



**UNIVERSITÉ DE  
STRASBOURG**



*École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé*

Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire (LPTNC) : UR 7296

# Habilitation à diriger des recherches

Présentée par :

**Véronique Kimmel**

Soutenue le : **31 Aout 2021**

Biochimie et Biologie Moléculaire / Neurosciences

CNU : 44.1 Biochimie et Biologie Moléculaire

## **Rôles du GHB et de la sérotonine dans la maladie d'Alzheimer**

Directeur/Garant de Recherche :

**Pr. Monassier Laurent**

Pr, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS Externes :

**Pr. Leininger-Muller Brigitte**

Pr, Université de Lorraine

**Dr. Maroteaux Luc**

Dr, INSERM

RAPPORTEURS Internes :

**Pr. Ricci Roméo**

Pr, Université de Strasbourg

AUTRES MEMBRES DU JURY :

**Pr. Lessinger Jean-Marc**

Pr, Université de Strasbourg

**Dr. Berlin Ivan**

Dr, Université Paris Sorbonne

« On rencontre souvent sa destinée par les chemins qu'on a pris pour l'éviter. »

film Kung Fu Panda



## Remerciements

Mon chemin hospitalo-universitaire a été une succession de rencontres qui se sont traduites pour la plupart en projets plus ou moins fous et dont une partie est présentée dans ce document.

Parmi toutes ces rencontres, je remercie d'abord Laurent Monassier, pour avoir accepté que j'intègre le laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire en tant qu'enseignant-chercheur. Il m'a permis d'avancer sur ce projet d'HDR, tant de fois retardé... Merci pour ses rappels à l'ordre amicaux qui ont finis par aboutir à ce document.

Tous mes remerciements vont également aux autres membres du jury : Pr. Brigitte Leininger-Muller, Dr. Maroteaux, Pr. Roméo Ricci, Pr. Jean-Marc Lessinger, Dr. Berlin. Grand merci de l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger parmi ce jury d'HDR. Tout particulièrement, merci à Brigitte, Dr Maroteaux et Roméo pour le travail supplémentaire lié à la rédaction d'un rapport qui je l'espère ne sera pas trop compliqué à rédiger surtout en ces périodes plutôt dédiées aux vacances. Sans oublié, Dr Berlin, vous me faites l'honneur d'interrompre vos vacances pour assister à la soutenance. Bien entendu, Jean-Marc, pour toi cela deviendra presque à une habitude. Une thèse en pharmacie et une HDR, cela ne nous rajeuni pas mais cela me fait très plaisir que tu aies accepté de participer à ces deux jury.

Tous mes remerciements vont aussi à l'ensemble des membres de l'équipe du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neurocardiovasculaire pour leur soutien et discussions scientifiques (ou non) qui permettent de s'évader du quotidien rempli de petits ou grands soucis. Un merci tout particulier à Guillaume et Naomi deux doctorants adorables qui malgré leur propres difficultés trouvent du temps pour écouter et me transmettent l'énergie pour avancer ensemble sur des projets difficiles mais passionnants. Merci à Sylvia pour son soutien logistique et technique, c'est notre « Mutter Thésis » locale, à Hugues pour une « co-habitation » harmonieuse et l'arrosage régulier de ma plante. Elle serait certainement toute desséchée. Et à tous les autres qui se reconnaitront pour les instants passés « dans le coins détente du CRBS ».

Ma gratitude va aussi vers tous les membres passés et présents du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital de Hautepierre et du secteur Chromato en particulier, sans qui bon nombre de projets n'auraient pas pu être menés. Les débuts du secteur chromatographie avec Daniel, Christian, Marie Rose, Muriel, puis Mélissa et maintenant tous le personnel de l'UF 6443 qui a bien grandi et qui va encore grandir. Merci également à tous les cliniciens qui ont permis de monter des projets, Catherine (s), Natacha, Eric, Anne, Nicolas pour la partie suivi thérapeutiques. D'autres plus fous, comme faire vapoter des cochons avec Pr Diemunsch, Marise, Eric. A l'ICS, ce sont des souris que l'on a fait fumer grâce à Ghina, Emilie et bien entendu Naomi.

Enfin grand merci à tous ceux qui au détours d'une rencontre ont permis d'ouvrir des possibles. Jean-François, Toufik, Fanny et tout le personnel d'Alsachim, Sébastien, et les responsables de la société Gaiatrend, Yannick, Éric, Anne Claire, Elisabeth les collègues et amis de toujours. Et tous ceux que je n'ai pas oublié mais dont la liste serai trop longue si je la voulais exhaustive. Soyez remercié pour votre patience lors de nos discussions enflammées à refaire le monde.

Plus personnellement, je tenais à remercier Dominique, Amandine et Alexandre et plus généralement ma famille. Ils ont toujours compris ou tout au moins accepté que je passe beaucoup de temps à mon bureau « à travailler ». Et à tous nos amis, qui trouvent de nombreuses occasions pour partager des bouts de vies avec nous.



# Table des matières

<i>Remerciements</i> .....	4
<i>Table des matières</i> .....	6
<i>Liste des tableaux</i> .....	7
<i>Liste des figures</i> .....	7
<b>I. Chapitre 1 : Le système du gamma-hydroxybutyrate : une molécule endogène, utilisée comme médicament et détournée comme stupéfiant.</b> .....	9
A. Le système du GHB endogène .....	9
1. Caractérisation d'un modèle cellulaire : les cellules NCB-20.....	11
2. Clonage du récepteur du GHB.....	18
3. Le système GHBergique dans le système nerveux central .....	22
4. Conclusions de mes travaux sur le mécanisme d'action cérébral du GHB endogène..	24
B. Mécanismes pharmacologiques du GHB. ....	30
1. Mécanismes d'action du GHB à doses pharmacologiques .....	30
5. Potentiel rôle thérapeutique du GHB dans la Maladie d'Alzheimer .....	34
<b>II. Chapitre 2 : Du GHB à la sérotonine dans la Maladie d'Alzheimer</b> .....	36
A. Rôle de la sérotonine dans la Maladie d'Alzheimer.....	37
1. La barrière hémato-encéphalique dans le cadre de la Maladie d'Alzheimer .....	37
2. Rôle du système sérotoninergique dans la perméabilité de la BHE .....	39
<b>III. Chapitre 3 : Rôle de la sérotonine sur la Barrière Broncho-Alvéolo-Capillaire et les processus inflammatoires du tissu pulmonaire</b> .....	45
A. Validation d'un modèle cellulaire de la barrière broncho-alvéolo-capillaire .....	45
C. Impacts des systèmes électroniques de délivrance de nicotine sur la barrière broncho alvéolo capillaire.....	49
D. Rôle de la sérotonine dans les processus inflammatoires du tissu pulmonaire.....	51
<b>IV. Projets : Rôle(s) de la sérotonine dans la maladie d'Alzheimer selon l'origine périphérique ou centrale des peptides A<math>\beta</math></b> .....	53
A. Hypothèses de recherche .....	53

B. Etudes des processus physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer impliquant la BHE et la sérotonine grâce à des modèles cellulaires de la BHE .....	55
C. Etude des processus physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer impliquant des peptides A $\beta$ extra-cérébraux.....	59
D. Perspectives .....	61
<b>V. CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>62</b>
<b>VI. Références bibliographiques : .....</b>	<b>75</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>83</b>
<b>Résumé en anglais.....</b>	<b>83</b>

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Expression protéique des éléments du système sérotoninergique dans notre modèle de BBAC. L'identification a été faite par q-PCR et/ou Western blot dans chacune des 2 lignées. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tableau 2 : Impacts des composants de e-liquide sur la BBAC après 48h de traitement. ....</i>	<i>50</i>

## Liste des figures

<i>Figure 1 : Métabolisme cellulaire du GHB. ....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 2 : Signalisation intracellulaire induite par le GHB diffère en fonction du niveau de polarisation membranaire. ....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 3 : L'action du GHB sur les terminaisons GABA diffère en fonction de sa concentration (A) physiologique (<math>\mu</math>M) ou (B) pharmacologique (mM). ....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 4 : Mécanisme d'actions du GHB administré à doses pharmacologiques (37) . ....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 5 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (A) et des jonctions serrées (B) (53). ...</i>	<i>38</i>
<i>Figure 6 : Modèle simplifié de barrière hématoencéphalique et mesure de la résistance électrique trans-épithéliale/endothéliale (TEER). ....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 7 : Le prucalopride permet une augmentation d'AMPC intracellulaire mais pas la phosphorylation de PKA. ...</i>	<i>41</i>
<i>Figure 8 : Le prucalopride augmente la phosphorylation de Scr et de ERK. Cet effet prévenu par la présence de GR 113 808 démontre le rôle joué par le récepteur 5-HT<sub>4</sub> dans la diminution d'expression d'occludine. ....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 9 : Mécanisme d'action du prucalopride dans les cellules hCMEC et expliquant la diminution d'expression d'occludine. ....</i>	<i>43</i>

<i>Figure 10 : Etude de la perméabilité de la BHE chez des rats contrôles ou après un traitement de 4 jours par du prucalopride.</i>	44
<i>Figure 11 : Modèle de barrière broncho-alvéolo-capillaire mis en place au laboratoire.</i>	46
<i>Figure 12 – Évolution de la résistance trans-épithéliale/endothéliale (TER) et trans-épithélio-endothéliale (TEER) au cours du temps.</i>	47
<i>Figure 13 : Projet de recherche schématisées à partir d'un modèle de BHE en 3 Dimension (3D).</i>	55
<i>Figure 14 : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer : les acteurs cellulaires (83).</i>	56
<i>Figure 15 : Modèle de BHE en 3D comprenant des cellules endothéliales (hCMEC), des neurones sérotoninergiques SH-SY5Y et des cellules astrocytaires U373 humaines.</i>	57
<i>Figure 16 : Modèle de BHE en 3D avec ajout des plaquettes afin de simuler un apport vasculaire en peptide Aβ.</i>	60

# I. Chapitre 1 : Le système du gamma-hydroxybutyrate : une molécule endogène, utilisée comme médicament et détournée comme stupéfiant.

## A. Le système du GHB endogène

C'est en fin d'internat de Biologie Médicale que j'ai commencé mon projet de recherche dans l'équipe du Pr. Michel Maitre et dans l'unité du Pr Guy Vincendon. Le GHB n'était connu, alors, que comme un médicament analogue du GABA et de premiers articles émettaient l'hypothèse de l'existence de récepteurs plus ou moins spécifiques et partagés entre le GHB et le GABA.

En effet, le GHB a été synthétisé dans les années 60 par le Dr Laborit (1,2) avec comme objectif d'obtenir une molécule analogue du GABA, pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique et pouvant être utilisée en clinique comme hypnotique et/ou anesthésique (3,4). Le GHB, à l'époque, a rendu de nombreux services en anesthésiologie avant d'être remplacé par des composés plus efficaces comme le propofol (5). L'avantage mais également l'inconvénient du GHB est sa demi-vie très brève qui permet un contrôle efficace d'anesthésies de courte durée mais qui, à *contrario*, nécessite des injections répétées pour les anesthésies de plus longues durées avec des risques de toxicité. Le GHB a également été proposé comme traitement de la narcolepsie (3,4) et il reste encore aujourd'hui une molécule très utile dans cette indication (6,7).

Dans les années qui ont suivies, le GHB a été identifiée comme une molécule endogène synthétisée (8) à partir de l'acide succinique semi-aldéhyde (SSA). En effet, une enzyme, la succinique semi-aldéhyde réductase (SSR) permet la transformation de SSA en GHB. Même si cette voie métabolique n'est pas majoritaire, elle reste spécifique (9,10) et permet une synthèse régulée du GHB par l'organisme. Ainsi, le GHB est caractérisé comme étant une molécule ubiquitaire impliquée dans le métabolisme énergétique de la cellule puisqu'en se transformant, via la voie majoritaire, en SSA par l'action de la GHB déshydrogénase (GHBDH) puis en acide succinique par la succinique semi-aldéhyde déshydrogénase (SSADH), le GHB permet à l'acide succinique d'intégrer le cycle de Krebs (Figure 1) et de fournir de l'énergie à la cellule (11). Lors d'un apport exogène de GHB cette voie de métabolisme devient majoritaire. Il existe, par ailleurs, une maladie métabolique provenant d'un déficit congénital en SSADH (ALDH5A1; OMIM 271980) (12) qui se manifeste par

des troubles neurologiques comme une ataxie, une hypotonie, un retard de développement, un déficit intellectuel, des troubles du comportement, une hyporéflexie et une épilepsie. D'un point de vue biochimique, on retrouve chez ces enfants des concentrations sanguines en GHB très importantes et un dépistage sur buvard est d'ailleurs proposé par certaines équipes (13).

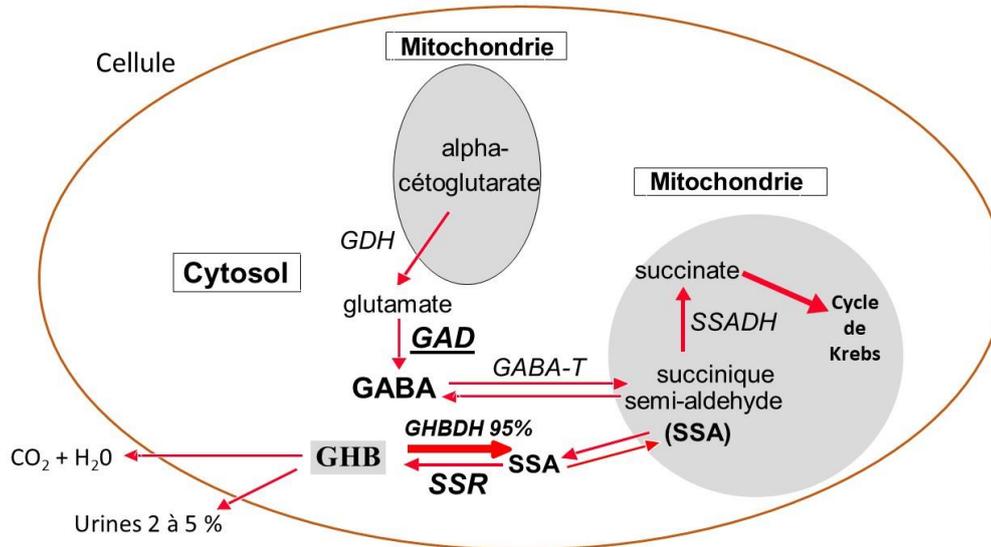


Figure 1 : Métabolisme cellulaire du GHB.

GHBDH: GHB dehydrogenase; SSR: succinic semialdehyde reductase; SSA: succinic semialdehyde; GABA: gamma-aminobutyric acid; GABA-T: GABA-transaminase; SSADH: succinic semialdehyde dehydrogenase.

Assez rapidement, l'intérêt de quelques équipes dont celle du Pr Maitre, s'est orienté vers l'étude du rôle fonctionnel du GHB dans le cerveau. Les questions posées étant essentiellement : Est-ce que le GHB joue un rôle spécifique au niveau du SNC ou est-ce que son rôle est uniquement GABA dépendant ? Et si le GHB joue un rôle indépendant, est-ce qu'il peut être considéré comme un neuromodulateur ou un neurotransmetteur ? Pour répondre à ces questions de nombreuses expérimentations ont été nécessaires et dans un premier temps des études de liaison spécifique ont montré que le GHB se fixait de manière spécifique à des cibles membranaires. C'est alors que le GHB a été proposé comme étant un neurotransmetteur ou au minimum un neuromodulateur (14). En effet, cette liaison membranaire avait une affinité de l'ordre du  $\mu\text{M}$  (comme le GABA pour son récepteur) (15,16), possédait une distribution particulière dans le SNC et différente de celle des récepteurs du GABA, et une pharmacologie également particulière (17). Par ailleurs, l'équipe du Pr Maitre en collaboration avec l'équipe du Dr Bourguignon avait identifié un antagoniste du récepteur du GHB (NCS-382) et plusieurs agonistes (NCS-356 ...) (18). La fixation du GHB à son

récepteur n'était pas déplacée par de fortes concentrations de GABA, ni par de fortes concentrations de baclofène (agoniste du récepteur GABA<sub>B</sub>) ou d'autres agonistes des récepteurs du GABA de type A ou B. Ainsi, le GHB a été proposé comme étant un authentique neuromodulateur/neurotransmetteur ayant des récepteurs spécifiques, possédant une distribution, une ontogénèse, une pharmacologie et une plasticité que nous avons étudiées et décrites au fil des années. (19,20).

C'est à ce moment, que j'ai commencé mon travail de DEA, que j'ai ensuite poursuivi par un travail de thèse. Mes objectifs étaient de doter le laboratoire d'un modèle cellulaire permettant l'étude du système GHBergique de manière à en identifier ses éléments moléculaires spécifiques et la signalisation intracellulaire du ou des récepteurs spécifiques du GHB.

### **1. Caractérisation d'un modèle cellulaire : les cellules NCB-20**

Dans le cadre de l'étude du système GHBergique, la difficulté principale de l'époque était de faire la différence, chez l'animal et plus globalement dans les systèmes très intégrés, entre les effets du GHB passant par son récepteur spécifique de ceux passant par une action métabolique ou par un récepteur non spécifique du GHB comme par exemple les récepteurs du GABA et plus particulièrement le récepteur GABA<sub>B</sub>. La polémique principale étant que le GHB, pour certains auteurs, était un ligand du récepteur GABA<sub>B</sub> et que ces mêmes auteurs ne croyaient pas à l'existence d'un récepteur GHB spécifique (21,22). Pour répondre à cette objection, nous avons décidé de mettre en place un modèle cellulaire dans lequel le système GHB s'exprimait et pas ou peu le système GABAergique. Plusieurs lignées cellulaires disponibles avaient été criblées en recherchant la présence de sites de fixation membranaire du GHB non déplaçables par le GABA. C'est comme cela que les cellules NCB-20 ont été sélectionnées (23). Puis, nous avons identifié, dans ces cellules, toute une série d'éléments en faveur de l'existence d'un système endogène cérébral qui synthétise, accumule et libère le GHB dans la fente synaptique pour actionner un signal post-synaptique spécifique du GHB (19,24,25).

### a) Le système GHBergique dans les cellules NCB-20

Les cellules NCB-20 sont issues d'une lignée, hybride entre un neuroblastome de souris (N18TG2) et des cellules embryonnaires du système nerveux central (SNC) (18 jours) de Hamster chinois (23). Elles présentent toutes les caractéristiques du système GHBergique observées au niveau du SNC (19). Ainsi, ces cellules possèdent des récepteurs fixant spécifiquement le GHB avec un Kd d'environ 250 nM, la capacité de synthétiser du GHB grâce à la présence de la Succinique Semi-aldéhyde Réductase. Ces cellules possèdent des transporteurs Na<sup>+</sup>-dépendant permettant la recapture du GHB extracellulaire. Par ailleurs, ces cellules répondent, après stimulation par le GHB à des concentrations de l'ordre du μM, en modifiant des conductances calciques. Ces effets sont bloqués par le NCS-382 (antagoniste spécifique du GHB) mais pas par les antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> ou B (CGP 55 845). Par ailleurs, nous avons mis en évidence que tous ces effets étaient amplifiés après un traitement de 3 jours par 1 mM de dibutyryl adenosine 3,5-cyclic monophosphate qui induit une différenciation cellulaire et la formation de synapses dans les cellules NCB-20 (19).



Pergamon

*Neuroscience* Vol. 86, No. 3, pp. 989-1000, 1998  
Copyright © 1998 IBRO. Published by Elsevier Science Ltd  
Printed in Great Britain. All rights reserved  
0306-4522/98 \$19.00+0.00

PII: S0306-4522(98)00085-2

NEUROCHEMICAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL  
EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF A FUNCTIONAL  
 $\gamma$ -HYDROXYBUTYRATE SYSTEM IN NCB-20 NEURONS

V. KEMMEL,\* O. TALEB,† A. PERARD,‡ C. ANDRIAMAMPANDRY,\*  
J. C. SIFFERT,\* J. MARK\* and M. MAITRE\*§

\*Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire des Interactions Cellulaires, UPR 416 CNRS,  
Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg cedex, France

†Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire, UPR 9009 CNRS, Centre de Neurochimie,  
5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg cedex, France

‡Laboratoire de la Fondation Transplantation, Avenue Molière, Strasbourg-Hautepierre, France

## b) Signalisation cellulaire des récepteurs du GHB

Par la suite, ce modèle cellulaire, nous a permis de mettre en évidence une régulation de la polarité membranaire par le GHB. En effet, lorsque la membrane neuronale était dépolarisée, les flux calciques entrants, passant par des canaux voltage dépendant (IBa) de type L ou N étaient inhibés en présence de GHB (19), à l'inverse lorsque la membrane cellulaire était hyperpolarisée les flux calciques entrants étaient activés par la présence de GHB et passaient par des canaux calciques voltage dépendant de type T qui permettaient l'activation de flux sortant d'ions potassium par des canaux de type SK (19,25). Cette mécanistique passait spécifiquement par la stimulation des récepteurs GHB car elle était stoppée en présence de NCS-382 mais pas lors d'un ajout d'antagonistes du récepteur GABA<sub>B</sub>. Par la suite, nous avons également démontré que les récepteurs du GHB étaient couplés à des protéines G. Certains récepteurs du GHB activés par des concentrations nanomolaires inhibaient l'adénylate cyclase et la synthèse d'AMPC alors que d'autres d'affinité plus faible, de l'ordre du micromolaire, avaient la capacité d'activer l'adénylate cyclase et la synthèse d'AMPC (24).

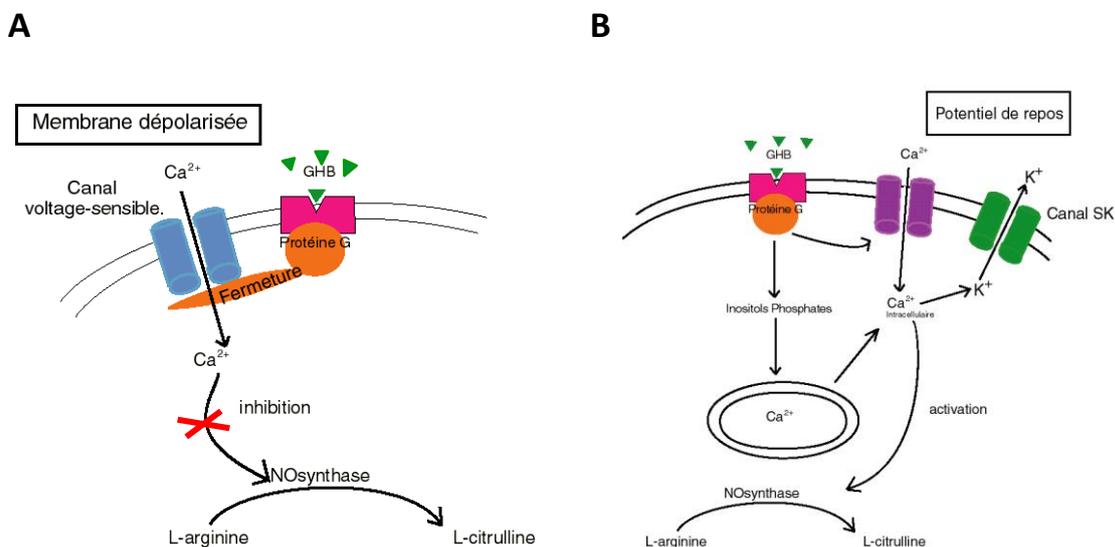


Figure 2 : Signalisation intracellulaire induite par le GHB diffère en fonction du niveau de polarisation membranaire.

## c) Désensibilisation des récepteurs du GHB

En explorant la réponse cellulaire après stimulation par le GHB, nous avons assez rapidement observé l'existence d'une désensibilisation du ou des récepteurs du GHB pour des

concentrations supérieures à 50 ou 100  $\mu\text{M}$  en fonction des modèles et des conditions expérimentales. Cette désensibilisation se traduisait par :

- De possibles réponses répétées pour de faibles concentrations de GHB (1 à 10  $\mu\text{M}$ ) mais l'absence de réponse cellulaire lors d'une deuxième stimulation pour des concentrations comprises entre 10 et 50  $\mu\text{M}$  de GHB.
- L'absence de réponses cellulaires pour des concentrations de GHB supérieures à 100  $\mu\text{M}$ .

Ces phénomènes ont été observés sur des signaux calciques et potassiques que se soit par des méthodes biochimiques et électrophysiologiques (24,25).

Article 2 : Etude de la réponse électrophysiologique consécutive à la stimulation des récepteurs du GHB : Mise en évidence d'une entrée calcique et d'un efflux potassique.

*Neuroscience* 116 (2003) 1021–1031

**$\gamma$ -HYDROXYBUTYRATE RECEPTOR FUNCTION DETERMINED BY STIMULATION OF RUBIDIUM AND CALCIUM MOVEMENTS FROM NCB-20 NEURONS**

**V. KEMMEL, O. TALEB, C. ANDRIAMAMPANDRY, D. AUNIS AND M. MAITRE\***

*Institut de Chimie Biologique and INSERM U-338, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France*

(Maitre, 1997). These pathways are not yet precisely known. However, some data on their organization is now beginning to be understood.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate is unevenly distributed in the rat brain at concentrations ranging

## Article 2 : Etude de la réponse électrophysiologique consécutive à la stimulation des récepteurs du GHB : Mise en évidence d'une entrée calcique et d'un efflux potassique.

1022

V. Kemmel et al. / Neuroscience 116 (2003) 1021–1031

tor stimulation. The results of these studies, combined with the demonstration of the existence of a GHB-dependent influx of calcium ions into the cells via low-threshold voltage-activated transient calcium current ( $I_{CaT}$ ) calcium channels, suggest that the stimulation of a calcium-dependent efflux of potassium ions is induced by physiological concentrations of GHB when the cell is at resting potential. Both electrophysiological and ion fluxes approaches have been used to explore these phenomena.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### Preparation of cell cultures

NCB-20 cells were cultured essentially as described previously (Kemmel et al., 1998). Briefly, cells were plated (30,000 cells/ml) on polyethylenimine polymer-coated sterile 22×22-mm square plastic coverslips in 35-mm Petri dishes. Each dish contained 2.5 ml of Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml) and 1 mM dibutyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. Cultures were incubated for 24 h in a humidified CO<sub>2</sub> (5%) incubator. Then the growth medium was replaced by 2 ml of fresh medium described above and incubation was continued for 3 days.

#### <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux studies

<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux studies were carried out on 4- to 5-day-old cultured NCB-20 neuroblastoma cells maintained at 37 °C on a hot plate. The incubation media was removed and replaced by Dulbecco's modified Eagle medium containing 10% fetal calf serum and 2 µCi/ml of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>. Cells were further incubated overnight under these conditions. Then the coverslips were washed once with 1 ml of solution A (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM D-glucose and 2 mM ouabain, adjusted to pH 7.4 with NaOH). Experiments were started by the addition of the substance to be tested (GHB,  $\gamma$ -*p*-chlorophenyl-*trans*-hydroxycrotonate [NCS-356], NCS-382, CGP 55,845 or the equivalent amount of Krebs medium). Efflux was terminated after incubation by rapid immersion of the coverslips for 10 s in an ice-cold "stop" solution with continuous stirring. The "stop" solution was identical to that described by Kamatchi and Ticku (1990) and contained 145 mM tetraethylammonium chloride, 1 mM tetrabutylammonium chloride, 5 mM RbCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NiCl<sub>2</sub> and 20 mM HEPES adjusted to pH 7.4 with NaOH. After rapid drying, coverslips were transferred into scintillation vials and the radioactivity was measured in a scintillation counter.

The percentage of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux was calculated as the ratio of the c.p.m.\* measured at various times after specific treatment of the cells present on the coverslips to the c.p.m. measured on coverslips after washing with solution A: % of released <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> = 200 - (100 c.p.m.\* / c.p.m.). C.p.m.\* = counts per minute measured in the presence of GHB or other ligands; c.p.m. = counts per minute measured in the presence of Krebs only. Under these conditions, 100% refers to no release compared with controls and 200% indicates that the totality of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> was released by the treatment. A value below 100% means that the treatment reduces the <sup>86</sup>Rb release compared with control conditions.

#### <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake by NCB-20 cells

Measurements of calcium ion uptake by NCB-20 cells stimulated by GHB were carried out using the same experimental design as for studies on rubidium movements. However, 35-mm Petri dishes containing 4- to 5-day-old NCB-20 neuroblastoma cells were used instead of coverslips. Cells were washed with solution A, but without ouabain. Experiments were started by the addition of

various amounts of GHB (5–500 µM) containing radioactive calcium (<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>; 2 µCi/ml) and in some cases 1 mM amiloride or 100 µM NiCl<sub>2</sub> in 1 ml Krebs medium for each Petri dish. After incubation for 10 min, uptake was terminated by rapid washing of cells with an ice-cold calcium-stop solution with continuous stirring (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucose, 2 mM NiCl<sub>2</sub> and 10 mM HEPES adjusted to pH 7.4 with NaOH). Then the cells were scraped off with 1 ml of water and an aliquot (900 µl) of the cell homogenate was mixed with 4 ml of scintillation fluid and the radioactivity counted. Another aliquot of the homogenate was used to determine the amount of protein (BCA method; Pierce, Rockford, IL, USA).

#### Electrophysiological recordings

For electrophysiological experiments, cells were plated in 35-mm non-coated dishes at low cell density (5 × 10<sup>5</sup> cells per dish) and differentiated as described above.

Resting membrane potential was measured in the whole-cell mode of the patch-clamp technique (Hamill et al., 1981). Records were performed on 3- to 11-day-old cells using solutions of the following composition: (in mM) NaCl 132, KCl 2, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 0.5, D-glucose 10 for the bath and D-gluconate 122, NaCl 3, KCl 3, EGTA 5.5, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10 for the pipette medium. The pH was adjusted to 7.4 with NaOH and 7.2 with KOH for the bath and the pipette medium respectively. After tight-seal establishment with pipettes of 3 to 4 MΩ resistance, the breakthrough into whole-cell was achieved in current-clamp mode, permitting resting potential determination before dialysis of the cell with the pipette medium.

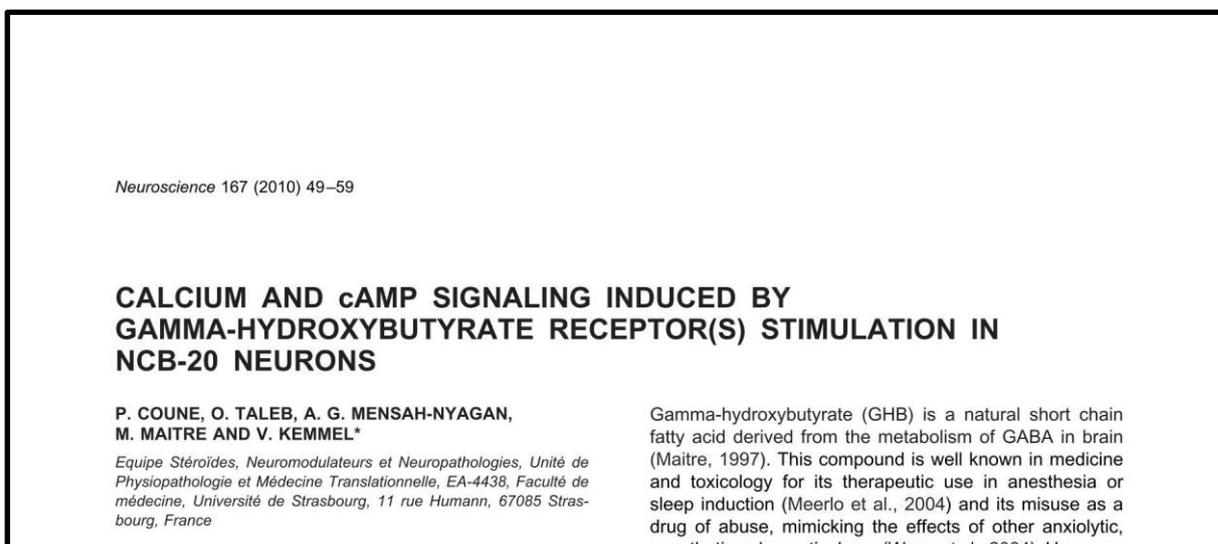
Whole-cell calcium current ( $I_{Ca}$ ) were recorded in voltage clamp conditions. Bath and pipette solutions were composed as to record  $I_{Ca}$  in isolation and contained respectively: (in mM) trichloroacetic acid 110, Tris 128, TEA-Cl 15, CaCl<sub>2</sub> (or BaCl<sub>2</sub>) 5, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, D-glucose 10 and EGTA-Tris 30, CaCl<sub>2</sub> 3, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 100, ATP 1. The pH was adjusted to 7.4 and 7.2 with Tris for the extra-cellular and the pipette medium respectively. In these conditions the recording pipette had resistance around 12 MΩ. The liquid junction potential ( $V_j$ ) was calculated according to the Clampex 8.2 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) software package and was -4 mV. All the results given here are corrected with respect to  $V_j$ . The recorded cell was held at a potential of -80 mV and periodically with a frequency of 0.05 Hz the membrane was depolarized during 70 ms to test potentials ranging from -70 to 50 mV.

Records used an axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) and the Clampex routine of the pClamp software package (Axon Instruments). The signal was usually filtered (1 kHz) before acquisition (2-kHz sampling frequency) with a LabRack interface card (Scientific Instruments, Sopon, OH, USA). Drugs were applied to the recorded cell by gravity through a multi-barrel of quartz tubes of 0.3-mm diameter each. Solution exchange was achieved manually by switching on the tube and placing it in front of the cell at a distance of about 100 µm. Results are expressed as mean ± S.E.M.

#### Statistics

Data are presented as mean ± S.E.M of nine independent determinations. All time courses were analyzed by analysis of variance (ANOVA) with repeated measures design with time as the within subject factor. Significant differences from control values are represented by: \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.005$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$  (ANOVA followed by Student's *t* test). Electrophysiological I-V data were statistically tested for significance of differences between various treatment conditions. The statistical repeated measure one-way ANOVA test (SigmaStat software) was used and probability *P* value determined.

Article 3 : Etude de la réponse électrophysiologique consécutive à la stimulation des récepteurs du GHB : Mise en évidence d'une entrée calcique et d'une désensibilisation des récepteurs impliqués.



## 2. Clonage du récepteur du GHB

Bien que nous ayons démontré l'existence d'un ou de plusieurs récepteurs du GHB par l'identification de différentes voies de signalisations cellulaires spécifiques, il était important d'asseoir leur existence par le clonage de ces protéines réceptrices. Ainsi le Dr Christian Andriamampandry a cloné chez le rat puis chez l'Homme des protéines pouvant fixer le GHB de manière spécifique (20,26). Nous avons ensuite caractérisé ces protéines et identifié leur rôle dans la réponse cellulaire suite à une stimulation par du GHB (20,26,27).

### a) Clonage d'un récepteur du GHB chez le rat

Une première protéine réceptrice du GHB a été clonée chez le rat. Bien qu'une partie de sa structure protéique soit homologue à celle d'une protéine de la famille des tétraspanines, elle était plus longue (forme non épissée) et possédait 7 domaines transmembranaires. Une fois transfectée dans les cellules CHO, la protéine clonée était couplée à une protéine G et

produisait une réponse électrophysiologique après stimulation par le GHB mais pas par le GABA. Cependant, si cette réponse était reproduite après stimulation par des agonistes du récepteur du GHB (NCS-356), elle n'était pas bloquée par le NCS-382 (antagoniste classique du récepteur du GHB). Aucune réponse n'était enregistrée après stimulation par des agonistes des récepteurs du GABA.

Pour caractériser ce récepteur cloné chez le rat, nous avons fabriqué des anticorps polyclonaux chez le lapin et, à l'aide de 2 de ces anticorps, nous avons localisé ce récepteur cloné dans différentes structures cérébrales du rat. Ainsi, ce récepteur se localisait très fortement dans l'hippocampe, le cortex frontal, le cortex piriforme, et le cervelet, plus légèrement dans le striatum, le bulbe olfactif et le thalamus. Nous avons également déterminé que ce récepteur avait une localisation neuronale exclusivement et plus particulièrement dans les corps cellulaires et les dendrites mais qu'il était absent des axones indiquant une localisation post-synaptique du récepteur. Par microscopie électronique, nous avons confirmé la présence de la protéine dans les neurones, au niveau de la membrane cytoplasmique des corps cellulaires des neurones, du réticulum endoplasmique mais surtout au niveau de la membrane de structures post-synaptiques.

## b) Clonage d'un récepteur du GHB chez l'Homme

La protéine identifiée par la suite comme récepteur humain du GHB a été clonée à partir d'une bibliothèque de cDNA provenant d'un cortex frontal humain. Ce récepteur humain (GPR172A) est couplé à une protéine G de type  $G_i/G_o$  et répond à une gamme de concentrations de GHB allant de 50 nM à 5  $\mu$ M selon une réponse sigmoïdale pour atteindre un plateau à 5  $\mu$ M. Cette réponse cellulaire était bloquée par le NCS-382 (antagoniste spécifique du récepteur du GHB) et sa réponse était reproduite par des agonistes spécifiques du récepteur du GHB comme le NCS-356 alors que le GABA et les agonistes des récepteurs  $GABA_B$  comme le baclofène n'avaient pas d'effets. La transfection de ce clone marqué par l'EGFP dans les cellules CHO montrait une expression protéique majoritaire au niveau de la membrane cytoplasmique. Un deuxième clone humain du récepteur du GHB a également été cloné (GHBh1) à partir de la même bibliothèque. Ce deuxième clone présentait des caractéristiques identiques au premier à la différence qu'il était tronqué et possédait une

séquence correspondant à un site de phosphorylation sur la partie C-terminale ce qui peut expliquer pourquoi ce clone GHBh1 se désensibilisait très rapidement et ceci même après la stimulation par de très faibles concentrations de GHB.

THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 498:508-524 (2006)

## **Immunohistochemical Localization of a GHB Receptor-Like Protein Isolated from Rat Brain**

VÉRONIQUE KEMMEL, MONIQUE MIEHE, GUY ROUSSEL, OMAR TALEB,  
KARINE NAIL-BOUCHERIE, CHRISTIANE MARCHAND, CHRISTINE STUTZ,  
CHRISTIAN ANDRIAMAMPANDRY, DOMINIQUE AUNIS, AND MICHEL MAITRE\*  
Institut de Chimie Biologique and INSERM U-575, Faculty of Medicine,  
67085 Strasbourg, France

*The FASEB Journal* • Research Communication

---

**Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain**

Christian Andriamampandry, Omar Taleb, Véronique Kemmel, Jean-Paul Humbert, Dominique Aunis, and Michel Maitre<sup>1</sup>

Institut de Chimie Biologique and INSERM U-575, Faculty of Medicine, Strasbourg, France

### **3. Le système GHBergique dans le système nerveux central**

#### **a) Localisation des neurones GHBergiques dans le striatum et la substance noire**

Après avoir caractérisé un certain nombre d'éléments du système GHBergique dans nos modèles simplifiés, nous avons voulu les retrouver et comprendre leurs rôles fonctionnels dans le système nerveux central (SNC). Le GHB était connu pour agir sur la libération de dopamine au niveau du striatum et plus particulièrement dans les structures liées aux processus de récompense (28,29). Cependant, selon les doses de GHB, la libération de dopamine était inhibée ou augmentée. Une dose unique faible à 250 mg/kg étant inhibitrice sur la libération de dopamine alors qu'une forte dose à 500 mg/kg était à l'origine d'une augmentation de la libération de dopamine dans le milieu interstitiel cérébral (28). Notre objectif a donc été de montrer l'existence de terminaisons synaptiques GHBergiques et de comprendre leurs liens fonctionnels avec les systèmes dopaminergiques et GABAergiques.

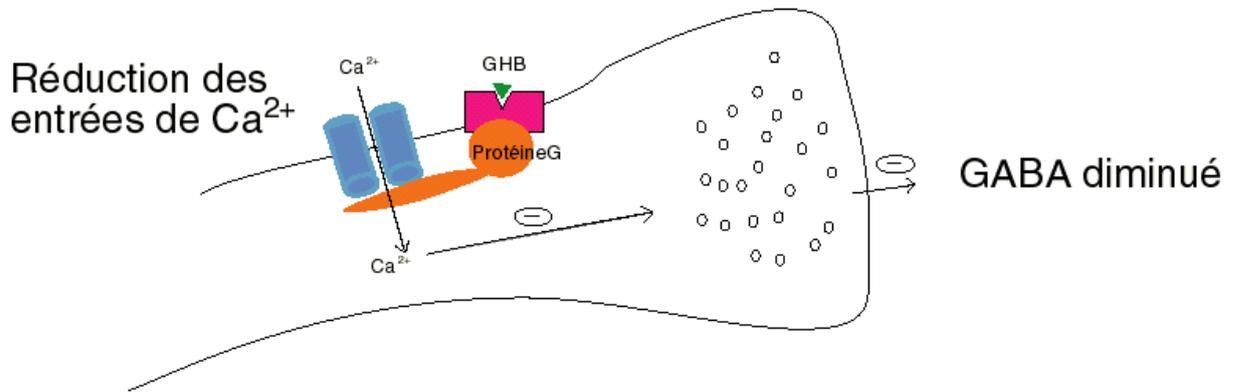
Une première étape a été de localiser les neurones GHBergiques dans le SNC et leurs liens anatomiques et histologiques avec les neurones dopaminergiques et GABAergiques. Puisque le GHB, le GABA et la dopamine sont tous impliqués dans des processus neurobiologiques communs tels que l'addiction, le sommeil, la cataplexie. Par ailleurs, peu d'informations existaient sur ce sujet et de plus un nouvel outil, le microscope confocal, ouvrait des possibilités d'investigation adaptées à ces problématiques. Ce travail, nous a permis de mettre en évidence une proximité physique entre les neurones GHBergiques, dopaminergiques et GABAergiques qui confortait l'hypothèse de leurs liens fonctionnels dans différentes structures cérébrales. Ainsi, en co-localisant les enzymes limitantes de la synthèse des neurotransmetteurs ; la tyrosine Hydroxylase (TH) pour la dopamine, la glutamate décarboxylase (GAD) pour le GABA et la SSR pour le GHB, nous avons pu montrer que les corps cellulaires des neurones GABAergiques étaient également majoritairement GHBergiques mais pas tous et que certains neurones de la substance noire possèdent les 3 enzymes SSR, GAD et TH. Cependant, l'observation des terminaisons axonales a bien montré qu'elles étaient systématiquement marquées par une seule des trois enzymes. Nous avons également montré que le striatum riche en terminaisons dopaminergiques possédait des neurones GHBergiques sur lesquels des boutons synaptiques dopaminergiques étaient co-localisés. Cette observation

confortait à la fois l'hypothèse d'un lien fonctionnel passant par des structures synaptiques entre la dopamine et le GHB mais aussi confirmait la régulation du système GHBergique par le système dopaminergique. Le même type de résultats était obtenu dans le caudate putamen qui est une structure très riche en terminaisons dopaminergiques et GABAergiques. Ainsi, l'existence de synapses GABAergiques provenant certainement d'interneurones GABA et de synapses dopaminergiques à proximité des membranes de neurones possédant de la SSR et/ou de la GAD montrait l'existence de potentielles interactions synaptiques entre ces systèmes de neurotransmetteurs. L'utilisation de la microscopie électronique a confirmé que, dans ces structures cérébrales, la SSR était présente dans des boutons présynaptiques de synapses matures (30) confirmant notre hypothèse que le GHB permet, via une transmission synaptique, la régulation des systèmes dopaminergiques et GABAergiques (30).

Dans un second temps, nous avons démontré que l'injection de GHB régula la libération de GABA dans le milieu interstitiel cérébral de la même manière que la libération de dopamine. Ainsi, une dose de 2 mmol/kg induit une diminution de la libération de GABA alors qu'une dose de 4 mmol/kg induit une augmentation de la libération de GABA. L'observation d'une réponse des systèmes GABAergique et dopaminergique à la suite d'injection de GHB à des doses considérées comme physiologiques (faibles doses) ou thérapeutiques (fortes doses) étant inversées, cela confortait notre hypothèse de l'existence d'un mécanisme de sensibilisation/désensibilisation des récepteurs du GHB. En effet, lors d'injections de doses considérées comme thérapeutiques voire addictives, il y a libération, dans le milieu extracellulaire et certainement synaptique, de fortes concentrations de GABA et de dopamine, cela explique les phénomènes addictifs du GHB lors de la prise de doses qui se mesurent en cuillères à soupe de produit et/ou en dizaine de grammes (31–34). Par ailleurs, nous avons également démontré que du GHB radioactif injecté à l'animal pouvait se transformer par voie métabolique, au niveau des neurones, en GABA et/ou en glutamate (figure 1). Ces deux neurotransmetteurs néoformés étant dans, un premier temps, mobilisés dans les vésicules synaptiques puis dans un temps décalé, ils peuvent être libérés après dépolarisation neuronale et induire une action synaptique sur leurs récepteurs spécifiques (31). Tous ces résultats laissent entrevoir des modalités d'action du GHB différentes en fonction de ses concentrations présentes dans l'environnement neuronal.

A

Membrane dépolarisée par un potentiel d'action



B

Membrane au potentiel de repos

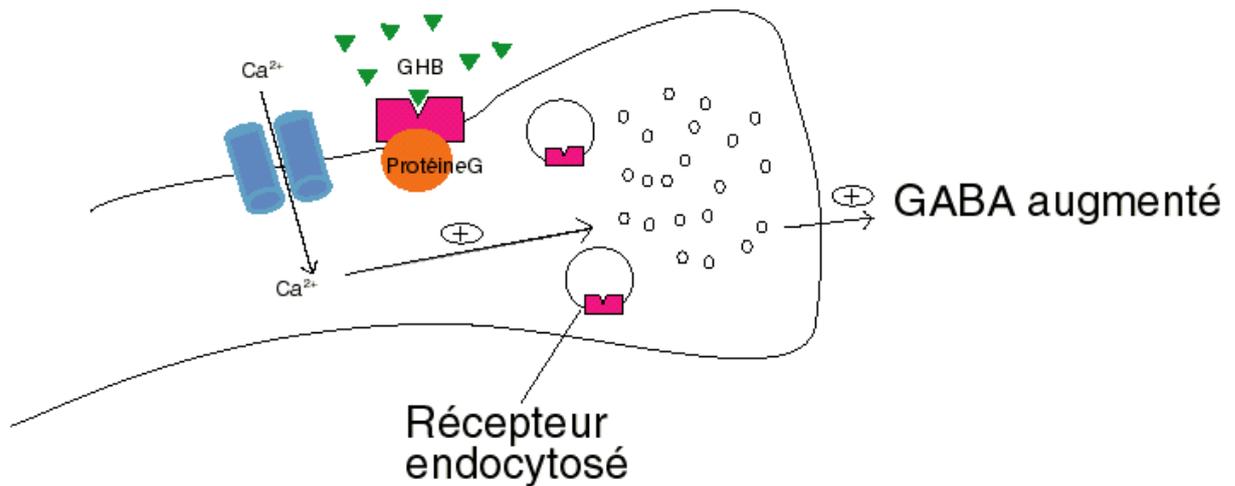


Figure 3 : L'action du GHB sur les terminaisons GABA diffère en fonction de sa concentration (A) physiologique ( $\mu\text{M}$ ) ou (B) pharmacologique (mM).

#### 4. Conclusions de mes travaux sur le mécanisme d'action cérébral du GHB endogène

Mon apport dans le décryptage des mécanismes d'action du GHB peut se résumer par la mise en évidence d'une action neuronale biphasique variant selon la concentration de GHB

au niveau neuronal et selon les conditions de polarisation des neurones (figures 2 et 3). Ainsi, les récepteurs du GHB, en présence de leur(s) ligand(s) à concentrations endogènes ( $< 50 \mu\text{M}$ ) et de neurones en situation d'hyperpolarisation membranaire donc considérés comme au repos (figure 2B), leur réponse induit une cascade de réactions intracellulaires dont une entrée de calcium par la stimulation de canaux calciques voltages dépendants et une sortie d'ions potassium. Ces modifications ioniques aboutissent à une légère polarisation membranaire. Une fois que la cellule atteint son potentiel de repos, aux environs de  $-50\text{mV}$ , cette réponse s'arrête car les canaux calciques de type T voltages dépendant sont alors inactivables et donc le calcium cesse d'entrer dans la cellule malgré les stimulations du récepteur du GHB. Cela se traduit par l'absence de libération de neurotransmetteurs puisque la membrane n'a pas été dépolarisée (25). Le rôle de ce type de signal GHB semble être de réguler la polarité neuronale de manière à ce que le neurone reste au potentiel de repos sans être toutefois trop hyperpolarisé comme cela peut s'observer après une stimulation GABAergique.

A l'inverse lorsque les neurones sont en situation de dépolarisation membranaire (figure 2A), la stimulation du récepteur du GHB à concentration physiologique va bloquer l'entrée de calcium en inhibant des canaux calciques voltages dépendant de type L ou N, cela va mettre la membrane cytoplasmique en situation proche du potentiel de repos et limiter, voire empêcher la libération de neurotransmetteurs comme le GABA ou la dopamine. Tout cela se traduira par une diminution de la concentration de GABA et de dopamine dans le compartiment synaptique et extracellulaire cérébral mesurée lors des expériences de microdialyse (figure 3A).

Dans la situation où la présence de GHB se prolonge ou par un apport exogène de fortes concentrations de GHB qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire, le récepteur du GHB va se désensibiliser, ne plus agir sur les canaux calciques de type T si la membrane est hyperpolarisée, elle restera hyperpolarisée. Mais si la membrane est dépolarisée le GHB ne va pas freiner la dépolarisation du neurone ce qui se traduira par une libération augmentée de neurotransmetteur (GABA ou dopamine) (figure 3B). Par ailleurs, l'accumulation du GHB, dans le SNC, va activer son transport du milieu extracellulaire vers les éléments pré-synaptiques, sa transformation en GABA grâce à la GHB-DH intracellulaire et l'accumulation conjointe au GABA et du GHB dans les vésicules synaptiques grâce respectivement aux transporteurs membranaires du GABA et/ou du GHB et aux transporteur vésiculaire des acides aminés

inhibiteurs (VIAAT) au niveau des vésicules synaptiques (35). Tout cela va finalement aboutir à une augmentation du tonus GABAergique de la synapse qui se traduira par la libération d'encore plus de neurotransmetteur GABA dans la fente synaptique et une augmentation du signal GABA post-synaptique (36). (figure 4)

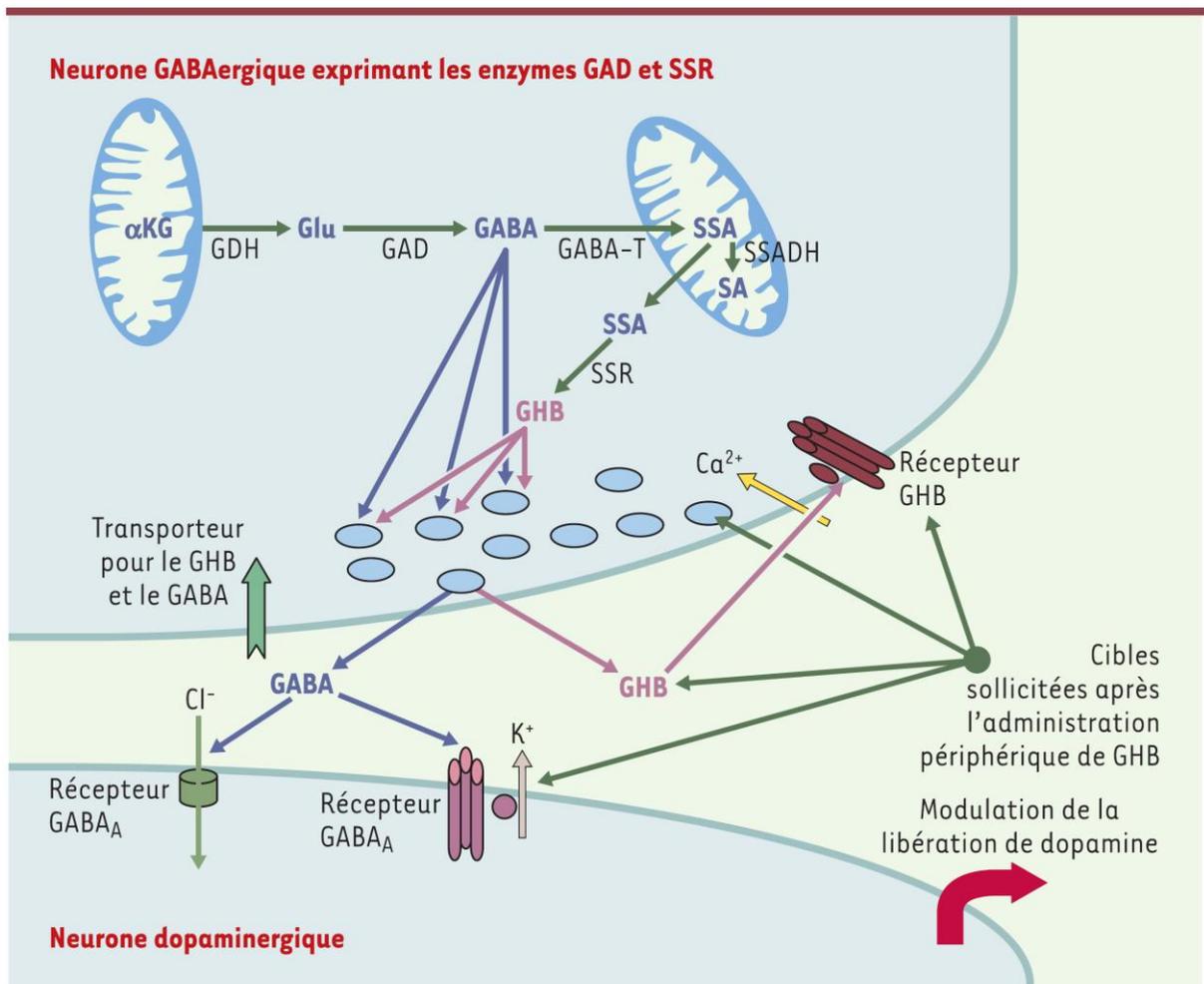


Figure 4 : Mécanisme d'actions du GHB administré à doses pharmacologiques (37) .

Article 6 : Localisation des neurones GHBergiques en regard des neurones dopaminergiques et GABAergiques.

THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 426:549-560 (2000)

**Immunohistochemical Studies of the  
Localization of Neurons Containing the  
Enzyme That Synthesizes Dopamine,  
GABA, or  $\gamma$ -Hydroxybutyrate in the Rat  
Substantia Nigra and Striatum**

GAËL HÉDOU,<sup>1</sup> SYLVETTE CHASSEROT-GOLAZ,<sup>2</sup> VÉRONIQUE KEMMEL,<sup>1</sup>  
SERGE GOBAILLE,<sup>1</sup> GUY ROUSSEL,<sup>3</sup> JEAN-CLAUDE ARTAULT,<sup>1</sup>  
CHRISTIAN ANDRIAMAMPANDRY,<sup>1</sup> DOMINIQUE AUNIS,<sup>2</sup> AND MICHEL MAITRE<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>LNMIC ER 2072 CNRS, Faculté de Médecine, 67085 Strasbourg Cedex, France

<sup>2</sup>INSERM U 338, Centre de Neurochimie, 67084 Strasbourg Cedex, France

<sup>3</sup>LNDR UPR 1352, Centre de Neurochimie, 67084 Strasbourg Cedex, France

0022-3565/99/2901-0303\$03.00/0  
THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS  
Copyright © 1999 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics  
JPET 290:303-309, 1999

Vol. 290, No. 1  
Printed in U.S.A.

**Experimental Therapeutics**

## $\gamma$ -Hydroxybutyrate Modulates Synthesis and Extracellular Concentration of $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Discrete Rat Brain Regions In Vivo<sup>1</sup>

SERGE GOBAILLE, VIVIANE HECHLER, CHRISTIAN ANDRIAMAMPANDRY, VÉRONIQUE KEMMEL, and MICHEL MAITRE  
*Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire des Interactions Cellulaires, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Strasbourg Cedex, France*

Accepted for publication March 17, 1999      This paper is available online at <http://www.jpet.org>



ELSEVIER

Alcohol 20 (2000) 277–283

---

---

**ALCOHOL**

---

---

## Gamma-hydroxybutyric acid as a signaling molecule in brain

Michel Maitre\*, Christian Andriamampandry, Véronique Kemmel, Catherine Schmidt,  
Yann Hodé, Viviane Hechler, Serge Gobaille

*Institute of Biochemistry and ER 2072 CNRS Faculty of Medicine, 11 Rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France*

Received 1 June 1998; accepted 8 June 1998

---

## **B. Mécanismes pharmacologiques du GHB.**

Bien que le GHB soit une molécule endogène, elle a initialement été proposée par le Dr Laborit comme un analogue du GABA, pouvant traverser la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) et ayant une activité pharmacologique inhibitrice au niveau du SNC (2). Le GHB, ou GammaOH®, est encore utilisé en complément de l'anesthésie générale au cours de certaines opérations chirurgicales de courte durée en pédiatrie et en obstétrique, ou lors de la sédation en neuro-traumatologie (38). La mise en évidence d'un mécanisme de sensibilisation/désensibilisation des récepteurs du GHB ouvre des questions sur les mécanismes pharmacologiques sous-tendant l'action du GHB lorsqu'il est administré en thérapeutique à de fortes posologies. Est-ce que le GHB thérapeutique joue un rôle par une réponse GHBergique spécifique et/ou GABAergique ?

### **1. Mécanismes d'action du GHB à doses pharmacologiques**

Afin d'expliciter les mécanismes d'action du GHB à doses pharmacologiques, nous avons utilisé une approche sans a priori en étudiant, par microarrays, les modifications d'expression de gènes chez le rat, deux heures après une prise de GHB (1 g/kg). Dans ces conditions, le GHB désensibilise ses récepteurs comme décrit précédemment et ses actions spécifiques passent par des mécanismes qui restent pour la majorité à élucider.

Nous avons étudié deux structures cérébrales et selon la structure cérébrale considérée, le nombre de gènes dont l'expression est modifiée par le GHB, diffère énormément. Ces gènes sont majoritairement hyperexprimés dans le cortex préfrontal (111/172) et hypo-exprimés dans l'hippocampe (269/470) mais surtout 20 gènes sont sur- et un sous-exprimés dans les 2 structures cérébrales (39). Ces résultats obtenus par microarrays ont été confirmés par western blot et immunohistochimie pour un certain nombre de protéines. Parmi les gènes identifiés, certains rôles fonctionnels ressortent. Il s'agit de gènes impliqués dans la neurotransmission/neuromodulation cérébrale, tels que le récepteur muscarinique de type 4, la fraction  $\gamma_2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> ou encore le récepteur dopaminergique D<sub>3</sub> et le récepteur de la prolactine. Il y a aussi des modifications dans l'expression de protéines ou d'enzymes

impliquées dans la transmission du signal de ces récepteurs. Le GHB régule par ailleurs et de manière plus étonnante, de nombreux gènes ayant un rôle dans la réponse au stress, les processus apoptotiques, la réponse immunitaire ou la réponse énergétique cellulaire (39).

Dans une étude menée en parallèle, nous avons aussi démontré qu'une dose pharmacologique de GHB active l'acétylation des histones (H3) en inhibant les histones désacétylases (HDAC) dans les différentes structures cérébrales testées (hippocampe, cervelet, tronc cérébral et le cortex). Cette inhibition est proportionnelle à la concentration de GHB présente dans la structure cérébrale (40). Si le GHB est un inhibiteur des HDAC, c'est également le cas du butyrate, du valproate ou du phénylbutyrate et toutes ces molécules appartiennent à la famille des acides gras à chaîne courte. Ces dernières données, ont confirmé notre hypothèse que le GHB administrée à doses thérapeutiques joue un rôle important dans d'autres processus que la neurotransmission. Nous avons donc recherché l'implication du GHB dans des processus physiopathologiques impliquant des phénomènes apoptotiques, du stress oxydant et c'est tout naturellement que les pathologies neurodégénératives ont fait l'objet de la suite de mes travaux.

Article 9 : Mécanisme d'action moléculaire du GHB à dose pharmacologique dans l'hippocampe et le cortex frontal : Etude par microarrays

*Physiol Genomics* 41: 146–160, 2010.  
First published January 26, 2010; doi:10.1152/physiolgenomics.00208.2009.

---

A single acute pharmacological dose of  $\gamma$ -hydroxybutyrate modifies multiple gene expression patterns in rat hippocampus and frontal cortex

Véronique Kemmel,<sup>1</sup> Christian Klein,<sup>1</sup> Doulaye Dembélé,<sup>3</sup> Bernard Jost,<sup>3</sup> Omar Taleb,<sup>1</sup> Dominique Aunis,<sup>2</sup> Ayikoe G. Mensah-Nyagan,<sup>1</sup> and Michel Maitre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Equipe Stéroïdes, Neuromodulateurs et Neuropathologies, EA 4438, Faculté de Médecine, <sup>2</sup>INSERM U-575, and <sup>3</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Strasbourg, France

Submitted 7 December 2009; accepted in final form 19 January 2010

Article 10 : Le GHB potentialise l'acétylation des histone par inhibition des Histones désacétylase

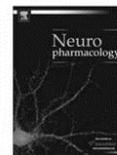
Neuropharmacology 57 (2009) 137–147



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neuropharm](http://www.elsevier.com/locate/neuropharm)



Pharmacological doses of gamma-hydroxybutyrate (GHB) potentiate histone acetylation in the rat brain by histone deacetylase inhibition

Christian Klein<sup>1</sup>, Véronique Kemmel<sup>1</sup>, Omar Taleb, Dominique Aunis, Michel Maitre\*

*Department of Biochemistry and INSERM U-575, Faculty of Medicine, 11, Rue Humann, 67085, University of Strasbourg, France*

## 5. Potentiel rôle thérapeutique du GHB dans la Maladie d'Alzheimer

Après le départ à la retraite du Professeur M. Maitre, j'ai intégré le laboratoire du Professeur Guy Nyagan Mensah dont les thématiques étaient orientées vers l'innovation thérapeutique par l'utilisation de neurostéroïdes dans le cadre de maladies neurodégénératives. C'est pourquoi, la suite de mes travaux a eu pour objectif la recherche de cibles moléculaires dans le cadre du traitement de pathologies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer (MA). Cette pathologie est liée à l'accumulation de peptides  $\beta$ -amyloïde qui entraînent la mort des neurones suite à un stress cellulaire.

Pour l'étude de cette pathologie, des modèles cellulaires ont été développés dont une lignée cellulaire neuronale, SH-SY5Y transfectée de manière stable avec le gène de l'APPwt (non mutée). Dans un premier temps, nous avons démontré que notre modèle cellulaire sur-exprimant l'APPwt présente un stress oxydant endogène et des phénomènes apoptotiques plus importants que les cellules natives. Nous avons également montré que des concentrations de GHB (200 à 500  $\mu$ M) permettent de diminuer ce stress oxydant et l'apoptose cellulaire. Le fait d'instaurer un stress oxydant par l'ajout d' $H_2O_2$  dans le milieu de culture des SH-SY5Y natives induit les mêmes phénomènes apoptotiques qui sont prévenus par un traitement par du GHB (41). Ces résultats confirmaient l'implication du GHB dans les processus de stress oxydant et d'apoptose identifiée par l'étude par microarrays qui montrait que le GHB activait l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus neuroprotecteurs.

*Neuroscience* 263 (2014) 203–215

## **GAMMA-HYDROXYBUTYRATE, ACTING THROUGH AN ANTI-APOPTOTIC MECHANISM, PROTECTS NATIVE AND AMYLOID-PRECURSOR-PROTEIN-TRANSFECTED NEUROBLASTOMA CELLS AGAINST OXIDATIVE STRESS-INDUCED DEATH**

**G. WENDT,<sup>a,d,f</sup> V. KEMMEL,<sup>a,g</sup> C. PATTE-MENSAH,<sup>a</sup> B. URING-LAMBERT,<sup>b</sup> A. ECKERT,<sup>c</sup> M. J. SCHMITT<sup>d</sup> AND A. G. MENSAH-NYAGAN<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> *Biopathologie de la Myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques, INSERM U1119, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Bâtiment 3 de la Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67 000 Strasbourg, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire d'Immunologie et d'Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67 000 Strasbourg, France*

<sup>c</sup> *Neurobiology Laboratory for Brain Aging and Mental Health, Psychiatric University Clinic, Wilhelm Klein-Strasse 27, CH-4025 Basel, Switzerland*

<sup>d</sup> *Molekular- und Zellbiologie, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), Universität des Saarlandes, Campus A 1.5, D-66041 Saarbrücken, Germany*

fected cells. Reverse-transcription, real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting showed that mRNA and protein basal ratios of apoptotic modulators Bax/Bcl-2 were also high in APPwt-transfected cells. GHB efficiently and dose-dependently rescued native and genetically modified cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced death. Interestingly, GHB, which strongly decreased elevated basal levels of TUNEL-staining, activated caspase 3-labeling and Bax/Bcl-2 in APPwt-transfected cells, also counteracted H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked increased apoptotic markers in native and genetically modified SH-SY5Y cells. Since GHB did not promote cell proliferation, anti-apoptotic action through the down-regulation of Bax/Bcl-2 ratios and/or caspase 3 activity appears as a critical mechanism involved in GHB-induced protection of SH-SY5Y cells against APPwt-overexpression- or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-evoked death. Altogether, these results, providing multi-parametric evidence for the existence of neuroprotective action of GHB, also open interesting

## II. Chapitre 2 : Du GHB à la sérotonine dans la Maladie d'Alzheimer

Le GHB est une molécule compliquée à utiliser en routine clinique car il fait partie maintenant de la classe des stupéfiants, qu'il a mauvaise réputation du fait de son utilisation comme « ChemSex Drug », qu'il présente une demi vie très courte et donc nécessite de nombreuses prises quotidiennes et que pour finir sa zone thérapeutique étroite est considérée comme proche de la zone addictive voire toxique (34,42). C'est pourquoi, je me suis orientée vers d'autres petites molécules impliquées dans les processus physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer et ayant des mécanismes d'action proches de ceux utilisés par le GHB à savoir jouer un rôle dans la neurotransmission, dans les phénomènes de stress oxydant et de mort cellulaire, dans l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des peptides  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) et de manière plus général une molécule impliquée dans des processus cognitifs dysfonctionnels comme les démences, la dépression ou les déficits de mémorisation. C'est pourquoi changer de sujet pour intégrer l'équipe du Pr. Laurent Monassier qui travaille sur le rôle de la sérotonine dans des pathologies cardiovasculaires et plus précisément sur les processus de dégénérescence des valves mitrales cardiaques, était une décision évidente. Ces processus bien que localisés au niveau du cœur, impliquent comme la maladie d'Alzheimer des mécanismes de dégénérescences, de remodelage, de stress cellulaires et de mort cellulaire aboutissant à une perte fonctionnelle de l'organe. Si la sérotonine du pool vasculaire joue le rôle d'une hormone, la sérotonine du pool cérébral possède un rôle de neurotransmetteur de premier plan. Elle est impliquée dans de nombreux processus cognitifs dont le plus connu et étudié est la dépression mais elle est aussi impliquée dans les processus de mémorisation, dans la maladie d'Alzheimer, l'autisme, l'addiction et l'anxiété. Par ailleurs, la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, présente une composante vasculaire importante et plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer la dérégulation de l'élimination du peptide  $A\beta$ . Ainsi, des pistes comme une origine périphérique des peptides  $A\beta$ , une diminution de la dégradation du peptide  $A\beta$  et/ou une élimination anormale des peptide  $A\beta$  du fait d'une Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) déficiente sont de plus en plus étudiées et ouvrent de nouveaux horizons. Tous ces processus

aboutissent à une accumulation de peptides A $\beta$  dans le SNC, au développement d'un stress oxydant, à des phénomènes apoptotiques intensifiés et pour finir la mort neuronale qui se traduit par les déficits cognitifs de la maladie d'Alzheimer.

### **A. Rôle de la sérotonine dans la Maladie d'Alzheimer**

#### **1. La barrière hémato-encéphalique dans le cadre de la Maladie d'Alzheimer**

La BHE a pour rôle de réguler le milieu intracérébral et de maintenir son homéostasie. Pour ce faire, la BHE a des propriétés physiques et métaboliques qui limitent l'entrée des molécules endogènes et exogènes dans le SNC, tout en permettant son alimentation en nutriments et autres molécules (43). Les cellules endothéliales cérébrales sont au cœur de cette structure car elles possèdent des jonctions serrées particulières qui tapissent les capillaires du côté du flux sanguin et jouent ce rôle de maintien homéostatique du SNC (Figure 5). Les péricytes et les astrocytes participent à la structuration de la BHE et au maintien de ses propriétés notamment en régulant les apports nutritifs et en molécules nécessaires aux besoins du SNC. Ainsi, la BHE par son rôle de filtre sélectif, protège le SNC des agents pathogènes et de toutes les molécules circulant dans le sang et non transportées du sang vers le SNC (44). Cette fonction protectrice devient un handicap dans certaines pathologies neurologiques où il y a accumulation, dans le SNC, de déchets qui ne peuvent pas s'éliminer par leur catabolisme ou en traversant la BHE mais aussi dans certaines pathologies vasculaires où il y a accumulation sur la paroi endothéliale d'éléments générateurs de stress oxydant ou d'inflammation qui peuvent à la longue rendre la BHE perméable et permettre la diffusion de ces éléments dans le SNC (45). Dans ces 2 cas, la perméabilité de la BHE est rompue et les flux moléculaires et cellulaires entre le sang et le SNC ne sont plus régulés.

Par ailleurs, le développement de l'imagerie cérébrale montre dans environ 30% des cas une accumulation des peptides  $\beta$ -amyloïdes dans l'endothélium vasculaire de la BHE (angiopathie cérébrale amyloïde) concomitamment au développement de la maladie d'Alzheimer, laissant penser que le système vasculaire cérébral n'a plus la capacité d'éliminer efficacement les peptides  $\beta$ -amyloïdes produits dans le SNC ou qu'une partie de la plaque  $\beta$ -amyloïde est d'origine périphérique (45–47). Plusieurs études montrent aussi que les granules plaquettaires contiennent des peptides amyloïdes, de la sérotonine, des facteurs de la coagulation et bon nombre de molécules pro-inflammatoires (48–50) et que des traumatismes crâniens répétés ainsi que les micro-thromboses cérébrales augmentent le

risque de développer une maladie d'Alzheimer (45,49). Enfin, des médicaments à tropisme sérotoninergiques comme la fluoxétine ont montré des effets positifs sur les capacités mnésiques de modèle animaux de la maladie d'Alzheimer (51,52). Cependant leur(s) mécanisme(s) d'action reste(nt) encore largement inexpliqué(s).

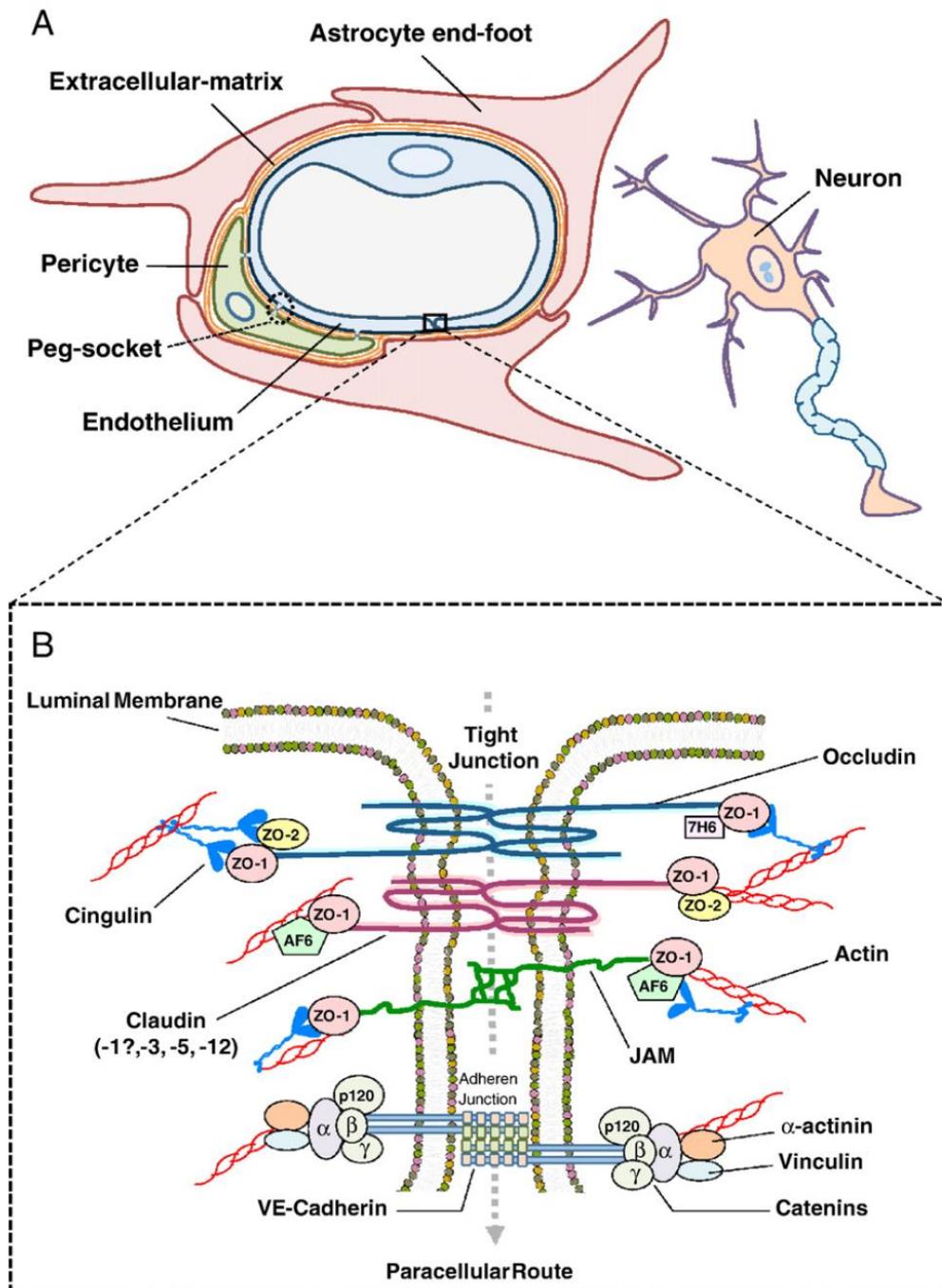


Figure 5 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (A) et des jonctions serrées (B) (53).

Notre objectif est de comprendre ces mécanismes et d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques assurant la régulation de la perméabilisation de la BHE. Dans un premier

temps nous avons recherché des mécanismes d'action du système sérotoninergique sur la perméabilité de la BHE. Cela fait l'objet du travail de thèse de Guillaume Becker, qui a mis en évidence le rôle du récepteur 5-HT<sub>4</sub> dans la perméabilité d'un modèle cellulaire simplifié de BHE : les cellules hCMEC.

## **2. Rôle du système sérotoninergique dans la perméabilité de la BHE**

Pour étudier les rôles du système sérotoninergique dans la perméabilité de la BHE, nous avons mis en place un modèle de culture cellulaire ; les cellules hCMEC qui sont des cellules endothéliales issues de la microvascularisation cérébrale (54).

Un premier objectif a été d'identifier, dans les cellules hCMEC, la présence d'éléments du système sérotoninergique. Cette caractérisation a permis de mettre en évidence la présence de constituants importants du système sérotoninergique à savoir des récepteurs de la sérotonine, 5-HT<sub>1B</sub> et 1D mais également les récepteurs 5-HT<sub>4</sub> et 5-HT<sub>6</sub> ainsi que la tryptophane hydroxylase (TPH<sub>1</sub>), enzyme limitante de la synthèse de sérotonine périphérique. Il y a environ 40 µg de sérotonine par mg de protéines dans les cellules hCMEC. Ces données confortent notre hypothèse que le système sérotoninergique est représenté dans les cellules endothéliales et pourrait jouer un rôle dans la modulation de la perméabilité de la BHE. Cette hypothèse est par ailleurs confortée par le fait que des agonistes et des antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> et 5-HT<sub>6</sub> respectivement, ont déjà été décrits dans la littérature comme ralentissant les pertes mnésiques dans les modèles animaux transgéniques de la maladie d'Alzheimer (55,56). Toutefois, le mécanisme d'action mis en avant par ces auteurs, passe par une surexpression de métalloprotéases comme la MMP-9 (57) ou l'ADAM 10 (58). Par ailleurs, d'autres actions indirectes ont été mises en avant comme par exemple l'inhibition de l'acétylcholinestérase (59,60). Mais rien n'est décrit quant à une action de la sérotonine en lien avec une perméabilité augmentée de la BHE.

Pour démontrer notre hypothèse, nous avons mis en culture les cellules hCMEC sur une membrane poreuse (Figure 6A) de manière à reproduire un modèle simplifié de BHE. Puis nous avons traité pendant 96 heures ces cellules hCMEC par du prucalopride (10 µM), un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, avant de mesurer la résistance électrique trans-endothéliale (TER),

technique aussi appelée trans-épithélio-endothéliale (TEER). Cette mesure est une technique qui évalue la résistance ohmique entre les compartiments vasculaire et cérébral, tout en préservant la ou les population(s) cellulaire(s) étudiée(s). Cette résistance indique le degré d'intégrité des jonctions mises en place par les cellules endothéliales en monoculture dans notre cas.

Les cellules hCMEC, montrent une diminution de la TEER, ce qui se traduit par une augmentation de la perméabilité du tapis cellulaire en présence de prucalopride (figure 6B). Ce signal est inexistant en présence d'un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>4</sub>, le GR113808.

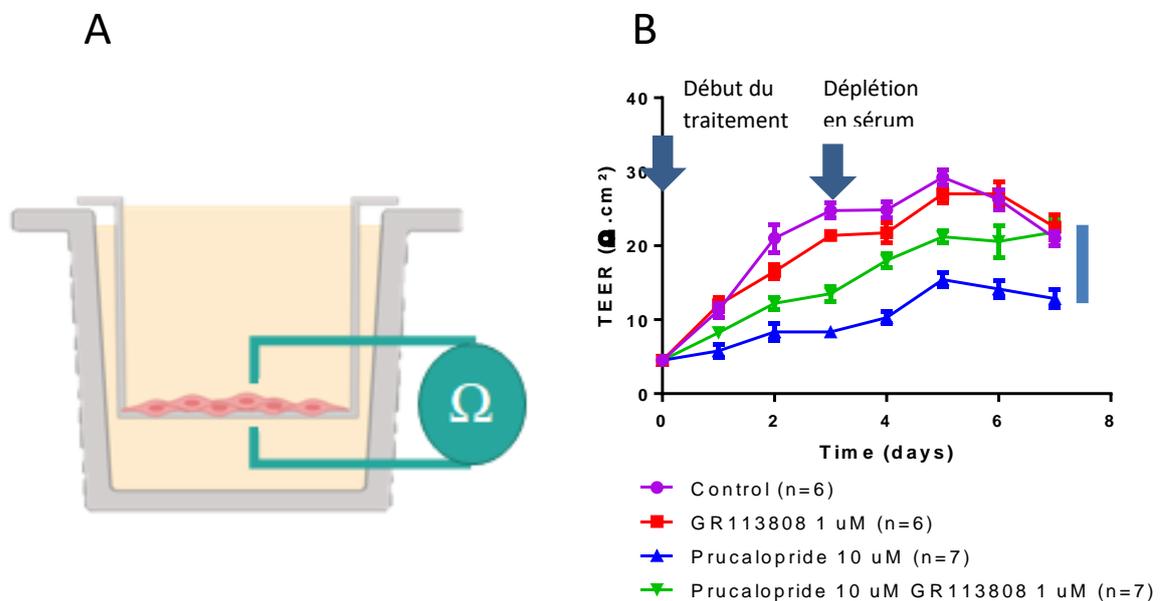


Figure 6: Modèle simplifié de barrière hématoencéphalique et mesure de la résistance électrique trans-épithélio-endothéliale (TEER).

(A) Modèle simplifié de BHE et de mesure de la TEER. (B) En présence de prucalopride la TEER diminue cet effet est partiellement prévenu par la présence de GR 113808, antagoniste du récepteur 5-HT<sub>4</sub>. Cela indique une perméabilisation de la BHE médiée par le récepteur 5-HT<sub>4</sub>.

Nous avons ensuite qualifié la taille des molécules pouvant traverser la BHE suite à l'action du prucalopride en utilisant le même modèle cellulaire et des molécules colorées, de manière à visualiser et quantifier leur passage à travers la membrane. Ainsi, des molécules de plus de 3kDa mais de moins de 10 kDa passent à travers la BHE en présence de prucalopride dans nos conditions expérimentales.

Fort de ce premier résultat encourageant, nous avons souhaité identifier le mécanisme moléculaire à l'origine de cette perméabilisation de la BHE. Nous avons, d'abord, recherché une modification d'expression des protéines de jonctions membranaires car, en raison du traitement de 96h nécessaire, l'hypothèse d'une modification de la structure moléculaire par une diminution de la jointure entre les cellules étaient l'hypothèse la plus probable. Effectivement, dans nos conditions expérimentales, le traitement par le prucalopride diminue l'expression d'occludine dans les cellules hCMEC. Ce n'est cependant ni le cas de la claudine 5, ni celui de ZO-1 qui sont deux autres protéines de jonction très impliquées dans la BHE (figure 5) (61).

Dans la littérature l'activation des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> est connue pour induire, par sa voie canonique, un signal AMPc, protéine G dépendant et par une voie secondaire, protéine G indépendante, la protéine Src (62). Nous avons exploré ces deux voies de signalisation. Un premier résultat montre que le prucalopride augmente la concentration d'AMPc cependant aucune modification n'est retrouvée quant à la phosphorylation de la protéine PKA (figure 7).

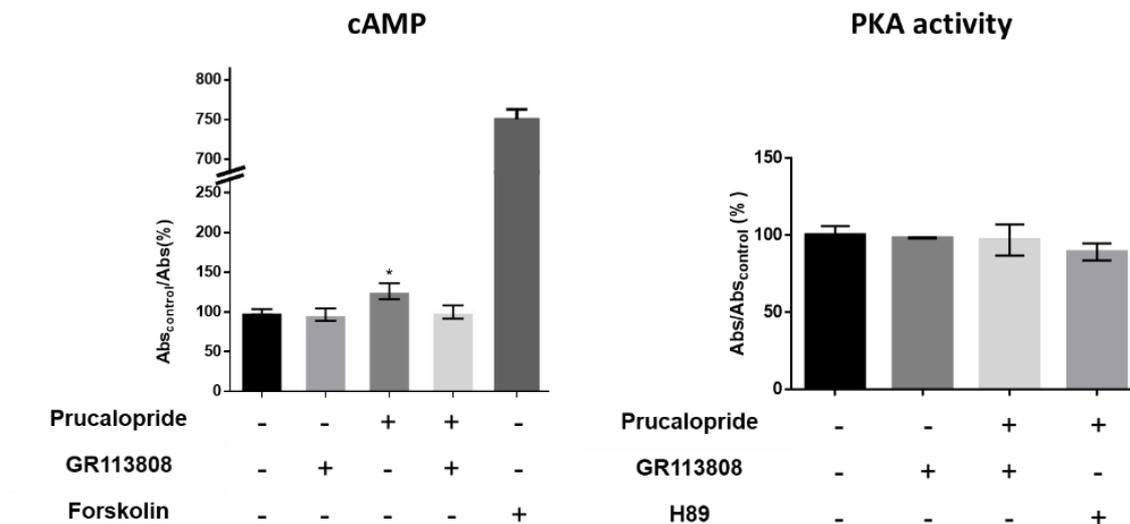


Figure 7 : Le prucalopride permet une augmentation d'AMPc intracellulaire mais pas la phosphorylation de PKA.

Cette observation est en cohérence avec la littérature puisque l'expression des protéines de jonctions, telles que l'occludine, ZO-1 ou les claudines, est modulée à la baisse par l'activation de PKC et/ou l'inhibition de la phosphorylation de la PKA (63). En effet, une phosphorylation importante de la PKA induit un effet inhibiteur indirect sur la phosphorylation

de protéines telles que l'extracellular signal-regulated kinase (ERK) ou la myosine kinase à chaîne légères (MLCK) qui sont d'importants modulateurs de la perméabilité vasculaire par la régulation de l'expression d'occludine (64). C'est pourquoi, l'étude de la voie de Src permettant la phosphorylation de ERK semble plus prometteuse. D'autant qu'il a déjà été démontré, dans les cellules hCMEC, que la phosphorylation d'ERK induit une diminution d'expression de l'occludine (65,66). En fait, c'est ce que nous avons obtenu après stimulation des cellules par du prucalopride (10  $\mu$ M), la proportion de Src phosphorylée augmente ainsi que celle de ERK phosphorylée. Ces effets sont prévenus par le GR 113808 (antagoniste du récepteur 5-HT<sub>4</sub>) (figure 8).

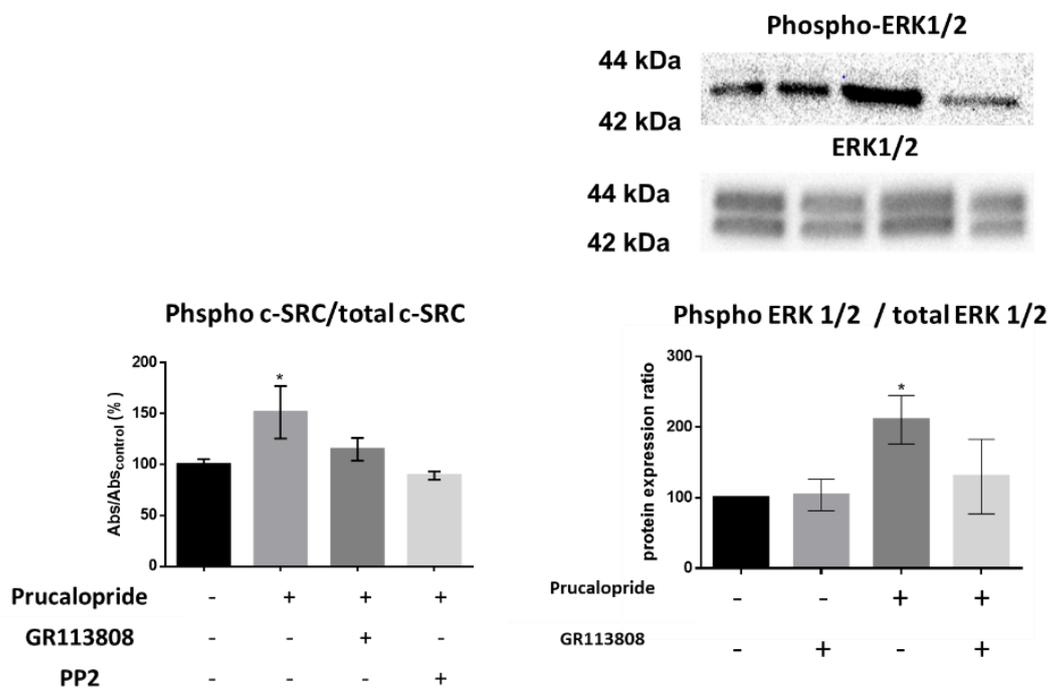


Figure 8 : Le prucalopride augmente la phosphorylation de Src et de ERK. Cet effet prévenu par la présence de GR 113 808 démontre le rôle joué par le récepteur 5-HT<sub>4</sub> dans la diminution d'expression d'occludine.

Ces expérimentations en culture cellulaire, nous ont donc permis de proposer un mécanisme d'action cellulaire du prucalopride permettant l'ouverture de la BHE dans un modèle cellulaire simplifié (Figure 9).

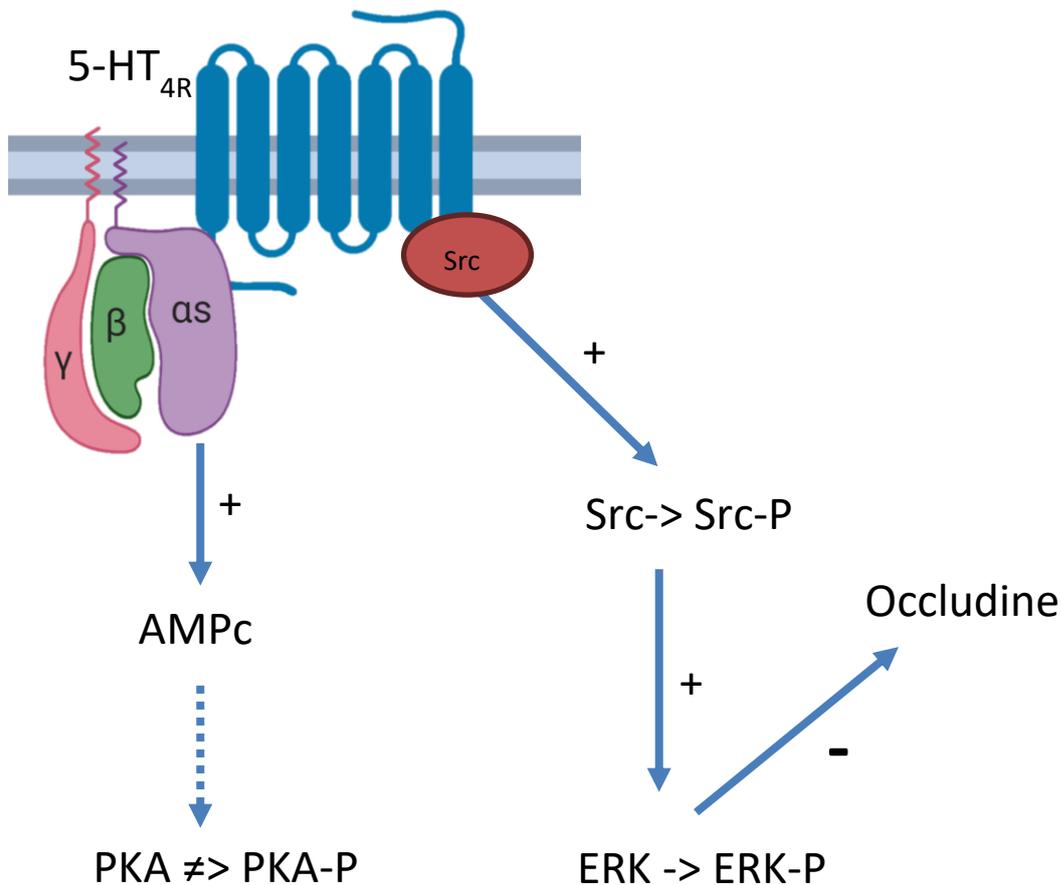


Figure 9 : Mécanisme d'action du prucalopride dans les cellules hCMEC et expliquant la diminution d'expression d'occludine.

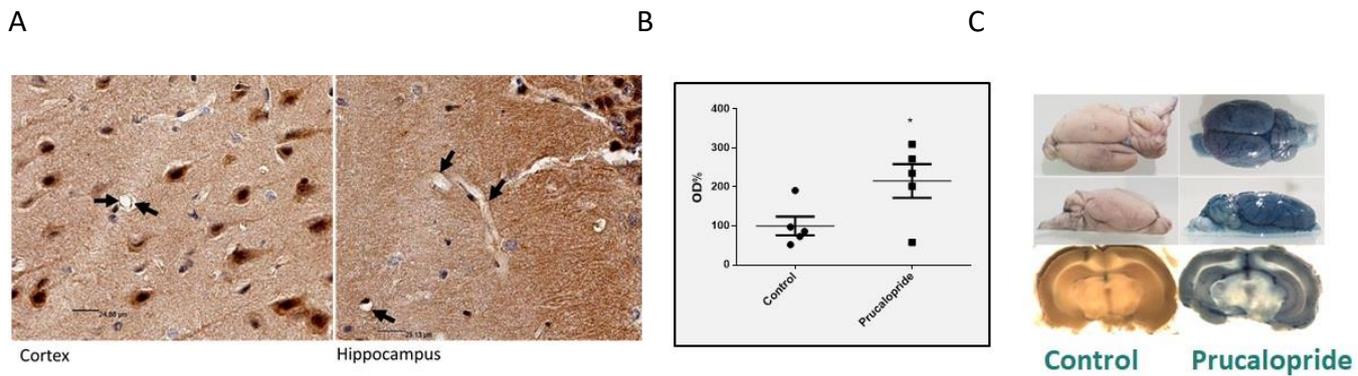
En permettant une diminution d'expression de l'occludine le récepteur 5-HT<sub>4</sub> stimulé par du prucalopride diminue la perméabilité de la BHE.

Cependant notre modèle cellulaire reste simple et très éloigné de la BHE physiologique de l'animal ou de l'homme. Donc pour conforter nos hypothèses mécanistiques, nous avons souhaité tester l'effet du prucalopride chez le rat.

Cependant dans un premier temps, il était important, pour nous, de confirmer la présence du récepteur 5-HT<sub>4</sub> sur des cellules endothéliales de la BHE dans le SNC de rat. Par immunohistochimie, nous avons localisé ce récepteur 5-HT<sub>4</sub> dans le cortex et l'hippocampe mais également dans de nombreuses autres régions du cerveau. Plus précisément, il est présent sur des neurones mais, et c'est ce qui nous intéresse le plus, sur les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (figure 10A). Nous projetons de réaliser également cette recherche sur des coupes de cerveaux chez l'homme de manière à pouvoir transposer nos hypothèses à l'homme.

Après un traitement de 4 jours de prucalopride à 10 mg/kg, nous avons perfusé ces rats ainsi que des rats sains avec du bleu trypan puis observé la diffusion du bleu dans le parenchyme cérébral. Les rats traités par le prucaloprides ont une diffusion plus grande de bleu dans le SNC comparé aux rats non traités (figure 10B et C).

Tous ces résultats sont en cours de rédaction et cette publication sera soumis au journal Biochemical Pharmacologie (BCP).



*Figure 10 : Etude de la perméabilité de la BHE chez des rats contrôles ou après un traitement de 4 jours par du prucalopride. (A) Localisation des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> dans le cortex et l'hippocampe de rat au niveau de neurones mais également comme le montre les flèches au niveau des vaisseaux sanguins du SNC. (B) L'injection de bleu trypan chez des rats contrôles ou après 4 jours de traitement par prucalopride montre une diffusion plus grande du bleu dans le tissu nerveux chez les rats traités. (C) Cerveaux et coupes montrant cette diffusion au niveau du parenchyme nerveux.*

### **III. Chapitre 3 : Rôle de la sérotonine sur la Barrière Broncho-Alvéolo-Capillaire et les processus inflammatoires du tissu pulmonaire**

Dans le cadre d'un essai clinique, VapExpAir, financé par un fournisseur de e-liquide qui possède un centre de recherche sur le vapotage (CRIVAP), je me suis intéressée, avec l'aide de Naomi Sabo qui en a fait son sujet de thèse en pharmacie, à la pharmacocinétique de la nicotine en fonction de la composition en excipients des e-liquides testés dans l'essai clinique et à la composition de l'air expiré par le vapoteur. Pour aller plus loin dans la compréhension des effets du vapotage sur l'organisme, nous avons développé un modèle de barrière broncho-alvéolo-capillaire (BBAC) afin d'étudier les effets des composés des e-liquides sur cette barrière. Nous avons également voulu étudier le rôle joué par la sérotonine dans les processus inflammatoires liés à la consommation de tabac et/ou du vapotage sur la BBAC.

#### **A. Validation d'un modèle cellulaire de la barrière broncho-alvéolo-capillaire**

La BBAC est une structure particulière du fait de son emplacement à l'interface entre l'air alvéolaire et le flux sanguin. Comme pour la BHE son rôle principal est de permettre les échanges, notamment gazeux, tout en protégeant l'organisme des agents pathogènes, et des molécules toxiques provenant de notre environnement aérien (67). Cette barrière peut se modéliser comme une interaction entre un épithélium alvéolaire (ou pneumocytes) exposé à l'air et un endothélium continu non-fenêtré exposé au sang capillaire. C'est pourquoi, nous avons choisi 2 lignées cellulaires d'origine humaine (figure 11) :

- La lignée cellulaire NCI-H441 qui a les caractéristiques physiologiques, métaboliques et de transporteurs semblables aux cellules épithéliales alvéolaires humaines.
- La lignée HULEC-5a issue de poumon sain et immortalisée. Cette lignée présente les caractéristiques des cellules endothéliales et a été utilisée dans divers modèles de BBAC.

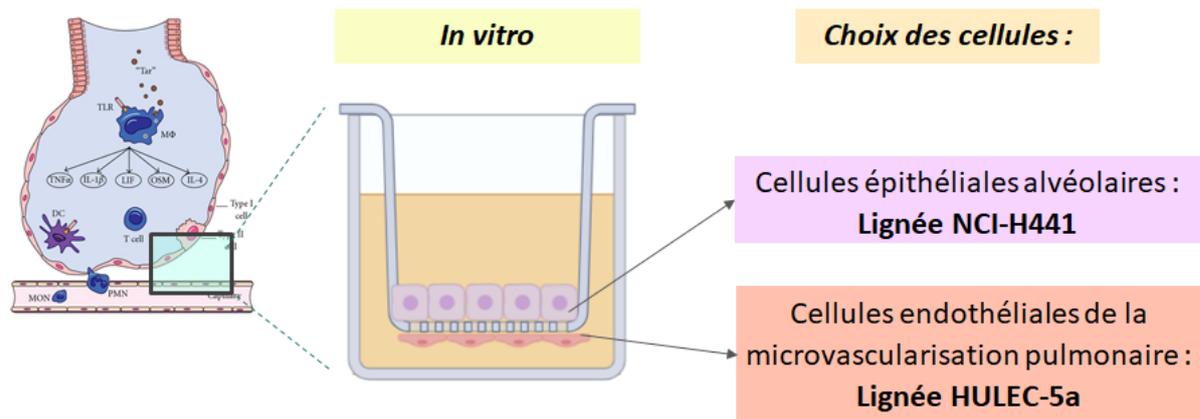


Figure 11 : Modèle de barrière broncho-alvéolo-capillaire mis en place au laboratoire.

Une première étape importante de la validation de ce modèle a été la caractérisation phénotypique des deux lignées choisies. Ainsi, des marqueurs spécifiques de chaque lignée ont été recherchés et localisés dans les cellules par immunofluorescence.

Pour les cellules NCI-H441, les ARNm et les protéines ont été identifiées par qPCR et/ou Western blot pour les protéines du surfactant A, du surfactant D, de l'aquaporine 5 (transporteur impliqué dans le transport d'eau nécessaire à la production du surfactant) et du TTF-1 qui est un facteur de transcription de la synthèse des protéines du surfactant.

Pour les cellules HULEC-5a, les ARNm et les protéines ont été identifiées par qPCR et/ou Western blot pour la protéine CD31, l'enzyme eNos et le facteur de von Willebrand.

Par ailleurs, nous avons vérifié que l'occludine et ZO-1, deux protéines de jonctions serrées étaient exprimées dans les 2 lignées.

Une deuxième étape, non moins importante, a été de confirmer que notre modèle de BBAC joue bien un rôle de barrière. Pour ce faire, nous avons mesuré la TEER entre les compartiments alvéolaire et sanguin (figure 12) et observé une augmentation dans le temps de la TEER jusqu'à obtenir un plateau après 7 jours de culture. Mais surtout, nous avons observé que les cellules NCI-H441 forment la barrière la plus efficace des 2 lignées et qu'il existe une synergie qui augmente les propriétés de barrière de la BBAC, dans le modèle contenant les 2 lignées cellulaires à savoir les cellules épithéliales alvéolaires et endothéliales.

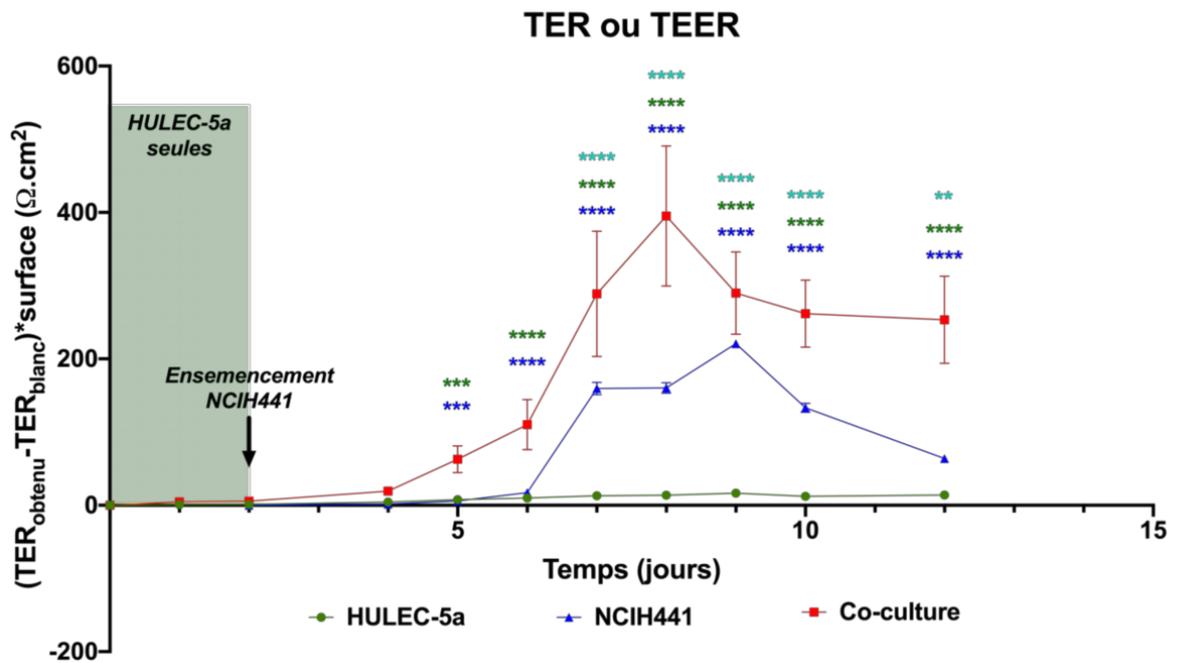


Figure 12 – Évolution de la résistance trans-épithéliale/endothéliale (TER) et trans-épithélio-endothéliale (TEER) au cours du temps.

Densité cellulaire initiale pour HULEC-5a à J0 et NCI-H441 en monoculture et co-culture à J2 :  $5 \times 10^4$ /puits. Analyse statistique : Comparaison des monocultures NCI-H441 ( $\blacktriangle$  et  $*$ ) et HULEC-5a ( $\bullet$  et  $*$ ) versus coculture ( $\blacksquare$ ) et monoculture NCI-H441 versus monoculture HULEC-5a ( $*$ ) à l'aide d'un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey.  $*$   $p < 0,05$ ;  $**$   $p < 0,01$ ;  $***$   $p < 0,001$ ;  $****$   $p < 0,0001$ .

Enfin, nous avons recherché les éléments du système sérotoninergique dans notre modèle de BBAC. Les marqueurs concernés sont la tryptophane hydroxylase périphérique (TPH<sub>1</sub>) qui est impliquée dans la production de la sérotonine à partir du tryptophane, le transporteur spécifique de la sérotonine (SERT) et les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>7</sub>. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Expression protéique des éléments du système sérotoninergique dans notre modèle de BBAC. L'identification a été faite par q-PCR et/ou Western blot dans chacune des 2 lignées.

Marqueurs	Fonction	HULEC-5a	NCIH-441
<b>TPH<sub>1</sub></b>	Enzyme impliquée dans la synthèse de la sérotonine en périphérie	+++	++
<b>SERT</b>	Transporteur de recapture de la sérotonine	+++	+++
<b>5-HTR<sub>1B</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>i</sub>	+++	-
<b>5-HTR<sub>1D</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>i</sub>	+++	+
<b>5-HTR<sub>1F</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>i</sub>	++	+
<b>5-HTR<sub>2A</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>q</sub>	++	-
<b>5-HTR<sub>2B</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>q</sub>	-	+++
<b>5-HTR<sub>4</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>s</sub>	++	-
<b>5-HTR<sub>6</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>s</sub>	+	++
<b>5-HTR<sub>7</sub></b>	Récepteur membranaire couplé à une protéine G <sub>s</sub>	-	+++

Ainsi, notre modèle de BBAC joue bien un rôle de barrière, il contient les éléments protéiques spécifiques attendus dans des cellules épithéliales alvéolaires et des cellules endothéliales pulmonaires et le système sérotoninergique est représenté par des éléments déjà décrits dans le poumon (68–70). Nous pouvons donc le considérer comme valide pour la suite de nos expérimentations.

### **C. Impacts des systèmes électroniques de délivrance de nicotine sur la barrière broncho alvéolo capillaire**

La mise en place de ce modèle m'a permis de répondre à un appel à projet qui a été financé : ANR « Tabac 2019 ». Dans cet appel d'offre, nous proposons d'identifier grâce à ce modèle, les dommages cellulaires induits par les systèmes électroniques de délivrance de nicotine (ENDS) ou e-cigarettes en fonction de leur composition en propylène glycol (PG), en glycérine végétale (VG), en nicotine et en arômes. Nos objectifs sont de savoir si : (1) les ENDS induisent dans notre modèles cellulaires une augmentation du stress oxydant, de l'apoptose cellulaire et la production de facteurs de l'inflammation. (2) Des anomalies observées pourraient être corrélées à la concentration de nicotine administrée et à la présence d'arôme dans le e-liquide testé.

Pour commencer, nous avons utilisé plusieurs approches comme la mesure de la TEER, de l'activité mitochondriale de la succinate déshydrogénase NAD(P)H-dépendant (test MTS) et de l'activité LDH dans le milieu de culture pour déterminer la toxicité cellulaire des composants d'un e-liquide. Toutes ces expérimentations vont dans le même sens et démontrent (Tableau 2) que la nicotine augmente la perméabilité de la BBAC de manière significative à partir de 25  $\mu$ M et que selon la sensibilité du test, une mort cellulaire significative s'observe à partir de 40  $\mu$ M de nicotine. Les excipients PG et VG seuls ne sont pas anodins non plus car ils induisent une augmentation significative de la perméabilité de la BBAC et une surmortalité cellulaire certainement par une action osmotique car 5% de PG ou de VG représente une osmolarité de 1000 mOsm/L. Cette hyperosmolarité induit une augmentation de la lyse cellulaire. Par ailleurs, nous avons observé que si on associe aux excipients les arômes menthes/eucalyptus, on augmente des effets délétères du e-liquide sur la BBAC en augmentant sa perméabilité et la mort des cellules. Ce qui est plus étonnant et pour tout dire un résultat inattendu, c'est qu'un liquide contenant des arômes de fruits rouges ou de saveur tabac sans nicotine n'ont pas plus d'effet que les excipients voire même un effet légèrement protecteur puisque non significativement différent que la culture témoin. Ces derniers résultats doivent être confirmés et surtout nous devons discuter de la composition précise de ces liquides avec le fabricant, toutefois notre hypothèse est que ces arômes ont peut-être des propriétés d'antioxydants qui limiterait la mort cellulaire induite par le PG et VG du liquide (71).

Tableau 2 : Impacts des composants de e-liquide sur la BBAC après 48h de traitement.

Concentration ou pourcentage de produit nécessaire pour induire un effet (rupture de la BBAC et/ou mort cellulaire) significative dans notre modèle de BBAC.

Après 48 h de traitement	<b>TEER</b> Effets négatifs sur la BBAC à partir de	<b>MTS</b> Effets négatifs sur la BBAC à partir de	<b>Activité LDH</b> Effets négatifs sur la BBAC à partir de
Nicotine	25 µM	100 µM	40 µM
VG	5 %	10 %	5 %
PG	10 %	10 %	20 %
e-liquide aux fruits rouges	5 %	5 %	5 %
e-liquide Menthe eucalyptus	2.5 %	2.5 %	2.5 %
e-liquide Tabac blond	0.1 et 1 %	NS	NS

NS : Effets non significativement différent du contrôle.

Ces premiers résultats font parties intégrantes de la thèse en Sciences de Naomi Sabo. Ce travail financé par l'ANR « tabac 2019 » va être poursuivi avec pour objectif de déterminer quelles sont les modalités de mort cellulaires et/ou permettant la destruction de la BBAC. (1) Est-ce que les e-liquides induisent des phénomènes nécrotiques, apoptotiques ou d'autophagie et quelle lignée cellulaire est la plus impactée ? (2) Est-ce que cette mort cellulaire est précédée de processus inflammatoires ou liés au stress oxydant ? (3) Est-ce que le tabac brûlé induit le même type de toxicité ou une toxicité plus importante que la toxicité trouvée après contact des e-liquides ? (4) Où se situe la toxicité des nouveaux systèmes de consommation de tabac (type IQOS®) produisant, après une pyrolyse du tabac, un aérosol contenant de la nicotine, sont-ils plus ou moins toxiques que le tabac après combustion et/ou que l'e-cigarette ?

#### **D. Rôle de la sérotonine dans les processus inflammatoires du tissu pulmonaire**

L'inflammation est un processus primordial lors d'agressions exogènes. Elle se décompose en 3 phases ; une augmentation de la perméabilité vasculaire, une migration des cellules immunitaires qui mobilisent des outils pro-inflammatoires et enfin une phase anti-inflammatoire permettant la reconstruction des tissus lésés (72). L'inflammation chronique rompt l'homéostasie du tissu et induit sa destruction qui s'étend progressivement à tout l'organe. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) se caractérise par une inflammation des voies aériennes, l'épaississement des parois des bronches, une hypersécrétion de mucus et une inflammation locale qui entraîne une destruction progressive des alvéoles pulmonaires (73,74). La BPCO concerne 3,5 millions de personnes en France. Plus de 80% des BPCO sont dues au tabac et chaque année le nombre d'hospitalisations et de décès liés à la BPCO s'accroît dans le monde (75). Malgré les progrès de sa prise en charge, la mortalité liée à la BPCO stagne, car la maladie est diagnostiquée trop tard et qu'aucun traitement curatif n'est disponible (74).

De nombreux éléments du système sérotoninergique comme ses récepteurs ou les capacités de transport et/ou de synthèse de la 5-HT sont décrits dans certaines cellules immunitaires. Leurs rôles, encore largement méconnus, sont confirmés par l'observation de propriétés immunosuppressives d'inhibiteurs spécifiques de la recapture de la 5-HT dans un contexte de maladies auto-immunes (76,77).

La suite du projet ANR se situe dans la continuité du développement du modèle de BBAC pour proposer des stratégies thérapeutiques, en lien avec le système sérotoninergique. Ainsi, à partir du modèle cellulaire de la BBAC comportant les cellules NCI-H441 et HULEC-5a, nous allons continuer à complexifier le modèle en y intégrant des éléments du système immunitaire responsables des phénomènes pro- et anti-inflammatoires de manière à mimer une agression pulmonaire et son éventuelle réparation. Cette agression pourra par ailleurs être provoquée et/ou amplifiée par des composants de e-liquides ou de la fumée de cigarette (nanoparticules, nicotine, hypoxies transitoires répétées...). Le 3<sup>ème</sup> type cellulaire ajouté dans le compartiment alvéolaire sera des cellules immunitaires de différent type comme (1) des macrophages M0 qui modéliseront les conditions physiologiques du tissu pulmonaire, (2) des macrophages M1, sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, modéliseront des conditions inflammatoires ou

(3) des macrophages M2, sécrétant des cytokines anti-inflammatoires, modéliseront la phase de reconstruction. Par ailleurs, dans le compartiment vasculaire, l'ajout de monocytes, permettra d'étudier leur passage vers le compartiment pulmonaire.

Dans ces modèles de BBAC, nous pourrons tester les actions d'agonistes, d'antagonistes du système sérotoninergique ou d'inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine. En effet ce système semble particulièrement actif sur les macrophages. Les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> et 5-HT<sub>7</sub> (70,78,79) ont déjà été identifiés sur la membrane de ces cellules (données partiellement confirmées par nos expérimentations) et la sérotonine semble avoir un effet activateur ou inhibiteur sur les macrophages en fonction de sa concentration et apparaissant moduler la sécrétion en cytokines des cellules phagocytaires. Par exemple, la sérotonine peut inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (80). Il a aussi été démontré que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>7</sub> favorise la polarisation M1 des macrophages, c'est-à-dire un phénotype pro-inflammatoire (81). Mais il a aussi été démontré que la sérotonine augmente l'expression de gènes spécifiques du phénotype des macrophages M2 et diminue l'expression de gènes spécifiques des macrophages M1, et donc aboutit à un phénotype anti-inflammatoire (82). Ces différentes études relayant des résultats pouvant sembler contradictoires, il nous paraît légitime d'étudier le rôle de la sérotonine dans le processus de polarisation des macrophages et les mécanismes cellulaires mis en œuvre plus spécifiquement dans un environnement où d'autres cellules pulmonaires sont présentes.

Par ailleurs, nous avons débuté, en collaboration avec la clinique de la Souris, la mise en place d'un modèle de BPCO après exposition intensive à la fumée de cigarette chez la souris. Notre objectif est dans un premier temps de confirmer les effets délétères de la fumée de cigarette par l'observation de l'activation des cellules immunitaires dont l'activation des macrophages, la sécrétion de cytokines, l'histologie et des épreuves fonctionnelles. L'objectif ensuite étant de confirmer l'actions du système sérotoninergique et de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la BPCO.

## **IV. Projets : Rôle(s) de la sérotonine dans la maladie d'Alzheimer selon l'origine périphérique ou centrale des peptides A $\beta$**

Ce dernier chapitre concerne mes projets à venir. Les thématiques de recherche que j'ai explorées jusqu'à présent reposaient sur la mise en place de modèles cellulaires permettant de comprendre les mécanismes cellulaires tant au niveau de la signalisation que de la vie et de la mort cellulaire, impliqués dans certaines pathologies du SNC. Avec le temps, ces modèles cellulaires se sont complexifiés pour passer de la culture simple de lignées cellulaires vers des modélisations plus intégrées. Par ailleurs, j'ai également élargie l'étude des signaux cellulaires de la seule neurotransmission à des réponses intra et intercellulaires plus complexes mettant en jeu notamment la communication entre différents types cellulaires en réponse à des agressions soient endogènes soient exogènes des tissus. Pour la suite de ce projet, je vais continuer à perfectionner notre modèle de BHE de manière à mieux comprendre son rôle dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives et plus particulièrement de la maladie d'Alzheimer.

### **A. Hypothèses de recherche**

Nos hypothèses de travail sont que :

- L'amyloïdogénèse et les dysfonctionnements vasculaires, plus particulièrement ceux de la BHE, sont des éléments clés dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.
- Le système sérotoninergique joue un rôle de régulation dans ces 2 phénomènes : l'amyloïdogénèse et la perméabilisation de la BHE.
- L'action du système sérotoninergique s'exerce par l'activation de récepteurs de la sérotonine présents sur les différentes cellules de la BHE.

Si l'amyloïdogénèse est à la base de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (83), la question de l'origine des peptides amyloïdogéniques reste encore ouverte. Une origine centrale est indiscutable dans les maladies génétiques de la maladie mais elle est plus discutée

dans les cas sporadiques de la maladie et encore plus lorsque la maladie d'Alzheimer s'accompagne d'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) (47). Notre hypothèse est que les peptides amyloïdes ont plusieurs origines :

- Neuronale ; du fait d'une dégradation anormale de la protéine APP par les sécrétases ( $\beta$  et  $\gamma$ ) (83)
- Plaquettaire car les granules  $\alpha$  contiennent des peptides amyloïdes (48,84)
- D'autres origines périphériques comme le microbiote ou certains organes comme le foie (85).

Pour ce qui concerne les dysfonctions vasculaires, de nombreux arguments cliniques vont dans ce sens puisque les maladies cardiovasculaires consécutives à des lésions traumatiques ou des ischémies cérébrales augmentent le risque de développer une démence dont la maladie d'Alzheimer (45,86). De plus, l'accumulation de dépôts amyloïdogéniques se traduit par l'installation d'un stress oxydant et ses conséquences neuroinflammatoires modifient la perméabilité voire provoquent des ruptures localisées de la BHE (87).

Enfin, des arguments cliniques laissent penser que le système sérotoninergique est une piste d'espoir pour un traitement de la maladie d'Alzheimer (88). Tout d'abord, il a été observé que les premiers signes de la maladie d'Alzheimer sont souvent confondus avec ceux de la dépression, que les antidépresseurs de la classe des inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine sont le plus souvent bénéfiques en début de maladie (89). Et plus récemment, il a été montré que les agonistes du récepteurs 5-HT<sub>4</sub> (RS 67333) et des antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (idalopirdine) sont actifs en ralentissant l'accumulation des plaques amyloïdes, en diminuant la neuroinflammation et en améliorant les performances cognitives dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. Cependant, si des pistes mécanistiques impliquant le système sérotoninergique sont proposées, elles restent préliminaires et aucune stratégie thérapeutique n'est réellement mise en place même dans le cadre d'essais cliniques.

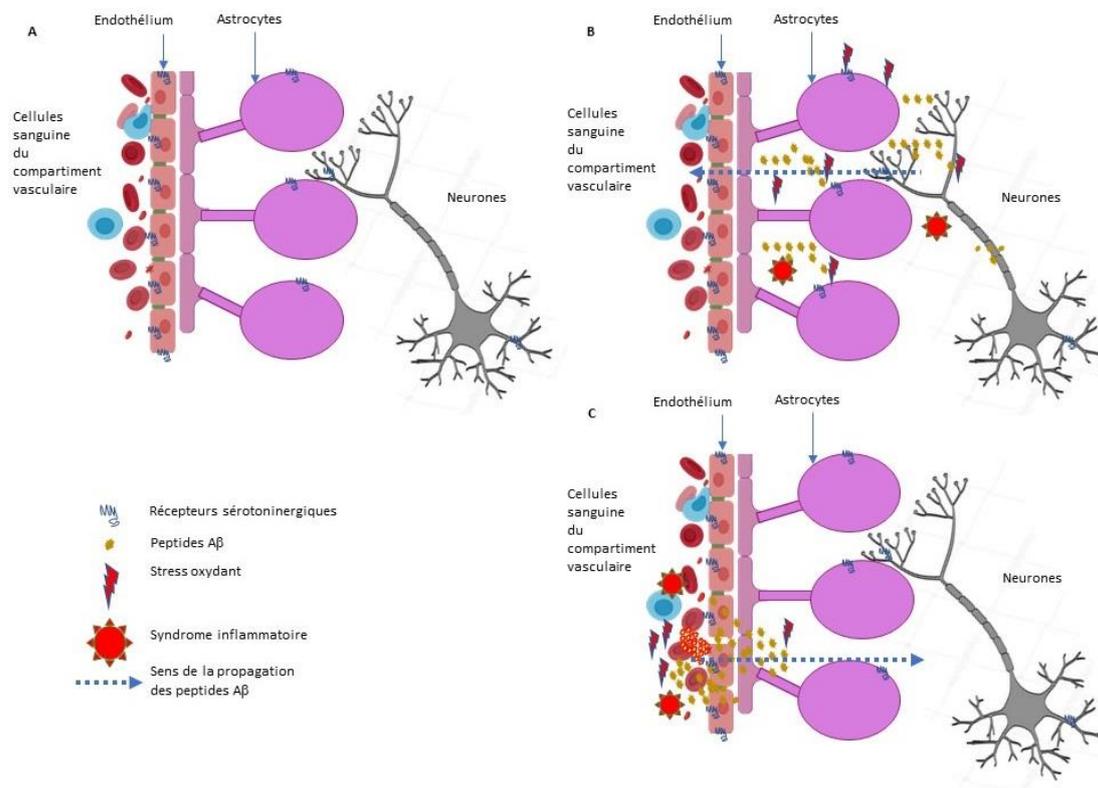


Figure 13 : Projet de recherche schématisées à partir d'un modèle de BHE en 3 Dimension (3D).

(A) Modèle de la BHE en 3D. Après validation de ce modèle, différentes conditions d'accumulation de peptides A $\beta$  seront simulés (B) soit après une accumulation intracérébrale (C) soit vasculaire des peptides A $\beta$ . Dans ces conditions, nous évaluerons le développement de processus d'élimination du peptide, soit par transport à travers la BHE soit par catabolisme, le développement d'un stress oxydant et de processus inflammatoires. Ce modèle nous servira aussi pour la compréhension de ces processus de manière à proposer des cibles moléculaires et cellulaires en lien avec le système sérotoninergique pour répondre aux enjeux thérapeutiques posés par la maladie d'Alzheimer.

## **B. Etudes des processus physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer impliquant la BHE et la sérotonine grâce à des modèles cellulaires de la BHE**

Le processus physiopathologique décrit dans la maladie d'Alzheimer est lié à la formation de la plaque amyloïde dans le tissu nerveux. Ces dépôts de peptide A $\beta$  sont observés car ces peptides très hydrophobes possèdent une clairance plus faible que les peptides non amyloïdogènes. La formation de plaques amyloïdes se traduit par une augmentation du stress oxydant intra et extra-cellulaire, la mise en place d'une inflammation chronique et l'activation des cellules microgliales. Ces phénomènes conduisent à la mort des neurones par des mécanismes apoptotiques principalement. Pour combattre cette histoire naturelle de la maladie, les cellules gliales comme les astrocytes jouent un rôle régulateur en absorbant les peptides A $\beta$  et les molécules à l'origine du stress oxydant et de l'inflammation. Par ailleurs, les astrocytes comme les cellules gliales participent à la dégradation des peptides A $\beta$



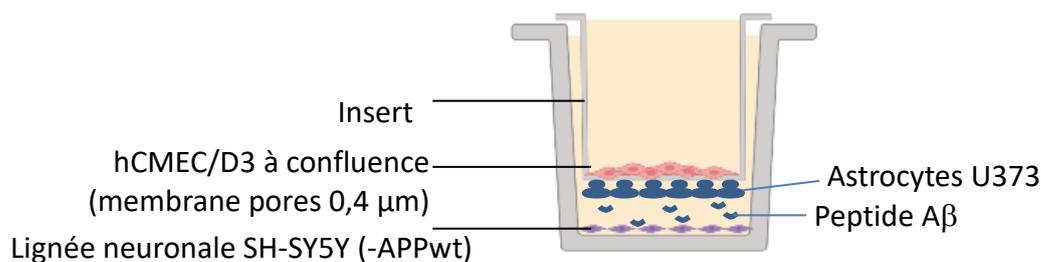


Figure 15 : Modèle de BHE en 3D comprenant des cellules endothéliales (hCMEC), des neurones sérotoninergiques SH-SY5Y et des cellules astrocytaires U373 humaines.

Les astrocytes jouent un rôle primordiale dans l'interface entre le compartiment vasculaire et cérébral en activant les flux moléculaires de molécules nutritionnelles par exemple. Par ailleurs, les astrocytes ont une plus grande résilience face au stress que les neurones et jouent un rôle de détoxification du tissu cérébral comme en catabolisant les peptides Aβ pour éviter leur accumulation.

Par ailleurs pour simuler un modèle cellulaire de la maladie d'Alzheimer (sans origine génétique), nous utiliserons des cellules sérotoninergiques SH-SY5Y sur-exprimant la protéine APP non mutée (SH-SY5Y-APPwt). Des premiers résultats montrent qu'un modèle contenant des cellules hCMEC et SH-SY5Y en co-culture sans contacts (figure 15) est viable. Nous avons également reproduit la même cinétique de perméabilisation après un traitement par du prucalopride que celle observée dans les cellules hCMEC seules. De plus, une co-culture des cellules endothéliales et neuronales ne modifie pas leur survie respective car il n'y a pas d'augmentation de la mort cellulaire du fait de la proximité des 2 lignées cellulaires. Lorsqu'on change des cellules SH-SY5Y par des cellules SH-SY5Y-APPwt, on fait les mêmes observations en dépit du fait que les cellules SH-SY5Y-APPwt présentent un stress oxydant endogène et des phénomènes apoptotiques importants qui auraient pu se propager aux cellules hCMEC et les endommager. Pour compléter notre modèle, l'ajout d'astrocytes est essentiel car ils jouent un rôle d'interface entre le compartiment vasculaire et cérébral en activant le transport de molécules telles que le glucose ou le lactate. Par ailleurs, les astrocytes ont une plus grande résilience face au stress oxydant que les neurones et ils jouent un rôle de détoxification du tissu cérébral en catabolisant les peptides Aβ, ce qui évite leur accumulation dans le parenchyme cérébral (figure 14). C'est pourquoi, nous projetons d'ajouter dans notre protocole de culture une lignée astrocytaire humaine comme les U373 qui sont très utilisées dans la littérature (92). Puis nous proposons de vérifier que le contact entre les cellules hCMEC et astrocytaires ne modifie pas leur phénotype respectif. Enfin, il sera important pour nous de vérifier qu'il existe bien une accumulation de peptide Aβ et de son précurseur, l'APP, dans le

milieu cellulaire du côté simulant le parenchyme intracérébral lorsque la culture se fait en présence des cellules SH-SY5Y-APPwt et que cette accumulation se diffuse aux cellules astrocytaires et hCMEC (figure 15).

A partir de ce modèle 3D, nous souhaitons confirmer les hypothèses suivantes : (1) Le peptide A $\beta$ , lorsqu'il s'accumule dans le compartiment cérébral, traverse la BHE selon différentes modalités, par des transporteurs (LRP1, *lipoprotein receptor related protein-1* et RAGE, *receptor for advanced glycation end products*) ou en péri-cellulaire, après perméabilisation ou rupture de la BHE. Puis les peptides A $\beta$  s'accumulent dans le compartiment vasculaire. (2) L'activation des récepteurs sérotoninergiques, dont le récepteur 5-HT<sub>4</sub>, favorise le passage du peptide A $\beta$  du compartiment neuronal vers le compartiment vasculaire car il augmente la perméabilisation de la BHE. (3) Le système sérotoninergique régule le catabolisme des peptides A $\beta$  en modulant l'expression de différentes protéases dans les cellules neuronales comme dans les cellules astrocytaires. Ces effets, ont déjà été démontrés pour des agonistes des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> et des antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> qui augmentent l'expression de l' $\alpha$ -sécrétase et de métalloprotéases comme la MMP-9 et diminue l'accumulation de plaques amyloïdes au niveau du SNC (55,57,58). Cependant, rien n'est connu sur la capacité de ces récepteurs ni de ces protéases à perméabiliser la BHE pour faciliter l'élimination des peptides A $\beta$  via la circulation sanguine. Une identification plus précise des mécanismes moléculaires mis en jeu, nous permettra de proposer des cibles thérapeutiques complémentaires aux agonistes des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> ou aux antagonistes des 5-HT<sub>6</sub> comme cela est déjà proposé dans la littérature (55). (4) Enfin, les interactions entre les cellules endothéliales, astrocytaires et neuronales permettent une synergie d'action sur l'expression de ces protéases, sur l'action des transporteurs des peptides A $\beta$  mais également permettent d'absorber une partie importante du stress oxydant cellulaire généré par les cellules SH-SY5Y-APPwt et plus généralement l'accumulation des peptides A $\beta$ . Ainsi, nous souhaitons étudier l'évolution du niveau de stress oxydant généré par les cellules SH-SY5Y-APPwt en fonction des capacités d'épuration du modèle de la BHE en 3D vis-à-vis des peptides A $\beta$ . Ce stress endogène devrait diminuer ainsi que les phénomènes apoptotiques qui y sont assujettis, si nous activons les cibles sérotoninergiques (5-HT<sub>4</sub> et/ou 5-HT<sub>6</sub>) et augmentons la clairance d'élimination des peptides A $\beta$ .

Enfin, tous les résultats obtenus grâce au modèle 3D seront vérifiés et confirmés sur un modèle animal de la maladie d'Alzheimer présentant des mutations caractéristiques de la maladie (Souris APPSWE (B6, SJL-Tg)). Par exemple, nous pourrions traiter ces souris transgéniques par un agoniste du récepteur 5-HT<sub>4</sub>, comme du prucalopride à 10 mg/kg, à différents temps de la maladie (présymptomatique ou post symptomatique) pour évaluer les bénéfices du traitement sur les fonctions cognitives des souris et relier ces bénéfices à des mécanismes moléculaires et cellulaires observés dans le modèle 3D.

### **C. Etude des processus physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer impliquant des peptides A $\beta$ extra-cérébraux**

Un stock périphérique de peptide A $\beta$ , existe et se situe principalement dans les muscles squelettiques, le foie et les granules  $\alpha$  plaquettaires (84,93). Certaines micro-angiopathies cérébrales sont associées à des dépôts amyloïdes vasculaires constitués de peptide A $\beta$ . Ces dépôts sont à l'origine de rupture de perméabilité de la BHE qui laissent passer les peptides amyloïdes du compartiment vasculaire vers le compartiment cérébral (93). Par ailleurs, la maladie d'Alzheimer s'associe, dans environ 30% des cas, avec ces angiopathies amyloïdes cérébrales. Toutes ces données laissent penser qu'à l'interface entre les compartiments central et vasculaire, la BHE joue un rôle essentiel dans la régulation du passage du peptide A $\beta$ , dans les deux sens (transport entrant et sortant du SNC) (94). Plusieurs hypothèses existent sur l'origine des peptides A $\beta$  vasculaires et les 2 sources les plus fréquemment avancées sont les plaquettes en lien avec des événements traumatiques cérébraux augmentant le risque de démences et le système digestif en lien avec le microbiote (49,85).

Le système sérotoninergique est un système moléculaire commun aux cellules endothéliales, aux plaquettes et aux neurones (95,96). Ainsi, à partir de notre modèle 3D auquel nous ajouterons des plaquettes activées par la présence de thromboxane ou d'agonistes du récepteur purinergique P2Y<sub>12</sub> dans le milieu, coté compartiment vasculaire (figure 14), nous étudierons les effets de la dégranulation plaquettaire sur la BHE, de manière à comprendre l'importance du peptide A $\beta$  d'origine périphérique dans la maladie d'Alzheimer, et les mécanismes physiopathologiques favorisant l'accumulation de peptide A $\beta$  d'origine périphérique sur l'endothélium vasculaire.

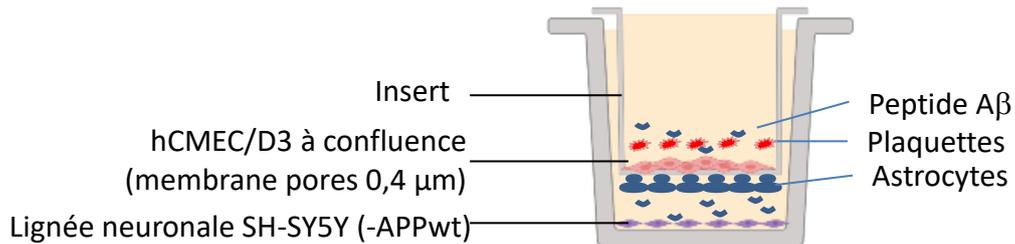


Figure 16 : Modèle de BHE en 3D avec ajout des plaquettes afin de simuler un apport vasculaire en peptide A $\beta$ .

Nos hypothèses sont (1) que la dégranulation des plaquettes va libérer des peptides A $\beta$  dans le milieu cellulaire, mimant le compartiment vasculaire. Ces peptides A $\beta$  vont se déposer à la surface des cellules hCMEC induisant un stress oxydant et une réponse inflammatoire (97). Une augmentation de l'expression de protéases par les cellules endothéliales est également attendue. Toutes ces réactions augmentant la perméabilisation de la BHE par la rupture des jonctions serrées permettront le passage des dépôts amyloïdes vers le compartiment cérébral de la culture cellulaire. (2) Ces phénomènes pourraient être contrecarré par des antagonistes du récepteur 5-HT<sub>4</sub> mais aussi par l'action d'agoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub> en modulant à la baisse l'expression des  $\gamma$ -sécrétases et de certaines protéases (98) et *in fine* limiteraient le passage des peptides A $\beta$  du compartiment vasculaire vers le compartiment cérébral, l'objectif étant de protéger le SNC.

Afin de valider nos résultats obtenus en culture cellulaire, nous utiliserons des modèles animaux présentant des thromboses cérébrales consécutives à des traumatismes cérébraux (99). Ces traumatismes ont pour effet de provoquer des lésions vasculaires, d'activer les plaquettes qui libéreront du peptide A $\beta$ , des granules  $\alpha$ , de la sérotonine des granules denses, et activeront des facteurs de la coagulation. Ces traumatismes répétés vont produire des dépôts amyloïdes d'origine plaquettaire aboutissant à une rupture de la BHE et à l'invasion du SNC. Ce qui aura pour conséquence l'augmentation de l'expression et de l'activité des protéases, du stress oxydant et d'un syndrome inflammatoire et aboutissant à des pertes cognitives similaires à celles observées dans les démences. Nous confirmerons que ces conséquences cognitives peuvent être atténuées après un traitement par des antagonistes et agonistes des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> et 5-HT<sub>6</sub> respectivement. Et nous vérifierons également que

les pistes mécanistiques que nous aurons démontrées au niveau du modèle cellulaire se confirment chez l'animal.

#### **D. Perspectives**

L'apport et la finalité de ces travaux sont de mettre en place de nouveaux outils permettant l'étude de mécanismes complexes. L'apport de modèles cellulaires en 3D, plus proche d'une structure tissulaire, est un atout primordial car il permet d'explorer rapidement et en demandant moins de ressources, de nombreuses hypothèses scientifiques qu'elles soient mécanistiques ou pharmacologiques. Bien entendu, toutes les hypothèses retenues et notamment toutes les stratégies thérapeutiques avancées à partir des modèles cellulaires seront à confirmer dans des modèles animaux caractéristiques de la maladie avant de pouvoir être proposées dans des essais cliniques chez l'homme. En sachant que typiquement la maladie d'Alzheimer est un parent pauvre en termes de traitements efficaces et que pour l'instant la stimulation cognitive reste le seul traitement montrant des résultats positifs, chez les patients, en retardant l'évolution de la maladie.

## V. CURRICULUM VITAE

### 1. ETAT CIVIL

---

Véronique Vilg   épouse Kemmel  
N  e le 19 Avril 1966   Thionville  
Nationalité : Française  
Mari  e, deux enfants

Adresses professionnelles :  
Université de Strasbourg  
Faculté de Médecine, Maïeutique et des Sciences de la Santé  
Centre de Recherche en Biomédecine de Strasbourg (CRBS)  
1 rue Eugène Boeckel  
67085 STRASBOURG  
Tél : +33(0)3 68 24 30 62

Adresse personnelle :  
3 rue de Vincennes  
67 550 ECKWERSHEIM  
Téléphone : 03 88 69 42 72

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire  
Hôpital de HautePierre  
Avenue Molière  
67 098 STRASBOURG Cedex

e-mail : kemmel@unistra.fr  
Tél : +33(0)3 88 12 75 33

### 2. TITRES ET DIPLOMES UNIVERSITAIRES

---

- 1984-1991 : Etudes de Pharmacie à la faculté de Nancy, option Industrie.  
Avril 1990 : Stage de 6  me année de Pharmacie réalisé chez Rhône-Poulenc-Rorer : **Législation internationale : description d'un système de pharmacovigilance.**  
1991 : Admission au concours de l'Internat option Biologie Médicale Inter région Nord-Est.

#### Diplôme d'Etudes Spécialisées.

- 1992 : DES d'Hématologie et DES d'Immunologie.  
1993 : DES de Biochimie, DES d'Organisation, de Gestion et de Droit du Laboratoire et DES de Bactériologie, Virologie  
1994 : DES de Parasitologie  
Avril 1996 : Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie et d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale : Alpha 1 microglobuline : un marqueur des atteintes tubulaires rénales.

#### Maîtrise des sciences Biologiques et Médicales.

- 1993 : C1 de Biochimie générale.  
1994 : C2 de Biochimie Spécialisée : Etude du dosage du NGF chez des enfants nouveau-nés.

#### Diplôme d'Etudes Approfondies.

- 1995 : DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire de Strasbourg : Caractérisation des principaux paramètres de la neuromodulation médiée par le gamma-hydroxybutyrate dans les cellules NCB-20.

#### Thèse d'Université.

- 11/10/1999 : Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Strasbourg en Neurosciences : Etude de la nature des signaux induits par le récepteur du  $\gamma$ -hydroxybutyrate et modalités de sa désensibilisation.

#### Habilitation   Diriger des Recherches.

Mars 2020 : Avis favorable du conseil scientifique de l'UdS : Rôle du  $\gamma$ -hydroxybutyrate et de la sérotonine dans la maladie d'Alzheimer. Date prévisionnelle 1er semestre 2021.

### 3. PARCOURS PROFESSIONNEL

1991-1996 : Interne des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg  
1995 : Lauréat de la médaille d'or des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg  
1996 : Attaché des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg  
1997 : Assistant Hospitalo-universitaire  
2000 : Maître de Conférences des Universités / Praticien Hospitalier

#### **Actuellement Maître de Conférences des Universités / Praticien Hospitalier**

Rattachée au :

- Laboratoire de pharmacologie et toxicologie neurocardiovasculaire - EA 7296  
Directeur : Pr L. Monassier
- Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire. (Chef de Service : Pr J.M. Lessinger)
  - Biologiste responsable de l'UF 6443 intitulé analyses spécialisées
  - Responsable du secteur Suivi Thérapeutique du Laboratoire
  - Coresponsable du secteur du Diagnostic et Suivi des Maladies Métaboliques
  - Responsable Qualité du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire sur le site de Hautepierre
  - Pilote du processus analytique du Pole de Biologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

### 4. ACTIVITE DE RECHERCHE.

1995-2000 : Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire des Interactions Cellulaires, UPR 416 CNRS, Directeur : Pr G. Vincendon  
2001-2010 : Physiopathologie du Système Nerveux, INSERM U575, Directeur : Dr D. Aunis  
2008-2009 : Mobilité : UMR 7561, CNRS-Université Henri Poincaré Nancy I, Faculté de Médecine Directeur : Dr. J. Magdalou : Caractérisation et étude de la régulation de l'activité UGT dans les cellules du système nerveux central.  
2011-2016 : Biopathologies de la myéline, Neuroprotection et Stratégies Thérapeutiques INSERM U1119, Directeur Pr. G.A. MENSAH-NYAGAN  
2017 : Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Neuro-Cardiovasculaire EA 7296, Directeur : Pr. L. Monassier.

### 5. ENCADREMENT

Etudiants en BTS/IUT : stage de 8 semaines au laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire.

- Chaque année, nous accueillons entre 1 à 2 étudiants en BTS, IUT de différentes origines (Strasbourg 3 lycées et 2 IUT, Luxeuil les Bains, Leuven...).
- Chaque étudiant a un projet ciblé concernant une mise au point ou une validation de méthode analytique.

Etudiants en stage M2/S4 de différents Masters.

2012 : **Analyse des médicaments** : Mélissa Tatlot : Validation d'une méthode HPLC de dosage de l'urapidil.  
2013 : **Neurosciences** : Guillaume Wendt : Etude des effets neuroprotecteurs du GHB dans un modèle cellulaire de la maladie d'Alzheimer  
2014 : **Analyse du médicament** : Hassiba Outilaft : Validation d'une méthode LC/MS<sup>2</sup> de dosage des immunosuppresseurs

- 2015 : **Neurosciences** : Cédric Castelin : Etude du stress du réticulum dans le modèle de souris Jimpy
- 2016 : **Pharmacocinétique de l'université Aix-Marseille** : Guillaume Becker : Développement d'outils pharmacocinétique de suivi thérapeutique du Busulfan chez l'enfant.
- 2018 : **Pharmacocinétique de l'université Aix-Marseille** : Naomi Sabo : De la validation de la méthode de dosage à l'étude pharmacocinétique de l'hydroxyurée dans une population pédiatrique drépanocytaire.
- 2021 : **Biomédecine** : Emma Filaudeau : Etude du rôle du système sérotoninergique dans les processus inflammatoires du tissu pulmonaire grâce à la lignée THP-1

Direction de Thèse de fin de cycle en Pharmacie :

- 2010 : Koch-Mathian Caroline : *Mise au point d'un protocole de dosage de l'Hydroxychloroquine (Plaquenil®) par HPLC/PDA pour le suivi thérapeutique du lupus.*
- 2013 : Raphael Gaspar : *Ropivacaïne : un élément clé dans la récupération rapide lors de la pose d'une prothèse totale du genou.*
- 2017 : Sarah Betoum : *Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'ulipristal.*
- 2018 : Claire Brugerol : *Mise au point d'une méthode de dosage plasmatique du ganciclovir par méthode HPLC et analyses cliniques des premiers résultats*
- 2018 : Rodrigue Tankeu Njamen : *Suivi thérapeutique de l'administration de mitomycine dans le cadre de la chirurgie hyperthermique intrapéritonéale.*
- 2019 : Hélène Hamm : *L'hypertension artérielle résistante : l'intérêt de la recherche d'antihypertenseurs dans l'évaluation de l'observance*
- 2021 : Naomi Sabo : *Etude pharmacocinétique de la nicotine après vapotage de deux liquides pour cigarette électronique : les premiers résultats de l'étude clinique vapexp'air*

Direction de Mémoire de Diplômes d'Etudes Spécialisées en Biologie Médicale :

- 2013 : Sébastien Ganel : *Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'urapidil dans le sérum et le lait maternel : étude pharmacocinétique dans le traitement de la pré-éclampsie.*
- 2013 : Cathy Baralon : *Ropivacaïne : Validation d'une méthode de dosage par HPLC dans le cadre d'études pharmacocinétiques en chirurgie orthopédique et thoracique.*

Co-direction de Thèse d'Université (PhD) : :

- 2014: Guillaume Wendt : co-tutelle avec la Faculté de Saarbrücken : *Assessment of neuroprotective effects of gamma-hydroxybutyrate and neurosteroids on cellular models of Alzheimers disease.*
- 2017 : Anne Sophie Wilding : *Décryptage des mécanismes moléculaires à l'origine de la mort des oligodendrocytes et des neurones dans le cadre des pathologies dysmyélinisantes : intérêts des neurostéroïdes comme traitement.*
- Prévue 2021 : Guillaume Becker : *Homéostasie cérébrale et maladie d'Alzheimer : étude de l'implication des récepteurs sérotoninergiques dans l'accumulation cérébrale du peptide  $\beta$ -amyloïde.*
- Prévue 2022 : Naomi Sabo : *Etude in vitro et in vivo du rôle du système sérotoninergique dans la réponse pro-inflammatoire et dans le stress oxydatif pulmonaire suite à l'exposition à la cigarette et aux systèmes de vapotage*

## 6. DEMANDE DE FINANCEMENT POUR LA RECHERCHE

---

### Etudes Cliniques achevées

- **PHRC 5277** - Analgésie postopératoire après thoracotomie sans péridurale thoracique : intérêt du cathéter cicatriciel associé à une analgésie morphinique autocontrôlée. Investigateur : Dr. O. Helms. Analyse pharmacocinétique réalisée par V. Kemmel
- **PRI 5615** - Validation d'un modèle cinétique de l'Erlotinib. Investigateur : Pr E. Quoix Analyse pharmacocinétique réalisée par V. Kemmel
- **PHRC 6001 UPACOMT** - Effet à long terme et tolérance d'UliPristal Acétate dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 1A (UPACOMT). Investigateur : Dr. N. Collonges. Analyse pharmacocinétique réalisée par V. Kemmel

### Etudes en cours

- **PRI 5560 Glasgow** - Anesthésie locale continue versus bloc nerveux fémoral continu après prothèse totale de genou unilatérale : impacte sur la durée moyenne d'aptitude à la sortie d'hospitalisation du patient. Investigateur : Dr. J.Y. Jenny Analyse pharmacocinétique réalisée par V. Kemmel
- **PRI 2016 – HUS N°6911** - Etude pharmacocinétique de la nicotine et identification de molécules absorbées et/ou transformées par le sujet lors du vapotage de liquide pour vaporette : Investigateurs Dr D.Brumaru, Dr V. Kemmel, Dr C. Mutter, Pr A. Charloux.
- **Etude DisCoVeRy – C20-15** - Etude multicentrique, randomisée, adaptative, de l'efficacité et de la sécurité des traitements des patients adultes hospitalisés pour une infection COVID-19. Participation sur la partie pharmacologique de l'étude (Lopinavir/Ritonavir /Hydroxychloroquine)

### Projet (mise en place)

- Optimisation de la prise en charge des patients drépanocytaires traités par hydroxyurée : Evaluation de l'intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique PRI Investigateur : Dr. Charlotte Nazon, Dr V. Kemmel

**2014-2016 :** DOSIMED : Demande d'Aide aux projets de Projet collaboratif entre les HUS et l'entreprise Alsachim. Financement total 3 000 k€

⇒ Financement HUS par la Région/Eurométropole (500 k€).

**2020-2022 :** DOSILAB : Demande d'Aide aux projets de Recherche & Développement (R&D) et d'Innovation Grandes entreprises. Projet collaboratif entre les HUS et l'entreprise Alsachim. Financement total 1 300 000 k€

⇒ Financement HUS par la Région/Eurométropole (250 k€ d'équipement + Mise à disposition de personnels par la société Alsachim).

### Financement ANR :

AAP - Tabac 2019 : Impacts clinico-biologiques des systèmes électroniques de délivrance de nicotine sur la barrière broncho alvéolo capillaire et l'évolution de la bronchopneumopathie chronique obstructive : Séro-BPCO. (50 k€)

## 7. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

---

### FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

#### DFGSM2 : (CM = 13H)

UE APPAREIL LOCOMOTEUR :

1H Métabolisme des bases puriques et l'acide urique

UE REVETEMENT CUTANE :

1H Métabolisme de la mélanine

UE HORMONOLOGIE, REPRODUCTION ET NUTRITION :

1H Catabolisme des acides aminés et cycle de l'urée

1H Protéines sériques

- 1H Biosynthèse des hormones thyroïdiennes et sa régulation / Aspects physiologiques, biochimiques et pharmacologiques
- 1H Biosynthèse et régulation des hormones de l'hypophyse (ADH, hormone de croissance, prolactine)
- 1H Séméiologie des dysfonctions hypophysaires-2 : biologique
- UE REIN ET VOIES URINAIRES :
  - 1H Séméiologie biochimique rénale, ionogramme
  - 1H Protéines sériques et urinaires
- UE SYSTEME NEUROSENSORIEL
  - 3H Biochimie de la synapse et des neurotransmetteurs
  - 1H Glycoprotéines et biosynthèse de la myéline

**DFGSM3 : (CM = 1H)**

- UE TISSU SANGUIN ET SYSTÈME IMMUNITAIRE
  - 1H Métabolisme de la vitamine B12 et de l'acide folique

**DFASM1 et DFASM2 (CM = 2H)**

- Module à option "STRATEGIE DES EXAMENS DE LABORATOIRE"
  - Coordonnateur du Module
  - 1H Introduction : Intérêt de la notion de stratégie en exploration biologique
  - 1H Stratégie de l'exploration biologique des urgences neurologiques
- Stage : Laboratoire de Recherche de 15 demi-journées : 5 étudiants/an

**FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG**

- Etudiants de l'Université Internationale Abulcasis des Sciences de la Santé (UIASS) de Rabat (pharma, 4<sup>ème</sup> année) dans le cadre d'une convention pour un stage « découverte » au sein pôle de bio des HUS
  - => Présentation de la plateforme de Chromatographie / Spectrométrie de Masse du Pole de Biologie des HUS. Intérêt dans le suivi thérapeutique et le diagnostic des maladies métaboliques.

**FORMATIONS PARAMEDICALES**

- Co-Coordinateur des UE 2.1 et 2.2 des IFSI d'Alsace (11 IFSI) : Objectif de la mise en place de cours inversés sur les 11 IFSI avec cours enregistrés, TD et évaluations mis en communs.

**S1 : UE 2.1 et 2.2 : Institut de Formation en Soins Infirmiers : (CM enregistrés=10H)**

10H : CM enregistrés en vidéo (MOOC) pour UE 2.1 et 2.2 dans le cadre d'un projet de classe inversée prévue pour l'année 2020-2021 (Mais la date sera certainement reportée en raison du Covid-19).

**S6 : UE 3.4 : Initiation à la démarche de recherche : Institut de Formation en Soins Infirmiers de Brumath et de Haguenau : (CM=14H, Visite labo=12H)**

- 1H : Organisation de la recherche clinique en France
- 2H : Le laboratoire d'Analyses Médicale (son organisation, focus sur le processus pré-analytique, ses obligations Normative)
- 3 Matinées : Visite du Laboratoire de Biochimie des étudiants de l'IFSI par petits groupes
- 4H : Lecture critique d'article en groupe de travail

**S1 : UE 2.1 : Orthophonie (CM = 20) (responsable d'UE)**

U.E. 2.1 Notions de biologie cellulaire, moléculaire et génétique :

- De l'atome à la molécule : les briques de base de la cellule
- Organisation dans la cellule et organisation des cellules entre elles (notion de tissus et exemples)
- Fonctionnement d'une cellule
- Vie et mort d'une cellule
- La multiplication cellulaire, développement embryonnaire et les mécanismes de transmission génétique
- La physiologie du Système Nerveux : transmission synaptique

- Mécanismes physiopathologiques impliqués dans les pathologies nécessitant une rééducation orthophonique

**S1 : UE 1 : Orthoptie (CM = 20 et TD=6H) enseignement distanciel** car étudiants de la région Grand Est (responsable d'UE)

UE 1 : Biologie moléculaire et cellulaire, génétique:

- ❖ Biologie moléculaire
  - Biomolécules, notions de bioénergétique, notions de base du métabolisme et génome
- ❖ Biologie cellulaire
  - La cellule et les tissus et organisation des appareils et systèmes
  - Généralités sur la cellule - Membrane plasmique et transport trans-membranaire - Système
  - endomembranaire et trafic intracellulaire – Cytosquelette – Mitochondries et peroxysomes – Structure et
  - organisation fonctionnelle du noyau cellulaire – Matrice extracellulaire
  - Vie cellulaire : division – prolifération – différenciation – apoptose
- ❖ Notions de génétique
  - Chromosomes et caryotype
  - Bases de l'hérédité
- ❖ Histologie générale
  - Les tissus fondamentaux, épithéliums et tissus conjonctifs, les tissus nerveux, les tissus musculaires.

#### **ENSEIGNEMENTS EN MASTER :**

Master de Neurosciences (M2/S3) et Master de Physiopathologie : de la Molécule à l'Homme (M1/S1)

Coordinateur de l'Unité d'enseignement NCGM ; Neuropathologie Clinique, Génétique et Moléculaire (3 ECTS)  
 2H Migraines,  
 2H Dépression,  
 2H Anxiété,  
 2H Pathologies de la Myéline.

Master de Physiopathologie : de la Molécule à l'Homme (M1/S1) :

Médecine Personnalisée en Transplantation Humaine : 2H Suivi thérapeutique en transplantation humaine

#### **ENSEIGNEMENTS DE 3<sup>ème</sup> CYCLE :**

Enseignements en DES de Biologie Médicale :

- Spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire : **Rendez-vous pédagogiques (CM = 20H)**
- Biochimie des intoxications : Alcool, CO, Stupéfiants
- Stratégie de prescription ou comment atteindre la « Juste Prescription »
- Gestion des contrôles qualité au laboratoire
- Suivi thérapeutique pharmacologique
- Méthodes chromatographiques
- Validation de méthodes
- D'Organisation, de Gestion et de Droit du laboratoire (OGD) (CM = 6H)
- 2H Ethique en Biologie Médicale
- 6H Processus Analytique et Accréditation (Contrôles Qualité + Validation méthode + Gestion Portée Flexible)

#### **ENSEIGNEMENTS FORMATION CONTINUE :**

- Pole de biologie des HUS (**16H annuelles - 2 sessions/an**)
- 2H Processus Analytique : Contrôles Qualité
- 2H Validation de méthode niveau 1

- 2H Validation de méthode niveau 2
- 2H Gestion de portée flexible

## 8. Activités de diagnostic et de soins

Actuellement, Biologiste au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire (LBBM) de l'Hôpital de Hautepierre, j'y suis également responsable de l'UF « analyses spécialisées ». Ce Laboratoire représente une production annuelle de 2 millions d'actes (34 millions de B), un personnel de 14 biologistes et de 40 personnels non médical. L'UF « analyses spécialisées » se constitue de 3 biologistes, 9 ETP techniciens et regroupe 2 thématiques :

- Suivi Thérapeutique Pharmacocinétique (38 199 actes en 2019)
- Diagnostic des Maladies Métaboliques hors dépistage néonatal (12 256 actes en 2019)

### **Biologiste au LBBM secteur Urgences - Gardes**

En tant que Biologiste signataire du LBBM, je participe aux astreintes et aux gardes du Laboratoire. Cela représente :

- 1 journée de signature/semaine (responsabilité du laboratoire d'urgence garde sur la journée). Cette activité, m'amène à libérer les résultats de l'activité d'urgence et de routine du Laboratoire de Biochimie en temps réel la journée et lors de la permanence des soins.
- 1 astreinte opérationnelle /semaine
- 1 week end/ jour férié de garde toutes les 6 semaines

Cette approche de terrain, nous permet de mieux appréhender les difficultés organisationnelles et techniques liées à la garde mais plus généralement à l'activité du laboratoire de biochimie générale.

### **Responsabilités en Qualité dans le pole de Biologie**

#### **Pilote du Processus Analytique du pole de Biologie**

Chaque processus du pole de biologie, est piloté par un biologiste. Mes activités en tant que Pilote du processus analytique étant de :

- Mettre en œuvre les objectifs et la démarche qualité pour le processus
- Formations adaptées à la compréhension du processus (Validation méthodes, gestion portée flexible => 6H par semestre pour les « nouveaux entrants »).
- Assurer la gestion de portée flexible des EBM et EBMD des HUS (Audits documentaires ou paillasse...),
- S'assurer de la mise en œuvre et du maintien du processus par la mise en place et le suivi de documents polaires
- Mettre en œuvre une amélioration continue du processus par des audits polaires ou dans les laboratoires
- Surveiller et mesurer le processus par des indicateurs (ex : Nombre d'EBM accréditée/ nombre d'EBM total pour le processus analytique ou nb d'EEQ conforme/ nb total d'EEQ)
- Réaliser une revue de processus annuelle
- Réaliser des analyses de risques à priori et à posteriori pour le processus
- Participation et animation (si nécessaire) des réunions de co-pilotage du processus et du Groupe Qualité du Laboratoire.

#### **Responsable qualité du LBBM sur le site de Hautepierre**

Chaque laboratoire du pole de biologie a un biologiste nommé Responsable Qualité (RQ), dont les activités sont de :

- Promouvoir la Qualité auprès du personnel, des clients et des prestataires de service du laboratoire

- S'assurer de la mise en œuvre et du maintien du Système de Management de la Qualité (SMQ) soit plus de 1300 documents au sein du LBBM de Haute-pierre et assurer l'amélioration continue de ce SMQ par des audits réguliers (trimestriel)
- Mettre en œuvre les objectifs et la politique qualité du pôle de biologie.
- Surveiller et mesurer les performances du SMQ (délai de révision de doc), des prestations du laboratoire (délai de rendu de résultats, ...)
- Maîtriser la documentation interne et externe
- Réaliser des analyses de risques à priori et à posteriori pour le processus (Analyse des événements indésirables...)
- Participer aux réunions du Groupe Qualité du Laboratoire

Le Laboratoire du CHU est accrédité depuis Novembre 2015 et 84% des Examens de Biologie Médicale sont réalisés sous accréditation.

## **Responsable de l'UF 6443 : Analyses Spécialisées et de la Plateforme de Chromatographie / Spectrométrie de Masse**

L'UF 6443 intitulée « Analyses Spécialisées », est d'abord un secteur d'activité technique « LC/GC/MS » qui regroupe plusieurs disciplines en biologie Médicales :

- Suivi Thérapeutique des Médicaments par Pharmacocinétique (TDM)
- Biochimie Spécialisée (maladies métaboliques).

Dans ce secteur, nous sommes 4 biologistes et 9 ETP techniciens. La production de ce secteur représente plus de 50 000 actes sur l'année. Ce secteur a été initié en 1998 après ma nomination en temps qu'AHU et a une progression annuelle variant entre 10 et 25% selon les années du nombre d'acte. Notre activité se développe du fait de l'intérêt grandissant de la médecine personnalisée qui permet des économies de prescriptions médicamenteuses et une prise en charge de patient plus rationalisée.

Mon objectif en tant que responsable de cette UF est de progressivement la transformer en le plateau technique des HUS de Chromatographie/Spectrométrie de masse et de lui donner une visibilité en recherche et développement. C'est pourquoi, nous sommes impliqués depuis 2010 dans un certain nombre de PHRC qui commencent à fournir leurs fruits en termes de publications cliniques et de visibilité scientifique. L'objectif est également que ce secteur soit perçu comme un plateau technique ouvert aux laboratoires universitaires ou industriels.

L'objectif étant d'avoir une reconnaissance locale, nationale voir internationale. Nous participons avec les cliniciens à des réseaux impliqués dans le suivi thérapeutique.

### **9. Responsabilités collectives**

#### **Responsabilités administratives universitaires**

- Membre de la commission Parcoursup permettant le classement des dossiers déposés dans la filière Santé et Sciences de la Terre (500 dossiers)
- IFSI Brumath : Correspondant pédagogique pour l'Université de Strasbourg.
- Correspondant pédagogique des IFSI d'Alsace pour les UE 2.1 et 2.2 (en lien avec Samy Tahla pour la partie physiologie)
- Coordinateur de plusieurs enseignements dans les formations paramédicales
  - Orthophonie – UE 2.1
  - Orthoptie – UE 1
- Coordinateur de plusieurs enseignements de faculté de médecine et de sciences.
  - DFGSM2 - UE8 - Système neuro-sensoriel
  - DFASM1 et 2 - MO21- Stratégie des Examens de Laboratoire
  - NCGM : Neuropathologie Clinique, Génétique et Moléculaire
    - Master de la Molécule à l'Homme M1/S1
    - Master Neurosciences M2/S3

#### **Responsabilités universitaires : Jury de travaux de fin d'études**

- Bachelor-Arbeit (Faculté de Saarbrücken):
  - o 2013 : Caroline Bost : *"Die Rolle der GABA-Rezeptoren bei GHB vermittelten Effekten in der Honigbiene (Apis mellifera)"*
- Thèse de fin d'étude en Pharmacie :
  - o 2016 : Henri Foulagar : *Etat des lieux de l'administration par voie pulmonaire et des recherches galéniques permettant une amélioration du dépôt pulmonaire de particules inhalées*
- Thèse de fin d'étude en Médecine :
  - o 2013 : Su Degirmenci : *Analgésie postopératoire après thoracotomie sans péridurale thoracique : intérêt du cathéter cicatriciel associé à une analgésie morphinique autocontrôlée.*
- Mémoire d'Etudes Spécialisées de Pharmacie Hospitalière :
  - o 2015 : Ludovic Sylvestre : *Intérêt du dosage du taux résiduel de ganciclovir en prophylaxie chez les transplantés pulmonaires*
- Thèse d'Université en Sciences de la Vie
  - o 2013 Nancy : Sarah El chakour el hajj chehadeh : *Conséquence d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur l'expression des protéines clés de la neurostéroïdogénèse chez le rat.*
  - o 2016 Lille: *Mise en évidence de l'implication d'une mort cellulaire dépendante du fer, la ferroptose, dans des modèles de la maladie de Parkinson.*
  - o 2017 Nancy : Khalid Mimoun : *Effets de la carence en vitamine B12 au niveau cérébral chez le modèle murin invalidé pour le gène CD320 : approche comportementale et mécanismes moléculaires de l'apprentissage hippocampo-dépendant.*

## 10. Liste des Travaux et Publications

\* Travaux résultant de l'encadrement d'étudiants.

### a) Publications en voie de finalisation :

1. \*Sabo A.N., \*Becker G., Nazon C., Lessinger J.M., Paillard C., Kemmel V. Hydroxyurea in sickle cell disease: Implementation and validation of a GC-MS quantification method in plasma and stability information in whole blood, plasma and water *Analytical Chimica Acta*
2. \*Becker G., Spiegel A., \*Sabo A.N., Tatlot M., Levêque D., Gourieux B., Lessinger J.M., Paillard C., Kemmel V. Busulfan Therapeutic Drug Monitoring: simple, reliable and effective tool to optimize effectiveness and reduce toxicity of children in different conditioning regimens *Pediatric transplantation*
3. \*Becker G., \*Sabo A.N., Lefevre P., Lessinger J.M., Kemmel V. Co-administration of mtor inhibitors and carbamazepine in tuberous sclerosis complex: a case report and Literature Review. *Anticancer Research*

### b) Publications (1-53)

1. \*Sabo, A.-N.; Jannier, S.; Becker, G.; Lessinger, J.-M.; Entz-Werlé, N.; Kemmel, V. Sirolimus Pharmacokinetics Variability Points to the Relevance of Therapeutic Drug Monitoring in Pediatric Oncology. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 470.
2. Stefania Kokkali, David Ternant, Véronique Kemmel, Dominique Levêque, Frédérique Wendling, Philippe Barthelemy, Jean-Emmanuel Kurtz. Intravenous and subcutaneous administration of trastuzumab in a patient on peritoneal dialysis. *British Journal of Clinical Pharmacology* Accepted.
3. Jannier S., Kemmel V., \*Sabo A.N., Koob M., Farace F., Pencreach E., Geoerger B., Aerts I., Frappaz D., Leblond P., André N., Perel Y., Corradini N., Rubie H. Guenot D. and Entz-Werle N. Phase I study of daily rapamycin administration and biweekly intra-venous irinotecan (RAPIRI) in children with a relapsed or refractory malignant solid tumor-a report from the Société Française des Cancers et leucémies de l'Enfant et de l'adolescent (SFCE). *Cancer* **2020**, *12*, 3051-71.

4. Beauvieux MC, Bérard AM, Aimone-Gastin I, Barbé F, Barguil Y, Collin-Chavagnac D, Delacour H, Delevallée C, Nivet-Antoine V, Peoc'h K, Poupon C, Schmitt F, Piéroni L, Sapin V; Membres du Groupe de travail SFBC « Marqueurs biochimiques de COVID-19 »; Sous-groupe Privés; Sous-groupe Outre-Mer (OM)/francophonie; Sous-groupe CH; Sous-groupe Hôpitaux d'instruction des armées (HIA); Sous-groupe CHU Nord-Est; Sous-groupe CHU Ouest; Sous-groupe CHU Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP); Sous-groupe CHU Sud; Sous-groupe CHU Auvergne Rhône-Alpes-Bourgogne Franche-Comté (ARA-BFC). [SFBC working group "Biochemical markers of COVID-19"]. *Ann Biol Clin (Paris)*. **2020**, *78* (3), 269-277.
5. Poinsignon V, Faivre L, Nguyen L, Neven B, Broutin S, Moshous D, Bourget P, Dufour C, Dalle JH, Galambrun C, Devictor B, Kemmel V, De Berranger E, Gandemer V, Vannier JP, Jubert C, Bondu S, Mir O, Petain A, Vassal G, Paci A. New dosing nomogram and population pharmacokinetic model for young and very young children receiving busulfan for hematopoietic stem cell transplantation conditioning. : *Pediatr Blood Cancer*. **2020**, *67*, e28603.
6. Nazon C, \*Sabo A-N, \*Becker G, Lessinger J-M, Kemmel V, Paillard C. Optimizing Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Disease Patients: The Pharmacokinetic Approach. *J Clin Med*. **16 oct 2019**, *8*, 1-10.
7. Poisbeau P, Aouad M, Gazzo G, Lacaud A, Kemmel V, Landel V, et al. Cholecalciferol (Vitamin D3) Reduces Rat Neuropathic Pain by Modulating Opioid Signaling. *Mol Neurobiol*. **oct 2019**; *56*, 7208-21.
8. \*Wilding, A.-S.; Patte-Mensah, C.; Taleb, O.; Brun, S.; Kemmel, V.; Mensah-Nyagan, A.-G. Protective effect of 4-Phenylbutyrate against proteolipid protein mutation-induced endoplasmic reticulum stress and oligodendroglial cell death. *Neurochem. Int*. **2018**, *118*, 185–194.
9. Taleb, O.; Patte-Mensah, C.; Meyer, L.; Kemmel, V.; Geoffroy, P.; Miesch, M.; Mensah-Nyagan, A.-G. Evidence for effective structure-based neuromodulatory effects of new analogues of neurosteroid allopregnanolone. *J. Neuroendocrinol*. **2018**, *30*.
10. Cordeanu, E.-M.; Gaertner, S.; Faller, A.; Mirea, C.; Lessinger, J.-M.; Kemmel, V.; Stephan, D. Rifampicin reverses nicardipine effect inducing uncontrolled essential hypertension. *Fundam Clin Pharmacol* **2017**, *31*, 587–589.
11. Duval, C.Z.; Goumon, Y.; Kemmel, V.; Kornmeier, J.; Dufour, A.; Andlauer, O.; Vidailhet, P.; Poisbeau, P.; Salvat, E.; Muller, A.; et al. Neurophysiological responses to unpleasant stimuli (acute electrical stimulations and emotional pictures) are increased in patients with schizophrenia. *Sci Rep* **2016**, *6*, 22542.
12. \*Jannier, S.; Kemmel, V.; Koob, M.; Pencreach, E.; Geoerger, B.; Aerts, I.; Frappaz, D.; Leblond, P.; Andre, N.; Perel, Y.; et al. Rapiri Phase I Study Associating Rapamycin and Irinotecan in Children with Refractory Malignant Solid Tumors: Good Tolerance and Promising Results in Brain Tumors and Sarcomas. *Pediatr. Blood Cancer* **2016**, *63*, S8–S9.
13. \*Jannier, S.; Kemmel, V.; Koob, M.; Farace, F.; Pencreach, E.; Geoerger, B.; Aerts, I.; Faure-Contier, C.; Leblond, P.; Andre, N.; et al. Rapiri I - Phase I Study of Daily Oral Rapamycin and Intravenous Irinotecan in Children with a Recurrent/Refractory Malignant Solid Tumor: Good Tolerance and Promising Results in Brain Tumors - a Report from the Societe Franc, Aise Des Cancers Et Leucemies De L'enfant Et De L'adolescent (sfce). *Neuro-Oncology* **2016**, *18*, 26–26.
14. Pottecher, J.; Kindo, M.; Chamaroux-Tran, T.-N.; Charles, A.-L.; Lejay, A.; Kemmel, V.; Vogel, T.; Chakfe, N.; Zoll, J.; Diemunsch, P.; et al. Skeletal muscle ischemia-reperfusion injury and cyclosporine A in the aging rat. *Fundam Clin Pharmacol* **2016**, *30*, 216–225.
15. Kemmel, V.; Mercoli, H.-A.; Meyer, N.; Brumaru, D.; Romain, B.; Lessinger, J.-M.; Brigand, C. Mitomycin C Pharmacokinetics as Predictor of Severe Neutropenia in Hyperthermic Intraperitoneal Therapy. *Ann. Surg. Oncol*. **2015**, *22 Suppl 3*, S873-879.
16. Suarez, F.; Bourget, P.; Alessandrino, E.P.; Bartoli, A.; Socie, G.; Michallet, M.; Bourhis, J.; Paci, A.; Blaise, D.; Berceanu, A.; Kemmel, V. et al. Final results of a prospective multicenter phase II study using Busulfan AUC intensification in AML patients undergoing allogeneic HSCT in first complete remission. *Bone Marrow Transplant*. **2015**, *50*, S227–S227.

17. Pape, E.; Scala-Bertola, J.; Petitpain, N.; Jouzeau, J.Y.; Charrois-Sciaudeau, S.; Kemmel, V.; Barraud, H.; Gambier, N. Management of Telaprevir-Tacrolimus drug-drug interaction in a liver transplant patient with hepatitis C virus: Practical considerations. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2015**, *29*, 35–35.
18. Pape, E.; Scala-Bertola, J.; Petitpain, N.; Jouzeau, J.-Y.; Charrois-Sciaudeau, S.; Kemmel, V.; Barraud, H.; Gambier, N. Management of Tacrolimus-Telaprevir Drug-Drug Interaction in a Liver Transplant Patient With Hepatitis C Virus: Practical Considerations. *Transplantation* **2015**, *99*, e163-164.
19. Pottecher, J.; Chamaroux-Tran, T.-N.; Charles, A.-L.; Bouitbir, J.; Minh, T.H.; Hengen, M.; Kemmel, V.; Zoll, J.; Diemunsch, P.; Geny, B. Cyclosporine a Does Not Protect Hind Limb Skeletal Muscle from Ischemia-Reperfusion Injury in the Aging Rat but Further Exacerbates Local and Remote Oxidative Stress. *Acta Physiol.* **2015**, *214*, 62–63.
20. \*Puel, M.A.; Kemmel, V.; Spiegel, A.; Lutz, P.; Lessinger, J.M.; Paillard, C. Comparative pediatric study of two modalities of administration of intravenous Busulfan (Bu) : four-times-daily versus once daily schedule. *Bone Marrow Transplant.* **2015**, *50*, S257–S258.
21. Paci, A.A.; Neven, B.B.; Poinsignon, V.V.; Faivre, L.L.; Bourget, P.P.; Broutin, S.S.; Dufour, C.C.; Dalle, J.-H.J.; Galambrun, C.C.; Devictor, B.B.; Kemmel, V. et al. Pharmacokinetics/Pharmacodynamic Relationship in Busulfan Conditioning Regimen: Results from a Large Pediatric Cohort Undergoing Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Blood* **2014**, *124*.
22. \*Wendt, G.; Kemmel, V.; Patte-Mensah, C.; Uring-Lambert, B.; Eckert, A.; Schmitt, M.J.; Mensah-Nyagan, A.G. Gamma-hydroxybutyrate, acting through an anti-apoptotic mechanism, protects native and amyloid-precursor-protein-transfected neuroblastoma cells against oxidative stress-induced death. *Neuroscience* **2014**, *263*, 203–215.
23. Suarez, F.; Bourget, P.; Alessandrino, E.P.; Regazzi, M.; Socie, G.; Michallet, M.; Guitton, J.; Wittnebel, S.; Paci, A.; Blaise, D.; Kemmel, V. et al. High AUC intensity with once-daily IV BuCy2 as myeloablative conditioning regimen prior to HSCT for adult AML patients in first complete remission. *Bone Marrow Transplant.* **2013**, *48*, S384–S385.
24. Taleb, O.; Maammar, M.; Brumaru, D.; Bourguignon, J.-J.; Schmitt, M.; Klein, C.; Kemmel, V.; Maitre, M.; Mensah-Nyagan, A.G. Xanthurenic acid binds to neuronal G-protein-coupled receptors that secondarily activate cationic channels in the cell line NCB-20. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48553.
25. Paci, A.; Vassal, G.; Moshous, D.; Dalle, J.-H.; Bleyzac, N.; Neven, B.; Galambrun, C.; Kemmel, V.; Abdi, Z.D.; Broutin, S.; et al. Pharmacokinetic behavior and appraisal of intravenous busulfan dosing in infants and older children: the results of a population pharmacokinetic study from a large pediatric cohort undergoing hematopoietic stem-cell transplantation. *Ther Drug Monit* **2012**, *34*, 198–208.
26. Suarez, F.; Bourget, P.; Michallet, M.; Guitton, J.; Socie, G.; Alessandrino, E.; Regazzi, M.; Wittnebel, S.; Paci, A.; Blaise, D.; Kemmel, V. et al. Preliminary results of an AUC intensification strategy with once daily Busilvex (R) in patients with AML in CR 1 undergoing allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* **2012**, *47*, S98–S98.
27. Scholler, J.; Leveque, D.; Kemmel, V.; Nivoix, Y.; Fornecker, L.-M.; Beretz, L.; Herbrecht, R. Bigeminism due to an interaction between voriconazole, esomeprazole and methadone. *Int. J. Clin. Phar.* **2011**, *33*, 289–290.
28. Scholler, J.; Nivoix, Y.; Herbrecht, R.; Kemmel, V.; Levêque, D. Ventricular bigeminy associated with voriconazole, methadone and esomeprazole. *Int J Clin Pharm* **2011**, *33*, 905–908.
29. Abdi, Z.D.; Paci, A.; Moshous, D.; Dalle, J.-H.; Bleyzac, N.; Neven, B.; Galambrun, C.; Kemmel, V.; Petain, A.; Broutin, S.; et al. Screening for Potential Covariates Influencing the Pharmacokinetics of Intravenous Busulfan: Results From a Large Pediatric Cohort Undergoing Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Blood* **2010**, *116*, 757–757.
30. Charlet, A.; Muller, A.H.; Laux, A.; Kemmel, V.; Schweitzer, A.; Deloulme, J.-C.; Stuber, D.; Delalande, F.; Bianchi, E.; Van Dorselaer, A.; et al. Abnormal nociception and opiate sensitivity of

- STOP null mice exhibiting elevated levels of the endogenous alkaloid morphine. *Mol Pain* **2010**, *6*, 96.
31. Coune, P.; Taleb, O.; Mensah-Nyagan, A.G.; Maitre, M.; Kemmel, V. Calcium and cAMP signaling induced by gamma-hydroxybutyrate receptor(s) stimulation in NCB-20 neurons. *Neuroscience* **2010**, *167*, 49–59.
  32. Kemmel, V.; Klein, C.; Dembélé, D.; Jost, B.; Taleb, O.; Aunis, D.; Mensah-Nyagan, A.G.; Maitre, M. A single acute pharmacological dose of  $\gamma$ -hydroxybutyrate modifies multiple gene expression patterns in rat hippocampus and frontal cortex. *Physiol. Genomics* **2010**, *41*, 146–160.
  33. Koessler, S.; Diemunsch, S.; Marshall, J.; Hayward, J.; Kemmel, V. Conditioning the CO<sub>2</sub> for pneumoperitoneal insufflation: Combination of humidification, heating and drug delivery. *Eur. J. Anaesth.* **2010**, *27*, 30–30.
  34. Santucci, R.; Levêque, D.; Lescoute, A.; Kemmel, V.; Herbrecht, R. Delayed elimination of methotrexate associated with co-administration of proton pump inhibitors. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 3807–3810.
  35. Santucci, R.; Levêque, D.; Kemmel, V.; Lutz, P.; Gérout, A.-C.; N'guyen, A.; Lescoute, A.; Schneider, F.; Bergerat, J.-P.; Herbrecht, R. Severe intoxication with methotrexate possibly associated with concomitant use of proton pump inhibitors. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 963–965.
  36. Santucci, R.; Leveque, D.; Kemmel, V.; Lescoute, A.; Lutz, P.; NGuyen, A.; Schneider, F.; Beretz, L.; Bergerat, J.P.; Herbrecht, R. Identification of causes of methotrexate intoxication. *Pharm. World Sci.* **2010**, *32*, 288–288.
  37. Santucci, R.; Leveque, D.; Lescoute, A.; Kemmel, V.; Beretz, L.; Bergerat, J.P.; Herbrecht, R. Association of methotrexate with proton pump inhibitors: an important risk factor of methotrexate delayed elimination. *Pharm. World Sci.* **2010**, *32*, 287–287.
  38. Klein, C.; Kemmel, V.; Taleb, O.; Aunis, D.; Maitre, M. Pharmacological doses of gamma-hydroxybutyrate (GHB) potentiate histone acetylation in the rat brain by histone deacetylase inhibition. *Neuropharmacology* **2009**, *57*, 137–147.
  39. Gobaille, S.; Kemmel, V.; Brumar, D.; Dugave, C.; Aunis, D.; Maitre, M. Xanthurenic acid distribution, transport, accumulation and release in the rat brain. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 982–993.
  40. Muller, A.; Glattard, E.; Taleb, O.; Kemmel, V.; Laux, A.; Mieke, M.; Delalande, F.; Roussel, G.; Van Dorsselaer, A.; Metz-Boutigue, M.-H.; et al. Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1641.
  41. Andriamampandry, C.; Taleb, O.; Kemmel, V.; Humbert, J.-P.; Aunis, D.; Maitre, M. Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J.* **2007**, *21*, 885–895.
  42. Maloisel, F.; Kemmel, V.; Zamfir, A.; Voegeli, A.C.; Bennada, K.; Lioure, B.; Gaub, M.P. Determination of imatinib plasma levels: Consequences in patients management and prediction of response to treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematol-Hematol. J.* **2007**, *92*, 388–389.
  43. Kemmel, V.; Mieke, M.; Roussel, G.; Taleb, O.; Nail-Boucherie, K.; Marchand, C.; Stutz, C.; Andriamampandry, C.; Aunis, D.; Maitre, M. Immunohistochemical localization of a GHB receptor-like protein isolated from rat brain. *J. Comp. Neurol.* **2006**, *498*, 508–524.
  44. Maitre, M.; Humbert, J.-P.; Kemmel, V.; Aunis, D.; Andriamampandry, C. [A mechanism for gamma-hydroxybutyrate (GHB) as a drug and a substance of abuse]. *Med Sci (Paris)* **2005**, *21*, 284–289.
  45. Kemmel, V.; Taleb, O.; Andriamampandry, C.; Aunis, D.; Maitre, M. Gamma-hydroxybutyrate receptor function determined by stimulation of rubidium and calcium movements from NCB-20 neurons. *Neuroscience* **2003**, *116*, 1021–1031.
  46. Maitre, M.; Andriamampandry, C.; Kemmel, V.; Schmidt, C.; Hodé, Y.; Hechler, V.; Gobaille, S. Gamma-hydroxybutyric acid as a signaling molecule in brain. *Alcohol* **2000**, *20*, 277–283.
  47. Hédou, G.; Chasserot-Golaz, S.; Kemmel, V.; Gobaille, S.; Roussel, G.; Artault, J.C.; Andriamampandry, C.; Aunis, D.; Maitre, M. Immunohistochemical studies of the localization of

- neurons containing the enzyme that synthesizes dopamine, GABA, or gamma-hydroxybutyrate in the rat substantia nigra and striatum. *J. Comp. Neurol.* **2000**, 426, 549–560.
48. Cash, C.D.; Gobaille, S.; Kemmel, V.; Andriamampandry, C.; Maitre, M. Gamma-hydroxybutyrate receptor function studied by the modulation of nitric oxide synthase activity in rat frontal cortex punches. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 58, 1815–1819.
49. Gobaille, S.; Hechler, V.; Andriamampandry, C.; Kemmel, V.; Maitre, M. gamma-Hydroxybutyrate modulates synthesis and extracellular concentration of gamma-aminobutyric acid in discrete rat brain regions in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 290, 303–309.
50. Kemmel, V.; Taleb, O.; Perard, A.; Andriamampandry, C.; Siffert, J.C.; Mark, J.; Maitre, M. Neurochemical and electrophysiological evidence for the existence of a functional gamma-hydroxybutyrate system in NCB-20 neurons. *Neuroscience* **1998**, 86, 989–1000.
51. Ratomponirina, C.; Gobaille, S.; Hodé, Y.; Kemmel, V.; Maitre, M. Sulpiride, but not haloperidol, up-regulates gamma-hydroxybutyrate receptors in vivo and in cultured cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, 346, 331–337.
52. Maitre, M.; Kemmel, V.; Cash, C.D.; Taleb, O.; Schleef, C.; Gobaille, S. Characterisation of the specific neuronal responses induced by stimulation of gamma-hydroxybutyrate receptors. *Faseb J.* **1997**, 11, A914–A914.
53. Haddad, J., Vilge, V., Juif, J.G., Maitre, M., Donato, L., Messer, J., Mark, J. Beta-nerve growth factor levels in newborn cord sera. *Pediatr Res.* juin 1994, 35, 637-9.

c) Communications orales - conférences invitées.

Kemmel V., Gobeille S., Andriamampandry C., Hechler V., Cash C.D. et Maitre M. **Mécanismes d'action d'un agent régulateur du sommeil et d'une drogue récréative : le gamma-hydroxybutyrate (GHB).** *A.N.P.M.C.B.* Clermont ferrand, 22-24 septembre 1999.

Kemmel V., Maloïsel F., **Expérience Clinique et Pharmacologique à Strasbourg : Intérêt de la pharmacocinétique dans l'optimisation du traitement de la LMC.** *Imatinib meeting* 21 Novembre 2008 Paris.

Kemmel V **Mass spectrometry: a new tool for medical applications.** Mass Spectrometry: the future technology in Forensic, Medical, and Microbiological Genetics 24 & 25 June 2010 Strasbourg.

Kemmel V **Intérêt du dosage de l'évérolimus dans le suivi thérapeutique.** Radiant Tables Rondes Régionales 27 janvier 2012. Strasbourg

Kemmel V **Les immunosuppresseurs par LC/MS<sup>2</sup> : une méthode toujours plus efficace.** 14 février 2013 Paris

Kemmel V **Le système mitra : un prélèvement « fait maison » pour faciliter l'organisation du laboratoire.** Séminaire Phenomènex, 21 septembre 2015 Paris

Kemmel V **Accréditation d'une méthode LC/MS<sup>2</sup> de dosage des immunosuppresseurs : quelles performances en attendre ?** Agilent LC/MS user meeting 15-16 octobre 2015 Marseille

\*Sabo A.N., Kemmel V. **A novel Nicotine administered by vaping Pharmacokinetics model in Pigs.** SNRT congress 11-14 september 2019, Oslo.

d) Score bibliométrique :

h-index : 16

Score Sigaps : 704

Détail par chercheur																				
Id. ↕	Nom	Prénom	Grade	Arrivée	Départ	Score	Nb. Public:	A	B	C	D	E	NC	1	2	3	k	ADA	DA	Inv.
451	KEMMEL	Veronique	MCU-PH	1997	-	704	34	2	30	18	12	6	0	10	8	14	26	6	2	2

## VI. Références bibliographiques :

1. Laborit H. SODIUM 4-HYDROXYBUTYRATE. *Int J Neuropharmacol.* sept 1964;3:433-51.
2. Laborit H, Jouany JM, Gerard J, Fabiani F. [Generalities concerning the experimental study and clinical use of gamma hydroxybutyrate of Na]. *Agressologie.* oct 1960;1:397-406.
3. Mamelak M. Narcolepsy and depression and the neurobiology of gammahydroxybutyrate. *Progress in Neurobiology.* 1 oct 2009;89(2):193-219.
4. Mamelak M, Escriu JM, Stokan O. The effects of gamma-hydroxybutyrate on sleep. *Biol Psychiatry.* avr 1977;12(2):273-88.
5. Kleinschmidt S, Schellhase C, Mertzlufft F. Continuous sedation during spinal anaesthesia: gamma-hydroxybutyrate vs. propofol. *Eur J Anaesthesiol.* janv 1999;16(1):23-30.
6. Xu X-M, Wei Y-D, Liu Y, Li Z-X. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) for narcolepsy in adults: an updated systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine.* 1 déc 2019;64:62-70.
7. Dornbierer DA, Boxler M, Voegel CD, Stucky B, Steuer AE, Binz TM, et al. Nocturnal Gamma-Hydroxybutyrate Reduces Cortisol-Awakening Response and Morning Kynurenine Pathway Metabolites in Healthy Volunteers. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 1 oct 2019;22(10):631-9.
8. Bessman SP, Fishbein WN. GAMMA-HYDROXYBUTYRATE, A NORMAL BRAIN METABOLITE. *Nature.* 21 déc 1963;200:1207-8.
9. Alzeer S, Ellis EM. Metabolism of gamma hydroxybutyrate in human hepatoma HepG2 cells by the aldo-keto reductase AKR1A1. *Biochemical Pharmacology.* 1 déc 2014;92(3):499-505.
10. ANDRIAMAMPANDRY C, SIFFERT J-C, SCHMITT M, GARNIER J-M, STAUB A, MULLER C, et al. Cloning of a rat brain succinic semialdehyde reductase involved in the synthesis of the neuromodulator  $\gamma$ -hydroxybutyrate. *Biochemical Journal.* 15 août 1998;334(1):43-50.
11. Mamelak M. Gammahydroxybutyrate: an endogenous regulator of energy metabolism. *Neurosci Biobehav Rev.* 1989;13(4):187-98.
12. Gibson KM, Hoffmann GF, Hodson AK, Bottiglieri T, Jakobs C. 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism. *Neuropediatrics.* févr 1998;29(1):14-22.

13. Brown M, Ashcraft P, Arning E, Bottiglieri T, Rouillet J-B, Gibson KM. Gamma-Hydroxybutyrate content in dried bloodspots facilitates newborn detection of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab.* oct 2019;128(1-2):109-12.
14. Vayer P, Mandel P, Maitre M. Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci.* 28 sept 1987;41(13):1547-57.
15. Snead OC. Relation of the [3H] $\gamma$ -hydroxybutyric acid (ghb) binding site to the  $\gamma$ -aminobutyric acidb (gabab) receptor in rat brain. *Biochemical Pharmacology.* 25 oct 1996;52(8):1235-43.
16. Benavides J, Rumigny JF, Bourguignon JJ, Cash C, Wermuth CG, Mandel P, et al. High affinity binding sites for gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci.* 15 mars 1982;30(11):953-61.
17. Maitre M, Hechler V, Vayer P, Gobaille S, Cash CD, Schmitt M, et al. A specific gamma-hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties. *J Pharmacol Exp Ther.* 1 nov 1990;255(2):657-63.
18. Bourguignon JJ, Schoenfelder A, Schmitt M, Wermuth CG, Hechler V, Charlier B, et al. Analogues of gamma-hydroxybutyric acid. Synthesis and binding studies. *J Med Chem.* mai 1988;31(5):893-7.
19. Kemmel V, Taleb O, Perard A, Andriamampandry C, Siffert JC, Mark J, et al. Neurochemical and electrophysiological evidence for the existence of a functional gamma-hydroxybutyrate system in NCB-20 neurons. *Neuroscience.* oct 1998;86(3):989-1000.
20. Andriamampandry C, Taleb O, Kemmel V, Humbert J-P, Aunis D, Maitre M. Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J.* mars 2007;21(3):885-95.
21. Mathivet P, Bernasconi R, De Barry J, Marescaux C, Bittiger H. Binding characteristics of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid as a weak but selective GABAB receptor agonist. *European Journal of Pharmacology.* 19 févr 1997;321(1):67-75.
22. Bernasconi R, Lauber J, Marescaux C, Vergnes M, Martin P, Rubio V, et al. Experimental absence seizures: potential role of gamma-hydroxybutyric acid and GABAB receptors. *J Neural Transm Suppl.* 1992;35:155-77.
23. Elisabeth Berry-Kravis, Dawson G. Characterization of an Adenylate Cyclase-Linked Serotonin (5-HT<sub>1</sub>) Receptor in a Neuroblastoma  $\times$  Brain Explant Hybrid Cell Line (NCB-20) - Berry-Kravis - 1983 - *Journal of Neurochemistry* - Wiley Online Library [Internet]. 1983 [cité 26 avr 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary-wiley-com.scd-rproxy.u-strasbg.fr/doi/full/10.1111/j.1471-4159.1983.tb08081.x?sid=nlm%3Apubmed>
24. Coune P, Taleb O, Mensah-Nyagan AG, Maitre M, Kemmel V. Calcium and cAMP signaling induced by gamma-hydroxybutyrate receptor(s) stimulation in NCB-20 neurons. *Neuroscience.* 28 avr 2010;167(1):49-59.

25. Kemmel V, Taleb O, Andriamampandry C, Aunis D, Maitre M. Gamma-hydroxybutyrate receptor function determined by stimulation of rubidium and calcium movements from NCB-20 neurons. *Neuroscience*. 2003;116(4):1021-31.
26. Andriamampandry C, Taleb O, Viry S, Muller C, Humbert JP, Gobaille S, et al. Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator  $\gamma$ -hydroxybutyrate. *The FASEB Journal*. 2003;17(12):1691-3.
27. Kemmel V, Miehe M, Roussel G, Taleb O, Nail-Boucherie K, Marchand C, et al. Immunohistochemical localization of a GHB receptor-like protein isolated from rat brain. *J Comp Neurol*. 1 oct 2006;498(4):508-24.
28. Hechler V, Gobaille S, Bourguignon J-J, Maitre M. Extracellular Events Induced by  $\gamma$ -Hydroxybutyrate in Striatum: A Microdialysis Study. *Journal of Neurochemistry*. 1991;56(3):938-44.
29. Howard S, Feigenbaum J. Effect of  $\gamma$ -hydroxybutyrate on central dopamine release in vivo: A microdialysis study in awake and anesthetized animals. *Biochemical Pharmacology*. 10 janv 1997;53(1):103-10.
30. Hédou G, Chasserot-Golaz S, Kemmel V, Gobaille S, Roussel G, Artault JC, et al. Immunohistochemical studies of the localization of neurons containing the enzyme that synthesizes dopamine, GABA, or gamma-hydroxybutyrate in the rat substantia nigra and striatum. *J Comp Neurol*. 30 oct 2000;426(4):549-60.
31. Gobaille S, Hechler V, Andriamampandry C, Kemmel V, Maitre M. gamma-Hydroxybutyrate modulates synthesis and extracellular concentration of gamma-aminobutyric acid in discrete rat brain regions in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. juill 1999;290(1):303-9.
32. Hechler V, Ratomponirina C, Maitre M. gamma-Hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacement of GABAB binding that is blocked by valproate and ethosuximide. *J Pharmacol Exp Ther*. mai 1997;281(2):753-60.
33. Dijkstra BAG, Beurmanjer H, Goudriaan AE, Schellekens AFA, Joosten EAG. Unity in diversity: A systematic review on the GHB using population. *International Journal of Drug Policy*. 1 août 2021;94:103230.
34. Dijkstra BAG, Kamal R, van Noorden MS, de Haan H, Loonen AJM, De Jong CAJ. Detoxification with titration and tapering in gamma-hydroxybutyrate (GHB) dependent patients: The Dutch GHB monitor project. *Drug and Alcohol Dependence*. 1 janv 2017;170:164-73.
35. Muller C, Viry S, Miehe M, Andriamampandry C, Aunis D, Maitre M. Evidence for a  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) uptake by rat brain synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry*. 2002;80(5):899-904.
36. Muller C, Viry S, Miehe M, Andriamampandry C, Aunis D, Maitre M. Evidence for a gamma-hydroxybutyrate (GHB) uptake by rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem*. mars 2002;80(5):899-904.

37. Maitre M, Humbert J-P, Kemmel V, Aunis D, Andriamampandry C. Mécanismes d'action d'un médicament détourné: le  $\gamma$ -hydroxybutyrate. *Med Sci (Paris)*. 1 mars 2005;21(3):284-9.
38. Meyer S, Gottschling S, Georg T, Lothschütz D, Graf N, Sitzmann FC. Gamma-hydroxybutyrate Versus Chlorprothixene/Phenobarbital Sedation in Children Undergoing MRI Studies. *Klin Padiatr*. mars 2003;215(02):69-73.
39. Kemmel V, Klein C, Dembélé D, Jost B, Taleb O, Aunis D, et al. A single acute pharmacological dose of  $\gamma$ -hydroxybutyrate modifies multiple gene expression patterns in rat hippocampus and frontal cortex. *Physiol Genomics*. 1 avr 2010;41(2):146-60.
40. Klein C, Kemmel V, Taleb O, Aunis D, Maitre M. Pharmacological doses of gamma-hydroxybutyrate (GHB) potentiate histone acetylation in the rat brain by histone deacetylase inhibition. *Neuropharmacology*. août 2009;57(2):137-47.
41. Wendt G, Kemmel V, Patte-Mensah C, Uring-Lambert B, Eckert A, Schmitt MJ, et al. Gamma-hydroxybutyrate, acting through an anti-apoptotic mechanism, protects native and amyloid-precursor-protein-transfected neuroblastoma cells against oxidative stress-induced death. *Neuroscience*. 28 mars 2014;263:203-15.
42. Di Trana A, Beck R, Del Rio A. Management of GHB acute intoxications. *LA CLINICA TERAPEUTICA*. 10 janv 2021;(1):49-51.
43. Agarwal N, Carare RO. Cerebral Vessels: An Overview of Anatomy, Physiology, and Role in the Drainage of Fluids and Solutes. *Front Neurol* [Internet]. 2021 [cité 8 mai 2021];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.611485/full>
44. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*. nov 2015;282(21):4067-79.
45. Abrahamson EE, Ikonovic MD. Brain injury-induced dysfunction of the blood brain barrier as a risk for dementia. *Experimental Neurology*. 1 juin 2020;328:113257.
46. Brown WR, Thore CR. Review: Cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2011;37(1):56-74.
47. Drenth N, van der Grond J, Rombouts SARB, van Buchem MA, Terwindt GM, Wermer MJH, et al. Cerebral amyloid angiopathy is associated with decreased functional brain connectivity. *NeuroImage: Clinical*. 1 janv 2021;29:102546.
48. Wu T, Chen L, Zhou L, Xu J, Guo K. Platelets transport  $\beta$ -amyloid from the peripheral blood into the brain by destroying the blood-brain barrier to accelerate the process of Alzheimer's disease in mouse models. *Aging*. 15 mars 2021;13(5):7644-59.
49. Fang W, Geng X, Deng Y, Li Y, Shang E, Cen J, et al. Platelet activating factor induces blood brain barrier permeability alteration in vitro. *Journal of Neuroimmunology*. 1 janv 2011;230(1):42-7.

50. Odaka H, Hiemori K, Shimoda A, Akiyoshi K, Tateno H. Platelet-derived extracellular vesicles are increased in sera of Alzheimer's disease patients, as revealed by Tim4-based assays. *FEBS Open Bio*. 2021;11(3):741-52.
51. Chao F, Zhang Y, Zhang L, Jiang L, Zhou C, Tang J, et al. Fluoxetine Promotes Hippocampal Oligodendrocyte Maturation and Delays Learning and Memory Decline in APP/PS1 Mice. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2021 [cité 2 mai 2021];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2020.627362/full>
52. Zhou C, Chao F, Zhang Y, Jiang L, Zhang L, Fan J, et al. Fluoxetine delays the cognitive function decline and synaptic changes in a transgenic mouse model of early Alzheimer's disease. *Journal of Comparative Neurology*. 2019;527(8):1378-87.
53. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of Disease*. 1 nov 2008;32(2):200-19.
54. Weksler B, Romero IA, Couraud P-O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. 26 mars 2013;10:16.
55. Lalut J, Karila D, Dallemagne P, Rochais C. Modulating 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors in Alzheimer's disease treatment. *Future Medicinal Chemistry*. 1 mai 2017;9(8):781-95.
56. Baranger K, Giannoni P, Girard SD, Girot S, Gaven F, Stephan D, et al. Chronic treatments with a 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. 1 nov 2017;126:128-41.
57. Hashimoto G, Sakurai M, Teich AF, Saeed F, Aziz F, Arancio O. 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation leads to soluble A $\beta$ PP $\alpha$  production through MMP-9 upregulation. *J Alzheimers Dis*. 2012;32(2):437-45.
58. Cochet M, Donneger R, Cassier E, Gaven F, Lichtenthaler SF, Marin P, et al. 5-HT<sub>4</sub> Receptors Constitutively Promote the Non-Amyloidogenic Pathway of APP Cleavage and Interact with ADAM10. *ACS Chem Neurosci*. 16 janv 2013;4(1):130-40.
59. Lalut J, Payan H, Davis A, Lecoutey C, Legay R, Sopkova-de Oliveira Santos J, et al. Rational design of novel benzisoxazole derivatives with acetylcholinesterase inhibitory and serotonergic 5-HT<sub>4</sub> receptors activities for the treatment of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. 20 févr 2020;10(1):3014.
60. Lecoutey C, Hedou D, Freret T, Giannoni P, Gaven F, Since M, et al. Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. *PNAS*. 9 sept 2014;111(36):E3825-30.
61. Brunner J, Ragupathy S, Borchard G. Target specific tight junction modulators. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1 avr 2021;171:266-88.
62. Barnes N, Ahern gerard, Becamel C, Boeckart J, Camilleri M, Chaumont-Dubel S, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; *Pharmacology and Function* | *Pharmacological Reviews*

[Internet]. 2021 [cité 8 mai 2021]. Disponible sur: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/73/1/310.long>

63. Cong X, Kong W. Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease. *Cellular Signalling*. 1 févr 2020;66:109485.
64. Rodrigues SF, Granger DN. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*. 3 avr 2015;3(1-2):e978720.
65. Zhang Y, Ding X, Miao C, Chen J. Propofol attenuated TNF- $\alpha$ -modulated occludin expression by inhibiting Hif-1 $\alpha$ / VEGF/ VEGFR-2/ ERK signaling pathway in hCMEC/D3 cells. *BMC Anesthesiol*. 9 juill 2019;19(1):127.
66. Zhang Y, Li X, Qiao S, Yang D, Li Z, Xu J, et al. Occludin degradation makes brain microvascular endothelial cells more vulnerable to reperfusion injury in vitro. *J Neurochem*. févr 2021;156(3):352-66.
67. Herold S, Gabrielli NM, Vadász I. Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 15 nov 2013;305(10):L665-681.
68. Löfdahl A, Tornling G, Wigén J, Larsson-Callertfelt A-K, Wenglén C, Westergren-Thorsson G. Pathological Insight into 5-HT<sub>2B</sub> Receptor Activation in Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. janv 2021;22(1):225.
69. Esteve JM, Launay J-M, Kellermann O, Maroteaux L. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochem Biophys*. 1 janv 2007;47(1):33-43.
70. Yang T, Wang H, Li Y, Zeng Z, Shen Y, Wan C, et al. Serotonin receptors 5-HTR<sub>2A</sub> and 5-HTR<sub>2B</sub> are involved in cigarette smoke-induced airway inflammation, mucus hypersecretion and airway remodeling in mice. *International Immunopharmacology*. 1 avr 2020;81:106036.
71. Golovinskaia O, Wang C-K. Review of Functional and Pharmacological Activities of Berries. *Molecules*. janv 2021;26(13):3904.
72. Lee J-W, Chun W, Lee HJ, Min J-H, Kim S-M, Seo J-Y, et al. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. *Cells*. avr 2021;10(4):897.
73. Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, Pau MC, Scano V, Piras B, et al. Oxidative Stress Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: A Systematic Review. *Antioxidants*. mai 2021;10(5):710.
74. MacLeod M, Papi A, Contoli M, Beghé B, Celli BR, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation fundamentals: Diagnosis, treatment, prevention and disease impact. *Respirology* [Internet]. [cité 8 mai 2021];n/a(n/a). Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/resp.14041>
75. Pasquereau A, Andler R, Arwidson P, Guignard R, Nguyen-Thanh V. Consommation de tabac parmi les adultes : bilan de cinq années de programme national contre le tabagisme,

- 2014-2019. [Internet]. 2020 [cité 8 mai 2021]. Disponible sur: /import/consommation-de-tabac-parmi-les-adultes-bilan-de-cinq-annees-de-programme-national-contre-le-tabagisme-2014-2019
76. Wan M, Ding L, Wang D, Han J, Gao P. Serotonin: A Potent Immune Cell Modulator in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cité 8 mai 2021];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00186/full>
  77. Sales MC, Kasahara TM, Sacramento PM, Rossi AD, Cafasso MOSD, Oyamada HAA, et al. Selective serotonin reuptake inhibitor attenuates the hyperresponsiveness of TLR2+ and TLR4+ Th17/Tc17-like cells in multiple sclerosis patients with major depression. *Immunology*. 2021;162(3):290-305.
  78. Quintero-Villegas A, Valdés-Ferrer SI. Role of 5-HT7 receptors in the immune system in health and disease. *Mol Med*. 31 déc 2019;26(1):2.
  79. Cloëz-Tayarani I, Changeux J-P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(3):599-606.
  80. Herr N, Bode C, Duerschmied D. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2017 [cité 8 mai 2021];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2017.00048/full>
  81. Shajib MS, Khan WI. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol (Oxf)*. mars 2015;213(3):561-74.
  82. Casas-Engel M de las, Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Bragado R, Nieto C, Puig-Kroger A, et al. Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7. *The Journal of Immunology*. 1 mars 2013;190(5):2301-10.
  83. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 28 janv 2010;362(4):329-44.
  84. Sepúlveda C, Hernández B, Burgos CF, Fuentes E, Palomo I, Alarcón M. The cAMP/PKA Pathway Inhibits Beta-amyloid Peptide Release from Human Platelets. *Neuroscience*. 15 janv 2019;397:159-71.
  85. Bostanciklioğlu M. The role of gut microbiota in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Applied Microbiology*. 2019;127(4):954-67.
  86. Cortes-Canteli M, Iadecola C. Alzheimer's Disease and Vascular Aging: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology*. 3 mars 2020;75(8):942-51.
  87. Chakraborty A, de Wit NM, van der Flier WM, de Vries HE. The blood brain barrier in Alzheimer's disease. *Vascular Pharmacology*. 1 févr 2017;89:12-8.
  88. Claeysen S, Bockaert J, Giannoni P. Serotonin: A New Hope in Alzheimer's Disease? *ACS Chem Neurosci*. 15 juill 2015;6(7):940-3.

89. Liu P-P, Xie Y, Meng X-Y, Kang J-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 23 août 2019;4(1):1-22.
90. Bianco F, Bonora E, Natarajan D, Vargiolu M, Thapar N, Torresan F, et al. Prucalopride exerts neuroprotection in human enteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 15 2016;310(10):G768-775.
91. Jerman JC, Brough SJ, Gager T, Wood M, Coldwell MC, Smart D, et al. Pharmacological characterisation of human 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*. 23 févr 2001;414(1):23-30.
92. Toimela T, Mäenpää H, Mannerström M, Tähti H. Development of an in vitro blood–brain barrier model—cytotoxicity of mercury and aluminum. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15 févr 2004;195(1):73-82.
93. Humpel C. Platelets: Their Potential Contribution to the Generation of Beta-amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Current Neurovascular Research*. 31 juill 2017;14(3):290-8.
94. Erickson MA, Banks WA. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. oct 2013;33(10):1500-13.
95. Tajeddinn W, Persson T, Calvo-Garrido J, Seed Ahmed M, Maioli S, Vijayaraghavan S, et al. Pharmacological Modulations of the Serotonergic System in a Cell-Model of Familial Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 07 2016;53(1):349-61.
96. Plagg B, Marksteiner J, Kniewallner KM, Humpel C. Platelet dysfunction in hypercholesterolemia mice, two Alzheimer's disease mouse models and in human patients with Alzheimer's disease. *Biogerontology*. août 2015;16(4):543-58.
97. Wautier J-L, Wautier M-P. Endothelial Cell Participation in Inflammatory Reaction. *Int J Mol Sci*. 13 juin 2021;22(12):6341.
98. Fisher JR, Wallace CE, Tripoli DL, Sheline YI, Cirrito JR. Redundant Gs-coupled serotonin receptors regulate amyloid- $\beta$  metabolism in vivo. *Mol Neurodegener*. 18 2016;11(1):45.
99. Najem D, Rennie K, Ribocco-Lutkiewicz M, Ly D, Haukenfrers J, Liu Q, et al. Traumatic brain injury: classification, models, and markers. *Biochem Cell Biol*. août 2018;96(4):391-406.



## Rôles du GHB et de la sérotonine dans la maladie d'Alzheimer

### Résumé

Ce travail de recherche, s'intéresse dans un premier temps à identifier le rôle du gamma-hydroxybutyrate (GHB) en tant que neurotransmetteur. L'utilisation de modèles cellulaires a permis de décrypter les mécanismes de signalisation cellulaire spécifiques des récepteurs du GHB. Par une approche sans à priori, nous avons démontré l'intérêt potentiel du GHB dans la maladie d'Alzheimer (MA) du fait de ses propriétés de neuroprotection.

L'avancée des connaissances sur la physiopathologie de la MA a démontré le rôle pivot joué par la barrière hématoencéphalique (BHE). En effet, il a été montré que les peptides amyloïdogènes provenaient d'origines cérébrales mais également périphériques. Un des pourvoyeurs étant la plaquette puisqu'en « dégranulant » les plaquettes libèrent d'importantes quantités de peptides amyloïdes et de sérotonine. Nous avons pu mettre en évidence, grâce à un modèle cellulaire de BHE, le rôle du récepteur 5-HT<sub>4</sub> dans la modulation de la perméabilité de la BHE et le mécanisme moléculaire qui s'y rapporte. Ces résultats retrouvés chez l'animal, confortent l'utilisation de modèles cellulaires mimant la BHE pour décrypter d'autres mécanismes d'action et identifier des cibles cellulaires et moléculaires en lien avec le système sérotoninergique et permettant de répondre aux défis posés par la MA.

Mots clés : Gamma hydroxybutyrate, Sérotonine, Barrière Hémato-Encéphalique, Maladie d'Alzheimer

### Résumé en anglais

This research focuses initially on the role play by gamma-hydroxybutyrate (GHB) as a neurotransmitter. Cellular models helped us to describe the intracellular signaling and mechanisms of GHB specific receptors. With a microarray approach, we demonstrated the potential interest of GHB in Alzheimer's disease (AD) because of its neuroprotective properties.

The knowledge on AD pathophysiology highlighted the pivotal role played by the blood-brain barrier (BBB). Indeed, amyloid peptides have been shown to be from cerebral but also from peripheral origins. One of the most important peripheral origin is platelets since platelet's granules contain large amounts of amyloid peptides and serotonin. We were able, in a cell model of BBB, to highlight the 5-HT<sub>4</sub> receptor role in modulating the permeability of BBB and to describe the molecular related mechanism. These results were confirmed in animal experiments and confirm the idea that BBB cellular models were a nice approach to describe such mechanisms. Further, we want to decrypt other pathophysiological mechanisms in order to identify cellular and molecular targets related to serotonergic system and to answer to AD treatment needing.

Keywords: gamma hydroxybutyrate, serotonin, blood-brain barrier, Alzheimer's disease