui va stabiliser l'inhibiteur au sein du site actif (Figures 4A, 4B).

Il est à noter qu'une lysine est présente aussi chez hHDAC8 (K33) à la même position que smHDAC8 K20. Cependant cette lysine ne peut accéder au site actif, du fait de la conformation tournée vers le site actif de hHDAC8 F152. Il est important de noter que l'ensemble des inhibiteurs de la série créée à partir de l'inhibiteur J1038 possèdent tous un groupement amide capable d'interagir avec la pince K20-H292, expliquant leur inhibition de smHDAC8 de l'ordre du nM. Certains composés, comme TH33 et TH39 (Figure 4C), montrent même une meilleure inhibition que TH31. En fait, ces composés sont très proches de TH31, mais quelques groupements additionnels semblent stabiliser la conformation adoptée par ces inhibiteurs dans le site actif.

L'ensemble de nos résultats permet donc de mieux comprendre comment smHDAC8 peut être plus fortement inhibée par les composés de cette nouvelle série que par des inhibiteurs généraux des HDAC en jouant sur les spécificités structurales de cette enzyme. C'est d'ailleurs la même raison qui conduit à ce que ces inhibiteurs bloquent de façon quasi-identique smHDAC8 et hHDAC8, alors que hHDAC8 était plus fortement inhibée que smHDAC8 par les inhibiteurs précédemment testés.

La raison de cette différence d'inhibition entre ces deux enzymes, qui est annulée mais non pas inversée en jouant sur les spécificités structurales de smHDAC8, reste mal comprise. Il est cependant probable que la flexibilité inhérente de smHDAC8 F151 joue un rôle dans cette observation. En effet, cette flexibilité, même si elle va permettre à des inhibiteurs de se fixer plus spécifiquement dans la poche de smHDAC8, va probablement aussi jouer un rôle négatif dans l'accessibilité du site actif de smHDAC8 ou du maintien de l'inhibiteur dans ce même site.

De plus, il ne faut pas oublier, comme mentionné précédemment, que les HDAC semblent avoir une forte flexibilité, notamment au niveau de leur site actif, et que l'ajout de molécules inhibitrices réduit fortement cette flexibilité, comme le démontre des analyses de sensibilité à la température (Marek *et al.*, 2013). Ainsi, on peut s'attendre à ce que la plasticité du site actif soit beaucoup plus importante que ce qui peut être observée par des analyses structurales qui donnent une vision souvent trop statique des molécules étudiées. Cette plasticité peut avoir pour effet d'accommoder des inhibiteurs qui *a priori* ne semblent pas optimisés pour les sites actifs étudiés.

Implication pour les maladies causées par d'autres vers pathogènes

L'étude décrite s'est focalisée sur l'enzyme HDAC8 de *Schistosoma mansoni*. Même si cette espèce

est la cause de nombreuses schistosomiasis à travers le monde, il existe plusieurs espèces de schistosomes qui infectent l'homme : *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* et *S. haematobium*, cette dernière espèce étant même responsable du développement de certains cancers. Une étude des génomes disponibles pour certaines de ces espèces a montré qu'elles possédaient toutes un gène codant pour une enzyme HDAC8. De plus, la modélisation de la structure de ces enzymes à partir de la structure de smHDAC8 a révélé qu'elles possédaient toutes une histidine à l'emplacement de H292 et une poche hydrophobe capable d'accueillir une phénylalanine équivalente à F151 (Marek *et al.*, 2013).

Ainsi, même si des différences de réactivité aux inhibiteurs sont possibles entre espèces, les épimédicaments qui seraient développés en utilisant smHDAC8 comme cible pourraient potentiellement être utilisés contre d'autres espèces de schistosomes. En fait, en étendant notre recherche, nous nous sommes rendus compte que d'autres vers plats pathogènes tels que *Clonorchis sinensis*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus* et *Taenia solium* possèdent des enzymes HDAC8 avec très probablement les mêmes spécificités structurales que smHDAC8, rendant l'utilisation d'épimédicaments contre smHDAC8 potentiellement plus large qu'envisagé initialement (Marek *et al.*, 2013).

Conclusion

L'étude présentée ici montre combien le développement de candidats-médicaments, notamment dans le cas des maladies négligées causées par des pathogènes eucaryotes, est compliquée car elle doit prendre en compte à la fois les aspects qui concernent le pathogène lui-même, mais aussi tous les aspects liés au risque de cibler les protéines homologues humaines. De plus, les étapes décrites ici ne sont que les étapes initiales de cette recherche et ne prennent pas en compte l'ensemble des aspects *in vivo*.

En fait, les consortiums SEtTREND et plus particulièrement A-ParaDDisE ont abordé ces autres aspects. De nombreuses molécules ont été testées sur les schistosomes et ont révélé que plusieurs composés développés dans le cadre de ces projets affectaient les vers de façon dépendante de la dose administrée et du temps (Marek *et al.*, 2013; Kannan *et al.*, 2014; Stofa *et al.*, 2014). Des tests sur des modèles animaux infectés sont actuellement en cours. Ici, la complexité est encore plus importante car il est nécessaire à l'inhibiteur de pouvoir être stable suffisamment longtemps dans l'hôte pour pouvoir atteindre le ver et y pénétrer.

Cette étude a cependant permis de montrer la faisabilité et l'intérêt de la stratégie consistant à

dériver des épimédicaments pour combattre les infections causées par des agents pathogènes eucaryotes. Même si le développement de médicaments est un processus long et coûteux, le travail effectué démontre l'importance de poursuivre une telle stratégie, qui est d'ailleurs actuellement appliquée à d'autres cibles chez les schistosomes et chez d'autres pathogènes.

Finalement, il est important de noter que le travail accompli pour comprendre les bases de la sélectivité de l'inhibition de HDAC pathogènes n'a pas seulement eu pour effet de développer des inhibiteurs plus sélectifs pour les enzymes pathogènes mais a aussi permis de mieux comprendre les principes d'inhibition sélective des HDAC humaines. Les implications de ce travail sont donc aussi directes pour le développement d'autres médicaments, notamment contre le cancer, permettant ainsi un double retour sur investissement.

Remerciements. Le travail décrit a été soutenu par des financements du septième programme cadre de l'Union Européenne sous les accords numéros 241865 (SEtTREND) et 602080 (A-ParaDDisE). Le travail de CR et MM a été soutenu par des fonds institutionnels du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), et de l'Université de Strasbourg. Le travail de RJP a été soutenu par des fonds institutionnels du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), de l'Institut Pasteur de Lille et de l'Université de Lille. Ce travail a été financé par l'Infrastructure pour la Biologie Structurale Intégrative (FRISBI, *French Infrastructure for Integrated Structural Biology*; ANR-10-INSB-05-e01), et par Instruct qui fait partie du Forum de Stratégie Européenne sur les Infrastructures de Recherche (*European Strategy Forum on Research Infrastructures*, ESFRI).

Références

- Allis, C.D., Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 17, 487-500.
- Andrews, K.T., Haque, A., Jones, M.K. (2012). HDAC inhibitors in parasitic diseases. *Immunol Cell Biol*, 90, 66-77.
- Brien, G.L., Valerio, D.G., Armstrong, S.A. (2016). Exploiting the Epigenome to Control Cancer-Promoting Gene-Expression Programs. *Cancer Cell*, 29, 464-76.
- Chakrabarti, A., Oehme, I., Witt, O., Oliveira, G., Sippl, W., Romier, C., Pierce, R.J., Jung, M. (2015). HDAC8 : a multifaceted target for therapeutic interventions. *Trends Pharmacol Sci*, 36, 481-92.
- Chen, T., Dent, S.Y. (2014). Chromatin modifiers and remodellers : regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet*, 15, 93-106.
- Dissous, C., Grevelding, C.G. (2011). Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment : A tangible perspective? *Trends Parasitol*, 27, 59-66.

- Drazic, A., Myklebust, L.M., Ree, R., Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta*, 1864, 1372-401
- Dubois, F., Caby, S., Oger, F., Cosseau, C., Capron, M., Grunau, C., Dissous, C., Pierce, R.J. (2009). Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 168, 7-15.
- Falkenberg, K.J., Johnstone, R.W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 673-691.
- Hotez, P.J., Kamath, A. (2009). Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa : review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e412.
- Kannan, S., Melesina, J., Hauser, A.T., Chakrabarti, A., Heimburg, T., Schmidtkunz, K., Walter, A., Marek, M., Pierce, R.J., Romier, C., Jung, M., Sippl, W. (2014). Discovery of inhibitors of *Schistosoma mansoni* HDAC8 by combining homology modeling, virtual screening, and in vitro validation. *J Chem Inf Model*, 54, 3005-3019.
- Lancelot, J., Caby, S., Dubois-Abdesselem, F., Vanderstraete, M., Trolet, J., Oliveira, G., Bracher, F., Jung, M., Pierce, R.J. (2013). *Schistosoma mansoni* Sirtuins : characterization and potential as chemotherapeutic targets. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2428.
- Lancelot, J., Cabezas-Cruz, A., Caby, S., Marek, M., Schultz, J., Romier, C., Sippl, W., Jung, M., Pierce, R.J. (2015). Schistosome sirtuins as drug targets. *Future Med Chem*, 7, 765-782.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-260.
- Marek, M., Kannan, S., Hauser, A.T., Moraes Mourao, M., Caby, S., Cura, V., Stolfa, D.A., Schmidtkunz, K., Lancelot, J., Andrade, L., Renaud, J.P., Oliveira, G., Sippl, W., Jung, M., Cavarelli, J., Pierce, R.J., Romier, C. (2013). Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS pathogens*, 9, e1003645.
- Marek, M., Oliveira, G., Pierce, R.J., Jung, M., Sippl, W., Romier, C. (2015). Drugging the schistosome zinc-dependent HDACs : current progress and future perspectives. *Future Med Chem*, 7, 783-800.
- Marek, M., Shaik, T.B., Duclaud, S., Pierce, R.J., Romier, C. (2016). Large-Scale Overproduction and Purification of Recombinant Histone Deacetylase 8 (HDAC8) from the Human-Pathogenic Flatworm *Schistosoma mansoni*. *Methods Mol Biol*, 1436, 109-118.
- Morgan, M.A., Shilatifard, A. (2015). Chromatin signatures of cancer. *Genes Dev*, 29, 238-49
- Oger, F., Dubois, F., Caby, S., Noel, C., Cornette, J., Bertin, B., Capron, M., Pierce, R.J. (2008). The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem Biophys Res Com*, 377, 1079-1084.
- Ouaissi, M., Ouaissi, A. (2006). Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 13474.
- Pierce, R.J., Dubois-Abdesselem, F., Caby, S., Trolet, J., Lancelot, J., Oger, F., Bertheaume, N., Roger, E. (2011). Chromatin regulation in schistosomes and histone modifying enzymes as drug targets. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 794-801.
- Pierce, R.J., Dubois-Abdesselem, F., Lancelot, J., Andrade, L., Oliveira, G. (2012). Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development. *Curr Pharm Des*, 18, 3567-3578.
- Seto, E., Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation : the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a018713.
- Soshnev, A.A., Josefowicz, S.Z., Allis, C.D. (2016). Greater Than the Sum of Parts : Complexity of the Dynamic Epigenome. *Mol Cell*, 62, 681-694.
- Stolfa, D.A., Marek, M., Lancelot, J., Hauser, A.T., Walter, A., Leproult, E., Melesina, J., Rumpf, T., Wurtz, J.M., Cavarelli, J., Sippl, W., Pierce, R.J., Romier, C., Jung, M. (2014). Molecular basis for the antiparasitic activity of a mercaptoacetamide derivative that inhibits histone deacetylase 8 (HDAC8) from the human pathogen *Schistosoma mansoni*. *J Mol Biol*, 426, 3442-3453.
- You, J.S., Jones, P.A. (2012). Cancer genetics and epigenetics : two sides of the same coin ? *Cancer Cell*, 22, 9-20.
- Zentner, G.E., Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 259-66.