

Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de
l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Neurosciences

Par KLEIN Christian

**Modulations de l'expression des gènes cérébraux
induits par le gamma hydroxybutyrate (GHB).**

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Date de soutenance : 19 octobre 2009

Membres du jury :

M. le Professeur NAASSILA Mickaël	Rapporteur externe
M. le Professeur NIEOULLON André	Rapporteur externe
M. le Docteur ZWILLER Jean	Rapporteur interne
M. le Professeur AUNIS Dominique	Examineur
Mme le Professeur ECKERT Anne	Examineur
M. le Professeur MAITRE Michel	Directeur de thèse

A la mémoire de mon père

A ma mère

A ma famille et à mes amis

Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité de Physiopathologie du Système Nerveux (INSERM U-575) dirigée par M. le Professeur Dominique Aunis. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son unité et d'avoir accepté de juger cette thèse. Qu'il trouve ici témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je souhaite également remercier M. le Professeur André Nieoullon, M. le Professeur Mickaël Naassila et M. le Docteur Jean Zwiller qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie aussi Mme le Professeur Anne Eckert d'avoir bien voulu accepter de participer à ce jury.

Je remercie tout particulièrement M. le Professeur Michel Maitre, qui m'a accueilli dans son équipe et m'a fait découvrir les neurosciences, ainsi que M. le Professeur Ayikoe G. Mensah-Nyagan qui dirige actuellement l'équipe dans laquelle je travaille (EA 4438 Unité de Physiopathologie et Médecine Translationnelle Equipe Stéroïdes, Neuromodulateurs et Neuropathologies) et qui m'a fait largement profiter de ses conseils judicieux.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et m'ont apporté leur soutien, leurs compétences ou leurs conseils pendant ces années de thèse.

Merci à tous les membres de notre équipe (Véronique Kemmel, Laurence Meyer, Omar Taleb, Christine Mensah, Christine Stutz et Christiane Marchand) pour leur soutien de tous les jours, et à toutes les personnes qui m'ont accueilli dans les différents laboratoires où une partie des présents travaux ont pu être réalisés, en particulier les Docteurs Doulaye Dembélé, Christelle Thibault et Bernard Jost (plateforme microarrays de l'IGBMC), les Docteurs Chantal Mathis et Jean-Christophe Cassel (LINC).

Mes remerciements s'adressent également à M. le Professeur Anant. N. Malviya qui m'avait accueilli dans le laboratoire qu'il dirigeait au Centre de Neurochimie de Strasbourg pour la réalisation des expériences concernant le calcium nucléaire. Merci à tous les membres de son équipe (Claire Gensburger et Solange Freyermuth).

Je tiens enfin à remercier mes proches et tout particulièrement mes parents pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études et pour tous les bons moments partagés.

SOMMAIRE

Résumé	7
---------------	----------

Le Gamma-hydroxybutyrate (GHB) : médiateur d'un système endogène régulateur de l'activité GABA, utilisé à des fins thérapeutiques et pour ses effets récréatifs.	9
---	----------

Métabolisme du Gamma-hydroxybutyrate dans le cerveau	10
Distribution du Gamma-hydroxybutyrate endogène	13
Libération du Gamma-hydroxybutyrate endogène dans le milieu extracellulaire	15
Transport du Gamma-hydroxybutyrate par le tissu cérébral	16
Les récepteurs du Gamma-hydroxybutyrate	16
Transduction des signaux induits par les récepteurs Gamma-hydroxybutyrate	23
Un modèle pour le système Gamma-hydroxybutyrate cérébral endogène	27
La potentialisation du système Gamma-hydroxybutyrate endogène par l'apport de Gamma-hydroxybutyrate exogène débouche globalement sur une hyper GABAergie fonctionnelle utilisée en thérapeutique	29
Mécanismes de l'action neuropharmacologique du Gamma-hydroxybutyrate	31

Travaux personnels	34
---------------------------	-----------

A. Le Gamma-hydroxybutyrate à doses thérapeutiques induit des modifications épigénétiques chez le rat	38
1. Les modifications post-traductionnelles des histones modifient l'expression du génotype	38
a. Données succinctes sur l'organisation de l'ADN génomique des cellules eucaryotes	38

b.	Mécanismes de régulation de la compactation de l'ADN	39
c.	Acétylation et désacétylation des Histones	40
d.	Les histones acétyltransférases (HAT)	40
e.	Les histones-désacétylases ou HDACs	42
f.	Inhibiteurs de HDAC	44
2.	Résultats obtenus : implication du GHB dans l'inhibition des HDACS cérébrales	45
a.	Hyperacétylation des histones H3	47
b.	Mécanisme de cette hyperacétylation	48
	<i>Publication : Pharmacological doses of gamma-hydroxybutyrate (GHB) potentiate histone acetylation in the rat brain by histone deacetylase inhibition</i>	50
B.	Modification de l'expression des gènes sous l'action du gamma-hydroxybutyrate à dose thérapeutique aigue	62
1.	Résultats obtenues lors des expériences de microarrays	62
	<i>Manuscrit en révision : A single acute pharmacological dose of gamma- hydroxybutyrate (GHB) modifies multiple gene expression patterns in rat hippocampus and frontal cortex.</i>	65
2.	Modifications de l'expression de certaines métalloprotéinases	99
C.	Peut-on modifier l'accumulation de certaines protéines toxiques par le GHB à doses thérapeutiques ?	99
1.	Etat de la question : protéinopathies et maladie d'Alzheimer	99
a.	La maladie d'Alzheimer	100
b.	Les mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer	102
c.	Les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer	104
2.	Le Gamma-hydroxybutyrate (GHB) possède t-il un effet sur l'élimination des peptides A β ?	106
	<i>Manuscrit soumis : Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) regulates brain amyloid β peptides through modulation of proteolytic degradation.</i>	108
	Discussion	122

Références	133
-------------------	------------

Annexe : études et publications obtenues pendant mes années de maîtrise et de DEA	145
--	------------

Etude du signal calcium dans le noyau cellulaire : production d'inositol 1,4,5-trisphosphate nucléaire.	145
<i>Publication 1 : In vivo nuclear Ca²⁺-ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus.</i>	147
<i>Publication 2 : A 120 kDa nuclear phospholipase Cγ1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR.</i>	150
<i>Publication 3 : Mechanism regulating nuclear calcium signaling.</i>	153
<i>Publication 4 : Mechanism of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate produced in the nucleus, nuclear located protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase.</i>	156
Références	161

Résumé

Le gamma-hydroxybutyrate (GHB) est à la fois une molécule endogène du système nerveux central, un médicament utilisé en clinique humaine dans plusieurs indications et une substance consommée de façon illicite à des fins récréatives. Mon laboratoire d'accueil a largement participé à la démonstration des propriétés de neuromodulateur-neurotransmetteur attribuées maintenant au GHB cérébral, en particulier en clonant récemment des récepteurs membranaires pour cette substance dans le système nerveux central (SNC).

Administré à l'homme ou à l'animal à doses pharmacologiques, le GHB pénètre rapidement dans le SNC et interfère avec ses principales cibles naturelles (machinerie enzymatique, transporteurs, récepteurs spécifiques), mais également avec les récepteurs GABA-B, bien que cette dernière interaction soit de faible affinité. La résultante de ces multiples effets est une stimulation GABAergique globale avec des conséquences pharmacologiques (anxiolyse, sommeil, anesthésie). Néanmoins, les effets spécifiques du GHB à doses thérapeutiques ne peuvent pas uniquement s'expliquer par ces modifications fonctionnelles. Notre hypothèse de travail a donc consisté à postuler des remaniements de l'expression de certains gènes dans des régions stratégiques du cerveau, accompagnés ou précédés par des modifications épigénétiques, sur le mode de celles décrites pour certaines molécules de synthèse proches du GHB sur le plan structural.

En utilisant des doses thérapeutiques de GHB chez le rat ou la souris, nous avons tout d'abord montré qu'au moment de l'effet pharmacologique maximum se produisait une hyperacétylation des histones H3 d'environ 250 % par rapport aux animaux non traités. Cette modification, non décelable dans les histones H4, a pu être attribuée à une inhibition des histones déacétylases. Nous avons constaté que les distributions des histones H3 acétylées et des concentrations de GHB dans le cerveau sont très hétérogènes. Et nous pouvons émettre l'hypothèse d'un rôle du GHB dans la régulation de l'expression de certains gènes.

A la suite de ces études, nous avons exploré les modifications de l'expression des gènes de l'hippocampe et du cortex frontal en utilisant les mêmes conditions de doses et de durée de traitement que dans les expériences précédentes. Ces recherches ont été réalisées en utilisant la technique des microarrays (Affymetrix). Après une analyse statistique, les résultats ont montré qu'environ 270 gènes avaient une expression significativement modifiée (plus ou

moins de 1,5 fois le niveau de base) par le traitement. Certains de ces gènes (15) sont significativement hyperstimulés (14) ou hypostimulés (1) dans les deux structures. Parmi les 270 gènes dont l'expression est modifiée, figurent plusieurs gènes codant pour des récepteurs de neurotransmetteurs (GABA, dopamine) et pour des canaux ioniques. Pour plusieurs gènes d'intérêt, nous avons confirmé les résultats de l'analyse par microarrays en quantifiant, par western blot et immunocytochimie, les modifications des protéines correspondantes dans le cerveau de rats traités par rapport à des témoins. Ces expériences de microarrays avaient pour objectif d'orienter l'attention sur des mécanismes à priori non soupçonnés dans le mode d'action physiologique du GHB endogène et/ou dans ses effets pharmacologiques.

Parmi les nouvelles cibles moléculaires du GHB pouvant avoir un intérêt à moyen terme, nous avons mis en évidence que des doses pharmacologiques de GHB augmentaient d'environ 2 fois l'expression de certaines métalloprotéinases dans le cerveau de rat. Ces enzymes sont connues comme participant à la dégradation des dépôts de protéines bêta-amyloïdes dans des protéinopathies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer. Nous avons donc exploré la cinétique de leur augmentation sous traitement GHB à la fois par PCR quantitative et par mesure des activités enzymatiques *ex vivo*. Par la suite, nous avons montré que le traitement *per os* par du GHB sur une période d'environ 5 semaines, administré à des souris transgéniques exprimant une APP (Amyloïd precursor protein) mutée, favorisait l'élimination des peptides bêta-amyloïdes du cerveau de ces animaux. Ces expériences montrent que le système GHB cérébral, potentialisé pharmacologiquement, pourrait participer à la régulation des dépôts bêta-amyloïdes cérébraux dans un modèle de maladie d'Alzheimer chez l'animal. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes tant sur le plan fondamental que sur le plan clinique et thérapeutique.

En conclusion, nos travaux ont montré que le GHB à doses thérapeutiques remaniait l'expression de nombreux gènes, peut-être via la modification de l'architecture de la chromatine. Parmi les gènes d'intérêt qui sont induits par le traitement, l'hyperexpression de certaines métalloprotéinases pourrait jouer un rôle très important dans la densité des dépôts de protéines délétères pour la survie neuronale. Ces expériences préliminaires ont pour objectif à terme de mettre au point un système *in vitro* capable de sélectionner des molécules GHB-mimétiques, possédant des indications dans l'évolution et le traitement de certaines maladies neurodégénératives.

Le Gamma-hydroxybutyrate (GHB)

Le gamma-hydroxybutyrate (GHB) est une petite molécule simple faisant partie de la famille de l'acide butyrique et de ses dérivés (aminobutyrate, phénylaminobutyrate, phénylhydroxybutyrate, dipropylacétate ou valproate...etc.). Sa structure particulière, faite de deux extrémités hydrophiles et polaires reliées par un squelette hydrocarboné hydrophobe, lui confère des fonctions moléculaires et cellulaires bien particulières, qui le distinguent des autres composés de sa famille.

Tout d'abord, le GHB possède deux propriétés essentielles. D'une part, c'est un composé naturel endogène présent dans la plupart des organes chez l'homme et de nombreux animaux, à des concentrations variant de quelques micromolaires jusqu'à plusieurs dizaines de micromolaires. Son rôle fonctionnel dans les organes périphériques n'est pas connu, il pourrait être présent du fait de l'innervation de ces organes. Par contre, dans le cerveau, de nombreuses études que nous allons détailler succinctement, plaident fortement en faveur de son rôle comme neurotransmetteur ou neuromodulateur.

D'autre part, le GHB présente la propriété importante de pouvoir passer, à l'aide d'un transporteur, du compartiment sanguin circulant dans le compartiment cellulaire cérébral où il est capturé en particulier par les neurones. De ce fait, toutes fluctuations des concentrations sanguines de GHB retentissent rapidement sur les concentrations cérébrales de GHB, ce qui peut constituer un signal moléculaire important entre la périphérie et le SNC surtout lorsque l'on connaît les liens métaboliques et fonctionnels entre le GHB et le GABA. La plupart des neurotransmetteurs périphériques ne passent pas la barrière hémato-encéphalique (BHE), mais certains neuromodulateurs ou neurohormones sont capables de le faire, soit physiologiquement, soit du fait de modifications locales de la perméabilité de la BHE.

Compte tenu des rôles connus du GHB dans le cerveau au niveau moléculaire, fonctionnel, neuropharmacologique et thérapeutique et de la complète ignorance de son rôle dans les organes périphériques, nous exposerons uniquement les faits qui proviennent de la littérature internationale et surtout de nos propres expériences concernant les propriétés du GHB au niveau du SNC. Dans de nombreux domaines concernant sa physiologie moléculaire et fonctionnelle et sa pharmacologie, notre laboratoire a joué un rôle de précurseur pour l'élaboration des connaissances sur cette molécule naturelle.

Métabolisme du GHB dans le cerveau

Le gamma-hydroxybutyrate dans le cerveau dérive de façon prédominante du métabolisme du GABA (Figure 1). Celui-ci est d'abord transaminé par la GABA-transaminase mitochondriale pour former dans cette mitochondrie un aldéhyde chimiquement très réactif, le semialdéhyde succinique (SSA), à l'instar de ce qui se passe pour les aldéhydes formés par désamination des monoamines. Le SSA est ensuite transloqué hors de la mitochondrie dans le cytosol pour y être réduit par une semialdéhyde réductase en GHB, le co-substrat préférentiel étant le NADPH. Cet enzyme (SSA réductase ou SSR), isolé à l'origine du cerveau de rat, possédait plusieurs particularités : un K_m relativement faible pour le SSA (environ 20 μM) et n'était pas inhibé par les barbituriques et le valproate (Rumigny et al., 1981). Chez l'homme, cet enzyme était constitué par un dimère d'environ 80 kDa. Un antisérum polyclonal a été fabriqué contre cet enzyme chez le lapin, sérum qui a permis de la localiser de façon préférentielle dans les neurones GAD positif (GABAergiques) (Figure 2) et dans certaines terminaisons pré-synaptiques (Hedou et al., 2000). Les plus fortes concentrations d'enzyme se situent dans le compartiment cytosolique et dans les synaptosomes chez le rat (Snead, 1987). Des travaux plus récents ont montré qu'il était probable que cette SSR soit représentée par une aflatoxine aldéhyde réductase faisant partie de la famille des aldo-keto-réductases (AKR), identifiée comme l'AKR7A2 (Lyon et al., 2007) dans le neuroblastome d'origine humaine (SH-SY5Y). Cet enzyme est présent dans le cerveau de rat, mais aussi dans de nombreux organes périphériques où il produit la presque totalité du GHB. Néanmoins, il est probable que des isoformes de SSR existent, au moins dans le cerveau. Le flux métabolique total de SSA passant dans le cytosol cellulaire pour y être réduit en GHB représente environ 0,15 % du SSA total. La sortie du SSA de la mitochondrie doit probablement être un mécanisme de transport fortement régulé, de même que les activités AKR7A2.

La majorité du SSA produit dans la mitochondrie n'emprunte pas la voie cytosolique de réduction en GHB que nous venons de décrire. Le SSA est majoritairement oxydé par un enzyme mitochondrial, la succinique semialdéhyde déshydrogénase (SSADH) qui possède comme co-substrat le NAD^+ et qui oxyde le SSA en acide succinique faisant partie du cycle de Krebs. Des mutations de cette activité SSADH (Malaspina et al., 2009) conduisent à une maladie métabolique héréditaire qui, sur le plan moléculaire, combine une altération de la

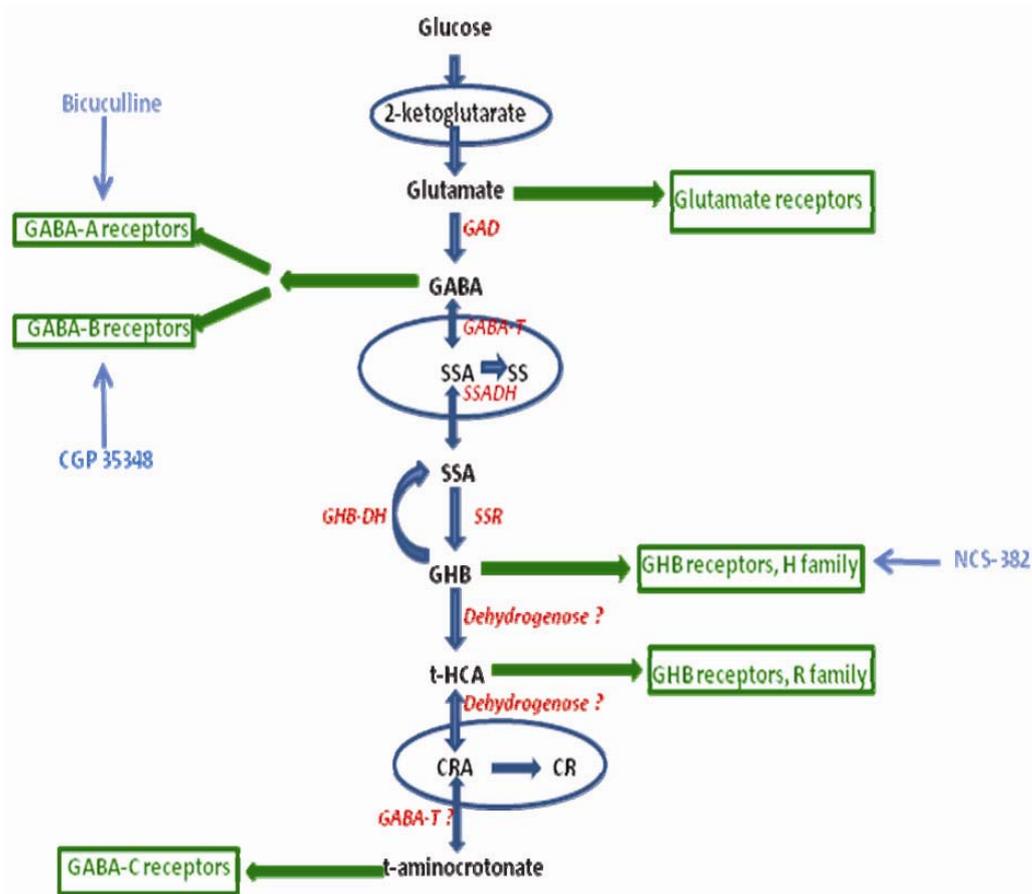


Figure 1 : Voie de synthèse et de dégradation du GHB. Le GHB provient essentiellement de la transamination du GABA en SSA (semi aldéhyde succinique) qui est réduit par une SSA réductase cytosolique. Le GHB est principalement ré-oxydé en SSA par une GHB déshydrogénase (GHB-DH) ou déshydrogéné en un dérivé désaturé (trans-hydroxycrotonate, T-HCA). Les ronds bleus représentent l'espace mitochondrial.

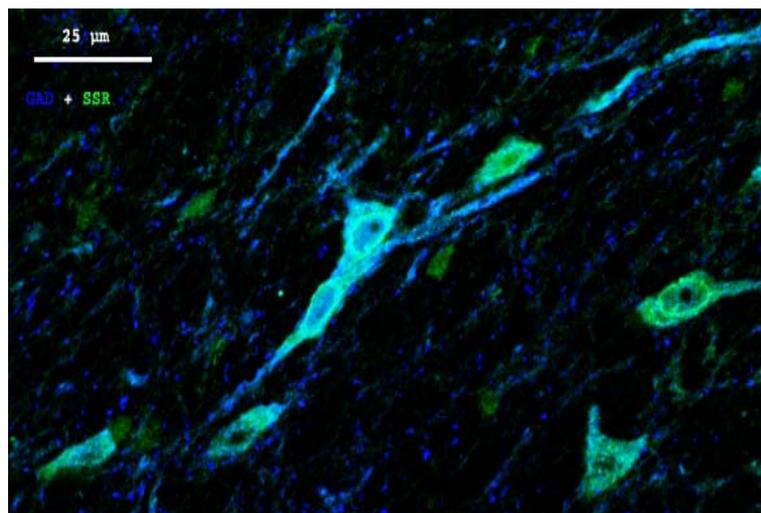


Figure 2 : Images en microscopie confocale de la co-localisation de l'enzyme GAD (en bleu) et de la SSA réductase (en vert) dans la substance noire. Certaines formations somatiques ou punctiformes (terminaisons neuritiques ?) sont uniquement bleues ou vertes, laissant supposer une capture active de GABA pour ces dernières.

production énergétique cellulaire cérébrale, une accumulation de GHB dans le cerveau, le sang et les urines, une augmentation de SSA, délétère pour la mitochondrie, et une augmentation de GABA cérébral qu'on retrouve dans le liquide céphalorachidien chez ces malades. Une lignée de souris transgénique SSADH γ^- a été mise au point pour l'étude de cette maladie et de son traitement. Ces animaux ont une survie moyenne de 21 jours du fait des troubles majeurs dans la réponse énergétique cellulaire (Gupta et al., 2002).

Les études concernant le catabolisme du GHB, étudié dans le cerveau de rat, ont démontré qu'il s'effectuait principalement via une réoxydation en SSA par une GHB déshydrogénase (GHB-DH) dépendante préférentiellement du NADP (Vayer et al., 1985b). Cet enzyme possède pour le GHB un K_m élevé et pourrait correspondre à l'enzyme AKR1A1 (Lyon et al., 2009). Le SSA produit, au niveau du cytosol cellulaire, est en équilibre avec celui du compartiment mitochondrial pour une oxydation (en acide succinique), une transamination (en GABA) ou une nouvelle réduction en GHB. Les recherches menées à l'origine sur ce thème ont montré que l'activité GHB déshydrogénase isolée du cerveau de rat était inhibée par les barbituriques et le valproate et qu'administrées à l'animal, ils entraînaient l'augmentation de GHB cérébral. Cet effet du valproate a été mis à profit pour estimer la vitesse d'accumulation du GHB cérébral et donc accéder à sa vitesse de renouvellement (Vayer et al, 1988). Des temps de 9 à 30 minutes ont pu être calculés, selon la structure cérébrale considérée. Ces vitesses de renouvellement doivent être considérées comme reflétant le flux métabolique cytosolique conduisant à la synthèse du GHB dans ce même compartiment. Par la suite, un enzyme mitochondrial (GHB transhydrogénase) a été mis en évidence, il permet l'oxydation de GHB en SSA par un mécanisme couplé à la réduction de α -cétoglutarate en D- α -hydroxyglutarate (Kaufman and Nelson, 1991). Ce dernier enzyme n'est en revanche pas sensible aux barbituriques et au valproate.

Pour terminer sur le métabolisme du GHB cérébral, trois voies qui semblent accessoires ont été décrites ou postulées. La première consiste en la conversion du 1,4 butanediol en GHB via un enzyme proche ou identique à l'alcool déshydrogénase (Poldrugo and Snead, 1986). Cet enzyme serait induit dans les cellules SH-SY5Y dont l'expression d'AKR7A2 a été fortement réduite. Il s'agirait d'un mécanisme compensateur pour maintenir les concentrations de GHB stables dans les cellules. La deuxième voie accessoire décrite est l'équilibre dans le cerveau entre le GHB et son analogue cyclisé, la γ -butyrolactone (Maitre, 1997). Cet équilibre se ferait spontanément ou par le biais d'une lactonase périphérique. En tout état de cause, les concentrations endogènes cérébrales de γ -butyrolactone et de 1,4 butanediol sont 10 fois

moindres que celles de GHB. Enfin, une troisième voie possible est la déshydrogénation par β -oxydation du GHB pour aboutir au trans- γ -hydroxycrotonate (T-HCA), produit également endogène du cerveau de rat à des concentrations d'environ 0,1 μ M (Ehrhardt et al., 1988). Cette dernière substance possède en outre des propriétés de ligand pour certaines classes de récepteurs GHB (Bourguignon et al., 1988; Hechler et al., 1990, Andriamampandry et al., 2003).

Distribution du GHB endogène

Les concentrations tissulaires de GHB ont été mesurées chez plusieurs espèces animales, le plus souvent dans des régions cérébrales (Doherty et al., 1978; Eli and Cattabeni, 1983). Ces concentrations (Figure 3) sont de 25 à 50 μ M pour les zones les plus riches, et 1-2 μ M pour les régions les plus pauvres (Vayer et al, 1988) (Figure 3). Ces études de distribution (Doherty et al., 1978; LeBeau et al., 2006), inaugurées dans les années 1970, ont depuis largement bénéficié de la spectrométrie de masse. Les concentrations de GHB augmentent avec la durée de l'anoxie et donc les valeurs rapportées après des délais post-mortem importants sont sujet à caution et probablement surestimées. Le sacrifice du rat par irradiation du cerveau aux micro-ondes pendant quelques secondes donne les concentrations les plus basses. Au niveau subcellulaire, les compartiments cytosoliques et les synaptosomes sont les plus riches (Snead, 1987). Dans les organes périphériques, le GHB est également présent à des concentrations variables, la graisse brune fait partie des tissus les plus riches (Nelson et al., 1981). Le rôle du GHB dans les autres tissus que le cerveau n'est pas documenté pour l'instant, certains auteurs pensent qu'il pourrait posséder un rôle métabolique et/ou protecteur contre le stress oxydant. Une partie de ce GHB périphérique pourrait provenir des terminaisons nerveuses que contiennent ces organes. Il est intéressant de signaler que plusieurs organes périphériques contiennent des sites de binding spécifiques pour le GHB, comme c'est le cas pour le GABA et d'autres neurotransmetteurs, peptidiques ou non.

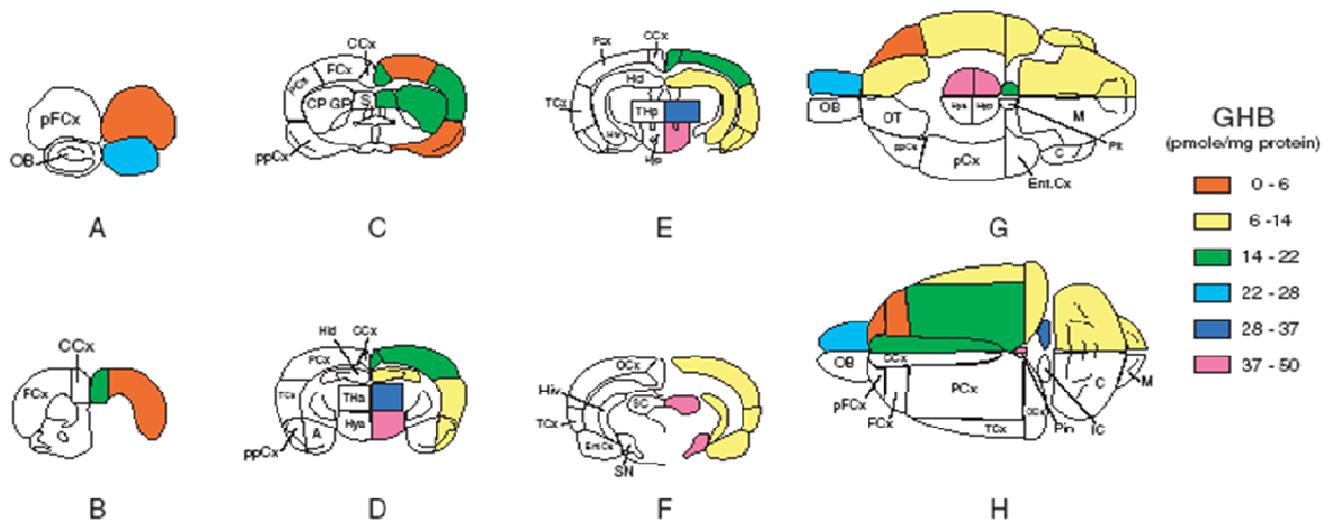


Figure 3 : Distribution du GHB au niveau des différentes structures cérébrales.

Les coordonnées stéréotaxiques sont : A (+11.5, +15.5) ; B (+9.5, +11.5) ; C (+5.5, +9.5)

; D (+3.5, +5.5) ; E (+1, +3.5) F (0, +1) ; G (vue ventrale) ; H (vue dorsale).

Les abréviations des structures cérébrales sont dans l'ordre d'importance des concentrations de GHB : SN, substantia nigra - Hyp, Hypothalamus postérieur - SC, colliculi supérieurs - Pin, glande pinéale ; Hya, hypothalamus antérieur - Tha, thalamus antérieur - IC, colliculi inférieurs - THp, thalamus postérieur ; OB, bulbes olfactifs - A, amygdale - PCx, cortex pariétal - CCx, cortex cingulaire - Rad + m, raphé ; CP + GP, striatum - Pit, glande pituitaire - S, septum - TCx, cortex temporal - ppCx, cortex prépiriforme ; pCx, cortex piriforme - Hid, hippocampe dorsal - Hiv, hippocampe ventral - Ocx, cortex occipital ; Ent.Cx, cortex entorhinal - OT, tubercules olfactifs - C, cervelet - M, medulla oblongata ; pFCx, cortex préfrontal - FCx, cortex frontal (Vayer et coll, 1988a).

Libération du GHB endogène dans le milieu extracellulaire

La libération extracellulaire de substances neurotransmettrices/neuromodulatrices s'effectue généralement par une exocytose Ca^{2+} -dépendante, mais certains neurotransmetteurs sont libérés aux extrémités synaptiques via leur(s) transporteur(s) spécifique(s) de façon indépendante du calcium. Pour ce qui concerne le GHB, la libération de ce composé a été étudiée à partir de deux modèles. Tout d'abord des tranches de tissu cérébral maintenues en survie dans un milieu physiologique (Maitre et al., 1983a; Vayer and Maitre, 1988), le compartiment de GHB de ces coupes étant au préalable marqué par du ^3H -GHB ; ensuite dans des neuroblastomes en cultures (NCB-20 et SH-SY5Y) qui expriment plusieurs marqueurs du système GHB (système de synthèse, transport, binding spécifique) (Kemmel et al., 1998; Lyon et al., 2009). Le compartiment de GHB est soit marqué au préalable par du GHB radioactif, soit le GHB libéré est quantifié par chromatographie couplée à un spectromètre de masse. La radioactivité libérée est toujours authentifiée comme du GHB n'ayant pas subi de transformation.

Ces études ont montré que le GHB était libéré du tissu cérébral ou des cellules neuronales après dépolarisation des membranes cellulaires par des ions K^+ , de la veratridine ou une stimulation électrique. Cette libération est, pour environ 80 %, dépendante de la présence des ions Ca^{2+} . Son intensité varie suivant la région cérébrale considérée et elle est bloquée par l'action de la tétrodontoxine. Ceci suggère fortement une libération par mécanisme d'exocytose. Certains anticonvulsivants comme le valproate ou l'ethosuccimide diminuent les quantités de GHB libérées après stimulation, ce qui pourrait entraîner une diminution des concentrations de GHB intrasynaptiques (Vayer et al., 1988; Vayer et al., 1987a). Les concentrations physiologiques de GHB dans la synapse ne sont pas connues, mais leur réduction pourrait augmenter l'activité GABAergique selon le modèle que nous décrivons pour expliquer le rôle endogène du GHB. Cette augmentation de l'activité GABAergique pourrait contribuer aux effets anti-épileptiques de ces médicaments. Pour ce qui est des cellules SH-SY5Y, la voie de synthèse du GHB a été décrite dans ces cellules ainsi que la libération et l'accumulation du GHB dans le surnageant cellulaire (Lyon et al., 2009). Cette libération doit être finement régulée, l'enzyme de synthèse apparaît souvent lié aux extrémités pré-synaptiques et aux synaptosomes et pourrait être associée à cette régulation.

Transport du GHB par le tissu cérébral

Plusieurs catégories de transporteurs du GHB ont été caractérisées dans le tissu nerveux cérébral. Tout d'abord, le GHB est capturé par des vésicules synaptiques isolées du cerveau de rat, avec un K_m de l'ordre du millimolaire, similaire aux constantes cinétiques du transport vésiculaire du GABA, de la glycine, du glutamate et de l'ATP (Muller et al., 2002). Cette capture nécessite la présence d'ATP et d'ions chlore dans le milieu et est fortement inhibée par la nigéricine et la bafilomycine A1. Mais le résultat le plus intéressant dans ce domaine est le fait que la capture vésiculaire du GHB radioactif est inhibée par le GABA et la glycine, avec un IC_{50} d'environ 1 mM. Ceci suggère que le GHB est accumulé dans les vésicules synaptiques en empruntant le transporteur VIAAT (vesicular inhibitory aminoacid transporter), en compétition avec l'accumulation de GABA principalement, pour les étages supérieurs du cerveau. Les principaux autres neurotransmetteurs testés sont sans effet sur ce transport. Ce résultat suggère que le GABA et le GHB sont co-accumulés dans les mêmes vésicules synaptiques (Figure 4).

Un système d'accumulation du GHB tritié a également été mis en évidence dans des vésicules membranaires d'origine synaptique (Benavides et al., 1982b), dans des synaptosomes (McCormick and Tunnicliff, 1998), dans des neurones NCB-20 (Kemmel et al., 1998). Ces systèmes de transport sont dépendants des ions sodium et chlore et possèdent des K_m d'environ 30-50 μ M suivant les modèles étudiés. Ils sont inhibés compétitivement par certains analogues structuraux du GHB et par le GABA. Au niveau de synaptosomes de souris, l'acide 2-hydroxycinnamique apparaît comme l'un des inhibiteurs les plus puissants ($K_i = 144 \mu$ M).

Les récepteurs du GHB

Depuis 1982, on sait qu'il existe dans le cerveau de rat des sites de binding (sites de fixation membranaires, réversibles, saturables et à haute affinité) pour le GHB (Benavides et al., 1982a). Ces sites sont spécifiques car ils ne fixent que le GHB et ses analogues structuraux, à l'exclusion du GABA, du glutamate et d'autres neurotransmetteurs connus. Sur le plan cinétique, les expériences de fixation du GHB sur des membranes brutes de cerveau de rat mettent en évidence deux classes de sites : l'une à haute affinité (domaine nanomolaire),

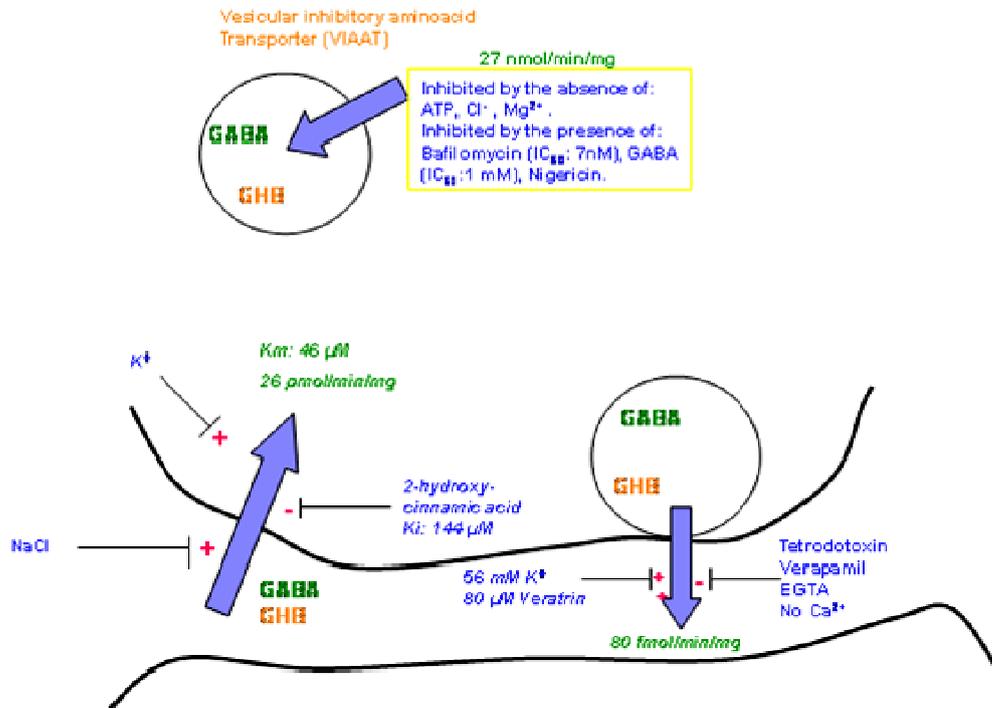


Figure 4 : Transport et libération du GHB à partir de vésicules synaptiques co-accumulant le GHB et le GABA. Le transporteur vésiculaire du GHB est le VIAAT qui capture également le GABA en échange de la dissipation d'un gradient de proton. La libération extracellulaire du GHB s'effectue par un processus exocytotique qui co-libère du GABA. Il existe en outre une capture Na⁺-dépendante du GHB par un transporteur de la membrane plasmique, en compétition avec le GABA.

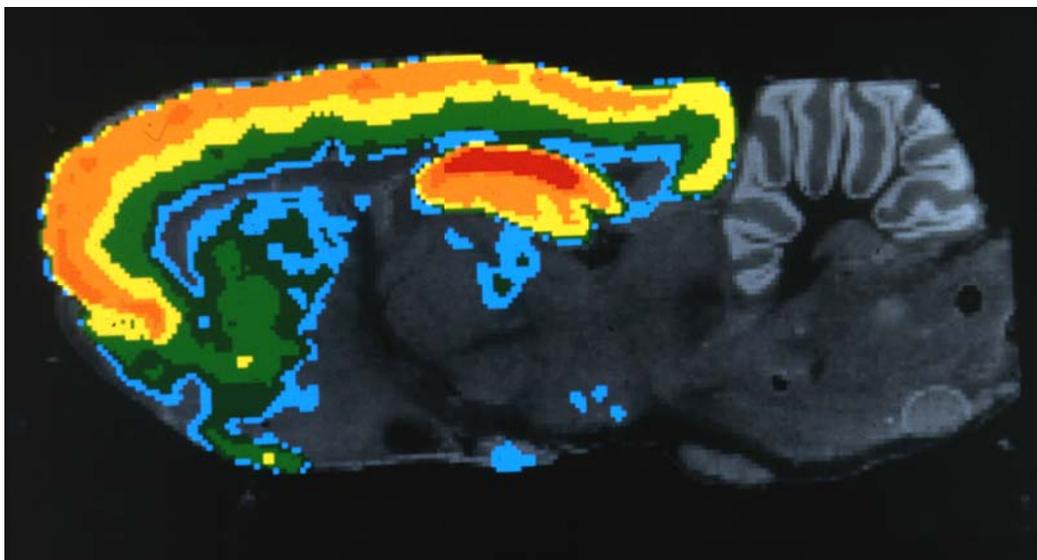


Figure 5 : Distribution sur une coupe sagittale de cerveau de rat du site de binding de haute affinité pour le GHB. Les densités relatives de sites sont en couleur arbitraire : rouge densité maximum des sites de fixation du GHB dans les couches supérieures du cortex et CA1 hippocampe ; jaune densité importante des sites de fixation du GHB dans les couches intermédiaires du cortex et de l'hippocampe ; vert Faible densité des sites de fixation du GHB dans les couches profondes du cortex et du striatum, bleu Très faible densité des sites de fixation du GHB dans le striatum, le thalamus et les noyaux dopaminergiques A9, A10 et A12.

l'autre à plus faible affinité (domaine micromolaire). Il n'est pas exclu que cette dernière classe soit due à une fixation sur un site enzymatique ou sur un transporteur. La distribution des sites de haute affinité dans le cerveau de plusieurs mammifères (rat, singe, homme) (Snead and Liu, 1984) montre une grande hétérogénéité, avec généralement une forte densité de sites dans l'hippocampe, le cortex en général, les bulbes olfactifs, certaines régions du striatum et du thalamus, et les régions dopaminergiques A9, A10 et A12 (Castelli et al., 2000; Hechler et al., 1989; Hechler et al., 1987; Mandel et al., 1987) (Figure 5). Dans les autres régions cérébrales, il n'existe soit pas de sites de haute affinité, soit ces sites sont en densités très faibles (cervelet, tronc cérébral). Au cours du développement cérébral chez le rat, les sites de binding pour le GHB apparaissent vers le 17^{ème} jour après la naissance, dans l'hippocampe et le cortex frontal d'abord (Snead, 1994). Du point de vue distribution, ontogénèse, mais aussi pharmacologie, paramètres cinétiques et plasticité, il n'y a rien de commun entre les sites GHB, GABA-B ou GABA-A.

En effet, les actions de la toxine pertussis et du GTP sur le binding GHB laissent penser que ces sites constituent des récepteurs authentiques pour le GHB et font partie de la famille des GPCR (Ratomponirina et al., 1995; Snead, 2000). En fractionnement subcellulaire, le binding GHB est surtout dense au niveau des synaptosomes avec une localisation préférentiellement pré-synaptique (Maitre et al., 1983b; Snead, 1987).

A partir d'une fraction membranaire brute de cerveau de rat et en utilisant un cocktail de fortes concentrations de triton X-100 et de NaCl, une fraction protéique a pu être solubilisée qui présentait de l'affinité pour le GHB et le T-HCA radioactif (Cash et al., 1996). Cette fraction a été purifiée par chromatographie d'affinité et électrophorèse préparative. Cette dernière technique a permis de montrer l'existence dans la préparation de deux bandes protéiques majoritaires, ayant des poids moléculaires respectifs d'environ 54 et 45 kDa. Seule la première bande a pu être obtenue en quantité suffisante pour être électroéluée, digérée et séquencée. Les sondes correspondantes obtenues ont permis le criblage d'une banque de cDNA d'hippocampe de cerveau de rat et l'obtention d'un clone codant pour une protéine de 512 AA (56 kDa) (Andriamampandry et al., 2003). La séquence de cette protéine ne présente aucune homologie avec d'autres protéines, excepté 105 AA (sur 512) qui sont communs avec la tétraspanine-5 ou TM4SF9 (Figure 6). La conformation de la protéine permet de prédire 7 domaines transmembranaires et le messenger correspondant n'existe que dans des extraits de tissu cérébral, et donc dans aucun des tissus périphériques testés. La fixation du GHB radioactif sur des cellules CHO transfectées montre un K_d de 426 nM pour le GHB et pas

d'affinité pour le GABA, le baclofen ou le glutamate. Par contre, le T-HCA présente une meilleure affinité pour ce récepteur que le GHB tandis que le NCS-382 (analogue du GHB) ne déplace pas le GHB fixé sur le récepteur. Cette dernière substance possédant certaines propriétés antagonistes pour les effets du GHB *in vivo*, permet de définir deux classes de récepteurs GHB sur des bases pharmacologiques : NCS-382 sensible ou insensible. Sur ces bases, le récepteur cloné chez le rat (GHBR), qui possède un homologue chez l'homme et la souris, fait partie de la famille des récepteurs pour le GHB/T-HCA, insensible au NCS-382. En expérience de patch-clamp sur des cellules CHO transfectées, le GHB (100-150 nM) induit une activation d'un courant entrant, activé de façon non réversible par le GTP- γ S et non antagonisé en présence de NCS-382.

A la recherche de récepteurs exprimés par le cerveau humain, une banque de cDNA de cortex frontal humain a été criblée par des sondes dérivées de la partie spécifique de GHBR (Andriamampandry et al., 2007). Un clone (B6H919) qui présente une relative faible homologie avec GHBR (environ 40 %) a été isolé. Ce clone est homologue à plusieurs séquences décrites dans les banques de données, codant pour plusieurs protéines : 3 chez l'homme, 2 chez la souris, 1 chez le rat (voir le tableau I qui concerne la famille des récepteurs humains). Les récepteurs humains, qui ont fait l'objet de nos études, ont été nommés respectivement GHBH1, GHBH2 et GHBH3.

Les algorithmes prédisent au moins 9 domaines transmembranaires pour tous les membres GHBH, mais la structure bidimensionnelle la plus fréquemment décrite propose 11 domaines transmembranaires. Ils sont relativement bien conservés lors des comparaisons intra et inter-espèces, ce qui permet de proposer une classification par la comparaison des extrémités et des boucles intra et extracellulaires. Les extrémités N-terminales sont intracytoplasmiques (dans un modèle à 11 domaines transmembranaires) et les extrémités C-terminales extracellulaires. Pour GHBH3, l'extrémité N-terminale est très courte (Figure 7). La différence entre GHBH2h et GHBH1h réside dans la taille de la quatrième boucle extracytoplasmique : 13-14 AA pour GHBH2h. Pour GHBH3, la différence la plus notable est la longueur deux fois plus importante des 3^{ème} et 5^{ème} boucles extracellulaires. Toutes ces structures possèdent des sites probables de palmitoylation sur la plupart des domaines transmembranaires ainsi que des sites de phosphorylation par la Protéine Kinase C (PKC). En ce qui concerne ces derniers, pour le modèle à 10 domaines transmembranaires, un site de phosphorylation est présent sur l'extrémité C-terminale intracytoplasmique pour GHBH1h, GHBH2h et GHBH2m. On retrouve un motif « leucine zipper » pour GHBH1 et GHBH2 ; motif habituellement décrit

Famille		Numéro d'accès des banques de gènes	Tissu	Taille (acides aminés)	Emplacement chromosomique
GHBR1	hGHBR1	AK021918, FLJ11856	10 weeks human head embryo	445	8
GHBR2	hGHBR2	AK00922, FLJ10060	10 weeks human head embryo	448	17
	mGHBR2	AK008081	Mus musculus adult male small intestine	450	15
	rGHBR2	<u>Partial sequences</u> CB782916 CA340251 BU759348	Rat hypothalamus lateral prostate Mixed tissues	450	7
GHBR3	hGHBR3	BC009750	Pancreas, adenocarcinoma	465-469	20
	mGHBR3	AK009850	Mus musculus adult male tongue	460	2
	rGHBR3	XM_230720	BN/SsNHsdMCW	450	3

TABLEAU I: Codes d'accès des banques de données, taille en aminoacides, localisations chromosomiques et tissus ou banque d'ADNc à partir desquels les protéines de la famille des récepteurs du GHB (GHBR) ont été isolées ou caractérisées.

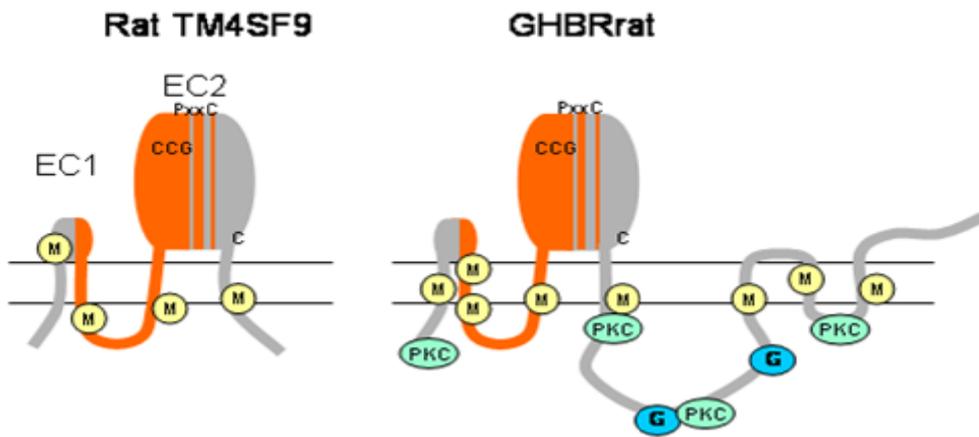


Figure 6 : Comparaison de la structure de TM4SF9 (tétraspanine 5 de rat) et de la structure de GHBR. M : sites de myristoylation ; PKC : sites consensus de phosphorylation par PKC. GHBR (chromosome 17 rat) possède 512 AA ; 105 sont communs avec la tétraspanine 5.

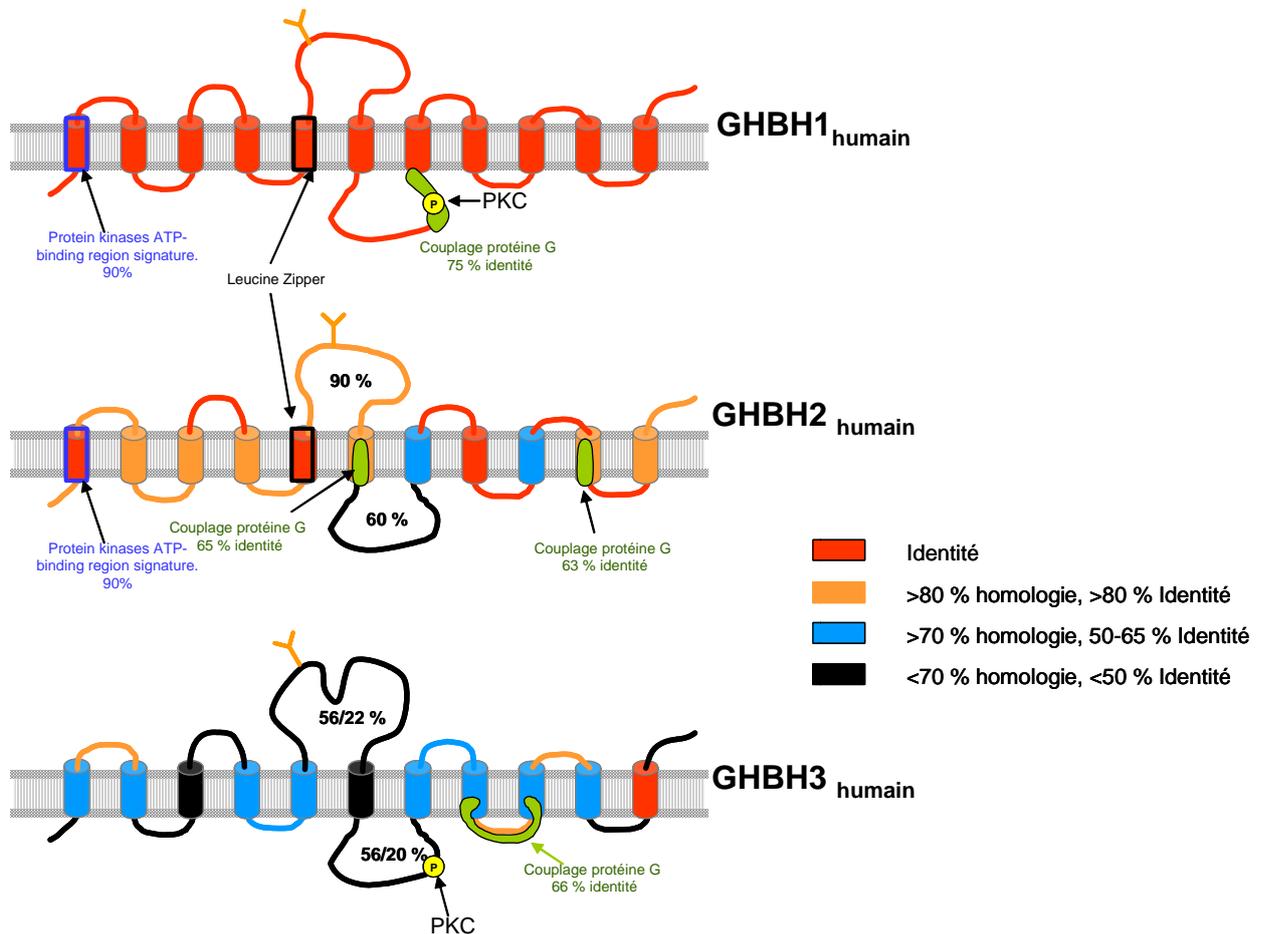


Figure 7 : Un modèle de représentation de la structure bidimensionnelle des récepteurs du GHB chez l'humain (GHBH) où sont indiqués par un code couleur les homologues et identités des domaines transmembranaires (modèle à 11 domaines transmembranaires) et des boucles intra et extracellulaires. Les sites possibles de phosphorylation par la PKC, les domaines de couplage à la protéine G ainsi qu'un motif « Leucine zipper » sont mentionnés.

pour les facteurs de transcription, mais qui laisse supposer une possible dimérisation de ces récepteurs. Des motifs de couplage avec des protéines G (famille 1, environ 70 % d'identité) sont présents pour GHBH1 et 3.

L'alignement des extrémités et des boucles de ces récepteurs montre qu'il existe une similitude intra et inter-espèce (AK008081 est l'homologue GHBH2h chez la souris) pour toutes les boucles extra et intracellulaires de GHBH1 et GHBH2. Toutes ces structures sont moins homologues pour GHBH3, mais présentent une conservation de certains motifs ; seule la 3^{ème} boucle intracytoplasmique de GHBH3 est totalement différente.

Les bases de données s'accordent en définissant de 9 à 11 domaines transmembranaires pour la protéine, la localisant ainsi dans la membrane plasmique, et avec les extrémités N et C-terminales respectivement intra et extracellulaires pour le modèle comportant 11 domaines transmembranaires. Malgré cette structure non conventionnelle, les banques et bases de données présentent les trois récepteurs GHBH comme liés à des protéines G. En fait, une structure à 7 domaines transmembranaires n'est pas impossible et est suggérée par l'utilisation de certains algorithmes spécialisés qui proposent l'existence d'une structure particulière non connue dans le détail (domaine Pfam, DUF1011) qui existe dans certains récepteurs à protéines G.

Pour le moment, nos études se sont focalisées sur le récepteur GHBH1 (GPCR 172A dans les banques) et un mutant de ce clone (C12K32) qui diffère de GHBH1 par la délétion d'une cytosine. Les deux clones transfectés dans des cellules CHO répondent positivement à l'application d'une quantité de GHB submicromolaire. Cependant, contrairement à C12K32, le récepteur GHBH1 se désensibilise rapidement après l'application d'une faible quantité de GHB (0,1 μ M). Les études électrophysiologiques et de binding ont donc été réalisées sur le récepteur C12K32. Celui-ci fixe le GHB avec un K_d de 114 nM et ne possède aucune affinité pour le GABA ou le glutamate. C12K32 fixe le NCS-382 avec un IC_{50} de 120 nM. Dans des expériences de patch-clamp, le GHB induit une réponse dose-dépendante avec un EC_{50} de 130 nM. Cet effet est antagonisé par le NCS-382, non reproduit par le GABA, et est sensible au $GTP\gamma S$ placé dans la pipette d'enregistrement. Les cellules CHO transfectées par C12K32 fixent le $GTP\gamma S$ avec un EC_{50} de 462 nM pour le GHB et un IC_{50} de 2,9 μ M pour le NCS-382. Finalement, C12K32 et GHBH1 sont deux isoformes du récepteur GHB humain.

Il semble que la mutation qui affecte C12K32 au niveau de l'extrémité C terminale du récepteur supprime l'expression de sites consensus de phosphorylation par la PKC ou une

GRK, phosphorylations réversibles qui modulent les réponses cellulaires pilotées par le (les) récepteur(s) et assurent en particulier leur désensibilisation fonctionnelle.

Transduction des signaux induits par les récepteurs GHB

Lorsqu'il est utilisé à doses physiologiques ($< 50 \mu\text{M}$ *in vitro*, $< 100 \text{ mg/kg}$ *in vivo*), le GHB n'interfère qu'avec ses cibles naturelles dans le cerveau et induit des effets non spécifiques très limités, voir totalement absents pour les doses les plus faibles. Dans ces conditions expérimentales, on peut décrire pour le GHB un ensemble de réponses cellulaires qui lui sont spécifiques. Les modèles utilisés jusqu'à présent ont été soit des tranches de cerveau maintenues en survie, soit des synaptosomes, soit des lignées cellulaires exprimant certains récepteurs du GHB (neurones NCB-20 par exemple). Un certain nombre d'expériences ont été également conduites chez le rat *in vivo*, après administration de GHB aux doses comprises entre 5 et 100 mg/kg. Les principaux enseignements de ces expériences ont été les suivants :

- Le GHB inhibe de façon dose-dépendante l'augmentation de cAMP induite par la forskoline, que ce soit dans des synaptosomes, tranches de cerveau (Snead, 2000) ou cellules NCB-20 (manuscrit en révision). Cette inhibition est bloquée par l'antagoniste partiel des récepteurs GHB (NCS-382) mais pas par les antagonistes des récepteurs GABA-B qui ne bloque que la réduction de cAMP induite par le baclofen dans les mêmes conditions que pour le GHB. Sur les cellules NCB-20, l' IC_{50} de cet effet est compatible avec les concentrations de GHB endogène et avec les K_d des récepteurs pour le GHB. Par contre, pour des concentrations en GHB supérieures à 20-50 μM , l'effet du GHB s'éteint progressivement. Pour des concentrations de GHB supérieures à 200 μM , on observe uniquement l'augmentation de cAMP induite par la forskoline.
- Sur les conductances calciques, nos études ont montré que les situations étaient différentes selon le degré de polarisation membranaire. En utilisant des cellules NCB-20 dépolarisées en patch-clamp ou des synaptosomes en présence de KCl, on peut montrer que la présence de GHB en quantité physiologique réduit l'entrée des ions Ca^{2+} dans ces structures de façon NCS-382 dépendante. Les antagonistes GABA-B n'ont pas d'effet

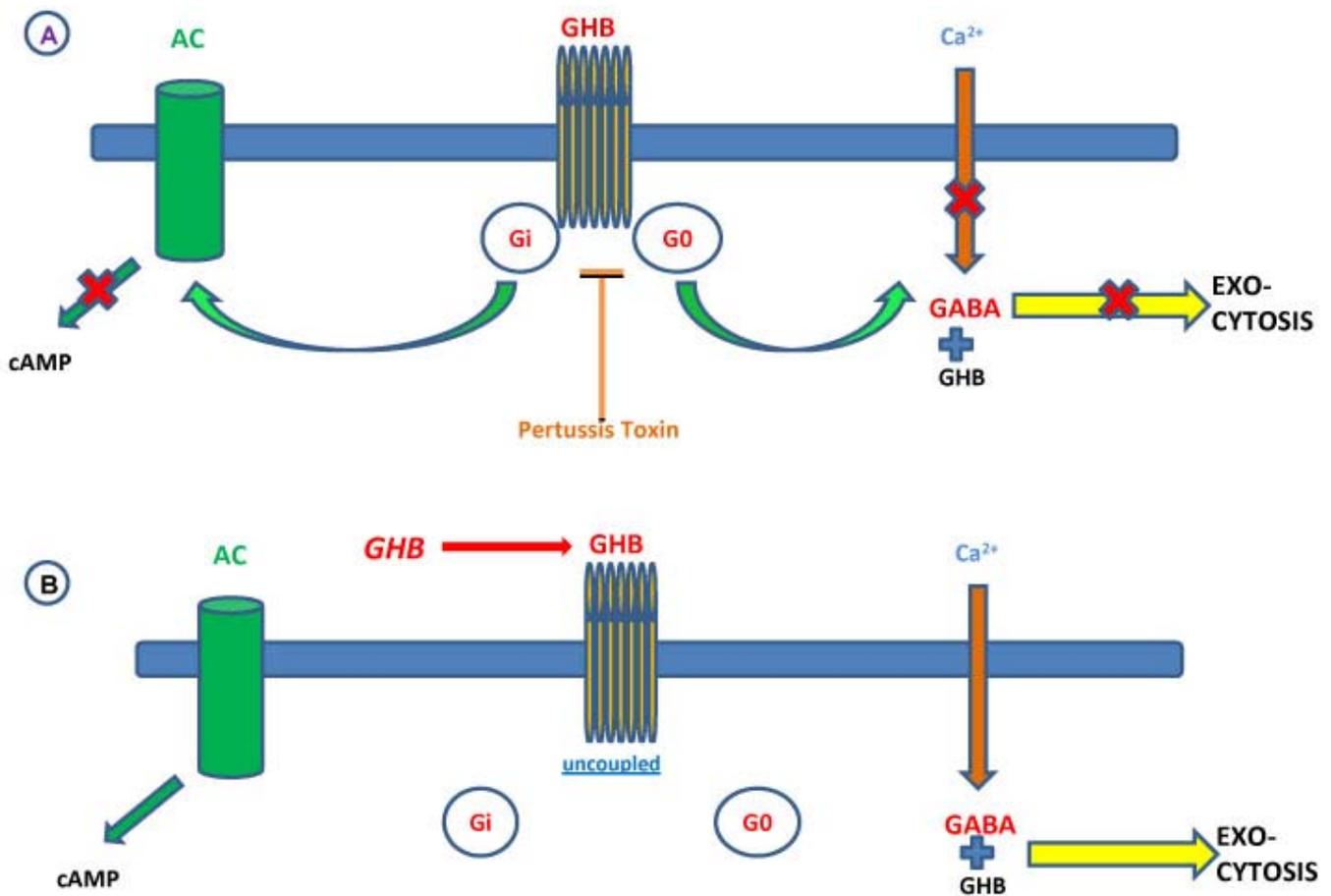


Figure 8 : Transduction du signal induit par la sollicitation des récepteurs GHB exprimés par les neurones NCB-20. Dans les conditions physiologiques (image A), le récepteur GHB couplé à des protéines G sensibles à la toxine pertussis, module la synthèse du cAMP et inhibe les entrées de Ca²⁺ (canaux L) dans l'extrémité présynaptique dépolarisée, entraînant l'inhibition de la libération de GABA (mais aussi de dopamine). Sous l'effet d'un apport massif de GHB (conditions thérapeutiques ou récréatives ; image B), le récepteur GHB se découple de la réponse cellulaire et devient silencieux, levant l'inhibition sur les entrées de Ca²⁺ et sur la libération de GABA (et de dopamine). Ce phénomène, étudié surtout sur les neurones NCB-20, existe dans le cerveau dans certaines régions, comme l'ont montré les expériences de microdialyse *in vivo*.

sur ces mouvements de calcium s'effectuant via des canaux de type L (Brancucci et al., 2004; Kemmel et al., 1998).

Par contre, si on travaille sur des cellules NCB-20 maintenues à leur potentiel de repos, des concentrations de GHB entre 5 et 25 μM induisent des sorties d'ions K^+ et une hyperpolarisation (Harris et al., 1989; Snead, 1996). Ces mécanismes sont dus à l'activation, à la suite d'une entrée de Ca^{2+} via des canaux de type T, de canaux potassium insensibles au tétraéthylammonium et à la charybdotoxine, mais sensibles à l'apamine (Figure 8). Cette pharmacologie est caractéristique des canaux potassium activés par le calcium (small conductance calcium-activated channels). Ces sorties de potassium sont reproduites par l'agoniste de synthèse NCS-356 des récepteurs GHB et bloquées par l'antagoniste NCS-382. Les antagonistes GABA-B n'ont pas d'effet (Kemmel et al., 2003).

En se plaçant dans des conditions aptes à suivre les variations de concentrations intracellulaires du calcium (cellules NCB-20 chargées en fluo-4), on constate que des quantités physiologiques de GHB (jusqu'à 25 μM) entraînent des augmentations de fluorescence dans la majorité des cellules qui sont bloquées par le NCS-382 et reproduites par le NCS-356. La stimulation des cellules pendant un temps prolongé (supérieur à 5-10 min) ou par des concentrations de GHB plus importantes (50-100 μM) provoque une disparition de l'entrée de calcium et une extinction de la réponse cellulaire induite par le GHB.

- Toutes ces expériences montrent qu'à concentrations physiologiques, le GHB exerce une activité hyperpolarisante sur les neurones au repos et diminue les phénomènes exocytotiques sur des extrémités pré-synaptiques dépolarisées. A fortes concentrations de GHB, une stimulation GABA-B non spécifique s'installe et simultanément les récepteurs GHB sont désensibilisés de façon à ce que la réponse cellulaire GHB-spécifique disparaisse. On observe alors un effet GABA-B prédominant (Carter et al., 2003; Cruz et al., 2004; Kaupmann et al., 2003; Lobina et al., 1999; Madden and Johnson, 1998), bloqué par les antagonistes spécifiques de ces récepteurs GABA, tandis que des récepteurs GHB désensibilisés restent silencieux. Seul un blocage préalable des récepteurs GABA-B par un antagoniste spécifique peut permettre de démasquer un effet GHB spécifique (Berton et al., 1999).

- Plusieurs résultats chez l'animal in vivo permettent de commencer à cerner le rôle physiologique du GHB sur certains paramètres cellulaires, fonctionnels et comportementaux. L'exploration de ce rôle nécessite l'administration de faibles doses de GHB de façon à très peu modifier la stimulation des récepteurs GHB sans entraîner d'effets non spécifiques (GABA-B essentiellement), car dans ces situations expérimentales, l'augmentation des concentrations de GHB cérébral est insuffisante pour stimuler des cibles de faibles affinités ou pour désensibiliser les récepteurs GHB. Si ces dernières cibles sont activées, elles parasitent les résultats et masquent les effets propres liés aux hyperstimulations des récepteurs GHB.

Les résultats rapportés concernent toujours de petites doses de GHB administrées chez l'animal, sans dépasser 100 mg/kg. Dans ces conditions, on a pu observer les résultats suivants :

- L'administration répétée chez le rat de doses faibles de GHB (10 mg/kg) entraîne l'apparition de troubles neurologiques et mnésiques (anomalies du « grasping reflexe », de la mémoire de travail et la mémoire spatiale) qui semblent liés à des effets neurotoxiques entraînant des pertes neuronales dans les régions CA1 de l'hippocampe et le cortex préfrontal. Ces anomalies sont prévenues par la co-administration de l'antagoniste NCS-382 et ne surviennent pas dans les régions du cerveau de l'animal dépourvues de récepteurs GHB (Pedraza et al., 2009).
- Le niveau d'anxiété, évalué chez la souris dans la situation expérimentale du « light-dark box », est augmenté très significativement (de façon similaire à l'anxiété observée suite à l'administration de meta-Chlorophenylpiperazine) lorsqu'on administre aux animaux des doses de GHB de 40-80 mg/kg, ip (Navarro et al., 2008).
- Les effets de faibles doses de GHB (5 mg/kg) et de doses moyennes (25-100 mg/kg) ont été testés sur le niveau d'agressivité de souris mâles isolées. Les doses faibles renforcent l'agressivité vis-à-vis d'un intrus alors que les doses plus fortes la réduisent, sans modification de l'activité spontanée des animaux (Navarro et al., 2007).
- De fortes doses de GHB possèdent chez l'animal un effet hypothermisant, à l'exemple de nombreux sédatifs, hypnotiques et anesthésiques. Par contre, l'administration de faibles doses (5-10 mg/kg) augmente la température corporelle de l'animal (Kaufman et al., 1990).

Un modèle pour le système GHB cérébral endogène

Le modèle d'organisation moléculaire et fonctionnel que nous proposons pour expliciter le rôle du GHB dans le cerveau tient compte de tous les résultats connus pour le moment sur le sujet (Figure 9). Il s'agit d'un modèle construit par ajouts successifs et utile pour la formulation d'hypothèses de travail sur le plan fondamental mais aussi sur le plan pharmacologique et thérapeutique. Il n'existe à notre connaissance pas de modèle concurrent pour le moment.

Les données expérimentales qui ont été rapidement exposées plus haut plaident pour l'existence d'une signalisation synaptique utilisant le GHB comme médiateur. Celui-ci est produit, accumulé et libéré par des synapses contenant plusieurs marqueurs spécifiques des terminaisons GABA : GAD et VIAAT par exemple. Le GHB est produit dans ces terminaisons par la transformation du GABA. On peut également imaginer des cellules produisant du GHB à l'aide de GABA capturé dans le milieu extracellulaire. GHB et GABA sont co-accumulés dans des vésicules synaptiques et libérés par exocytose lors de la dépolarisation neuronale. Des récepteurs GHB spécifiques, localisés de préférence du côté pré-synaptique, lient ce GHB avec haute affinité. Il s'agit de récepteurs couplés à des protéines G (G_o/G_i) qui pilotent des modifications de cAMP via l'activation d'adénylates cyclases, probablement sensibles aux ions calcium. Ces récepteurs, lorsqu'ils sont stimulés par une libération de GHB, réduisent par contre coup l'entrée de calcium (canaux L) dans l'extrémité présynaptique et éteignent la libération du transmetteur, en l'occurrence du GABA (et du GHB co-libéré). Des expériences de microdialyse cérébrale ont montré que l'administration de faibles concentrations de GHB réduisait la libération de GABA dans le cortex frontal. Il s'agit d'un mécanisme de rétrocontrôle inhibiteur de l'activité GABA, le GHB participant à la régulation de ces synapses. En conséquence, lorsqu'il est en quantité physiologique, le GHB réduit globalement le tonus GABA et induit les conséquences fonctionnelles décrites (anxiété, neurotoxicité, hyperthermie) soit directement, soit avec la contribution d'autres neurotransmetteurs (inhibition de la libération de dopamine). Sur les terminaisons au potentiel de repos, le GHB présent à un effet facilitateur sur l'entrée de calcium via des canaux T et favorise une hyperpolarisation neuronale via l'ouverture de canaux potassium dépendants du calcium.

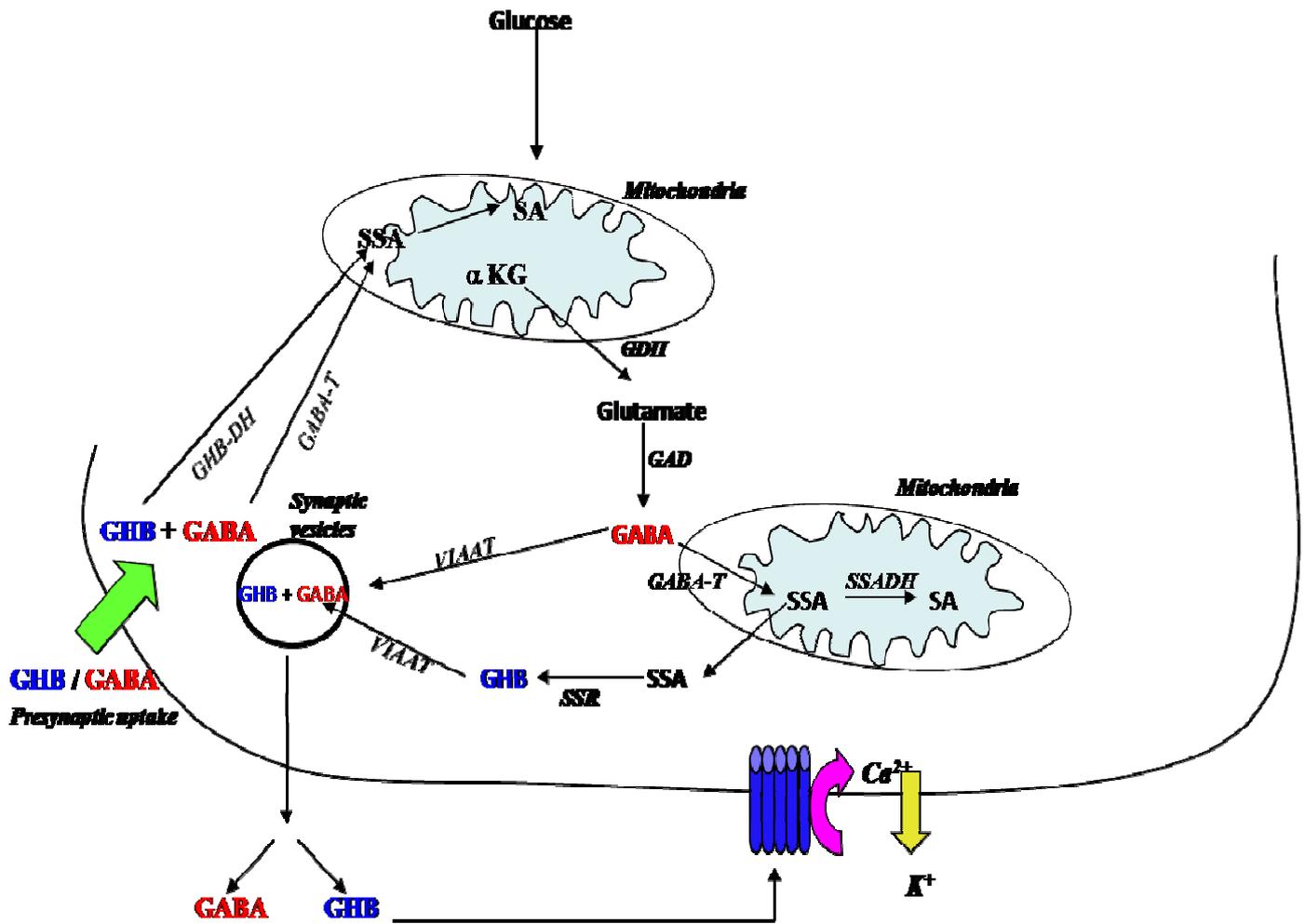


Figure 9 : Modèle d'organisation du système GHB participant à la régulation de l'activité GABA. Lors de l'activité synaptique, GABA et GHB sont co-libérés. Le GABA sollicite ses récepteurs correspondants tandis que le GHB exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la synapse en diminuant les entrées de Ca^{2+} via des récepteurs présynaptiques couplés à des protéines G. Le GHB possède également une action directe ou indirecte sur les terminaisons dopaminergiques en inhibant leurs effets lorsqu'il est présent à doses physiologiques.

La potentialisation du système GHB endogène par l'apport de GHB exogène débouche globalement sur une hyperGABAergie fonctionnelle utilisée en thérapeutique

Une hyperGABAergie est une augmentation globale du tonus GABA au niveau du système nerveux central. Elle a pour conséquence un certain nombre de modifications neurologiques et mentales, entraînant par exemple le plus souvent des effets antiépileptique, anesthésique, sédatif, hypnotique, anxiolytique qui sont largement utilisés en clinique humaine. Ces différents effets sont variables suivant la façon avec laquelle le système GABA est potentialisé. On peut altérer la dégradation du GABA (vigabatrine, valproate) ou cibler certains récepteurs GABA-A (barbituriques, neurostéroïdes, benzodiazépines, alcool éthylique, anesthésiques divers) ou GABA-B (baclofen). Les ligands GABA-B ont récemment été proposés dans l'anxiolyse et le sevrage à l'alcool (Frankowska et al., 2007; Maccioni et al., 2008).

Par contre, le ralentissement de l'activité GABA ne possède que des effets délétères et les substances actives dans ce domaine n'ont d'intérêt que comme outil pharmacologique, du moins pour l'instant (inhibiteurs de GAD déclenchant des convulsions plus ou moins généralisées, antagonistes ou agonistes inverses de certains sites allostériques GABA-A ... etc).

Pour altérer le fonctionnement du système GABA, on cible de façon plus ou moins spécifique un de ses éléments fonctionnellement important (enzymes, transporteurs, récepteurs). Dans ce contexte, le système GHB apparaît comme fonctionnant en symbiose avec le système GABA, de par sa participation à la régulation de l'activité GABA (Castelli, 2008). Le système GHB exprime, comme nous l'avons montré, plusieurs cibles d'intérêt (métabolisme, transporteurs, récepteurs), mais de plus, contrairement au GABA, le GHB peut pénétrer le SNC (Maitre, 1997). De ce fait, il est facile de potentialiser le système physiologique à l'aide de l'administration de GHB. Cette stratégie, comme nous allons le voir, a pour conséquence globale une potentialisation du système GABA qui est utilisée en thérapeutique dans plusieurs indications (Adelsberger et al., 1998; Carter et al., 2009; Colombo et al., 1998).

- Dans un premier temps, l'utilisation du GHB en thérapeutique suggère un problème de dose à absorber ou à administrer pour entraîner ces effets bénéfiques. Nous avons vu que chez l'animal, de petites doses entraînent plutôt des effets délétères en freinant l'activité GABA cérébrale. Ces effets néfastes peuvent aller jusqu'à l'apparition de

crises de petit mal épileptique chez certaines espèces et pour des doses moyennes de GHB (200-300 mg/kg) (Godschalk et al., 1977). Ces inconvénients n'ont jamais été observés en clinique humaine.

Chez l'animal, pour obtenir un effet sédatif et/ou anxiolytique, il faut que les concentrations cérébrales de GHB atteignent environ 100-200 μ M (400-500 mg/kg ip). Si les concentrations augmentent encore (700-800 μ M dans le SNC), la plupart des animaux présentent une anesthésie avec un sommeil lent profond de type IV (Pardi and Black, 2006; Van Cauter et al., 2004). C'est surtout pendant cette phase et avec ces concentrations de GHB que se produisent certaines sécrétions de neurohormones, en particulier d'hormone de croissance (GH). Ce type de sommeil réparateur ayant tendance à disparaître avec l'âge, le GHB a été proposé chez l'homme âgé et surtout chez le narcoleptique.

- A l'heure actuelle, le GHB possède en thérapeutiques les indications suivantes :
 - chez le narcoleptique (autorisé par la FDA en 2003), son administration pendant la phase nocturne (4.5g x 2 per os pendant une nuit de 8 heures) facilite l'installation d'un sommeil réparateur et contribue à faire disparaître les crises de sommeil subites et de cataplexie pendant la journée (Broughton and Mamelak, 1979; Thorpy, 2007)
 - en France, le GHB a été utilisé pendant plusieurs années en anesthésie générale (iv). Il est actuellement supplanté par des substances de synthèse, plus maniables et plus puissantes, mais conserve quelques indications dans ce domaine dans certains pays (Allemagne notamment) (Kleinschmidt et al., 1997),
 - Dans plusieurs pays européens (Italie, Autriche notamment), le GHB est utilisé comme aide au sevrage dans l'intoxication alcoolique chronique en concurrence avec les benzodiazépines (Gallimberti et al., 1989),
 - Enfin le GHB a été expérimenté avec succès aux USA pour le traitement de la fibromyalgie (Russell et al., 2009).
- Comme de nombreux médicaments agissant par potentialisation sélective du système GABA et entraînant sédation, anxiolyse, facilitation des relations sociales, levée des inhibitions comportementales, atténuation des stress, facilitation du sommeil, etc... , le GHB est sujet à un usage détourné aigu ou chronique (Wong et al., 2004), pouvant

dans de rares cas déboucher sur une dépendance (Nicholson and Balster, 2001). Cette dépendance peut être induite chez certaines lignées de rats, de souris ou de singes (Colombo et al., 1995; Lobina et al., 2005). Elle est plus fréquente chez l'homme en association avec des médicaments ou des drogues comme les benzodiazépines, les barbituriques, certains anesthésiques ou l'alcool éthylique.

Le GHB est peu toxique et plusieurs grammes sont nécessaires pour induire un coma avec dépression respiratoire, le plus souvent réversible sauf s'il est ingéré avec d'autres substances potentialisatrices (benzodiazépines, alcool éthylique le plus souvent) (Kim et al., 2007b).

Mécanismes de l'action neuropharmacologique du GHB

L'administration à la périphérie, chez l'animal ou chez l'homme, de doses thérapeutiques de GHB (plusieurs grammes chez l'homme, 500 à 1000 mg/kg chez l'animal), induit pendant 3-5 heures des concentrations de GHB de l'ordre de 800-1000 μM au niveau cérébral. La demi-vie du GHB dans l'organisme est très courte et varie suivant les individus et les espèces animales. Ces fortes concentrations saturant les sites récepteurs GHB, les transporteurs et les voies de dégradation de cette substance.

Au niveau des récepteurs, nous savons que plusieurs d'entre eux voient leurs réponses électrophysiologiques disparaître rapidement après une sollicitation importante (ainsi pour GHBH1 exprimé dans des cellules hétérologues). Nous savons aussi qu'un polymorphisme très limité (échange d'une seule base) change le cadre de lecture et donne naissance à un récepteur tronqué à son extrémité C terminale, faisant disparaître à la fois des sites de phosphorylation régulateurs et l'aptitude à la désensibilisation.

Au niveau de cellules NCB-20 différenciées, l'hyperstimulation des récepteurs GHB fait disparaître à la fois le binding $\text{GTP}\gamma\text{S}$, la réponse cAMP, la modulation de conductances calciques pilotées par les récepteurs GHB exprimés par ces cellules.

De ce fait, la nécessité de fortes doses de GHB pour obtenir un effet pharmacologique bénéfique est due à la nécessaire désensibilisation de la plupart de ces récepteurs pour les rendre non fonctionnels de façon temporaire et réversible. La conséquence de ce phénomène

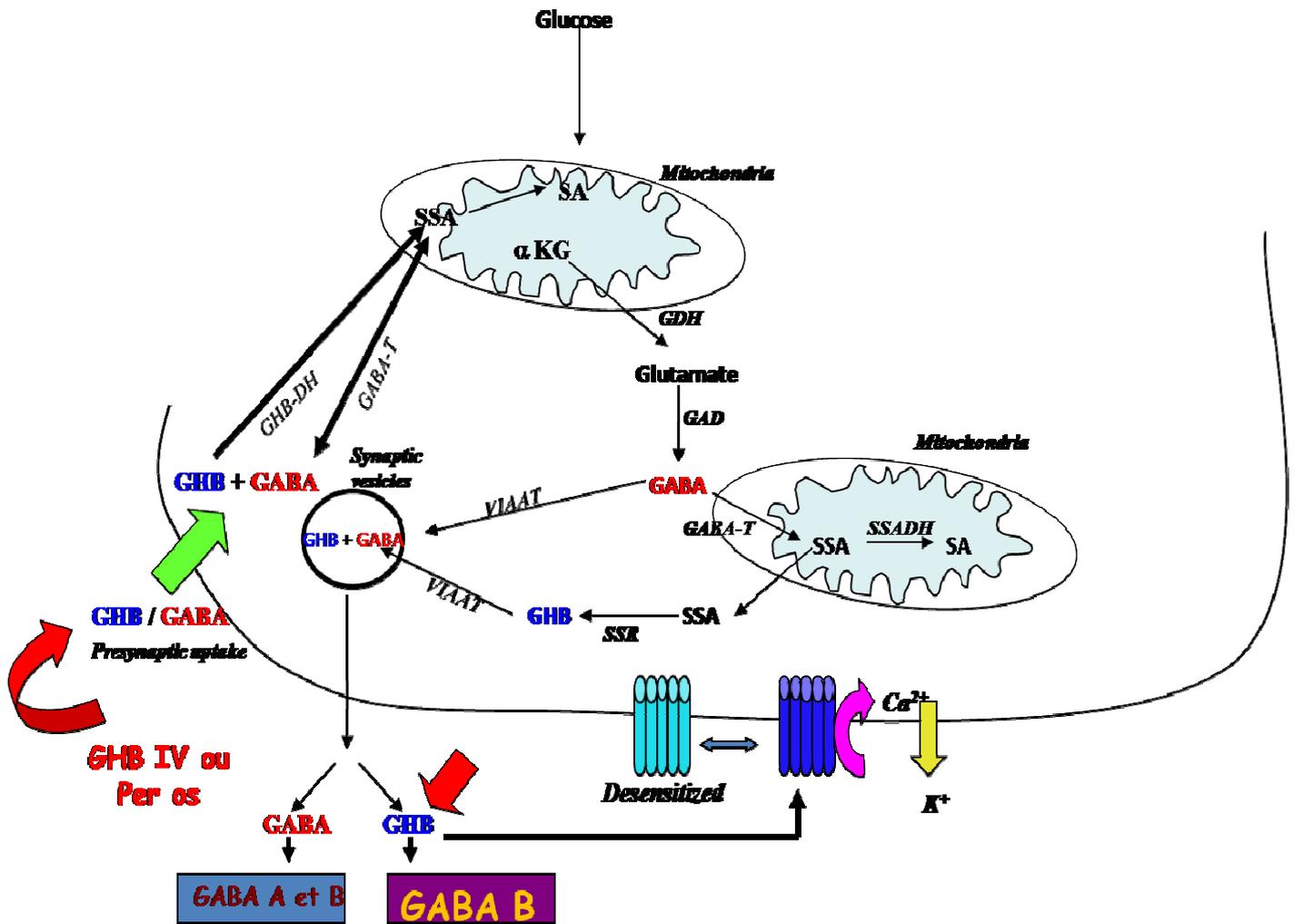


Figure 10 : L'apport massif de GHB exogène à des fins thérapeutiques ou pharmacologiques, chez l'animal ou chez l'homme, reproduit un effet GABAergique plus ou moins important selon la dose avec anxiolyse, sédation, sommeil, anesthésie. Ses effets ne sont pas reproduits par des ligands GABA-B spécifiques. Les fortes concentrations cérébrales de GHB désensibilisent les récepteurs correspondants et stimulent les récepteurs GABA-B. Ces effets, combinés avec l'augmentation de la libération du GABA interagissant avec les récepteurs GABA-A, induisent un mécanisme GABAergique global auquel s'additionne une action dopaminergique au fait de la levée de l'hyperpolarisation induite par le tonus GHB physiologique dans les synapses dopaminergiques.

est que l'effet hyperpolarisant du GHB disparaît ainsi que le rétrocontrôle inhibiteur sur la libération de GABA. On obtient une hyperstimulation des récepteurs GABA avec leurs conséquences neuropharmacologiques : sédation, anxiolyse, anesthésie, sommeil, neuroprotection (Gao et al., 2008) (Figure 10).

A cet effet s'ajoute une stimulation directe du GHB à fortes concentrations sur les récepteurs GABA-B, effet non spécifique du GHB qui accentue le tonus GABA post-synaptique. Dans ces conditions, l'administration de NCS-382 est inopérante et seuls les antagonistes GABA-B réduisent les effets GABAergiques observés.

De plus, l'apport massif de GHB sature les transporteurs et les activités GHB déshydrogénase et GABA-transaminase qui peuvent conduire à la néosynthèse de GABA, potentialisant encore les effets sur les récepteurs GABA.

En définitive, l'apport massif de GHB conduit à une potentialisation GABA du SNC par une voie originale, en contraste total avec les effets du GHB à faible doses. Des ligands GABA-B spécifiques ne reproduisent pas ces effets et ne possèdent pas les mêmes indications que le GHB en thérapeutique. Le sommeil physiologique lent profond lié au GHB serait dû à une commande GABA, commune avec d'autres anesthésiques, et au ralentissement de l'activité des canaux calciques T qui ont été impliqués dans la régulation du sommeil et dans une perte de poids (chez l'animal et chez l'homme) due à une lipolyse (qui explique l'utilisation du GHB chez les « bodybuilders », américains en particulier) (Husain et al., 2008).

Signalons enfin pour terminer que nous avons confirmé, par microdialyse cérébrale dans le cortex frontal chez l'animal, que de petites doses de GHB induisaient une baisse de la libération extracellulaire du GABA alors que de fortes doses entraînaient au contraire une augmentation de la libération de cette substance dans cette même région cérébrale (Gobaille et al., 1999). On peut suggérer finalement que des ligands de synthèse ayant une forte affinité pour certains récepteurs GHB (avec ou sans affinité additionnelle pour les récepteurs GABA-B) seraient des agents pharmacologiques et/ou thérapeutiques intéressants, ne possédant pas les inconvénients actuels du GHB en thérapeutique humaine (métabolisation rapide, doses actives importantes). De façon similaire, il est prévisible que des antagonistes spécifiques des récepteurs GHB pourraient, sans désensibiliser les récepteurs, aboutir aux mêmes résultats pharmacologiques et être utiles, par exemple, pour la protection et la survie neuronale dans certaines circonstances pathologiques (Vergoni et al., 2000).

TRAVAUX PERSONNELS

Compte tenu des connaissances acquises sur le système de neurotransmission utilisant le GHB dans le CNS, des adaptations et des modifications subies par ce système lorsqu'il est en présence de fortes concentrations de GHB exogène à des fins thérapeutiques dans plusieurs indications, plusieurs questions utiles peuvent être posées :

1. Le système GHB exerce son action neuropharmacologique via la potentialisation du système GABA (et particulièrement GABA-B). Est-ce que ce mécanisme résume les mécanismes de l'action du GHB dans le cerveau ?
2. Des ligands spécifiques GABA-B, en particulier le baclofen, ne possèdent pas les mêmes indications thérapeutiques ni la même pharmacologie que le GHB (Vacher and Bettler, 2003). Peut-on considérer le GHB comme un ligand GABA-B ordinaire et banal ?
3. Au niveau moléculaire et fonctionnel, baclofen et GHB ne modifient pas l'excitabilité neuronale avec la même distribution régionale dans le cerveau (van Nieuwenhuijzen et al., 2009). Quelles sont les différences mécanistiques entre ces deux substances ?
4. Sur le plan psychopharmacologique, la prise conditionnelle de baclofen ne peut être substituée à celle du GHB. Le baclofen ne donne pas lieu ni à récompense ni à dépendance. Pour quelles raisons ?
5. Finalement, outre les modifications fonctionnelles et métabotropiques attribuées aux GHB, n'existe-t-il pas des mécanismes additionnels, à la fois physiologiques et pharmacologiques, qui donnent une spécificité au GHB et qui pourraient être éventuellement reproduits par des substances strictement de type GHB ou de type mixte GHB/GABA-B ?

Nous avons dans le présent travail apporté des éléments de réponse à ces questions, en analysant certaines modifications épigénétiques et génétiques induites par le GHB à doses pharmacologiques, au moment de ses effets maximum sur le comportement et le niveau de vigilance de l'animal.

Dans un premier temps, nous avons montré que le GHB à doses thérapeutiques chez l'animal *in vivo*, participait au remaniement de la structure de la chromatine et donc à des

modifications dans l'expression du génome du cerveau en inhibant tout ou partie des histones déacétylases cérébrales.

Nous avons ensuite exploré plus précisément les modifications de l'expression des gènes de l'hippocampe et du cortex frontal chez des animaux ayant reçu une dose thérapeutique de GHB. Cette étude a montré de nombreuses modifications, en particulier dans l'expression de certaines protéases et métalloprotéases de la membrane plasmique cellulaire cérébrale.

Ce dernier résultat nous a permis de postuler un rôle pour le GHB à doses thérapeutiques dans la régulation de l'élimination de certaines peptides/protéines délétères du cerveau qui s'accumulent dans certaines protéinopathies. Nous avons montré qu'un traitement chronique par du GHB per os chez des souris transgéniques APPSWE activait l'expression de la néprilysine cérébrale et augmentait l'élimination des peptides β -amyloïdes.

L'ensemble de ces résultats conforte l'idée que les mécanismes d'action du GHB à doses thérapeutiques ne se limitent pas à une potentialisation non spécifique des phénomènes GABAergiques cérébraux. Un profond remaniement de l'expression de nombreux gènes s'installe rapidement suite à l'administration de GHB pouvant élargir le rôle de cette substance et de ses analogues synthétiques en thérapeutique et suggérer pour le système GHB cérébral des implications importantes dans le contrôle de l'expression génétique locale, modulée par les échanges de GHB avec la périphérie de l'organisme.

Le présent travail regroupe les résultats de 3 articles explorant les mécanismes génétiques et épigénétiques induits par le gamma hydroxybutyrate (GHB) dans le cerveau de rat.

Premier article:

Klein C, Kemmel V, Taleb O, Aunis D, Maitre M. (2009) Pharmacological doses of gamma-hydroxybutyrate (GHB) potentiate histone acetylation in the rat brain by histone deacetylase inhibition. *Neuropharmacology* 57, 137-147.

Second article (en revision) :

Kemmel V, Klein C, Taleb O, Dembélé D, Jost B, Aunis D, Maitre M. A single acute pharmacological dose of gamma-hydroxybutyrate (GHB) modifies multiple gene expression patterns in rat hippocampus and frontal.

Certaines expériences de ce travail ont été effectuées en collaboration avec l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) de Strasbourg (microarrays).

Troisième article (en préparation) :

Klein C, Kemmel V, Mathis C, Meyer L, Taleb O, Aunis D, Mensah-Nyagan A G, Maitre M. Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) regulates brain amyloid beta peptides through modulation of proteolytic degradation.

Cet article a été préparé en collaboration avec le laboratoire d'imagerie et neurosciences cognitives (UMR 7191 CNRS) de Strasbourg pour les tests comportementaux. Les résultats contenus dans ce manuscrit ont fait l'objet d'une déclaration d'invention et d'un dépôt de brevet.

En annexe des articles développés dans cette thèse, figurent des travaux effectués pendant mes années de Maitrise et de DEA dans le laboratoire du Professeur Anant N Malviya (Centre de Neurochimie du CNRS de Strasbourg, UPR 416, Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire des Interactions Cellulaires). Ces travaux, concernant le mécanisme de signalisation nucléaire impliquant les ions Calcium ne seront pas discutés dans la présente thèse mais constituent une étape importante dans ma formation.

Gensburger, C., Freyermuth, S., Klein, C., and Malviya, A. N. (2003). In vivo nuclear Ca^{2+} -ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 1225-1228.

Klein, C., Gensburger, C., Freyermuth, S., Nair, B. C., Labourdette, G., and Malviya, A. N. (2004). A 120 kDa nuclear phospholipase C gamma 1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR. *Biochemistry* 43, 15873-15883.

Malviya, A. N., and Klein, C. (2006). Mechanism regulating nuclear calcium signaling. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 403-422.

Klein, C., and Malviya, A. N. (2008). Mechanism of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate produced in the nucleus, nuclear located protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase. *Front Biosci* 13, 1206-1226.

A. Le Gamma-hydroxybutyrate induit à doses thérapeutiques des modifications épigénétiques chez le rat

Le terme épigénétique concerne l'information contenue dans la chromatine indépendamment de la séquence nucléotidique de l'ADN qui porte l'information génétique. En raison de la corrélation observée entre modifications post-traductionnelles des histones et état transcriptionnel de la chromatine, des mécanismes ont été avancés dans lesquelles différentes combinaisons de modifications post-traductionnelles des histones modifient la composition de la chromatine et l'expression d'une population de gènes.

1) Les modifications post-traductionnelles des histones modifient l'expression du génotype

a) Données succinctes sur l'organisation de l'ADN génomique des cellules eucaryotes

Le premier niveau d'organisation de l'ADN est constitué par les histones. Les histones sont des protéines basiques en contact étroit avec l'ADN. À ce jour, cinq histones sont décrites :

- les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment un octamère globulaire (de structure 2x (H2A, H2B, H3, H4)) qui permet l'enroulement de 146 paires de bases d'ADN en un tour trois quart afin de former un nucléosome ;
- l'histone H1 permet quant à elle la compaction des nucléosomes (Kornberg and Lorch, 1999). et rigidifie la structure hélicoïdale ainsi obtenue.

Le niveau suivant de compaction de l'ADN fait intervenir d'autres protéines dites « non histones ». Le degré de condensation de l'ADN autour des nucléosomes et des protéines non histones est variable le long des chromosomes. Il est faible dans l'euchromatine (accessible à la machinerie des ARN polymérase) et il est élevé dans l'hétérochromatine (gènes peu accessibles et souvent non exprimés ou silencieux). Ce degré de condensation est régulé par des modifications des extrémités N-terminales des histones (phosphorylations, acétylations, méthylation, ubiquitination, sumoylation, ribosylation) (Grant, 2001) qui sont catalysées par des enzymes spécifiques (Davie and Spencer, 1999; Wu et al., 1986). Les modifications

covalentes des histones agiraient soit directement en modifiant la compaction de l'enroulement d'ADN autour des nucléosomes, soit indirectement en constituant des signaux permettant le recrutement de protéines capables de modifier la structure de la chromatine (Davie, 1998).

b) Mécanismes de régulation de la compaction de l'ADN

A l'heure actuelle, deux théories non mutuellement exclusives permettent d'expliquer le rôle de l'acétylation des histones dans la transcription des gènes.

Dans la théorie physico-chimique, l'acétylation des histones neutralise les charges positives portées par les résidus lysines et diminue les liaisons électrostatiques entre les histones (chargés positivement) et l'ADN (chargé négativement) permettant ainsi la décompaction de la chromatine et un accès facilité aux gènes pour la transcription.

Dans la théorie du Code Histone (Fischle et al., 2003; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2000), les modifications covalentes des histones constituent un marqueur épigénétique d'expression des gènes permettant le recrutement de facteurs spécifiques intervenant dans l'activation ou la répression de la transcription. Le Code Histones établit un lien direct entre la modification de certains résidus de la queue des histones qui crée des liaisons pour des effecteurs protéiques et l'état transcriptionnel de la chromatine. Une modification d'histone peut aussi en influencer une autre de manière synergique ou antagoniste.

Les modifications post-traductionnelles portées par les histones peuvent aussi être reconnues par les protéines impliquées dans la régulation de l'état de la chromatine grâce à des domaines de reconnaissances particuliers (bromodomaine et groupe acétyle, chromodomaine et groupe méthyle ...) (Aasland and Stewart, 1995; Aasland et al., 1996). A noter que certaines de ces protéines sont capables de se fixer aux domaines extra-nucléosomiques des histones sans besoin de modifications post-traductionnelles de celles-ci (Cosgrove and Wolberger, 2005) et une fois fixées, elles peuvent recruter divers autres éléments afin d'induire activation ou répression transcriptionnelle, réparation ou compaction de l'ADN.

c) Acétylation et désacétylation des Histones

Globalement, les deux principales modifications des histones dans le cas de la régulation de la transcription sont soit une acétylation, soit une méthylation (Peterson and Laniel, 2004). De manière générale, ces modifications sont antagonistes, ce qui entraîne la mise en place d'un équilibre dynamique entre territoires hétérochromatiniens (généralement non exprimables et méthylés sur certains acides aminés clés) et euchromatiniens (généralement exprimables et acétylés) (Cress and Seto, 2000; Goll and Bestor, 2002).

L'acétylation / déacétylation est un phénomène hautement réversible contrôlé par les activités concomitantes et indissociables des histones acétyltransférases (HAT) (Roth et al., 2001) et déacétylases (HDAC) (Davie and Chadee, 1998; Marks et al., 2003) (Figure 11).

L'acétylation, associée à une activation de la transcription, s'effectue sur certains résidus lysine précis (lysines en positions 9, 14, 18 et 23 pour l'histone H3 – Figure 12) par les HATs, entraînant généralement la diminution de l'interaction inter-nucléosomes entre les histones et le fragment d'ADN qui fait le lien entre les nucléosomes. Ceci entraîne le relâchement de la chromatine, la faisant passer à l'état euchromatinien, et permet ainsi une meilleure accessibilité aux autres facteurs (Hansen et al., 1998; Tse et al., 1998).

d) Les histones acétyltransférases (HAT)

On attribue 2 grandes fonctions (Pazin and Kadonaga, 1997; Wade and Wolffe, 1997) aux HATs, fonctions qui en font des co-activateurs transcriptionnels :

- leur activité enzymatique acétyltransférase, menant à la déstabilisation de la structure condensée de la chromatine (Workman and Kingston, 1998) et à la stimulation de la transcription (Ikeda et al., 1999; Kouzarides, 1999) ;
- leur capacité à former des complexes multi-protéiques avec des éléments de la machinerie transcriptionnelle (Armstrong and Emerson, 1998; Ikeda et al., 1999; Liu et al., 1999).

Les 6 familles HATs connues (regroupées par homologie de séquence et motifs spécifiques

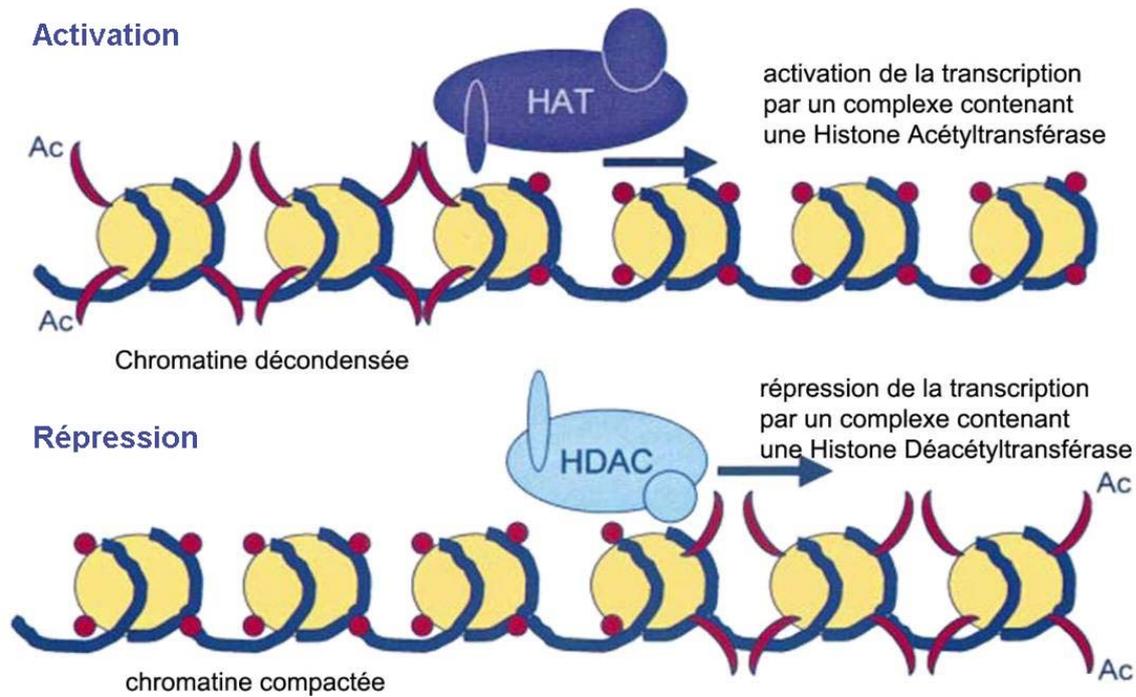


Figure 11 : Régulation de la transcription par la modification des histones. Les nucléosomes sont représentés en jaune, les queues des histones acétylées émergeants du nucléosome en rouge et l'ADN en bleu. Les HATs aussi bien que les HDACs forment des complexes avec des cofacteurs pour pouvoir agir. (de Ruijter et al., 2003)

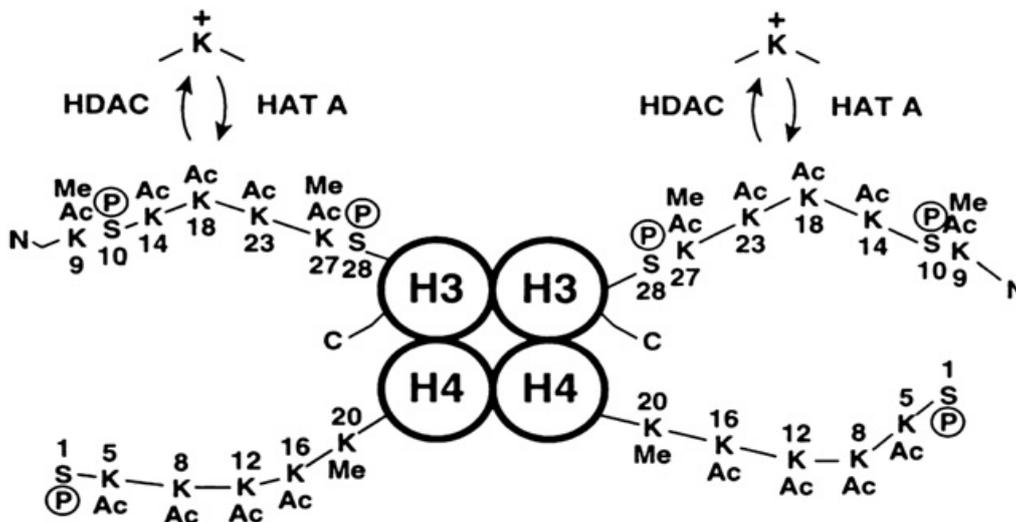


Figure 12 : Les histones dans le nucléosome. Les résidus lysines (K) des queues N-terminales des histones H3 et H4 sont des sites potentiels d'acétylation/déacétylation par les HATs et les HDACs. K^+ : lysine chargé positivement, S : serine, E : acide glutamique, Ub : ubiquitine, P : phosphate, Ac : acétylé, Me : méthyle

(Lee and Workman, 2007) catalysent le transfert d'un résidu acétyle depuis le cofacteur acétyl-coenzyme A sur les groupements amines des résidus lysines des histones ou de protéines non-histones (Roth et al., 2001) tels les facteurs de transcription (Gregory et al., 2001).

e) Les histones-désacétylases ou HDACs

Les activités HATs sont contre balancées par les activités HDACs de manière à permettre la réalisation d'un équilibre des niveaux d'acétylation des histones (voir de protéines non histones) dans les cellules (Bannister et al., 2000; Scolnick et al., 1997; Tomita et al., 2000). Les activités HDACs sont plutôt reliées à la répression de la transcription (Davie and Chadee, 1998; Forsberg and Bresnick, 2001; Yang and Seto, 2003), comme les HATs elles opèrent en général au sein d'un complexe multi-protéique (Figure 11). Le premier signal de répression est situé sur l'ADN, il s'agit de groupements méthyles fixés sur des cytosines situés en 5' de guanosines (îlots CpG). Les HDACs sont alors recrutées par l'intermédiaire de protéines liant ces groupements méthyles ou d'enzymes de méthylation de l'ADN. Ce genre de complexe, la localisation sub-cellulaire et les modifications post-traductionnelles subies constituent les modes de régulation des HDACs (Sengupta and Seto, 2004). Leur participation à de nombreux complexes de répression et leur activité enzymatique, fait des HDACs des co-répresseurs transcriptionnels.

Les HDACs sont principalement regroupés en 4 classes selon leur homologie de séquence avec ceux de la levure *S. cerevisiae* (de Ruijter et al., 2003); (Lee and Workman, 2007).

La classe I (de Ruijter et al., 2003) regroupe les homologues de la protéine de la levure RPD3 (Reduced Potassium Dependency 3). Elle comprend les HDACs 1, 2, 3 et 8 des mammifères. Elles sont exprimées pratiquement de manière ubiquitaire et localisées majoritairement dans le noyau (Figure 13). Seul HDAC3 possède un signal d'export nucléaire (NES). En général elles sont recrutées par des facteurs de répression de la transcription, ou qui « éteignent » les gènes, qui sont liés de façon covalente à l'ADN.

La classe II (Bertos et al., 2001); (Verdin et al., 2003) regroupe les homologues de la protéine de levure HDA1 (Histone Deacetylase 1). On y retrouve les HDACs 4, 5, 6, 7, 9 et 10 des mammifères. Leur expression est plus restreinte que pour les HDAC de classe I, suggérant un

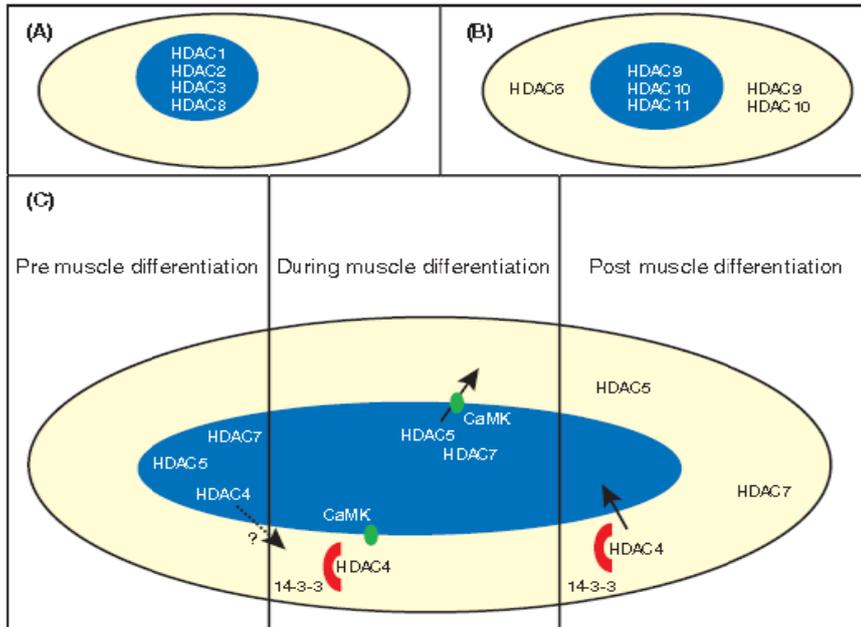


Figure 13 : Localisation cellulaire des HDACs de classe I (A) et de classe II (B) Le noyau est représenté en bleu. La protéine 14-3-3, en rouge, peut retenir les HDAC4, 5 ou 7 dans le cytoplasme quand ils sont phosphorylés. La Calmoduline Kinase (CaMK), en vert, est impliquée dans l'exportation hors du noyau par la voie du signal calcium/calmoduline lors de la différenciation des muscles (C). (de Ruijter et al., 2003)

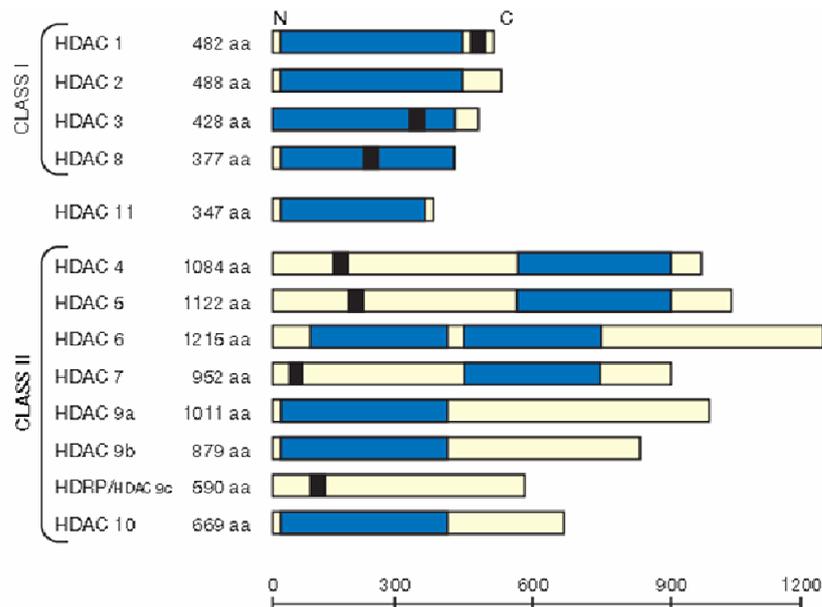


Figure 14 : Représentation schématique des différentes isoformes d'HDAC des mammifères. Le domaine catalytique est en bleu. En noir le domaine NLS. N, N-terminal, C, C-terminal. (de Ruijter et al., 2003)

rôle plus spécifique dans les phénomènes de différenciation et de développement (Buggy et al., 2000); (Galasinski et al., 2002). Leur localisation n'est pas strictement nucléaire (Figure 13), dans certains cas ils peuvent se « déplacer » dans le cytoplasme (Chawla et al., 2003) (Miska et al., 1999).

La classe III regroupe les homologues de la protéine de levure Sir2 (Silent Information Regulator 2), homologue de SIRT1 (sirtuine) des mammifères qui a un rôle important dans la survie neuronale et qui est testée dans le traitement de la chorée de Huntington (Parker et al., 2005). Les HDACs de classe III ont des particularités les différenciant des autres HDAC, elles nécessitent un cofacteur (le NAD⁺), sont insensibles à la trichostatine A (un des inhibiteurs les plus puissant des HDACs de classes I et II) (Yoshida et al., 1990), et alors que les classes I et II partagent des homologies de séquence limitées, Sir2 et les protéines Sir2-like ne présentent aucune ressemblance de séquence avec les autres HDACs.

La classe IV ne comprend que HDAC 11 (Gao et al., 2002);(Ledent and Vervoort, 2006), c'est l'isoforme la plus récemment clonée. Elle partage des régions communes avec les classes I et II (Figure 14), sa localisation est uniquement nucléaire, son expression est restreinte à certains tissus (rein, cœur, cerveau, muscles squelettiques et testicules). Elle semble posséder des fonctions spécifiques distinctes des autres HDACs.

f) Inhibiteurs des HDACs

Du fait du nombre très faible d'inhibiteurs des HAT proposés (Balasubramanyam et al., 2004a; Balasubramanyam et al., 2004b; Lau et al., 2000; Zheng et al., 2005), il est difficile de moduler les activités HAT. Par contre, de nombreux inhibiteurs des HDACs ont été mis au point au cours de la recherche de substances anti cancéreuse (Dokmanovic et al., 2007).

Ces inhibiteurs se sont avérés efficaces dans le traitement de tumeurs hématologiques ou solides (Marks, 2004; Marks et al., 2004). Leur mode d'action est multiple (induction de l'arrêt du cycle cellulaire, promotion de la différenciation ou de la mort cellulaire, blocage de la migration cellulaire ...) (Marks and Jiang, 2005; Marks et al., 2000; Richon et al., 1998; Sambucetti et al., 1999).

On compte cinq classes de composés présentant une activité HDAC inhibitrice (HDAC_i) :

- des acides gras à chaîne courte : acide butyrique, 4-phenylbutyrique et acide valproïque ;
- des acides hydroxamiques tels la trichostatine A (TSA), l'oxamflatine et le Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid (SAHA) ;
- des peptides ou tétrapeptides cycliques tels la trapoxine A et l'apicidine ;
- des benzamides (p-N-acetyl dialine) tels la N-acétyl dinaline et le MS-27-275 (dérivé benzamide synthétique).
- des cétones spécifiques (trifluorométhylcétone, -cétamides)

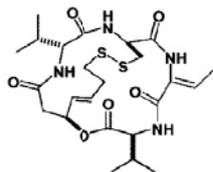
2) **Résultats obtenus : implication du GHB dans l'inhibition des HDACs cérébrales**

Le Gamma-hydroxybutyrate (GHB) appartient à la même famille d'acides gras à chaîne courte comprenant le butyrate, le valproate, le phenylbutyrate et ses dérivés, des molécules qui sont toutes proches du point de vue structurel (Figure 15).

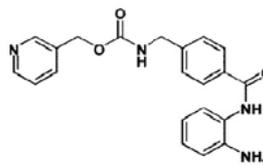
Toutes ces molécules sont des inhibiteurs d'HDAC de faible puissance (Voir tableau II) qui sont actives à des concentrations de plusieurs centaines de micromolaires (Lu et al., 2004). La concentration physiologique tissulaire du GHB est inférieure à 25 μ M, mais les concentrations obtenues après administration thérapeutique ou récréative atteignent un niveau de concentration de plusieurs centaines de micromolaires, donc se situent à des concentrations suffisantes pour inhiber significativement les HDACs.

L'intérêt pour les différentes familles d'inhibiteurs d'HDACs s'est récemment développé à la suite de résultats montrant leurs effets antiprolifératifs et neuroprotecteurs par des mécanismes complexes incluant l'accumulation d'histones acétylés qui sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes, la prolifération cellulaire et la mort cellulaire (Arts et al., 2007; Dokmanovic and Marks, 2005; Facchetti et al., 2004; Kim et al., 2007a). De plus il a aussi été mis en évidence, à la suite de l'administration intrapéritonéale de GHB chez l'animal, des effets neuroprotecteurs et anti-angiogéniques sur certains modèles de cancers (Basaki et al., 2001; Sadasivan et al., 2006).

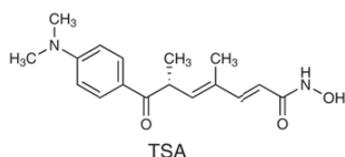
Peptides ou térapeptides cycliques :
depsiptide



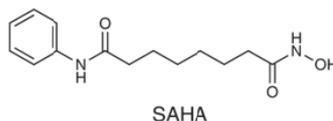
Benzamides :
MS-275



Acides hydroxamiques :
trichostatin A

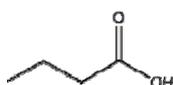


SAHA

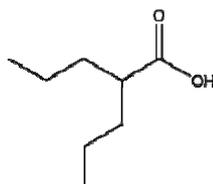


Acides gras à chaîne courte :

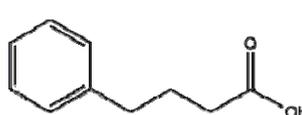
Acide butyrique



Acide valproïque



Acide 4-phénylbutyrique



Gamma-hydroxybutyrate :

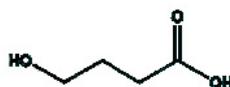


Figure 15 : Structure chimique de différents inhibiteurs d'HDACs et du GHB.

Classe	Composé	Gamme de concentrations de l'activité inhibitrice des HDACs	
		HDACs purifiées	Cellules
acides hydroxamiques	Trichostatin A (TSA)	nM	nM
	Suberoyl anilide hydroxamic acid (SAHA)	nM	μM
	LBH-589	μM	nM
	PXD-101	nM	μM
peptides cycliques	Depsiptide (FK-228)	nM	μM
acides gras à chaîne courte	Valproate	μM	μM
	Phenyl butyrate	μM	μM
Benzamides	MS-275	μM	μM

TABLEAU II : Gamme d'activité de quelques inhibiteurs d'HDAC.

a) Hyperacétylation des histones H3

Pour commencer notre étude nous avons cherché à savoir si le GHB à dose thérapeutique pouvait avoir un effet sur l'acétylation des histones. Nous avons donc injecté une dose de 1 g/kg de GHB intraperitonéalement à des rats de manière à induire un effet pharmacologique chez tous les animaux traités et permettre d'atteindre une concentration en GHB dans le cerveau suffisante pour observer un effet. Après une attente de 2 heures afin d'atteindre le maximum de l'effet neuro-pharmacologique du GHB et de potentialiser le recrutement des gènes, nous avons quantifié, par western blot, l'acétylation des histones à partir d'extraits de protéines nucléaires des cerveaux totaux des rats traités et contrôles. Parmi les histones étudiées, nous avons constaté que le niveau d'acétylation des histones H3 montre une augmentation du niveau d'acétylation de 2,5 fois chez les animaux traités par rapport aux animaux contrôles alors que nous n'avons pas constaté de modification dans le cas des histones H4.

Cette augmentation de l'acétylation des histones H3 se retrouve de façon hétérogène dans toutes les régions du cerveau de rat étudiées. Ces résultats obtenus par western blot ont été confirmés par immunohistochimie quantitative. Nous avons ainsi observé une augmentation significative de l'acétylation des histones H3 dans le cervelet, l'hippocampe et le tronc cérébral des rats traités par rapport aux témoins. Cependant cette augmentation n'est pas homogène dans ces structures, elle est plus marquée dans les cellules de Purkinje (qui expriment seulement l'HDAC 11 (Broide et al., 2007)) et la couche moléculaire du cervelet et de l'hippocampe mais reste encore significative dans les couches granulaires du cervelet et de l'hippocampe. Dans d'autres zones du cerveau (cortex pariétal et temporal), nous n'observons pas d'augmentation significative, mais il existe quand même une modification de l'acétylation dans certaines cellules cérébrales. Cette augmentation pouvant être liée soit à une inégale répartition du GHB, soit au fait que les différentes isoformes d'HDACs ne sont pas toutes inhibées de façon identique.

b) Mécanisme de l'hyperacétylation des histones H3

Nous avons donc mis en évidence une augmentation de l'acétylation des histones H3 *in vivo* sous l'action d'une dose thérapeutique de GHB mais sans avoir déterminé le mécanisme de ce phénomène. Pour essayer de déterminer le mécanisme, nous avons cherché à voir si cette augmentation était le résultat d'une inhibition des HDACs. Nous avons donc mesuré l'activité HDAC totale *in vitro* dans des extraits nucléaires de cerveau de rat en présence de doses variables de GHB. Nous avons pu ainsi mesurer un EC₅₀ de $1,5 \pm 0,3$ mM pour le GHB, valeur qui est du même ordre de grandeur que pour les inhibiteurs faibles d'HDAC de la classe des acides gras à chaîne courte (acide butyrique, 4-phenylbutyrique, acide valproïque) mais bien plus fort que pour des inhibiteurs d'autres classes comme l'inhibiteur de référence qui est la trichostatine A (Voir tableau II).

Dans le but de déterminer l'inhibition des activités HDACs *in vivo* après administration périphérique de GHB (1 g/kg) au niveau de différentes structures cérébrales étudiées, nous avons mesuré la concentration *in vivo* de GHB présente dans chacune d'elles 30 minutes et 60 minutes après l'administration de GHB (i.p.) (effet pharmacologique maximum du GHB). Le résultat montre bien une augmentation du GHB en fonction du temps et nous constatons une hétérogénéité des concentrations selon les structures (dans l'hippocampe $1170,0 \pm 12,6$ μ M, dans le tronc cérébral $1214,4 \pm 26,7$ μ M, dans le cervelet $1495,0 \pm 26,1$ μ M à 60 min). Les concentrations les plus faibles sont retrouvées dans les cortex pariétaux et temporaux ($605,0 \pm 62,1$ μ M à 60 min).

Une fois ces concentrations de GHB déterminées, nous avons traité des extraits protéiques totaux des différentes structures cérébrales avec les doses mesurées précédemment après 60 minutes de traitement et testé l'activité HDAC totale. Dans chaque structure testée nous avons observé une diminution significative de l'activité HDAC totale par rapport aux contrôles (64 ± 6 % dans l'hippocampe, 64 ± 8 % dans le cervelet, 58 ± 7 % dans le tronc cérébral et 36 ± 5 % dans les cortex pariétaux et temporaux)

La comparaison des animaux contrôles et des animaux traités dans les 3 zones étudiées où il existe une diminution significative de l'acétylation des histones H3 (cervelet, hippocampe et tronc cérébral) montre une diminution de plus de 50 % de l'activité HDAC totale *in vitro* en utilisant les doses de GHB déterminées 60 minutes après injection périphérique de 1 g/kg.

Dans les deux autres zones, cortex pariétaux et temporaux, où la variation de l'acétylation n'était pas significative, nous relevons une diminution plus faible (36 %) de l'activité HDAC totale dans les mêmes conditions. Cette différence laisse effectivement suspecter une hétérogénéité de l'inhibition des HDACs dans le cerveau, hétérogénéité résultant pour partie d'une distribution irrégulière du GHB, mais certainement aussi de l'hétérogénéité de la distribution des isoformes d'HDACs (Broide et al., 2007). Il est possible que le GHB inhibe préférentiellement une ou plusieurs des HDACs, comme dans le cas du valproate qui inhibe préférentiellement les HDACs de classe 1 (Hrzenjak et al., 2006).

Les concentrations de GHB endogène sont bien inférieures aux concentrations qui semblent nécessaire à inhiber significativement les activités HDAC, en tout cas *in vitro*. Cependant, il n'est pas exclu qu'une population de neurones particulière, comme les neurones GABAergiques, puisse présenter une concentration en GHB endogène nettement plus élevées que la dose moyenne endogène. Cela est d'autant plus possible que nous avons démontré, *in vitro* sur des noyaux isolés de cerveau de rat, que le GHB pouvait pénétrer dans le noyau par diffusion passive.

Nous pouvons donc dire que des doses thérapeutiques de GHB, chez l'animal et probablement également chez l'homme, induisent une augmentation significative de l'acétylation des histones H3 dans plusieurs structures du cerveau mais pas dans toutes. Cette hétérogénéité pourrait être le résultat d'une distribution inégale de l'inhibition des HDACs et de l'hétérogénéité de la distribution du GHB. Ce phénomène épigénétique pourrait participer à la modulation de la compactation de la chromatine et ainsi au remodelage du transcriptome.

Cependant l'intervention du GHB dans le remodelage de l'expression des gènes est probablement plus compliquée que l'on ne l'imagine. Son action épigénétique sur les HDACs entraîne toute une série de modifications probables qui induisent la nécessité d'explorer les remaniements des gènes intervenant dans le fonctionnement du SNC.

Publication 1 :

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

Christian Klein, Véronique Kemmel, Omar Taleb, Dominique Aunis, Michel Maitre

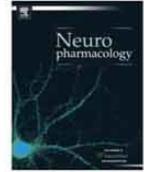
Neuropharmacology. Mars 2009. Volume 57, Issue 2, pages 137 à 147.

Plusieurs acides gras à chaîne courte, comprenant le butyrate, le valproate, le phénylbutyrate et ses dérivés, inhibent certaines activités HDAC dans le cerveau à une concentration de plusieurs centaines de micromolaires. Le Gamma-hydroxybutyrate (GHB), un composé naturellement produit à partir du GABA présent dans le cerveau possède une structure proche de ces acides gras. La concentration physiologique moyenne de GHB dans le cerveau est inférieure à 50 μM , mais quand le GHB est administré dans un but thérapeutique ou récréatif, sa concentration peut atteindre plusieurs centaines de micromolaires.

Nous démontrons dans la présente publication que des concentrations pharmacologiques de GHB induisent une hyperacétylation significative des histones H3 du cerveau avec une distribution hétérogène et une diminution des activités HDAC *in vitro*. Le degré d'inhibition de ces HDACs est différent selon les régions du cerveau étudiées.

En prenant en compte les multiples rôles physiologiques et fonctionnels attribués aux modifications de l'acétylation des histones et de leurs conséquences au niveau de l'expression des gènes, nous proposons qu'une partie des effets thérapeutiques ou toxiques liés aux fortes concentrations de GHB dans le cerveau puissent être partiellement dû à l'induction de facteurs épigénétiques par le GHB.

On peut suggérer que le GHB puisse pénétrer dans le noyau et atteindre une concentration suffisante pour pouvoir modifier significativement l'acétylation des histones et ainsi participer à la modification épigénétique de l'expression des gènes.



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

Christian Klein¹, Véronique Kemmel¹, Omar Taleb, Dominique Aunis, Michel Maitre*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2008
Received in revised form
21 April 2009
Accepted 27 April 2009

Keywords:

Histone acetylation
Gamma-hydroxybutyrate
GHB
HDAC inhibition
Hippocampus
Cerebellum
Brain stem

ABSTRACT

Several small chain fatty acids, including butyrate, valproate, phenylbutyrate and its derivatives, inhibit several HDAC activities in the brain at a several hundred micromolar concentration. Gamma-hydroxybutyrate (GHB), a natural compound found in the brain originating from the metabolism of GABA, is structurally related to these fatty acids. The average physiological tissue concentration of GHB in the brain is below 50 μ M, but when GHB is administered or absorbed for therapeutic or recreative purposes, its concentration reaches several hundred micromolars. In the present scenario, we demonstrate that pharmacological concentrations of GHB significantly induce brain histone H3 acetylation with a heterogeneous distribution in the brain and reduce *in vitro* HDAC activity. The degree of HDAC inhibition was also different according to the region of the brain considered. Taking into account the multiple physiological and functional roles attributed to the modification of histone acetylation and its consequences at the level of gene expression, we propose that part of the therapeutic or toxic effects of high concentrations of GHB in the brain after therapeutic administration of the drug could be partly due to GHB-induced epigenetic factors. In addition, we hypothesize that GHB, being naturally synthesized in the cytosolic compartment of certain neurons, could penetrate into the nuclei and may reach sufficient levels that could significantly modulate histone acetylation and may participate in the epigenetic modification of gene expression.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

γ -Hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous compound found in many organs at a micromolar concentration (Nelson et al., 1981). Its role and properties have been particularly studied in the brain where it appears to be synthesized after transamination and subsequent reduction of GABA (Vayer et al., 1985). In GABAergic neurons, the synthesis of GHB is thought to parallel the activity of these neurons, being co-released with GABA (Muller et al., 2002), and seems to exert a feedback inhibitory control on their activity. These effects are mediated through a family of receptors; some of these have been cloned from rat and human brain (Andriamampandry et al., 2003, 2007). In short, endogenous GHB is considered to be a brain neuromodulator which interacts, through

the modulation of the activity of GABA synapses, with several other neurotransmitters, including dopamine and glutamate. When administered peripherally to animals or humans at pharmacological doses, GHB penetrates easily into the brain, desensitizes its own receptors (Andriamampandry et al., 2007; Cash et al., 1999; Kemmel et al., 2003) and acts as a weak agonist at GABA-B receptors (Lingenhoehl et al., 1999). The global result of these effects is a potentiation of the GABAergic influence in the brain in addition to neuropharmacological consequences such as sedation, anxiolysis, deep sleep and anesthesia. In context of the above, large doses of GHB (several grams) are used in the clinical setting to treat narcoleptic symptoms (Mamelak et al., 1986), addiction to alcohol (Addolorato et al., 1996) and to induce anesthesia in some conditions (Kleinschmidt et al., 1997).

Besides these therapeutic uses, GHB has been abused for the last 20 years. The doses used range from 30 to 70 mg/kg and induce for several hours a state of well-being, euphoria, disinhibition, sedation, anxiolysis and sleep. Higher doses may lead to coma which could be fatal, especially if GHB is combined with other depressant substances (like benzodiazepines, barbiturates or alcohol) (Drasbek et al., 2006; Wong et al., 2004). Under both circumstances (therapeutic or recreative), a rapid increase in blood

Abbreviations: PBS, Phosphate buffered saline; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride; HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid; DTT, Dithiothreitol; PB, Phosphate buffer TBS; TBS, Tris-buffered saline; BSTFA-TMCS, N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide containing 1% trimethylchlorosilane; TSA, trichostatin A.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 90 24 30 96; fax: +33 3 90 24 35 70.

E-mail address: michel.maitre@neurochem.u-strasbg.fr (M. Maitre).

¹ The authors have equally participated in the present work.

and tissue levels of GHB is observed, reaching several hundred micromolar concentrations for 0.5–4 h, followed by a rapid elimination in the urine and transformation by the tissues (Abanades et al., 2006; Brenneisen et al., 2004).

γ -Hydroxybutyrate belongs to a family of short chain fatty acids with other well-known substances such as butyrate, valproate, phenylbutyrate and derivatives, which are all structurally related. All these substances have been reported to be relatively weak inhibitors of histone deacetylases, being active at several hundred micromolar concentrations (Lu et al., 2004). The family of HDAC inhibitors have gained recent interest for their reported anti-proliferative and neuroprotective effects via complex mechanisms (Kim et al., 2007), involving the accumulation of acetylated forms of histones which are implicated in the regulation of gene expression, cell proliferation and cell death (Arts et al., 2007; Dokmanovic and Marks, 2005; Facchetti et al., 2004). Interestingly, administration of GHB via the intraperitoneal route in animals and humans has been reported to produce some neuroprotective effects and anti-angiogenic effects in some animal models of cancer (Basaki et al., 2001; Sadasivan et al., 2006). With these data in mind, we have demonstrated that when administered *in vivo* in rats at pharmacological doses, GHB induces a hyperacetylation of histone H3 in the brain. The distribution of this histone modification is not uniform and depends on the brain structure. In parallel, GHB concentrations found in different brain regions after administration were able to inhibit a large percentage of endogenous HDACs in these structures. Taken together, these results indicate that pharmacological doses of GHB in humans could act partially via the modulation of epigenetic factors in the brain.

2. Materials and methods

2.1. Materials

N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide containing 1% trimethylchlorosilane (BSTFA–TMCS) was purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin, France).

2.2. Animals and drug treatments

Adult male Wistar rats, 250–300 g body weight, were used for all the experiments. They were housed 3 per cage and kept at constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) with regular light/dark schedule (07:00–19:00). Food and water were available *ad libitum*. Procedures involving animals and their care were conducted in compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) of November 24, 1986. Animals were injected intraperitoneally (i.p.) with NaCl (1 ml/kg at 9‰) or GHB (1000 mg/kg) 2 h prior to sacrifice by decapitation. Another group of animals received two injections of GHB or NaCl spaced by 4 h. These animals were decapitated 2 h after the second injection. In each case, the brain was rapidly removed and immediately used or stored at -80°C .

2.3. Acid extraction of proteins

Acid extraction of histones was performed as described previously (Zhu et al., 2001) with modifications. The brain was homogenized using a Teflon–glass homogenizer in 10 volumes of PBS by Dounce homogenization, and sonicated for 15 s. Samples were centrifuged two times at 800 g for 10 min. The pellet was then suspended with five volumes of lysis buffer (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, and 1.5 mM PMSF adjusted to pH 7.9 by hydrochloric acid). After incubation on ice for 30 min, the solution was centrifuged at 11,000 g for 10 min at 4°C and the supernatant fraction that contained acid-soluble proteins was retained. Supernatant was dialyzed against 200 ml of 0.1 M acetic acid twice for 1–2 h each and then dialyzed against 200 ml of H_2O for 1 h, 3 h, and overnight. Dialysis was performed using a Spectra/Pore 3 Dialysis Membranes 3500 MWCO (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). Protein concentration was performed using the bicinchoninic acid (BCA) method (Smith et al., 1985) with BSA as a standard, and the samples were stocked at -80°C .

2.4. Western immunoblotting

Acid extracted proteins were analyzed by SDS–PAGE gel electrophoresis/immunoblotting with antibodies recognizing acetylated histones H₃ (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA; 1/500) or histone H₃ (Upstate Biotechnology,

Lake Placid, NY, USA; 1/500) as described previously (Gaiddon et al., 1999). Equal amounts (100 μg) of protein samples were separated along with molecular weight markers (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA) in 13% polyacrylamide gels. Gel loading equivalence was confirmed by Coomassie brilliant blue R-250. Gels were transferred onto 0.2 μm nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Species-specific immunoglobulin G–horseradish peroxidase (IgG–HRP, anti-rabbit IgG (H + L), 1/100) secondary antibodies (P.A.R.I.S., Compiègne, France) were used. Blots were developed with chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA), and autoradiography was performed utilizing BioMax MR Film (Kodak, Rochester, NY, USA).

Western blots were quantified by using Image J software (NIH, USA). The values were expressed as a percentage of the control group arbitrarily set at 100%.

2.5. Brain distribution of acetylated histone H3 by immunohistochemistry

Animals were injected i.p. with NaCl (9‰) or GHB (1000 mg/kg). Two hours after injection, rats were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 1 ml (5.6% w/v) pentobarbital sodium solution (CEVA, santé animal, Libourne, France) and perfused transcardially with the fixative solution containing 4% freshly depolymerized paraformaldehyde (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin, France) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4). This solution was chilled before being injected into anesthetized animals with a peristaltic pump at a flow rate of 25 ml/min until 1 ml/g body weight was reached. The brains were quickly removed and left for 2 h at room temperature in the same fixative solution. Following fixation, the brain tissue was rinsed six times for 5 min in TBS (Tris-buffered saline, pH 7.4) to block residual aldehyde groups. Brain sections were dissected according to the Paxinos and Watson (1986) coordinates. Coronal sections (50–80 μm) were cut with a vibratome (Leica VT 1000 M) and collected in TBS.

Floating sections were immunostained for Ac–H3 (acetyl-histone H3) as follows. Tissue slides were rinsed with TBS, then blocked for 20 min with 10% normal bovine serum (NBS) in TBS. Sections were incubated overnight at 4°C with Ac–H3 antibody (anti-acetyl-histone H3, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA, rabbit polyclonal IgG, 1/1000) in TBS containing 10% NBS. Later, sections were washed in TBS and incubated with goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase in TBS (P.A.R.I.S.; B12407, anti-rabbit IgG (H + L), final dilution 1/200) for 3 h. Sections were again washed (6 times during 5 min) with TBS. Peroxidase activity was detected with a freshly prepared solution of 4-chloro-1-naphthol (0.2 mg/ml) in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with TBS, the sections were mounted in glycerol/TBS (v/v) before microscopic analysis using a microscope (Leica DMRB) equipped with a digital camera (Axiocam, Zeiss, Germany).

Immunolabeled sections were visualized by using a 10 objective lens. All analyses were carried out in comparable areas under the same optical and light conditions. Black and white images were digitized and viewed on a computer using Axio Vision software (Zeiss). Staining intensity inside each cell body perimeter was measured by using Image J software (NIH, USA). The optical density (OD) measurement for each cell is the mean gray of the pixels inside the perimeter of the cell body, with a 256 gray scale as a reference. OD increase with the intensity of labeling between a minimum (0 = white) and a maximum (255 = black). The OD background of each section was subtracted with Image J software before the OD measurement of each cell.

To represent the cell immunostaining intensity distribution in each section, we divided the OD values included between 0 and 255 gray scale in decimal unit categories. Then, for each brain region studied, we plotted these OD categories against the percentage of cells (frequency) that fell into a specific category. The above procedure was done for 500 cells per cerebral structures counted in three slices for each rat ($n = 3$). Data followed a Gaussian or a sum of Gaussian distribution were graphically plotted with Graph Pad Prism software (Graphpad-Prism program, San Diego, CA) in order to determine amplitude of the frequency, mean and SD of immunostaining (on a 256 gray scale as a reference) (Simonini et al., 2006).

2.6. GHB identification and measurement by GC/MS

Animals were injected intraperitoneally (i.p.) with GHB (750 mg/kg or 1000 mg/kg) 30 min or 1 h prior to being killed and decapitated. Their brains were removed and dissected on a cold glass plate. The brain structures were dissected according to the protocol described previously (Vayer et al., 1988), and nuclei were isolated using the Palkovits and Brownstein microdissection procedure (Palkovits and Brownstein, 1988). After tissue collection, samples were immediately immersed in liquid nitrogen until the day of analysis. After being weighed, each brain structure was homogenized in 0.3 ml of water. Three milliliters of methanol was added to the homogenate and centrifuged at 3500 rpm for 5 min. The precipitate was eliminated and 100 μl of D₆ GHB (50 ng/ml as internal standard) was added to the organic layer. The mixture was evaporated dry at 45°C . The residue was reconstituted in 200 μl of BSTFA–TMCS by vortex mixing and then the trimethylsilyl derivatives were produced by incubation in a dry heater block for 1 h at 60°C at the end of which the extract was transferred to an auto sampler vial and placed onto the sample tray of the gas chromatograph. From this vial, 2 μl of sample was injected for analysis.

GC–MS analysis was carried out on a TRACE 2000 gas chromatograph connected to a Polaris Q mass spectrometer (ThermoFinnigan, Courtaboeuf, France).

The compounds were separated on a fused-silica capillary column (Restek RTX-5MS; 30 m × 0.25 mm × 0.25 mm film thickness) with helium N55 (99.99%) carrier gas at a flow rate of 1.5 ml/min.

The initial temperature of the gas chromatograph oven was 60 °C with a hold time of 5 min, followed by a temperature gradient of 10 °C/min to 325 °C maintained 5 min at 325 °C (Total run time 37 min). The sample molecules were identified by total ion monitoring. The spectra of compounds were compared with the NIST library.

The system was calibrated by injection of various amounts (from 5 nM to 5000 nM) of standard solutions containing GHB.

2.7. Histone deacetylase assay

Assays were performed using the colorimetric HDAC activity assay from Bio-Vision (BioVision Research Products, Mountain View, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, experiments started by the addition of 50 µg of nuclear extracts and various amount of GHB (0–10 mM) or trichostatin A (TSA) at 200 nM in ddH₂O at a final volume of 85 µl. This solution was incubated for 1 h and then 10 µl of HDAC assay buffer were added followed by addition of 5 µl of the colorimetric substrate. Samples were incubated at 37 °C for 1 h. Subsequently, the reaction was stopped by adding 10 µl of lysine developer and left for an additional 30 min at 37 °C. Samples were then read in an ELISA plate reader at 405 nm. The kit contains negative and positive controls that consist of nuclear extract of HeLa treated or not with TSA, respectively. The results were expressed in percentage of OD and the 100% of HDAC activity was arbitrary set when GHB was absent of the incubation medium. Zero percent (0%) of HDAC activity was arbitrarily set when brain nuclear extract was incubated with 200 nM of Trichostatin A.

2.8. Preparation of nuclear and cytoplasmic extract

The brain was rapidly excised and immediately used employing Pierce NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent (Rockford, IL, USA). Briefly, the brain was cut into small pieces and rinsed with ice-cold PBS. Then the brain was homogenized using a Dounce homogenizer and the homogenate was vortexed for 5 s and centrifuged for 4 min at 800 g. The floating lipids on the top of the tubes and the supernatant were removed carefully, and discarded. The loosely packed pellets were aspirated out and placed in Eppendorf tubes. Each pellet was added to cytoplasmic extraction reagent (CER I, Pierce) with a mixture of protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, Saint-Quentin, France) at a ratio of 10 µl/ml. The suspension was incubated on ice for 10 min followed by the addition of a second cytoplasmic extraction reagent (CER II, Pierce), vortexed for 5 s, incubated on ice for 1 min, and centrifuged for 5 min at 16,000 g using an Eppendorf 5415R centrifuge. The resulting supernatants constituted the cytoplasmic extract while the pellets were made by the cell nuclei (Smirnova et al., 2000).

2.9. Accumulation of [³H]GHB by cell nuclei in vitro

Nuclear fractions from rat brain cells, prepared as described above, were resuspended in the following buffer (A): 125 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 0.3 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose, 1 mM ATP, and 40 mM HEPES (pH 7.0). Intra-nuclear accumulation of GHB was tested by adding increasing quantity of GHB containing [³H]GHB (160 µCi/mmol) to nuclear fraction with or without cytoplasm in two different sets of experiments (50% cytoplasm and 50% buffer A or 100% buffer A respectively). These mixtures were incubated at 37 °C for 30 min. Thereafter, the mixtures were filtrated through Whatman GF/B filters (0.45 µm, 25 mm diameter). The filters and incubation tubes were washed twice with ice-cold buffer A, then the filters were counted for radioactivity in a liquid scintillation spectrophotometer after adding 5 ml scintillation fluid. Assays were performed in three independent experiments, in triplicate at each GHB concentration.

3. Results

3.1. Levels of H3 acetylation in total rat brain after treatment by GHB

The level of histone H3 acetylation was explored after acid extraction of nuclear protein and Western blotting of total nuclear brain proteins of rats treated or not by anesthetic doses of GHB (1000 mg/kg, sodium salt). Using a specific anti-acetylated histone H3, a protein band of 17 kDa which corresponded to the MW of this histone was labeled as shown in Fig. 1 and revealed an important increase (about 2.5-fold) in histone H3 acetylation after pharmacological doses of GHB, when compared to control animals receiving saline.

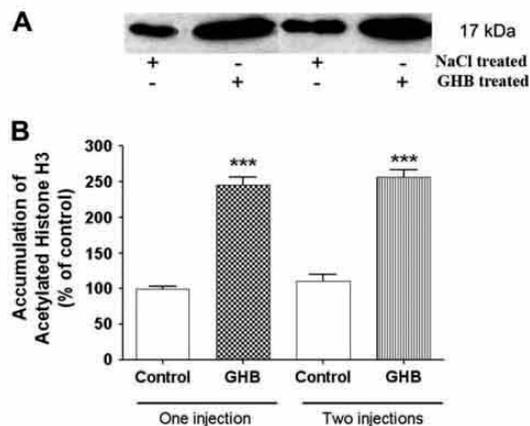


Fig. 1. Increase of histone H3 acetylation in GHB-treated rats. (A) Western blot of brain protein extracts from GHB- and NaCl-treated (control) rats using acetyl-histone H3 antibodies. (B) Quantification of Western blot results. A significant difference in the level of Ac-H3 was observed between rat groups (one group receiving only one injection of GHB (1000 mg/kg, sodium salt) and the second group receiving a supplementary injection 4 h after the first one). In each case, the animals were sacrificed 2 h after GHB treatment. Western blots were analyzed by densitometry and the values are expressed as a percentage of the control group (administered with saline) which was arbitrarily set at 100%. Student's *t*-test, ****p* < 0.001. Results represented three independent experiments with three animals in each group.

Results of Western blotting carried out on brain extracts of animals receiving two injections of GHB or NaCl (one at time zero, second at time +4 h, extraction at time +6 h), gave the same type of labeling and the same percentage increase in H3 acetylation. No further increase in acetylation level was observed.

3.2. Brain distribution of hyperacetylated histone H3 in rats treated with GHB

Rats treated with GHB (1000 mg/kg) showed an increased number of high-density acetylated histone H3 immunoreactive cells in different structures of the brain compared to rats injected with saline. The OD background of each section was subtracted with Image J software before OD measurement of each cell. In the cerebellum (Fig. 2), a variable but constant increase of acetylated histone H3 immunopositive neurons was observed in the molecular layer, in Purkinje cells and in granular cells. The mean ± SD (on the 256 gray scale reference) of a Gaussian or a sum of Gaussian distribution of the cell immunoreactivity was measured as 74 ± 11 for GHB- versus 36 ± 14 for NaCl-treated rats in the Purkinje cells (*p* < 0.0001). The amplitude of the frequency in these cells was 0.35 for GHB- versus 0.60 for the NaCl-treated rats.

Only a moderate but significant increase of acetylated histone H3 immunopositive neurons was observed in the granular layer with 82 ± 13 for GHB- versus 66 ± 9 for NaCl-treated rats (*p* < 0.0001), and the amplitude of frequency was respectively 0.31 for GHB- versus 0.4 for NaCl-treated rats.

Interestingly, in the molecular layer of the cerebellum, GHB-treated rats presented two cell populations, the first one with the same immunoreactivity as observed in control rats (61 ± 8 for GHB- versus 57 ± 12 for NaCl-treated rats) but with an amplitude of frequency significantly different (0.06 for GHB- versus 0.34 for NaCl-treated rats, *p* < 0.001), and a second one with an increase of histone H3 immunoreactivity (with 103 ± 14 for GHB- versus 57 ± 12 for NaCl-treated rats, *p* < 0.0001). This last cell population was the most important for GHB-treated rats, with amplitude of frequency of 0.24.

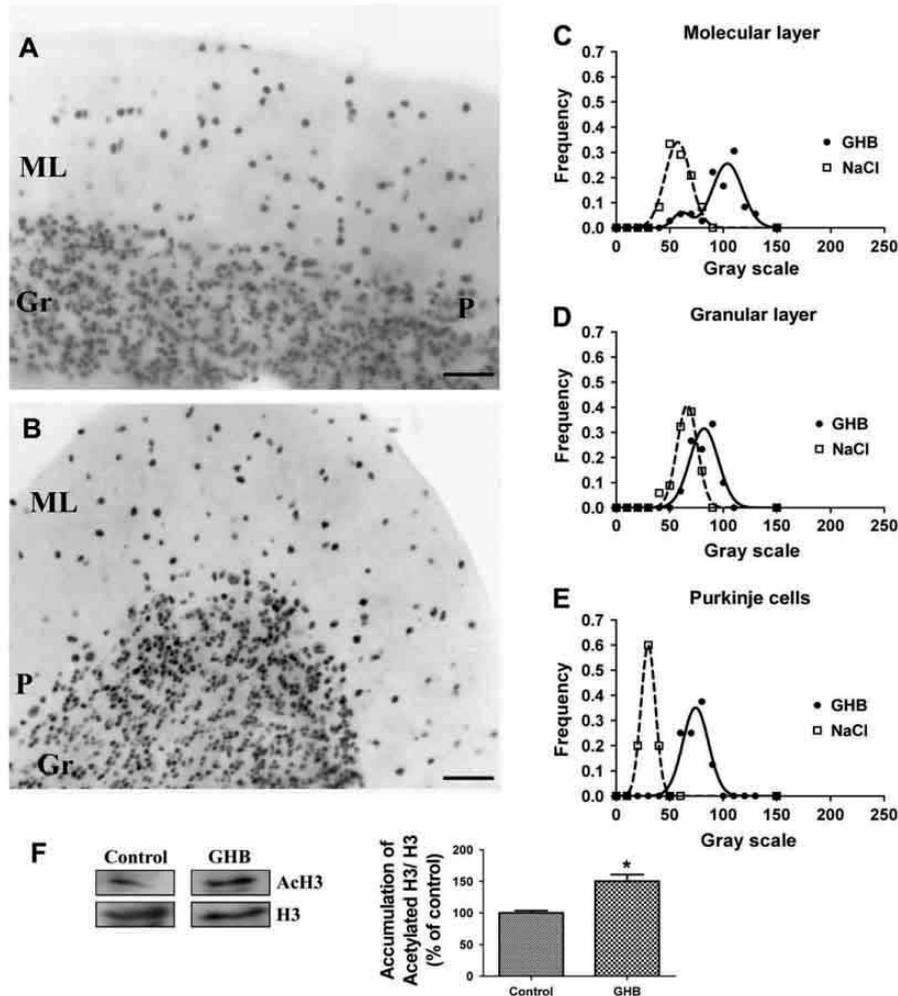


Fig. 2. GHB elicits an increase of neuronal Ac-H3 immunoreactivity in the cerebellum. (Left) Typical Ac-H3 immunostaining in cerebellum neurons of rats treated with NaCl (A) or GHB (1000 mg/kg) (B). Molecular layer (ML), granular layer (GR) and Purkinje cells (P) were stained with different intensity of labeling measured on a gray scale of 256 levels as reference. Scale bar = 25 μ m. (Right) Densitometric distribution profiles of Ac-H3-immunopositive neurons followed a Gaussian or a sum of Gaussian distribution in molecular layer (C), granular layer (D) and Purkinje cells (E): GHB-treated rats (black circles) showed a significant shift to the right in the population of neurons with relatively high OD compared to neurons from rats treated with NaCl (open squares). The shift was also more important (>30 units of the 256 gray scale, $p < 0.001$) in the molecular layer (C) and in the Purkinje cells layer (E) versus the granular layer (16 units of the 256 gray scale, $p < 0.0001$) (D). Data were analyzed by one-way ANOVA test for a population of 500 cells in three slices of each rats treated ($n = 3$) followed by Student–Newman–Keuls multiple comparison. (F) Western blot of cerebellum protein extracts from GHB-treated or control rats using acetyl-histone H3 or histone H3 antibodies revealed after quantification a significant difference in the level of Ac-H3/H3 between both groups of rats. Western blots were analyzed by densitometry and the values are expressed as a percentage of the control group (administered with saline) which was arbitrarily set at 100%. Student's *t*-test, * $p < 0.05$.

In rats treated with vehicle, no significant change was noted in the immunostaining of the cells in the molecular, granular and Purkinje cells layers (on the 256 gray scale).

The increase of immunohistochemical labeling of acetylated histone H3 in the cerebellum was confirmed by Western blot analysis. Also the ratio of acetylated H3 versus total histone H3 was $150 \pm 25\%$ in rats treated with GHB as compared to $100 \pm 9\%$ in controls ($p = 0.045$).

In hippocampal cells (Fig. 3), a significant increase of Ac-H3 immunopositive neurons was quantified in the molecular layer (77 ± 13 for GHB- versus 43 ± 10 for NaCl-treated rats, $p < 0.0001$) and the amplitude of frequency for the two groups of rats was almost the same, 0.38 for GHB- and 0.34 for NaCl-treated rats. In pyramidal cells (62 ± 9 for GHB- versus 46 ± 11 for NaCl-treated

rats, $p < 0.0001$), the amplitude of frequency for the two groups of rats was not significantly different, with 0.30 for GHB- and 0.35 for NaCl-treated rats. In rats treated with vehicle no significant change was noted in immunostaining of the cells in the molecular and pyramidal layers. These results were confirmed by Western blot analysis of hippocampus nuclear proteins. The ratio of acetylated histone H3 versus total histone H3 was $143 \pm 26\%$ in treated rats compared to $100 \pm 25\%$ in the controls ($p = 0.0123$).

In the brain stem (Fig. 4), AcH3-immunopositive neurons were quantified with amplitude of frequency of 0.35 and 0.29 for GHB- and NaCl-treated rats respectively. On the gray scale, values were significantly different with 125 ± 10 for GHB- versus 92 ± 15 for NaCl-treated rats ($p < 0.0001$). In the brain stem, the ratio of acetylated histone H3 versus total histone H3 measured by Western

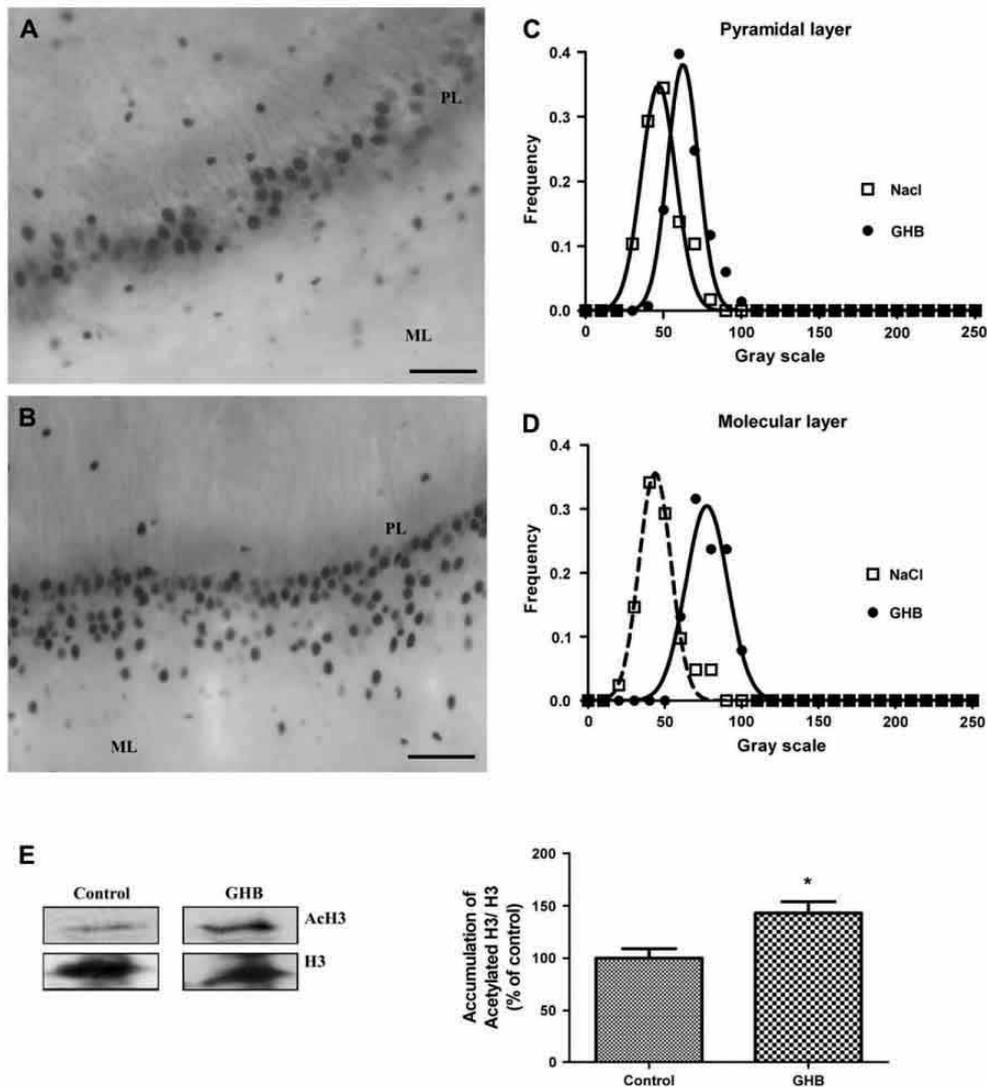


Fig. 3. GHB elicits an increase of neuronal Ac-H3 immunoreactivity in the hippocampus. (Left) Typical immunostaining in hippocampal neurons of rats injected with NaCl (A) or GHB (1000 mg/kg) (B). Molecular layer (ML) and pyramidal layer (PL) were stained with different intensity of labeling measured on a gray scale of 256 levels as reference. Scale bar = 20 μ m (Right) Densitometric Gaussian distribution profiles of Ac-H3-immunopositive neurons: GHB-treated rats (black circles) showed a significant shift to the right in the population of neurons with relatively high OD compared with neurons from rats treated with NaCl (open squares). The shift was 18 units on the 256 gray scale ($p < 0.001$) in pyramidal cells (C) and 34 units in the molecular layer (D). Data were analyzed by one-way ANOVA test for a population of 500 cells in three slices of each rats treated ($n = 3$) followed by Student–Newman–Keuls multiple comparison. (E) Western blot of hippocampus protein extracts from GHB-treated or control rats using acetyl-histone H3 or histone H3 antibodies showed after quantification a significant difference in the level of Ac-H3/H3 between both groups of rats. Western blots were analyzed by densitometry and the values are expressed as a percentage of the control group (administered with saline) which was arbitrarily set at 100%. Student's *t*-test, * $p < 0.05$.

blot analysis was also more important ($p = 0.03$) in rats treated with GHB ($133 \pm 9\%$) compared to controls ($100 \pm 18\%$).

In contrast, the temporal and parietal cortices (Fig. 5), did not show any difference in Ac-H3 immunoreactive brain cells between GHB-treated animals and controls (158 ± 20 for GHB- versus 160 ± 15 for NaCl-treated rats); the amplitude of frequency was respectively 0.20 and 0.26. However, the immunolabeled neurons in GHB-treated rats present a shift to the right for some of them. This population is not significantly representative compared to the majority of neurons statistically isolated (sum of Gaussian) but demonstrated that GHB slightly modified the pattern of acetylation

of these neurons. In Western blot analysis, no significant difference was observed in the ratio of acetylated histone H3 versus total histone H3. However, the rats treated with GHB presented an increase of this ratio by $129 \pm 24\%$ compared to controls ($100 \pm 27\%$).

To summarize, we observed a significant shift to the right in the population of neurons in GHB-treated rats compared to neurons of controls in cerebellum, hippocampus and brain stem but not in the temporal and parietal cortex. This shift to the right was due to a high OD (>30 units on the 256 gray scale, $p < 0.0001$) in the molecular layer (Fig. 2C) and Purkinje cells (Fig. 2E) of the cerebellum, in the molecular layer of the hippocampus (Fig. 3D) and in

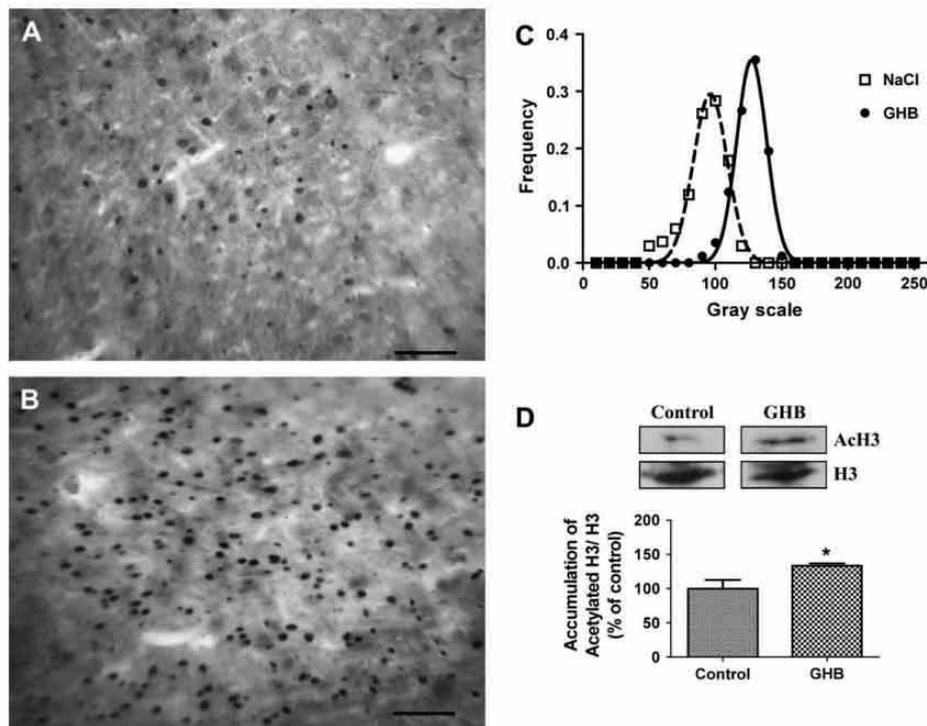


Fig. 4. GHB elicits significant modifications of neuronal Ac-H3 immunoreactivity in the brain stem. (A, B) Typical immunostaining in brain stem neurons of rats injected with NaCl (A) or GHB (1000 mg/kg) (B). Neurons were stained with significantly different intensity of labeling measured on a gray scale of 256 levels as reference. Scale bar = 25 μ m. (C) Densitometric Gaussian distribution profiles of Ac-H3-immunopositive neurons: There is a significant shift of the curve to the right for rats treated by GHB (black circles) compared to rats treated by saline (open circles), indicating a more intense labeling of neurons in treated rats. The shift of the curve was 33 units on the 256 gray scale ($p < 0.0001$). Data were analyzed by one-way ANOVA test for a population of 500 cells in three slices of each rats treated ($n = 3$) followed by Student–Newman–Keuls multiple comparison. (D) Western blot of brain stem protein extracts from GHB-treated or control rats using acetyl-histone H3 or histone H3 antibodies showed after quantification a significant difference in the level of Ac-H3/H3 between both groups of rats. Western blots were analyzed by densitometry and the values are expressed as a percentage of the control group (administered with saline) which was arbitrarily set at 100%. Student's *t*-test, * $p < 0.05$.

the brain stem (Fig. 4C). This shift to the right was lower but statistically different (<20 units on the 256 gray scale, $p < 0.0001$) in the cellular layer of the hippocampus (Fig. 3C) and in the granular layer of the cerebellum (Fig. 2D). No shift (2 units on the 256 gray scale, $p = 0.98$) was observed in the temporal and parietal cortex (Fig. 5C). These results were confirmed by the Western blot approach showing a significant increase in acetylated histone H3 in cerebellum, hippocampus and brain stem. An increase was also observed in temporal and parietal cortex, but was not significant. Moreover, Western blotting also revealed that in all brain regions investigated, total histone H3 showed no change between treated and non-treated rats.

3.3. GHB concentrations in rat brain tissue after exogenous administration

The GHB derived with BSTFA–TMCS reagent gave a compound whose chromatograms and spectra are presented in Fig. 6. The Total Ion Chromatogram (TIC, Fig. 6, first panel) obtained by GC/MS from total rat brain shows a peak at 12.69 min with the same characteristic spectrum than derived GHB (Fig. 6, inset). For GHB and for D₆ GHB, the Single Ion Monitoring (SIM) at m/z 233 (Fig. 6, second panel) and m/z 239 (Fig. 6, third panel) presented a peak at 12.7 and 12.64 min respectively, with a very clear cut baseline.

Brain extracts showed good chromatographic separations of the analytes. No interfering peaks were observed in selectivity studies.

Intra-analytical precision was determined using three concentration levels (100, 500, 1500 nM of GHB). The mean concentration was calculated ($n = 5$) with a bias of -2.5%, 1.3%, and 2.1% respectively with a relative standard deviation of 9.3%, 5.8%, and 3.9% respectively. In the inter-day precision study the results of relative standard deviation were 10.3%, 8.2%, and 5.5% with the same concentration levels 100, 500, 1500 nM of GHB respectively. The limit of quantification was determined to be 5 nM of GHB (with relative standard deviation <15%).

GHB concentrations of total rat brain were 560.5 ± 49.7 and 875.7 ± 35 nmol/g of fresh tissue 30 and 60 min respectively after administration of GHB to rats (1000 mg/kg, sodium salt). On the other hand after administration of 750 mg/kg GHB, the total brain concentrations were lower with respectively 254.7 ± 10.5 and 463.6 ± 17.9 nmol/g of fresh tissue 30 and 60 min after treatments.

However, administered GHB was distributed heterogeneously in brain. In order to estimate this heterogeneous distribution and to determine the maximal level of GHB in each region studied, GHB concentrations were measured by GC/MS in the same four brain regions of the animals studied by immunohistochemistry, 30 and 60 min respectively after GHB administration (750 or 1000 mg/kg, i.p.). The results are shown in Table 1. For both doses (750 or 1000 mg/kg), GHB concentrations are higher at 60 min than at 30 min. Thirty or sixty minutes after administration of 1000 mg/kg, the tissue GHB concentrations are between 0.7 and 1.5 mM in the regions studied, except for temporal and parietal cortex where the

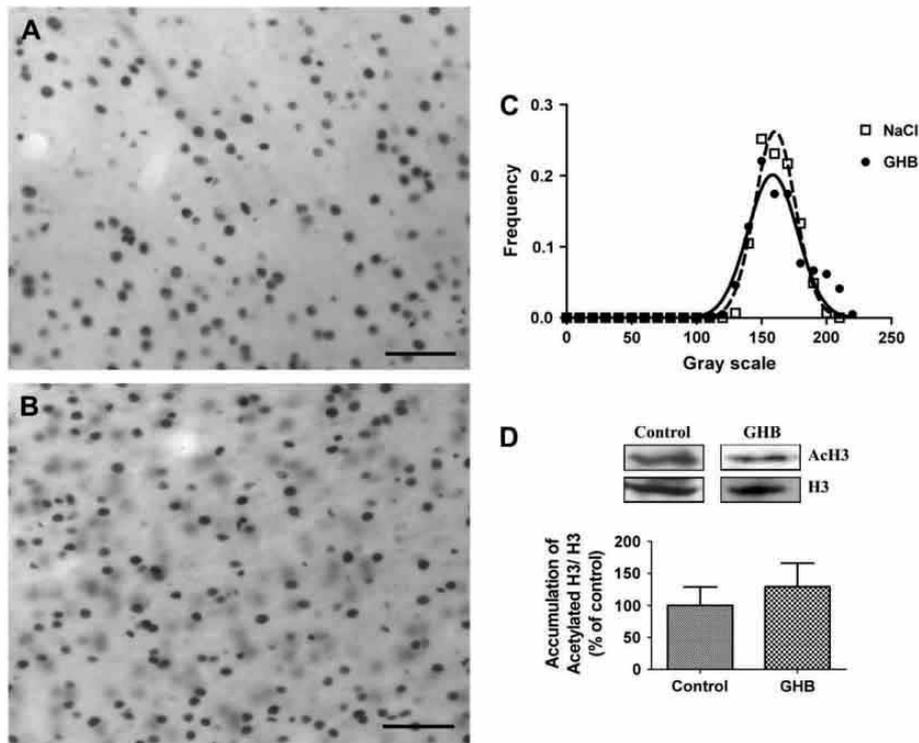


Fig. 5. GHB elicits no modifications of neuronal Ac-H3 immunoreactivity in the cortex. (Left) Typical immunostaining in cortices neurons of rats injected with NaCl (A) or GHB (1 g/kg) (B). Cortex neurons were stained without different intensity of labeling measured on a gray scale of 256 levels as reference. Scale bar = 25 μ m. (Right) Densitometric Gaussian distribution profiles of Ac-H3-immunopositive neurons: NaCl- (open squares) and GHB-treated rats (black circles) showed no significant shift to the right (2 units on the 256 gray scale, $p = 0.98$) in the population of neurons (C). Data were analyzed by one-way ANOVA test for a population of 500 cells in three slices of each rats treated ($n = 3$) followed by Student–Newman–Keuls multiple comparison. (D) Western blot of cortex protein extracts from GHB-treated or control rats using acetyl-histone H3 or histone H3 antibodies revealed after quantification a significant difference in the level of Ac-H3/H3 between both groups of rats. Western blots were analyzed by densitometry and the values are expressed as a percentage of the control group (administered with saline) which was arbitrarily set at 100%. Student's *t*-test, * $p < 0.05$.

concentrations are lower (0.6 mM). For the 750 mg dose, after 30 or 60 min, GHB concentration was between 0.2 and 0.5 mM and the lowest concentration was found in the temporal and parietal cortex and in the brain stem.

3.4. Inhibition of HDAC activities in total rat brain extract *in vitro* by increasing concentrations of GHB

In order to identify a possible inhibition of rat brain HDAC by pharmacological doses of GHB, activities of HDAC enzymes were measured in the presence of various amounts of GHB. Nuclear protein extracts were incubated with various concentrations of GHB *in vitro*. Using a colorimetric HDAC activity assay (BioVision, Clinisciences, France), HDAC activity was determined as a percentage by reference to total HDAC activity without GHB (100%). Compared to TSA at 200 nM (HDAC isoforms totally inhibited, 0%), maximal inhibition of HDAC activity by GHB represented $37 \pm 1.2\%$ of total HDAC without inhibitors. From these data, an IC_{50} of about 1.5 ± 0.3 mM (Fig. 7) could be calculated (non-linear fitting, Graphpad, San Diego, $r^2 = 0.98$).

3.5. *In vitro* inhibition of HDAC activities in some structures of the rat brain by specific concentrations of GHB

In order to estimate the degree of maximal HDAC inhibition in specific brain regions of the rat after peripheral administration of

GHB (750 or 1000 mg/kg, i.p), the total protein extracts from hippocampus, temporal and parietal cortex, brain stem, and cerebellum of naïve rats were treated by specific concentrations of GHB, using the colorimetric HDAC activity assay from BioVision, and the remaining HDAC activities in the various homogenates were determined. The GHB concentrations used were the concentrations previously measured (Table 1) in these same structures, 1 h after an i.p. injection of GHB (1000 mg/kg or 750 mg/kg). In each structure, the presence of GHB induced a significant decrease of total HDAC activity. This inhibition was less important for GHB concentrations observed after i.p. administration of 750 mg/kg.

Compared to the controls, total HDAC activities in the three regions presenting a significant increase of neuronal Ac-H3 immunoreactivity were reduced more than 50% *in vitro* using the GHB concentration measured *in vivo* after 1000 mg/kg and 60 min delay. Only the temporal and parietal cortex showed a less important reduction (36%; Table 2, experiments A). However, for the 750 mg/kg dose, HDAC activity decreases were around 20%, except for the cerebellum where the decrease was about 30% (Table 2, experiments B).

3.6. GHB could penetrate nuclei isolated *in vitro* from rat brain cells

Peripheral administration of GHB *in vivo* is known to produce an accumulation in various organs, including brain. However, the presence of exogenous GHB in the brain cells nuclei is still unknown

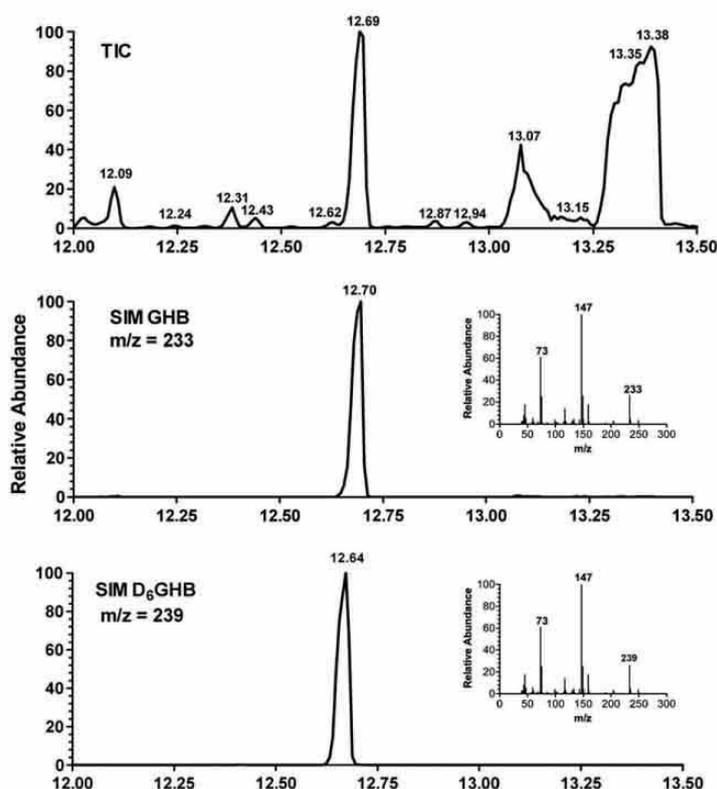


Fig. 6. Representative chromatograms from a rat brain sample. The first chromatogram is the Total Ion Chromatogram (TIC), the second one is the Single Ion Monitoring (SIM) chromatogram with an m/z of 233 which is the principal specific fragment of derivatized GHB. The third trace is the SIM chromatogram with an m/z of 239 which is the specific fragment of derivatized D_6 GHB (internal standard). All these chromatograms present a peak around 12.7 min. Insets: Full scan spectrum of the compound present in the peak at 12.7 min showed the main peaks of m/z at 73, 147 and 233. This spectrum has a very good match with the spectrum of derivatized GHB present in the NIST library. Full scan spectrum of the compound present in the peak at 12.64 min showed the main peaks of m/z at 73, 147 and 239. This spectrum has a very good match with the spectrum of derivatized D_6 GHB.

and is of particular importance in view of the modifications of H3 acetylation reported above. In order to look into this, we isolated brain cell nuclei from total rat brain using the protocol of Pierce (Rockford, IL, USA). Following isolation, these nuclei were immediately incubated in the presence of a buffer which mimics the intracellular medium composition with or without supplementation by fresh brain cytosol. Results are shown in Fig. 8. A saturable accumulation of [3 H]GHB was not observed in isolated nuclei, despite the high concentration of GHB included in the incubation medium (up to 6 mM). By contrast, we observed a linear accumulation of GHB after 30 min incubation, which represents about 2 nmol GHB per mg of nuclear proteins for a concentration of GHB of 1–2 mM in the incubation medium. For 500 μ M of GHB, which represented the concentration in total brain 30 min after treatment,

the accumulation was about 0.5 nmol/mg of nuclear proteins. The presence of cytoplasmic proteins in the incubation medium did not modify these results.

4. Discussion

The present results show that at pharmacological doses of GHB used in rats to induce anesthesia and sleep, acute administration of the drug induced significant inhibition of HDAC activity in the brain. These inhibitions were heterogeneously distributed in the brain most probably because of both specific distribution of HDAC isoforms in the brain and uneven repartition of administered GHB after peripheral injections. In parallel, we observed an increase in

Table 1

	GHB concentrations in nmol/g of fresh tissue or μ M			
	Administration of 1000 mg/kg		Administration of 750 mg/kg	
	30 min after administration	60 min after administration	30 min after administration	60 min after administration
Hippocampus	976.0 \pm 38.1	1170.0 \pm 12.6	274.6 \pm 16.9	505.0 \pm 26.7
Temporal and parietal cortices	425.0 \pm 28.8	605.0 \pm 62.1	222.0 \pm 13.4	356.7 \pm 23.0
Brain stem	738.8 \pm 38.1	1214.4 \pm 26.7	181.2 \pm 14.5	333.5 \pm 19.2
Cerebellum	976.0 \pm 54.1	1495.0 \pm 26.1	332.0 \pm 14.5	533.0 \pm 12.6
Total brain	560.5 \pm 49.7	875.7 \pm 35.0	254.7 \pm 10.5	463.6 \pm 17.9

GHB concentrations in rat brain, 30 or 60 min after i.p. injection of GHB to rats (1000 mg/kg or 750 mg/kg).

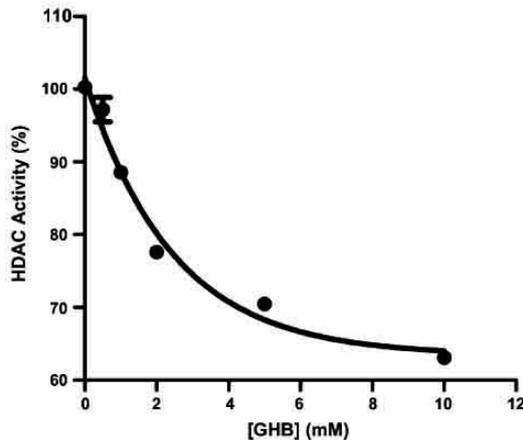


Fig. 7. GHB inhibits HDAC activity. Total HDAC activity of brain nuclear protein extracts was assayed *in vitro* in the presence of 0–10 mM GHB. GHB inhibited maximally $37 \pm 1.2\%$ of HDAC activity compared to the inhibition produced by TSA (200 nM, 100% inhibition). An IC_{50} of 1.5 ± 0.3 mM was measured for HDAC inhibition induced by GHB in total brain extract.

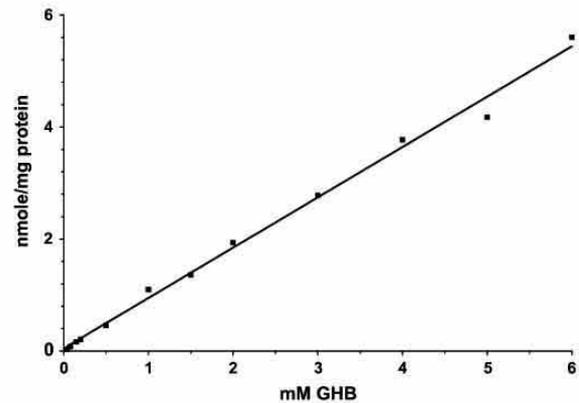


Fig. 8. Accumulation of [3 H]GHB in isolated nuclei from brain cells. When incubated with GHB at increasing concentration (160 μ Ci/mmol), a linear accumulation of GHB was observed in isolated nuclei after 30 min incubation. The result was not different in the presence of cytoplasmic proteins. Results are means from three separate experiments \pm SEM in each condition (slope 0.89; $r^2 = 0.99$).

histone H3 acetylation which also depended on the brain region examined.

4.1. GHB levels in rat brain regions after pharmacological doses

Despite the therapeutic and recreational uses of GHB, very few studies have been carried out with regard to the distribution of GHB in the brain of animals after administration of pharmacological doses. Most of the studies report GHB concentrations in plasma or urine.

In the rat brain, Shumate and Snead (1979) have measured a GHB concentration of about 200–1000 μ M in various regions of the brain, 60 min after intravenous administration of 500 mg/kg GHB. In another study (Lettieri and Fung, 1979), the authors reported a brain GHB concentration of about 1 mM at wake-up time in rats receiving 800 mg/kg intravenously. In the rat brain extracellular fluid, GHB concentration reached about 800 μ M at the time between 40 and 120 min in rats receiving acute GHB (548 mg/kg, s.c.) (Raybon and Boje, 2007). Using an LC–MS method with deuterated GHB as internal standard, a concentration of about 1.3 mM was found in whole rat brain homogenates after administration of an acute dose of GHB precursor GBL (gamma-butyrolactone) when the animals regained righting reflexes (Fung et al., 2004). In a pilot pharmacology study phase 1, oral GHB was

administered in human volunteers at doses between 40 and 72 mg/kg. GHB concentrations in plasma peaked between 30 and 60 min after drug administration at a concentration above 1 mM for the highest dose (Abanades et al., 2006). In the treatment for narcolepsy, the usual GHB dose is 4.5 g twice during the night which is approximately $70 \text{ mg/kg} \times 2$ for a period of 8 h. These doses lead to brain GHB concentrations which most probably exceed 1 mM (Borgen et al., 2004) and in addition, some brain regions may exhibit even higher concentrations, like in rat brain.

4.2. Pharmacological doses of GHB significantly inhibit HDAC activity in rat brain

In rat brain extracts containing all HDAC isoforms, GHB inhibits global HDAC activity with an IC_{50} of about 1.5 mM. This classifies GHB as a weak HDAC inhibitor which can be compared to related structural analogues (butyrate, valproate, phenylbutyrate derivatives) which also possess inhibitory constant in the millimolar range. However, in the case of GHB, the first important question is the heterogeneity in the distribution and metabolism of regional brain GHB levels. For the highest GHB dose which was administered to animals (1000 mg/kg) and for a time (60 min) which corresponds to the maximal GHB concentration in the brain, the animals slept for about 2–4 h (there is a large heterogeneity in the duration of anesthesia between animals; Lobina et al., 2001). For this dose and

Table 2

	HDAC activities in controls	Experiments A (1000 mg/kg)		Experiments B (750 mg/kg)	
		HDAC activities	Percentages of total HDAC decrease	HDAC activities	Percentages of total HDAC decrease
Hippocampus	0.78 ± 0.06	$0.28 \pm 0.04^{**}$	64 ± 6	$0.60 \pm 0.05^{***}$	23 ± 6
Temporal and parietal cortices	0.93 ± 0.07	$0.60 \pm 0.04^{***}$	36 ± 5	$0.77 \pm 0.09^{**}$	17 ± 10
Brain stem	1.52 ± 0.12	$0.64 \pm 0.10^{***}$	58 ± 7	$1.28 \pm 0.04^{**}$	16 ± 3
Cerebellum	1.41 ± 0.07	$0.51 \pm 0.11^{***}$	64 ± 8	$1.00 \pm 0.16^{***}$	30 ± 12

HDAC activity in nmol/mg protein/min. Statistics with Student's *t*-test ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$). Percentage of total HDAC decrease compared to control (100%). Total HDAC activity of protein extracts from hippocampus, temporal and parietal cortex, brain stem and cerebellum were assayed *in vitro* in presence of GHB. The GHB concentrations were measured experimentally after *in vivo* administration of GHB after a time lapse of 60 min (Table 1).

In the Experiments A, the HDAC activity and percentage of HDAC decrease corresponds to the inhibition of HDACs in the presence of GHB concentration corresponding to the tissue level measured after *in vivo* administration of 1000 mg/kg and a time lapse of 60 min.

In the Experiments B, the HDAC activity and percentage of HDAC decrease corresponds to the inhibition of HDACs in the presence of GHB concentrations corresponding to the tissue level measured after *in vivo* administration of 750 mg/kg and a time lapse of 60 min.

time, inhibition of global HDAC population in the four brain regions studied was about 50–60% with GHB concentrations within 1.1–1.5 mM. However, in the parietal cortex the GHB concentration was much lower and the HDAC inhibition was only about 36%. This pointed out the heterogeneity of HDAC inhibition in the brain, depending at least on uneven GHB distribution. For the 750 mg dose, a similar phenomenon was seen with GHB concentrations ranging from about 300 to 500 μ M with corresponding HDAC inhibition between 16% and 30%. Apart from this GHB concentration heterogeneity, a second phenomenon could contribute to the observed irregular HDAC inhibition among brain regions. To date, 11 HDAC isoforms have been identified in the rat brain, expressed primarily in neurons, with specific regional expression patterns (Broide et al., 2007). For example, valproate inhibits preferentially HDAC class 1 (Hrzenjak et al., 2006), and the possibility exists that GHB interferes similarly with one or several particular HDAC in brain. In that case, GHB would possess a higher potency for this (these) isolated HDACs and most probably a higher selective effect.

4.3. GHB-induced inhibition of rat brain HDAC increases histone H3 acetylation in several brain regions

We observed an increase of H3 acetylation in total rat brain extract of about 2.5 fold in rats treated with 1000 mg/kg GHB compared to control rats injected with saline. A second administration of the same dose of GHB 4 h after the first one (to mimic approximately the rhythm of treatment for narcolepsy) did not modify the level of H3 acetylation, probably because the endogenous brain GHB levels did not further increase because of the rapid metabolism of the first dose administered 4 h before. Lower doses of GHB (750 mg/kg), which induced only a 1.5–3 h of loss of righting reflexes in Wistar rats, were not explored. Considering both the heterogeneity of the distribution of administered GHB in rat brain region and the specific distribution of HDAC isoforms, we documented the possible irregular repartition in H3 acetylation among four brain regions using quantitative immunocytochemistry. In the cerebellum, the molecular, Purkinje and granular cells layers displayed stronger labeling in treated rats than in controls. It should be noted that Purkinje cell layer expressed only class 4 HDAC (HDAC 11) (Broide et al., 2007), which is a target for GHB in the brain. Two other brain regions which have been explored (hippocampus and brain stem) also showed significant increases in H3 acetylation in neurons. However, for parietal cortex, the modification was too small to be significant, using the immunocytochemical and immunoblotting techniques, despite a little increase of neuronal Ac-H3 immunoreactivity in the group of GHB-treated rats. This could be either due to the smaller accumulation of GHB in this region compared to other studied regions and/or to the special equipment in HDAC isoforms in the parietal cortex.

In general, increased levels of histone acetylation are associated with increased transcriptional activity of certain genes through relaxation of the DNA conformation. These epigenetic modifications are thought to be at the basis of numerous phenomena including growth arrest, differentiation and/or apoptotic cell death of transformed cells (Huang, 2006), and are also implicated in the mechanism of some anticonvulsant and antipsychotic drugs (Eyal et al., 2004; Simonini et al., 2006), in the neuroprotective effects against cerebral ischemia (Kim et al., 2007), restoration of impaired learning and memory in neurodegenerative diseases (Saha and Pahan, 2006) and modifications of embryonic neuron differentiation (Balasubramanian et al., 2006). Our present results focus on the effect of chronic modifications of gene expression in adult rat brain after single or repeated administrations of therapeutic or recreative doses of GHB. Up to now, no extensive study about the pattern of modification in the brain transcriptome of rats after

pharmacological doses of GHB has been published. However, at the phenotypic level several properties of administered GHB could be considered, which are similar by several aspects to those of many compounds which possess HDAC inhibitory properties. Several therapeutic indications of GHB include regulation of sleep pattern in narcoleptic patients (Robinson and Keating, 2007) and limitation of withdrawal symptoms in cocaine or alcohol addicts (Gallimberti et al., 1989). Recently, alcohol-related anxiety has been found to be associated with histone acetylation and HDAC inhibition in the limbic region (Pandey et al., 2008). A neuroprotective role of sub-anesthetic doses of GHB with a reduction of ischemic injury has been reported by several authors (Ottani et al., 2003; Sadasivan et al., 2006). Finally, GHB has been implicated in the modification of neuronal excitability in rodents and has been tested with modest results in the treatment of psychotic symptoms (Levy et al., 1983; Schulz et al., 1981). The role of GHB-induced inhibition of HDAC could also be a part of its toxic properties at high doses when GHB is used as a drug of abuse and/or when it is absorbed chronically (Anderson et al., 2006). Patients with metabolic disease caused by succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) mutations with an important and chronic accumulation of GHB in brain express several neuropsychiatric disorders (Gibson et al., 2003) and most probably a chronic modification of gene expression in some regions of the brain participates in the etiology of the symptoms. Exploration of the status of histone acetylation in transgenic SSADH^{-/-} mice compared to controls could be of interesting value, including the role of treatment by vigabatrin. In patients with SSADH mutation, the use of valproate is not recommended as anticonvulsant possibly because this short chain fatty acid induces an additional cause for histone(s) hyperacetylation, besides its role as inhibitor of GHB degradation (Loscher, 2002).

4.4. A role for brain endogenous GHB in the regulation of histone acetylation?

Finally, the possibility that endogenous GHB in brain participates in the modulation of histone acetylation and epigenetic regulation of some gene expression in certain neurons of the brain should be proposed. GHB is naturally present in various brain regions of several animals (including human) but at tissue concentration that never exceeds about 50 μ M. If we consider an effect of GHB on the whole HDAC population of the brain, this concentration appears to be far below the active concentration of GHB necessary to significantly inhibit nuclear HDACs, at least *in vitro*. However, the possibility that some restricted population of neurons, most probably GABAergic (because GABA is the precursor of GHB in brain) could possess higher GHB concentration cannot be excluded. In addition, we have shown, using an *in vitro* preparation of brain cell nuclei that radioactive GHB can penetrate into these organites. Under our specific conditions, even in the presence of cytosolic extract, we were not able to demonstrate a saturable and/or active accumulation of GHB in these brain cell nuclei. Thus, at least *in vitro*, this accumulation seems passive diffusion, however directly dependent on the concentration of cytosolic GHB present in the neuron. In GHBergic neurons, cytosolic GHB could be high enough to significantly modulate the acetylation of at least a class of HDAC, with a series of adaptive consequences on the genomic expression of the target neurons.

To summarize, our results indicate that pharmacologically active doses of GHB, in animals and most probably in humans, cause a significant increase in H3 acetylation to occur in several regions of the brain due to uneven distribution of HDAC inhibition. This phenomenon could participate in several effects of (self) administered GHB at the level of chromatin and transcriptome remodeling.

References

- Abanades, S., Farre, M., Segura, M., Pichini, S., Barral, D., Pacifici, R., Pellegrini, M., Fonseca, F., Langohr, K., De La Torre, R., 2006. Gamma-hydroxybutyrate (GHB) in humans: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074, 559–576.
- Addolorato, G., Castelli, E., Stefanini, G.F., Casella, G., Caputo, F., Marsigli, L., Bernardi, M., Gasbarrini, G., 1996. An open multicentric study evaluating 4-hydroxybutyric acid sodium salt in the medium-term treatment of 179 alcohol dependent subjects. *Alcohol Alcohol.* 31, 341–345. GHB Study Group.
- Anderson, I.B., Kim, S.Y., Dyer, J.E., Burkhardt, C.B., Iknoian, J.C., Walsh, M.J., Blanc, P.D., 2006. Trends in gamma-hydroxybutyrate (GHB) and related drug intoxication: 1999 to 2003. *Ann. Emerg. Med.* 47, 177–183.
- Andriamampandry, C., Taleb, O., Viry, S., Muller, C., Humbert, J.P., Gobaille, S., Aunis, D., Maitre, M., 2003. Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB). *FASEB J.* 17, 1691–1693.
- Andriamampandry, C., Taleb, O., Kemmel, V., Humbert, J.P., Aunis, D., Maitre, M., 2007. Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J.* 21, 885–895.
- Arts, J., Angibaud, P., Marien, A., Floren, W., Janssens, B., King, P., van Dun, J., Janssen, L., Geerts, T., Tuman, R.W., Johnson, D.L., Andries, L., Jung, M., Janicot, M., van Emelen, K., 2007. R306465 is a novel potent inhibitor of class I histone deacetylases with broad-spectrum antitumor activity against solid and haematological malignancies. *Br. J. Cancer.* 97, 1344–1353.
- Balabusramaniyan, V., Boddeke, E., Bakels, R., Kust, B., Kooistra, S., Veneman, A., Copray, S., 2006. Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. *Neuroscience* 143, 939–951.
- Basaki, Y., Chikahisa, L., Aoyagi, K., Miyadera, K., Yonekura, K., Hashimoto, A., Okabe, S., Wierzbicka, K., Yamada, Y., 2001. gamma-Hydroxybutyric acid and 5-fluorouracil, metabolites of UFT, inhibit the angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 4, 163–173.
- Borgen, L.A., Okerholm, R.A., Lai, A., Scharf, M.B., 2004. The pharmacokinetics of sodium oxybate oral solution following acute and chronic administration to narcoleptic patients. *J. Clin. Pharmacol.* 44, 253–257.
- Brenneisen, R., Elsohly, M.A., Murphy, T.P., Passarelli, J., Russmann, S., Salamone, S.J., Watson, D.E., 2004. Pharmacokinetics and excretion of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in healthy subjects. *J. Anal. Toxicol.* 28, 625–630.
- Broide, R.S., Redwine, J.M., Afzahi, N., Young, W., Bloom, F.E., Winrow, C.J., 2007. Distribution of histone deacetylases 1–11 in the rat brain. *J. Mol. Neurosci.* 31, 47–58.
- Cash, C.D., Gobaille, S., Kemmel, V., Andriamampandry, C., Maitre, M., 1999. Gamma-hydroxybutyrate receptor function studied by the modulation of nitric oxide synthase activity in rat frontal cortex punches. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1815–1819.
- Dokmanovic, M., Marks, P.A., 2005. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J. Cell. Biochem.* 96, 293–304.
- Drasbek, K.R., Christensen, J., Jensen, K., 2006. Gamma-hydroxybutyrate—a drug of abuse. *Acta Neurol. Scand.* 114, 145–156.
- Eyal, S., Yagen, B., Sobol, E., Altschuler, Y., Shmuel, M., Bialer, M., 2004. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45, 737–744.
- Facchetti, F., Previdi, S., Ballarini, M., Minucci, S., Perego, P., La Porta, C.A., 2004. Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 9, 573–582.
- Fung, H.L., Haas, E., Raybon, J., Xu, J., Fung, S.M., 2004. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of endogenous gamma-hydroxybutyrate concentrations in rat brain regions and plasma. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* 807, 287–291.
- Gaiddon, C., Larmet, Y., Trinh, E., Boutilier, A.L., Sommer, B., Loeffler, J.P., 1999. Brain-derived neurotrophic factor exerts opposing effects on beta2-adrenergic receptor according to depolarization status of cerebellar neurons. *J. Neurochem.* 73, 1467–1476.
- Gallimberti, L., Canton, G., Gentile, N., Ferri, M., Cibin, M., Ferrara, S.D., Fadda, F., Gessa, G.L., 1989. Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome. *Lancet* 2, 787–789.
- Gibson, K.M., Gupta, M., Pearl, P.L., Tuchman, M., Vezina, L.G., Snead 3rd, O.C., Smit, L.M., Jakobs, C., 2003. Significant behavioral disturbances in succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) deficiency (gamma-hydroxybutyric aciduria). *Biol. Psychiatry.* 54, 763–768.
- Hrzenjak, A., Moifan, F., Kremser, M.L., Strohmaier, B., Staber, P.B., Zatloukal, K., Denk, H., 2006. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2203–2210.
- Huang, L., 2006. Targeting histone deacetylases for the treatment of cancer and inflammatory diseases. *J. Cell. Physiol.* 209, 611–616.
- Kemmel, V., Taleb, O., Andriamampandry, C., Aunis, D., Maitre, M., 2003. Gamma-hydroxybutyrate receptor function determined by stimulation of rubidium and calcium movements from NCB-20 neurons. *Neuroscience* 116, 1021–1031.
- Kim, H.J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.S., Chen, P.S., Chuang, D.M., 2007. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 892–901.
- Kleinschmidt, S., Grundmann, U., Janneck, U., Kreienmeyer, J., Kulosa, R., Larsen, R., 1997. Total intravenous anaesthesia using propofol, gamma-hydroxybutyrate or midazolam in combination with sufentanil for patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Eur. J. Anaesthesiol.* 14, 590–599.
- Lettieri, J.T., Fung, H.L., 1979. Dose-dependent pharmacokinetics and hypnotic effects of sodium gamma-hydroxybutyrate in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 7–11.
- Levy, M.L., Davis, B.M., Mohs, R.C., Triglos, G.C., Mathe, A.A., Davis, K.L., 1983. Gamma-hydroxybutyrate in the treatment of schizophrenia. *Psychiatry Res.* 9, 1–8.
- Lingenhoehl, K., Brom, R., Heid, J., Beck, P., Froestl, W., Kaupmann, K., Bettler, B., Mosbacher, J., 1999. Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology* 38, 1667–1673.
- Lobina, C., Colombo, G., Brunetti, G., Diaz, G., Melis, S., Pani, M., Serra, S., Vacca, G., Gessa, G.L., Carai, M.A., 2001. Procedure of bidirectional selective outbreeding for production of two rat lines differing in sensitivity to the sedative/hypnotic effect of gamma-hydroxybutyric acid. *Brain Res. Protoc.* 8, 74–81.
- Loscher, W., 2002. Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* 16, 669–694.
- Lu, Q., Yang, Y.T., Chen, C.S., Davis, M., Byrd, J.C., Etherton, M.R., Umar, A., 2004. Zn²⁺-chelating motif-tethered short-chain fatty acids as a novel class of histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* 47, 467–474.
- Mamelak, M., Scharf, M.B., Woods, M., 1986. Treatment of narcolepsy with gamma-hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings. *Sleep* 9, 285–289.
- Muller, C., Viry, S., Miede, M., Andriamampandry, C., Aunis, D., Maitre, M., 2002. Evidence for a gamma-hydroxybutyrate (GHB) uptake by rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 80, 899–904.
- Nelson, T., Kaufman, E., Kline, J., Sokoloff, L., 1981. The extraneural distribution of gamma-hydroxybutyrate. *J. Neurochem.* 37, 1345–1348.
- Ottani, A., Saltini, S., Bartiromo, M., Zaffe, D., Renzo Botticelli, A., Ferrari, A., Bertolini, A., Genedani, S., 2003. Effect of gamma-hydroxybutyrate in two rat models of focal cerebral damage. *Brain Res.* 986, 181–190.
- Palkovits, M., Brownstein, M.J., 1988. Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain. Elsevier, New York–Amsterdam–London.
- Pandey, S.C., Ugale, R., Zhang, H., Tang, L., Prakash, A., 2008. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J. Neurosci.* 28, 3729–3737.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, second edition. Academic Press, New York.
- Raybon, J.J., Boje, K.M., 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gamma-hydroxybutyric acid during tolerance in rats: effects on extracellular dopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 1252–1260.
- Robinson, D.M., Keating, G.M., 2007. Sodium oxybate: a review of its use in the management of narcolepsy. *CNS Drugs* 21, 337–354.
- Sadasivan, S., Maher, T.J., Quang, L.S., 2006. Gamma-hydroxybutyrate (GHB), gamma-butyrolactone (GBL), and 1,4-butanediol (1,4-BD) reduce the volume of cerebral infarction in rodent transient middle cerebral artery occlusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074, 537–544.
- Saha, R.N., Pahan, K., 2006. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* 13, 539–550.
- Schulz, S.C., van Kammen, D.P., Buchsbaum, M.S., Roth, R.H., Alexander, P., Bunney Jr., W.E., 1981. Gamma-hydroxybutyrate treatment of schizophrenia: a pilot study. *Pharmacopsychiatry* 14, 129–134.
- Shumate, J.S., Snead 3rd, O.C., 1979. Plasma and central nervous system kinetics of gamma-hydroxybutyrate. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 25, 241–256.
- Simonini, M.V., Camargo, L.M., Dong, E., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., Guidotti, A., 2006. The benzamide MS-275 is a potent, long-lasting brain region-selective inhibitor of histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1587–1592.
- Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H., Andrews, G.K., 2000. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J. Biol. Chem.* 275, 9377–9384.
- Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Vayer, P., Mandel, P., Maitre, M., 1985. Conversion of gamma-hydroxybutyrate to gamma-aminobutyrate *in vitro*. *J. Neurochem.* 45, 810–814.
- Vayer, P., Ehrhardt, J.D., Gobaille, S., Mandel, P., Maitre, M., 1988. Gamma-hydroxybutyrate distribution and turnover rates in discrete brain regions of the rat. *Neurochem. Int.* 12, 53–59.
- Wong, C.G., Gibson, K.M., Snead 3rd, O.C., 2004. From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 29–34.
- Zhu, W.G., Lakshmanan, R.R., Beal, M.D., Otterson, G.A., 2001. DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* 61, 1327–1333.

B. Modulation du transcriptome cérébral sous l'effet d'une dose thérapeutique aigue de GHB

Pour tenter de déterminer, sans à priori, les gènes concernés par le remaniement de la structure chromatinienne, nous avons utilisé la technique des microarrays / Affymetrix dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour l'étude de l'acétylation des histones. Ainsi les rats traités, recevant une dose de GHB de 1 g/kg injectée intrapéritonéalement, et les rats contrôles ont été sacrifiés après un délai de deux heures. Mais cette fois ci nous avons effectué une extraction des ARN totaux de l'hippocampe et du cortex frontal, deux zones du cerveau dans lesquelles nous avons observé que le GHB modifie fortement l'acétylation des histones. Les résultats ont été confirmés pour certains gènes d'intérêt par western blot et immunocytochimie.

1) Résultats obtenus lors des expériences de microarrays

Dans nos conditions expérimentales, 268 gènes présentent une modification de l'expression significative, par rapport au contrôle, dans les deux structures étudiées.

	Nombre de « probe sets » modifiés	Nombre de gènes dont l'expression est modifiée	Nombre de gènes dont l'expression est augmentée			Nombre de gènes dont l'expression est diminuée		
			de 1,5 à 2 fois	de 2 à 3 fois	plus de 3 fois	de 1,5 à 2 fois	de 2 à 3 fois	plus de 3 fois
hippocampe	470	208	66	21	8	96	21	5
cortex pré-frontal	172	74	45	9	0	17	3	0

TABLE III : Nombre de gènes dont l'expression est modifiée plus de 1,5 fois dans l'hippocampe et dans le cortex pré-frontal.

Ces gènes codent pour une large variété de protéines possédant des fonctions différentes. Principalement, nous pouvons classer ces gènes dans plusieurs grandes catégories : la

communication inter-neuronale, les processus métaboliques, la régulation de la transcription du DNA, la réponse au stress et la croissance ou la mort neuronale. Nous constatons aussi une grande variation au niveau de la modification de l'expression des gènes qui ressortent de l'analyse des microarrays.

Parmi ces 268 gènes, nous avons choisi d'en étudier trois groupes qui nous apparaissent les plus intéressants au point de vue fonctionnel.

Tout d'abord les gènes dont l'expression est la plus modifiée par le traitement dans l'une ou l'autre des structures (modification de 3 fois et plus dans l'hippocampe et 2 fois et plus dans le cortex pré-frontal). Compte tenu de ces critères, nous avons arbitrairement sélectionné un certain nombre de gènes.

Ainsi dans l'hippocampe l'expression de 8 gènes est augmentée et celle de 5 gènes est diminuée de plus de 3 fois. Parmi les gènes dont l'expression est augmentée, 2 attirent particulièrement l'attention. Tout d'abord, le gène de la Transportin 1 (augmenté 12 fois) qui transfère des molécules dont il reconnaît le signal de localisation nucléaire en provenance du cytoplasme vers le noyau à travers les pores nucléaires (Kamei et al., 1999). Ensuite le gène codant pour la Heat shock 70 kD protein 1A dont l'expression est augmentée 7 fois. Cette protéine a une activité majeure de chaperon moléculaire dans le cytoplasme et participe à la mise en place de la structure 3D des protéines. Pour les 6 autres gènes dont l'expression est augmentée (3 à 5,5 fois), plusieurs codent pour des protéines impliquées dans la transcription des gènes (jun-B, cfos, transcription elongation factor B, bromodomain). Les 5 gènes dont l'expression est diminuée, sont impliqués dans le signal cellulaire et le métabolisme cellulaire.

Dans le cortex préfrontal, l'expression des gènes est moins fortement modifiée. Nous dénombrons ainsi 9 gènes dont l'expression est augmentée de plus de 2 fois et 3 gènes dont l'expression est diminuée de plus de 2 fois. Les protéines pour lesquelles codent ces gènes interviennent pour la plupart dans la régulation de la transcription.

Ensuite les gènes dont l'expression est modifiée dans les deux structures du cerveau. Ceux-ci sont représentés par une série de 14 gènes impliqués dans toute une série de processus (signalisation neuronale, métabolisme, réponse au stress et régulation de la transcription). Parmi ces gènes, celui de la glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 soluble est particulièrement à noter, en effet son expression est augmentée jusqu'à 4 fois et il est représenté par 2 « probe sets » différents dans les 2 zones du cerveau. Ce gène code pour une

enzyme qui intervient dans les navettes nécessaires à la réoxydation du NADH dans les mitochondries lors de la glycolyse.

Finalement, le fait que le GHB endogène soit un neurotransmetteur et le fait que les systèmes GABA et dopamine sont impliqués dans le mécanisme du modèle expliquant les effets du GHB (Diana et al., 1991; Gabor et al., 1989; Gobaille et al., 1999; Vayer et al., 1987b), nous ont conduit à centrer notre étude sur les gènes impliqués dans la signalisation et la régulation de l'excitabilité neuronale (récepteurs et canaux ioniques de la membrane cellulaire). Ainsi parmi les gènes dont l'expression est modifiée, nous trouvons le gène codant pour la chaîne $\gamma 2$ du récepteur GABA-A dont l'expression est diminuée, probablement à la suite d'une hyperstimulation de cette population de récepteurs. Parmi cette liste figurent également le récepteur cholinergique muscarinique de type 4, le récepteur de la dopamine D3, le récepteur opioïde Kappa 1, le récepteur $\beta 3$ adrénergique ainsi que différents canaux Kir.

Pour confirmer ces résultats, nous avons sélectionné 8 gènes d'intérêts dont nous avons quantifié l'expression protéique par western blot et immunocytochimie. Pour les récepteurs GABA-A (chaîne gamma 2), Muscarinique 4, prolactine et dopamine D3, ainsi que pour les protéines brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2, dual specific phosphatase 1 et glucocorticoïd regulated kinase 1, les résultats obtenus confirment sans aucune ambiguïté les résultats des microarrays. Dans le cas de cfos les résultats d'immunocytochimie dans l'hippocampe confirment les résultats de microarrays mais l'augmentation de l'expression dans le cortex pré-frontal n'a pu être confirmée par western blot. Ceci est probablement dû à l'existence d'une certaine dispersion des résultats de microarray dans cette région.

De fait, une publication récente montre que l'accumulation de cfos sous l'action du GHB est différente de celle induite sous l'action du baclofen (van Nieuwenhuijzen et al., 2009), agoniste de référence de GABA-B. Des expériences de microarrays, complétées par des expériences de RT-PCR, sur des cultures de cellules d'hippocampe stimulées par du baclofen (Ghorbel et al., 2005) font aussi ressortir un ensemble de gènes qui ne sont pas retrouvés dans nos expériences. Cependant les résultats obtenus après stimulation par le baclofen ont été obtenus à partir de cultures de neurones, contrairement à nos résultats obtenus sur du tissu ex-vivo.

Publication 2 :

A single acute pharmacological dose of gamma-hydroxybutyrate (GHB) modifies multiple gene expression patterns in rat hippocampus and frontal cortex.

Véronique Kemmel, Christian Klein, Omar Taleb, Doulaye Dembélé, Bernard Jost, Dominique Aunis and Michel Maitre

Manuscrit en révision

Dans ce travail, nous avons essayé d'identifier sans à priori les gènes dont l'expression était modifiée après administration d'une dose thérapeutique aiguë de GHB. Les animaux ont été sacrifiés au moment de l'effet pharmacologique maximum. Plusieurs gènes impliqués dans des processus fondamentaux de la neurotransmission, ainsi que plusieurs gènes exprimés spontanément dans les deux régions, ont été mis en évidence. Ce travail descriptif a pour but essentiel de mettre en évidence de nouvelles pistes mécanistiques pour le GHB absorbé à doses thérapeutiques et de suggérer, éventuellement, un rôle physiologique au GHB endogène.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

A single acute pharmacological dose of gamma-hydroxybutyrate (GHB) modifies multiple gene expression patterns in rat hippocampus and frontal cortex.

*Véronique Kemmel, Christian Klein, Omar Taleb, *Doulaye Dembélé, *Bernard Jost, Dominique Aunis and Michel Maitre*

*Department of Biochemistry and INSERM U-575, Faculty of Medicine and *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Strasbourg, France*

29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

Running title: GHB-induced modifications of transcriptome in the rat brain

Corresponding author: Michel Maitre

Faculty of Medicine and INSERM U-575

11, rue Human, 67085, Strasbourg, France.

Phone: 33 3 90 24 30 96

Fax: 33 3 90 24 35 70

E-mail: Michel.Maitre@neurochem.u-strasbg.fr

- Number of text pages: 24
- Number of tables: 5
- Number of figures: 10
- Number of references: 48
- Number of words in the Abstract: 274
- Number of words in the Introduction: 573
- Number of words in the Discussion: 1450

List of abbreviations: GPCR: G protein coupled receptor, FC: fold change.

Recommended Section: Neuropharmacology

57

58 **Abstract**

59 Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is used in therapeutic to induce sleep and anesthesia and to
60 reduce alcohol withdrawal syndrome. GHB is also popular as a recreative drug for its
61 anxiolytic and mild euphoric effects. However, in both cases, GHB must be administered or
62 self-administered at high doses in order to maintain GHB concentrations in brain around 800
63 μM . The general idea for the pharmacological effects of GHB is a direct and weak interaction
64 with GABA-B receptors that need high GHB concentrations, despite the fact that neither
65 baclofen nor other synthetic and specific agonists of GABA-B receptors exhibit closely
66 related therapeutic or pharmacological uses similar to GHB.

67 By using DNA microarrays studies to identify the modification of gene expression pattern in
68 hippocampus and prefrontal cortex, we demonstrate that a single acute therapeutic dose of
69 GHB alters a large amount of gene. In hippocampus, 66 genes showed an 1.5 to 2 fold
70 increase of expression, 20 genes showed an increase greater than 2 fold and 8 genes were
71 expressed more than 3 fold compared to controls. In frontal cortex, 45 genes showed a 1.5 to
72 2 fold increase of expression changes and 9 genes increased more than 2 fold. 14 genes were
73 modified simultaneously in both brain regions. Among all altered gene, we have particularly
74 selected those regulating several receptors and ions channels. Of particular interest in this
75 domain are GABA-A, muscarinic M4 and dopamine D3 receptors, but also some Kir
76 channels. Western blot and Immunohistochemical studies carried out with specific antibodies
77 confirmed the microarray findings. These results provide new insight into possible
78 mechanisms of GHB therapeutic effects in brain and tagged some new tracks for future
79 studies.

80

81 The idea that Gamma-hydroxybutyrate (GHB) possesses important functions as a
82 neuromodulator in brain is now supported by numerous results (Maitre, 1997). This
83 endogenous compound is synthesized from GABA and is co-released with it by GABA
84 synapses activity (Muller et al., 2002). Endogenous GHB concentrations in brain tissue range
85 from 0.5-1 μ M to 10-25 μ M but the fluctuations of GHB in the extracellular spaces, namely in
86 the synapses, have never been measured. Successively, specific GHB binding have been
87 described in the brain of several animal species and in human (Benavides et al., 1982a;
88 Castelli et al., 2000; Hechler et al., 1992) and more recently GHB receptors have been cloned
89 from both human and rat brain (Andriamampandry et al., 2007; Andriamampandry et al.,
90 2003). These GHB receptors appear to be heterogeneous with respect to their architecture and
91 pharmacology, despite the fact they belong to GPCR classes. In particular, the GHB analog
92 NCS-382 possesses either antagonistic, partial agonist or no activity, depending on the
93 receptor. Additionally, several GHB receptors desensitize rapidly upon GHB stimulation
94 (Cash et al., 1999; Kemmel et al., 2003; Ren and Mody, 2006). These results made the GHB
95 system more complex than generally thought.

96 Pharmacological or therapeutic active doses of GHB are high (0.5 to 1g/kg in rats; 9g during
97 the night to treat narcolepsy in human, several grams in self administration for recreative
98 purposes) (Scharf, 2006). It is generally considered that the main/unique target which
99 mediates therapeutic effect of GHB is GABA-B receptor(s) (Kaupmann et al., 2003). GHB is
100 a weak agonist for these receptors (Lingenhoehl et al., 1999), so the brain GHB concentration
101 must be high to induce significant effects like anxiolysis, sedation, sleep or anesthesia and in
102 some cases, dependence to the drug (Wong et al., 2004). While most of these effects are
103 generally attributed to the stimulation of GABA-A receptors, in addition the reference
104 GABA-B agonist (baclofen) possesses several different pharmacological effects and
105 therapeutic indications. Among all synthetic GABA-B ligands tested so far, GHB would have
106 been the only one possessing this specific pharmacological profile, according to the “only
107 GABA-B” hypothesis. We propose that GHB at high doses targets several brain systems,
108 including GABA-A and GABA-B receptors (Colombo et al., 1998), but also modulates the
109 whole endogenous GHB system. As a result, a global GABAergic effect is observed, because
110 exogenous GHB participates, through its own receptor(s), transporters and degradation
111 pathway in brain, to the potentiation of the GABA system.

112 However, beside these metabolomic and functional proteomic adaptations, direct or indirect
113 genomic regulation most probably takes place. These modifications in gene expression may
114 have a fundamental role in the mechanism of action of GHB. Almost nothing is known about
115 transcriptional changes that could explain the specificity of GHB effects after a single acute
116 dose of this compound and the installation of behavioral changes. We used oligonucleotide
117 microarrays to identify genes that are differentially expressed in hippocampus and frontal
118 cortex of rats treated two hours before RNA extraction by a therapeutic/anesthetic dose of
119 GHB and compared to rats receiving saline. Results of our microarray experiments showed
120 that acute GHB treatment alters significantly 97 genes in both regions, 14 genes belonging to
121 both hippocampus and frontal cortex. Of particular interest seems to be some genes directly
122 implicated in neuronal signaling and excitability. Finally, among the whole population of
123 modified genes, some of them could contribute to explain the mechanism of action of GHB
124 and to promote new targets for the design of GHB mimetics.

125

127

128 **Animals and Drug treatments.** Adult male Wistar rats (250 to 300 g of body weight), were
129 used for all experiments. They were housed 3 per cage and kept at constant temperature ($21 \pm$
130 1°C) with regular light/dark schedule (7 AM–7 PM). Food and water were available ad
131 libitum. Procedures involving animals and their care were conducted in compliance with the
132 European Communities Council Directive (86/609/EEC) of November 24, 1986. Animals
133 were injected intraperitoneally (i.p.) with saline (1 ml/kg) or GHB (1 g/kg) 2 hours prior to be
134 killed and decapitated. Hippocampus and prefrontal cortex were rapidly excised under sterile
135 conditions and immediately used or stored at -80°C until RNA extraction.

136

137 **RNA isolation and Microarray Analysis.** Total RNA was extracted from frozen hippocampus
138 and prefrontal cortex, using the Nucleospin RNAL protocol (Macherey-Nagel, Düren,
139 Germany). This protocol included a treatment of isolated RNA by DNase I. The different
140 batches of RNA were further purified using RNeasy columns (QIAGEN, Courtaboeuf,
141 France). Three biological replicates from three different rats were prepared for each cerebral
142 structure. Integrity and purity of RNA were checked by spectrophotometry and capillary
143 electrophoresis with the Bioanalyser 2100 RNA and 6000 Nano Kit from Agilent
144 Technologies (Palo Alto, CA). cDNA were synthesized with the Superscript Choice system
145 (Invitrogen), and then biotin-labelled cRNA were obtained with the Affymetrix IVT labelling
146 kit (Affymetrix, Santa Clara, CA). After purification, 10 μg of fragmented cRNA was
147 hybridized to the Affymetrix GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (31,042 probe sets
148 including $>28,000$ rat genes), and the chips were automatically washed and stained with
149 streptavidin-phycoerythrin using an Affymetrix fluidics station 450. Finally, arrays were
150 scanned at 570 nm with a resolution of $1.56 \mu\text{m}/\text{pixel}$ with the Gene Chip Scanner 3000 7G
151 from Affymetrix. Raw images (CEL format files) were generated with Affymetrix GeneChip
152 Operating Software (GCOS 1.4).

153

154 **Microarray Data Analysis.**

155 **1. Gene expression values.**

156 The calculation for selecting genes differentially expressed was based on data processed using
157 the dChip algorithm (Li and Wong, 2001). Data were first normalized using the rank invariant
158 method at probe level, then the Model Based Index algorithm is used with the PM/MM for
159 calculating gene expression indexes. The dChip algorithm also allows associating detection
160 level (P for present, A for absent and M for marginal) to probe set. The replicate samples
161 from of the test and the reference were averaged and a Fold Change (FC) was calculated for
162 each probeset. Permutation was used to control the False Discovery Rate of the final list
163 (Benjamini et al., 2001).

164 **2. Replicates reproducibility.**

165 To assess reproducibility we computed the correlation between the expression values of the
166 three biological replicate of each cerebral structure. All values were above $r = 0.97$, which
167 indicate good reproducibility.

168 **3. Gene selection.**

169 Stringent filtering criteria were used to identify genes whose expression level was
170 significantly changed between two stages. We performed a student t-test analysis to compare
171 treated versus no treated rats for each structure. We selected genes that met all of the
172 following requirements: 1) student t-test p value < 0.05 for the three replicates of each treated
173 versus non treated rat. 2) Mean of MASS 5 fold change over the three replicated was either \geq
174 1.5 or ≤ 0.67 (-1.5 fold change) for both comparisons.

175 For any of the above steps, except for the comparative analysis, we used the R affy package
176 of Bioconductor (Irizarry R, 2002). Online Mendelian inheritance in Man OMIM,
177 (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/) and UniProt (www.ebi.ac.uk/uniprot/) were used to provide
178 information on gene and protein functions. OMIM and the Gene Expression Omnibus
179 Database are provided in the public domain by National Center for Biotechnology
180 Information (Bethesda, MD).

181
182 **Antibodies.** The following antibodies were used: GABA_A receptor gamma 2 antibody (anti-
183 GABA_Aγ₂, rabbit polyclonal IgG, 1/500), Dopamine receptor D3 antibody (anti-D3R, rabbit
184 polyclonal IgG, 1/500), Dual specific phosphatase 1 antibody (anti-DUSP 1, goat polyclonal,
185 1/500), Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 antibody (anti-Baiap2,
186 rabbit polyclonal IgG, 1/500) and Muscarinic acetylcholine receptor M4 antibody (anti-M4R,
187 rabbit polyclonal IgG, 1/1 000), were purchased from ABCAM, Cambridge, UK. Prolactine
188 receptor antibody (anti-PRLR, goat polyclonal, 1/500), cFos antibody (anti-cFOS, rabbit
189 polyclonal, 1/500) and Serum/glucocorticoid regulated kinase 1 antibody (anti-sgk, mouse
190 monoclonal, 1/500) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA,
191 USA.

192
193 **Immunoprecipitation.** One-two µg of the various monoclonal antibodies or two-four µg of
194 the different polyclonal antibodies were added to cell lysates and mixed. Fifty µl (monoclonal
195 antibodies) or 100 µl (polyclonal antibodies) of Protein G MicroBeads (Miltenyi Biotec) were
196 added, mixed and incubated for 30 min at 0°C. The µColumns (Miltenyi Biotec) were placed
197 in the magnetic field of the µMACS™ Separator (Miltenyi Biotec). The µColumns were
198 rinsed with 200 µl of lysis buffer, then cell lysates were applied on the different columns and
199 lysates were allowed to run through. The columns were rinsed with 4 × 200 µl of a suitable
200 buffer (150 mM NaCl, 1% Igepal CA630 (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50
201 mM Tris HCl pH 8.0). Thereafter, columns were rinsed with 100 µl of low-salt wash buffer
202 (20 mM Tris HCl pH 7.5). Then 20 µl of pre-heated (95 °C) SDS gel loading buffer was
203 applied onto the column matrix and incubated for 5 min at room temperature. MicroColumns
204 were eluted with 50 µl of pre-heated (95 °C) SDS gel loading buffer. Eluted
205 immunoprecipitates were then analyzed by SDS-PAGE electrophoresis.

206
207 **Western immunoblotting.** Equal amounts of protein samples were separated along with
208 molecular weight markers (Fermentas, Inc., Hanover, MD, USA) in 10% polyacrylamide
209 gels. After electrophoresis, the various polyacrylamide gels were transferred onto 0.2 µm
210 nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and revealed with the specific
211 antibodies listed above as described previously. The amount of proteins loaded were
212 controlled by measuring the coloration by coomassie blue R-250. Species-specific
213 immunoglobulin G horseradish peroxidase (IgG-HRP) secondary antibodies (P.A.R.I.S,
214 Compiègne, France) were used. Blots were developed with chemiluminescent substrate
215 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA), and autoradiography was performed using
216 BioMax MR film (Kodak, Rochester, NY, USA).

217 The protein labelling was quantified by measuring the integrated optical density of the bands,
218 after subtracting background by Image J software. Image analysis of the blots was performed
219 on optical density-calibrated images captured with Adobe Photoshop software (Adobe
220 Systems Incorporated).

221
222 **Immunohistochemistry.** Animals were injected i.p. with NaCl (0.9 %) or GHB (1 g/kg). Two
223 hours after injection, rats were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 1 ml (5.6 %
224 w/v) pentobarbital sodium solution (CEVA, santé animal, Libourne, France) and perfused

225 transcardially with the fixative solution containing 4% freshly depolymerized
226 paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH
227 7.4). This solution was chilled before being injected into anesthetized animals with a
228 peristaltic pump at a flow rate of 25 ml/min until 1 ml/g body weight was reached. The brains
229 were quickly removed and left for 2 hours at room temperature in the same fixative solution.
230 Following fixation, brains were rinsed six times for 5 min in TBS (Tris-buffered saline, pH
231 7.4) to block residual aldehyde groups. Brain sections were dissected according to the Paxinos
232 and Watson coordinates (Paxinos G, 1986). Coronal sections (50–80 μ m) were cut with a
233 vibratome (Leica VT 1000 M) and collected in TBS.

234 Floating sections were immunostained as follows: Tissue slides were rinsed with TBS, then
235 blocked for 20 min with 10% normal bovine serum (NBS) in TBS. Sections were incubated
236 overnight at 4°C with either one of the antibody listed above, at optimal dilution. Sections
237 were then washed in TBS and incubated with species-specific immunoglobulin G horse radish
238 peroxidase (IgG-HRP) secondary antibodies for 3 hours. These antibodies were goat anti-
239 rabbit IgG (H+L), (BI2407, final dilution 1/200), goat anti-mouse IgG (H+L), (BI2413C,
240 final dilution 1/200) or rabbit anti-goat IgG (H+L), (BI2403, final dilution 1/200) (P.A.R.I.S.,
241 Compiègne, France). Sections were again washed (6 times during 5 min) with TBS.
242 Peroxidase activity was detected with a freshly prepared solution of 4-chloro 1-naphtol (0.2
243 mg/ml) in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with TBS, the
244 sections were mounted in glycerol/TBS (v/v) before microscopic analysis using a microscope
245 (Leica DMRB) equipped with a digital camera (Axiocam, Zeiss, Germany).

246 Immunolabeled sections were visualized by using an X 25 objective lens. All analyses were
247 carried out in comparable areas under the same optical and light conditions. Black and white
248 images were digitized and viewed on a computer using LAS software (Leica).

249
250

Results

GHB alters gene expression patterns in hippocampus and prefrontal cortex.

In an attempt to identify regulated genes whose expression changes are associated with administration of therapeutic doses of GHB, microarrays transcription profiles were obtained from hippocampus and prefrontal cortex of rats treated with 1 g/kg GHB and compared with control rats administered with saline. The proportion of probe set designated as “present” in the Hippocampus by the affymetrix software was $54 \pm 0.88\%$ and $57.9 \pm 3.09\%$ for GHB treated rats and for controls respectively, with no significant fluctuations ($p=0.27$). In Prefrontal Cortex, the proportion of probe set designated as “present” by the affymetrix software was $63.33 \pm 0.96\%$ and $65.03 \pm 1.41\%$ for GHB treated rats and for controls (non significant fluctuations, $p=0.39$). However, the percentage of probe sets designated as “present” by the affymetrix software was significantly different between hippocampus and Prefrontal Cortex.

621 probe sets representing 268 genes (less than 2% of the arrayed cDNA) showed 1.5-fold or greater changes in expression in the hippocampus and/or in the prefrontal cortex of the rat brain after systemic administration of therapeutic doses of GHB. Of these 621 probe sets, 24.2% were affected only in the prefrontal cortex (151 probe sets), 72.4% were affected only in the hippocampus (449 probe sets) and 3.4% (21 probe sets) were affected in both brain structures. Approximately the same number of probe sets were up or down regulated in the two structures investigated (304 and 317 respectively), however 58.2% of probe sets were up-regulated in the hippocampus and 36.3% in the prefrontal cortex while only 7.5% of probe sets (only one) was down regulated in both regions.

The probe sets modified by high doses of GHB were in a broad range of functional categories. When classified according to these arbitrarily functional categories, the most prominently regulated class of probe sets was expressed sequence target (EST) with accounted for 55.7 % of all probe sets regulated in the hippocampus and 57.0 % of all probe sets regulated in the prefrontal cortex.

Nevertheless, number of probe sets were affected to functional gene classes (44.3% in hippocampus and 43.0% in prefrontal cortex). Therefore, genes could be classified as follow in hippocampus (figure 1): neuronal signalling (10.7 %), metabolic processing (8.5 %), regulation of DNA transcription (5.3 %), stress response (5.1 %) and neuronal growth or structure (4.9 %). While in the prefrontal cortex, the classification was slightly different (figure 1): neuronal signalling (12.8 % genes), regulation of DNA transcription (9.9 %), metabolic processing (7.0 %), stress response (5.2 %) and neuronal growth or structure (4.6 %). The following results present four sections arbitrarily selected: first, we report about genes that are modified by more than three fold in hippocampus and more than 2 fold in the prefrontal cortex (tables 1-1 and 1-2 respectively) . Then, table 2 presents genes that are simultaneously modified in both regions. Tables 3 and 4 show genes involved in coding receptors and ions channels which are respectively modified by the acute drug treatment in hippocampus or in the prefrontal cortex.

Genes which presented the greatest modifications in their expression patterns in both brain regions after a therapeutic acute dose of GHB

The 470 probe sets regulated in hippocampus by GHB treatment represented 208 genes which were differentially expressed. 66 genes showed a 1.5 to 2-fold increases of expression changes, 12 genes showed an increase between 2 and 3 fold and 8 genes presented an increase

301 of expression changes greater than 3-fold (table 1-1). By contrast, 96 genes showed a 1.5 to 2
302 fold decrease of expression, 21 genes presented a 2 to 3 fold reduction while 5 genes were
303 reduced more than 3 fold (table 1-1).

304 In the prefrontal cortex, the 172 probe sets altered by the treatment represented 74 genes
305 differentially expressed. In this last region, 45 genes showed a 1.5 to 2 fold increases of
306 expression and 9 genes showed an increase between 2 and 3 fold (table 1-2). By contrast, 17
307 genes exhibited a 1.5 to 2 fold decrease in their expression and 3 genes showed a reduction
308 between 2 and 3 fold (table 1-2).

309

310 **Genes with simultaneous altered expression in both brain regions after an acute** 311 **therapeutic dose of GHB.**

312

313 15 probe sets showed 1.5 fold or greater change in expression in both Hippocampus and
314 Prefrontal cortex. These represented 14 genes (table 2). Only one gene showed an increase in
315 expression greater than 4 fold and this gene was represented by 2 different probe sets. The
316 associated gene or protein was the glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (Gdp1). Only one
317 gene expression (tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b; osteoprotegerin or
318 OPG) was reduced after GHB treatment in the two structures.

319

320 **Altered expression patterns of genes coding for receptors and ion channels in both** 321 **regions after an acute therapeutic dose of GHB.**

322

323 In both regions investigated, several genes implicated in the expression of a series of
324 receptors and ions channels were up or down regulated by GHB treatment. The corresponding
325 proteins are mainly involved in neuronal signalling and regulation of neuronal excitability. In
326 particular in the hippocampus, neuropeptide Y2, muscarinic m4 and opioid Kappa 1 receptors
327 were up regulated by the drug while adrenergic beta 3, dopamine D3 and several other
328 receptors were down regulated. In the prefrontal cortex, muscarinic m4 was also increased
329 and interestingly, the gamma 2 chain of GABA-A receptors and the prolactin receptor were
330 down regulated. Several ion channels, namely Kir channels, were affected by the treatment
331 (tables 3 and 4).

332

333 **Western blots analysis of proteins derived from selected modified genes.**

334

335 In rats treated by an anaesthetic dose of GHB and in control animals, the level of each
336 selected protein was explored after immunoprecipitation and Western blotting of total protein
337 from each brain structure (hippocampus and prefrontal cortex). Using a specific antibody for
338 each protein, the band which corresponds to the MW of the protein of interest was labelled
339 and quantified by Image J software. The significant modifications measured for proteins in
340 Western blotting were similar compared to the significant modifications measured for
341 corresponding mRNA in microarrays. The amplitude of these modifications induced by the
342 treatment was not exactly the same in both technics, due to regulation cascades between gene
343 transcription and protein synthesis (figure 2C). However, all the genes studied which were up
344 or down regulated in a given structure presented also the same up or down modification at
345 the protein level in Western blot analysis. More precisely, Muscarinic 4 receptor (Chrm4),
346 Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 (Baiap2), Dual specificity
347 phosphatase 1 (Dusp1), serum/glucocorticoid regulated kinase (Sgk) showed an increase in
348 hippocampus and prefrontal cortex, both at the level of gene and protein expression (figure 2).
349 Similarly, the Gamma 2 chain of GABA-A receptors (Gabrg2) and the Prolactin receptor
350 (Prlr) which were down-regulated only in the prefrontal cortex but not in the hippocampus at

351 the gene level, showed a significant corresponding decrease at the protein level only in the
352 cortex. By contrast, Western blot of Dopamine receptor D3 and *cfos* demonstrated an
353 increased expression only in the hippocampus where the corresponding genes were up-
354 regulated but no significant change in the cortex where the two genes were not significantly
355 modified.

356

357 **Immunocytochemical variations in the expression of selected brain proteins after GHB**

358

359 In order to confirm the modifications of some selected proteins showed by Western blot in the
360 hippocampus and prefrontal cortex of GHB-treated animals compared to controls, we
361 performed an immunocytochemical study of the distribution of these same proteins in
362 hippocampal and prefrontal tissue slices in another group of animals, treated identically.
363 Additionally, these studies give some details about the cellular and tissular distribution of the
364 accumulated or reduced concentration of specific proteins.

365 Figure 3 shows the intensity of labelling of Baiap2 protein in both prefrontal cortex and
366 hippocampus of either GHB-treated rats or naive rats. Baiap2 (Insulin receptor substrate p53
367 (IRSp53) or brain angiogenesis inhibitor associated 1 protein 2 (Shiratsuchi et al., 1997)) is an
368 adapter protein, which interacts with the Rho-family of GTPases and mediates neurite
369 outgrowth. Our immunohistochemical study revealed that control rats presented a slight
370 labelling in neurons of the prefrontal cortex, essentially in the cytoplasm and in the process of
371 the neurons. GHB treatment increased markedly the expression of Baiap2 protein in neuronal
372 cytoplasm and processes and in addition the number of positive neurons was also higher. In
373 the Hippocampus, the same phenomenon can be observed with a very discrete labelling in
374 controls compared with a much higher signal in a higher number of neurons in GHB-treated
375 rats. This staining was more important in polymorphic layers of the dentate gyrus and in the
376 hilar border of the granule cell layer (figure 3D).

377 For DUSP 1 protein (figure 4), immunocytochemical studies confirmed also the increase of
378 this protein after GHB treatment in hippocampus and prefrontal cortex. DUSPs are a group of
379 enzymes that belong to the superfamily of protein-tyrosine phosphatases (Teng et al., 2007).
380 They are able to recognize phospho-Ser/Thr and phospho-Tyr residues in substrates. Human
381 DUSP1 has been identified as an immediate early gene whose expression is rapidly induced
382 by oxidative stress, heat shock, and growth factors (Charles et al., 1993). Figures 4A and 4C
383 showed the distribution of this DUSP1 protein in the cytoplasm and processes of neurons in
384 the prefrontal cortex. In treated rats, the intensity of staining increased considerably but the
385 number of reactive neurons appeared to be the same. The labelling seemed to increase more in
386 the cytoplasm than in the processes of the neurons but dense punctuate structure were
387 frequently seen. In the Hippocampus, the staining of DUSP1 was essentially in the granule
388 cell layer and particularly in the process and synaptic end of these neurons, much more
389 intense in GHB-treated rats (figure 4B and 4D).

390 Serum/glucocorticoid regulated kinase (*sgk*) and muscarinic receptor 4 proteins were strongly
391 increased both in hippocampus and prefrontal cortex after GHB treatment according to
392 immunocytochemical experiments (Figure 5 and 6), in accordance with the increase in their
393 genes expression in these regions. The *sgk* gene originally was identified as a member of the
394 serine/threonine protein kinase gene family that is induced transcriptionally by glucocorticoid
395 and serum (Webster et al., 1993). Previous studies revealed that *sgk* mRNA was expressed
396 uniformly throughout the rat brain and especially in the CA3 of the hippocampus (Tsai et al.,
397 2002). Figure 5D showed the increase in *sgk* protein in GHB-treated rat, especially in the
398 CA3 region of hippocampus where neurons were heavily labelled both in the cytoplasm and
399 processes. For the cholinergic receptor m4, the increase in labelling in treated rats was also

400 obvious in both brain structure at the level of both cytoplasm and probably synaptic endings
401 (punctuated staining in figure 6).

402 We studied also by immunocytochemistry the products of 4 other genes of interest which
403 were significantly down-regulated in our microarray studies, but the intensity of these
404 variations were not similar in both prefrontal cortex or hippocampus, (non-significant in one
405 of these region). For example, Prolactin and GABA-A (Gamma 2 chain) receptors genes were
406 both hypo-expressed by GHB in prefrontal cortex but not in hippocampus. Immunocytochemistry
407 studies carried out with specific antibodies against the corresponding proteins showed no
408 apparent differences between controls and treated rats in the hippocampus (figure 7 and 8).
409 However, the two proteins staining were strongly reduced compared to controls under the
410 same conditions in the prefrontal cortex. By contrast, we studied by immunocytochemistry,
411 two other proteins (dopamine receptor D3, figure 9 and cfos, figure 10) whose corresponding
412 genes were non significantly altered by the treatment in the prefrontal cortex but down-
413 regulated for D3R in the hippocampus and up-regulated for cfos in the same brain region.
414 Figure 9 and 10 showed the intensity of labelling of D3R and of cfos proteins in controls and
415 treated rats. For the dopamine receptor, the images are largely in favour of a reduced staining
416 in hippocampus for treated rats, namely at the level of neuronal processes, while for prefrontal
417 cortex no apparent difference seems to exist between controls and treated rats. Finally, for
418 cfos protein, the images suggest a more heavily staining both in hippocampus and prefrontal
419 cortex (figure 10).

420

421

Discussion

422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471

The present study shows that a single acute therapeutic/anaesthetic dose of GHB administered to rats modify, during the period of pharmacological effects of the drug, a whole population of genes in the hippocampus and prefrontal cortex. These results support the fact that the mechanism of action of GHB is far more complex than generally thought and a simple stimulation of GABA-B receptors to explain the whole set of GHB pharmacological effects is doubtful. Despite the fact that GHB is rapidly metabolized in the organism and that high doses are needed to obtain beneficial effects in therapeutic or for recreative purposes, GHB is now commonly used to treat narcolepsy or alcoholism. Baclofen and GABA-B agonists shares in common with GHB several effects, generally inhibited by GABA-B antagonists (Goodwin et al., 2005), but GHB possess a unique pharmacological profile on sleep (Pardi and Black, 2006), is used for its prosocial and euphoric effects (McGregor et al., 2008) and interfere specifically with several endocrine function (Van Cauter et al., 2004). In addition, a large body of evidence strongly support the existence of a GHB system in brain with neurotransmitter function (Garcia et al., 2006). The existence of endogenous GHB in brain with high affinity binding sites and specific enzymatic machinery, together with transport and release mechanism for this substance is generally accepted. Peripheral administration of GHB to animals and man modify the turnover of several neurotransmitters, hormones and cell signals. All these properties of GHB and the existence of specific targets for GHB in brain lead to suspect the “only GABA-B” theory for GHB action.

Under our experimental conditions, a pharmacological/therapeutic dose of GHB given to rats via intraperitoneal route induces within 2 hours a significant change in the expression of more than 200 genes in the hippocampus or the prefrontal cortex of the treated animals compared to controls. These genes code for a large variety of functionally different proteins. Among these gene products, we have chosen to report only on three categories which appear to be of special interest. First, we selected in both brain region a few set of genes whose expression were the most modified by the treatment. Second, we described 14 genes simultaneously regulated in these two brain regions. Finally, taken into account the fact that GHB participates in brain neuronal signalling and excitability, we present the genes targeted by GHB whose products are directly involved in these functions.

In hippocampus, 8 genes were up-regulated and 5 genes down-regulated more than 3 fold. Among them, Transportin 1 (12 fold increase) is a transporter/ receptor protein that translocates substrates from the cytoplasm to the nucleus through nuclear pore complexes by recognizing nuclear localization signals (NLSs) (Kamei et al., 1999). Heat shock 70 kD protein 1A (7 fold increase) which is highly inducible, exhibits the major chaperoning activities within the cytoplasm and participates in de novo protein folding and refolding of damaged or misfolded proteins. Several genes are involved in transcription processes (JUN-B, cFOS, transcription elongation factor B, bromodomain (Brd4) which is a double bromodomain-containing protein that binds preferentially to acetylated chromatin (H3 and H4) (Dey et al., 2003). These genes are induced by 3 to 5.5 fold. The 5 down-regulated genes are mainly implicated in cell signaling and metabolic processing. In the prefrontal cortex, 11 genes were up or down-regulated by a factor around 2 to 3 fold.

If we consider the gene pattern modified simultaneously in both brain structures, 14 genes were found, 13 up-regulated and only one down regulated. These genes are implicated in neuronal signaling, metabolic processing, stress response or regulation of transcription. Only one gene showed an increase in expression greater than 4 fold changes and moreover it was represented by 2 different probe sets. The associated gene or protein was the soluble glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (Gdp1). This enzyme is involved in mitochondrial hydrogen shuttles necessary for the reoxidation of glycolysis derived NADH. Activated Gdp1 increases

472 intracellular levels of NADH and increases cellular resistance against H₂O₂ injury (Hwang et
473 al., 1999).

474 The existence of numerous targets and functions for endogenous GHB supports its role as
475 neurotransmitter in brain and could explain its role as a modulator of other neurotransmitter
476 system both at physiological dose but also at highest concentration. The GABA and dopamine
477 systems are mainly involved in mechanistic models to explain the effects of GHB at various
478 doses (Diana et al., 1991; Gabor et al., 1989; Gobaille et al., 1999; Vayer et al., 1987b). These
479 reasons lead us to focus on neuronal receptors and ions channels that adapt their expression
480 when being directly or indirectly stimulated by GHB. In hippocampus, Neuropeptide Y2,
481 Muscarinic 4, opioid Kappa 1, β 3 adrenergic, Dopamine D3 were among receptors for
482 neurotransmitters up or down-regulated by GHB. It could be speculated that the
483 corresponding neurotransmitters might be involved in the mechanism of action of GHB and
484 some results favor the implication of acetylcholine, opiates and dopamine (Gobaille et al.,
485 1994; Imperato et al., 1998; Schmidt-Mutter et al., 1999; Sethy et al., 1976). In prefrontal
486 cortex, Muscarinic 4 receptor was also up-regulated and this phenomenon could be the result
487 of reduced stimulation of this cholinergic receptor which functions mainly as an autoreceptor.
488 Interestingly, γ 2 chain of GABA-A receptor was down-regulated by the effect of the drug.
489 This could be due to a sustained hyperstimulation as GABA-A receptors seems to play a
490 pivotal role in the functional and pharmacological effects of GHB (Adelsberger et al., 1998;
491 Banerjee et al., 1998; Cammalleri et al., 2002; Colombo et al., 1998; Follesa et al., 2003;
492 Snead and Nichols, 1987). The majority of GABA-A receptors contains a γ 2 subunit,
493 expressed throughout the brain except in the thalamus. It is well known that GHB
494 administration to rats modify GABA release in brain (Brancucci et al., 2004; Cammalleri et
495 al., 2002; Gobaille et al., 1999), leading to a pharmacological profile (sleep, anaesthesia,
496 anxiolysis) similar to those described for other GABA-A agonists.

497 In order to confirm array data, we selected 8 of the most interesting genes and quantitatively
498 assessed their differential expression using Western blot of corresponding proteins. In a
499 second step, immunocytochemical works were carried out using the same antibodies than for
500 Western blot to obtain an estimation of the tissue distribution of the various proteins which
501 were modified in their expression by the treatment. M4R, Baiap2, Dusp1 and Sgk proteins
502 were elevated significantly in both brain regions, according to what has been observed for
503 corresponding genes. These results were confirmed non ambiguously if we observed the
504 corresponding immunocytochemical images of hippocampal and frontal cortex tissue
505 obtained from rats treated with GHB identically than for microarray experiments and
506 compared to controls. GABA-A (gamma 2 chain) and prolactin receptors proteins (Takahara
507 et al., 1977) were both down-regulated in prefrontal cortex but not significantly altered in
508 hippocampus, consistent with the microarray data. For D3R, Western blot,
509 immunocytochemical images and gene studies were also in accordance since this dopamine
510 receptor was down-regulated in hippocampus but non significantly in prefrontal cortex.
511 Although cfos gene showed a trend to increase its expression in the prefrontal of treated rats,
512 this was not confirmed by western blot. For this gene, the non significant result in prefrontal
513 cortex was due to some dispersion of microarray results in this region and a similar problem
514 for the corresponding protein in Western blot studies. However, immunocytochemical results
515 for this protein in prefrontal cortex were clearly in favor of an increase in cfos expression in
516 this region. In hippocampus, all results were coherent and in favor of an increase in cfos
517 expression either in microarray, Western blot or immunocytochemical studies.

518 The induction of cFos protein in various part of the rat brain has been studied by several
519 authors after administration. Our study confirms and extends this result to hippocampus, a
520 region which expresses a dense population of GHB receptor(s) and binding sites and
521 demonstrates an up-regulation of the corresponding gene. A recent publication pointed to the

522 fact that the GHB-induced accumulation of cFos is somewhat different than the cFos brain
 523 pattern due to baclofen administration (van Nieuwenhuijzen et al., 2009). In addition to this
 524 study, genomic experiments have shown that cultured hippocampal neurons stimulated by
 525 baclofen exhibits a profile of changes in gene expression containing several genes which are,
 526 for almost the totality of them, absent from the present set of gene modified by GHB
 527 (Ghorbel et al., 2005). For example, β -adrenergic receptor which was up-regulated by
 528 baclofen in primary culture of hippocampal neurons was down-regulated in hippocampus in
 529 our present study carried out after GHB administered in vivo. These results represent
 530 additional evidence suggesting that the mechanism of action of GHB and of the GABA-B
 531 reference agonist (baclofen) are different in many aspects, including the acute change in brain
 532 gene expression.

533
 534
 535
 536
 537
 538

Acknowledgments

539
 540
 541

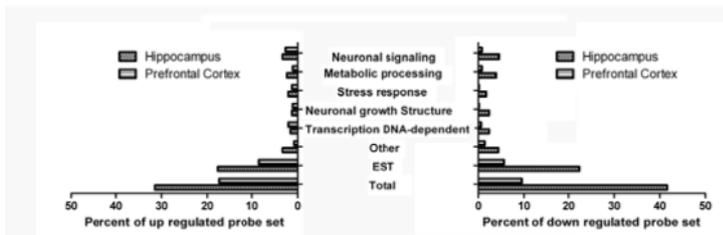
We thank Christelle Thibault and Samira Didaoui for preparing microarrays and helping with microarray analysis.

542
 543
 544
 545
 546
 547
 548

Legends to figures

549
 550
 551

Figure 1



552

553

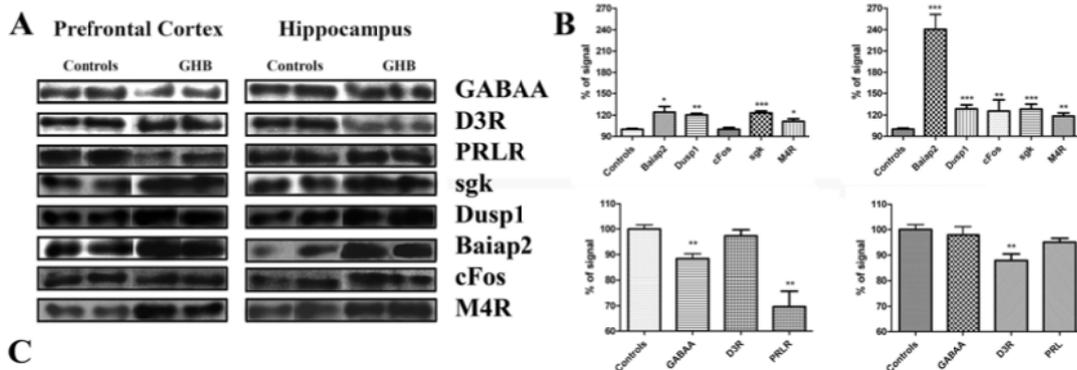
554 **Figure 1:** Functional classes of probe set showing GHB induced changes in expression.
 555 Each bar represents the percentage of all probe set regulated by GHB in Hippocampus and/or
 556 in Prefrontal cortex that belong to a given functional class of genes. Note that GHB regulated
 557 the majority of probe set in the Hippocampus (more than 70% of probe set) and the
 558 predominance of EST in the both structure (more than 50% of total probe set regulated by
 559 GHB treatment).

560

561

562

Figure 2



C

Gene identification	Prefrontal Cortex				Hippocampus			
	Microarrays		Western blot		Microarrays		Western blot	
	FC	Student t-test	FC	Student t-test	FC	Student t-test	FC	Student t-test
M4R	1.50	0.00314	1.10	0.0371	1.60	0.00723	1.18	0.0011
Baiap2	1.93	0.00548	1.24	0.0116	2.01	0.00903	2.40	P<0.0001
Dusp1	1.67	0.03759	1.20	0.0021	2.10	0.00092	1.28	P<0.0001
sgk	2.11	0.00032	1.23	0.0006	2.27	0.00012	1.28	1.0000
PRLR	-1.61	0.0182	-1.43	0.0024	1.25	0.537	-1.05	0.3071
GABA _A	-1.50	0.0056	-1.13	0.0038	-1.53	0.165	-1.02	0.57
D3R	1.09	0.953	-1.02	0.3893	-2.12	0.01688	-1.13	0.0016
cFos	1.55	0.228	1	1.0000	5.51	1.8E-05	1.25	0.0042

563

564

565 **Figure 2:** Analysis of 8 proteins whose genes were regulated by GHB treatment in the
 566 Hippocampus and/or in the Prefrontal Cortex.

567 **A, B :** Western blot analysis.

568 **A:** Western blots from proteins extracted from hippocampus or prefrontal cortex, showing
 569 GABA_A receptor subunit $\gamma 2$ (GABA-A), Dopamine receptor D3 (D3R), prolactine receptor
 570 (PRLR), serum/glucocorticoïd regulated kinase 1 (sgk), dual specific phosphatase 1 (Dusp1),
 571 brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 (Baiap2), FBJ murine
 572 osteosarcoma viral oncogene homolog (cFos), muscarinic acetylcholine receptor M4 (M4R)
 573 immunoreactivity after rat treatment with vehicle (controls) or GHB (1g/kg).

574 **(B)** Quantification of Western blot results. A significant difference in the level of proteins was
 575 observed in rats treated with GHB for all 8 proteins studied.

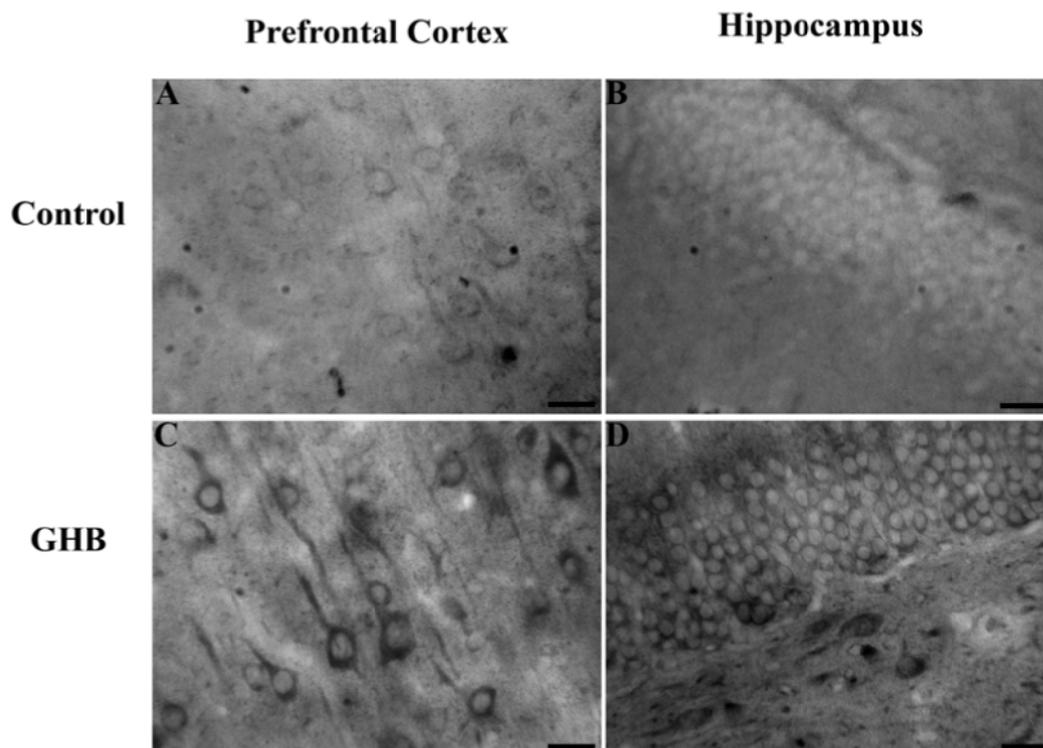
576 Western blot were analyzed by densitometry and the values are expressed as a percentage of
 577 the control group (administered with saline) which was arbitrarily set at 100%.

578 Student's t-test, *** p < 0.001, ** p < 0.01, * p < 0.05. Results represented three independent
 579 experiments with three animals in each group.

580 **C:** Comparison between the amplitude of modifications measured by microarrays and western
 581 blot analysis after GHB treatment. The statistic analysis was performed by the Student t-test
 582 on three rats on each condition (control and treated rats). FC: Fold change,

583

Figure 3

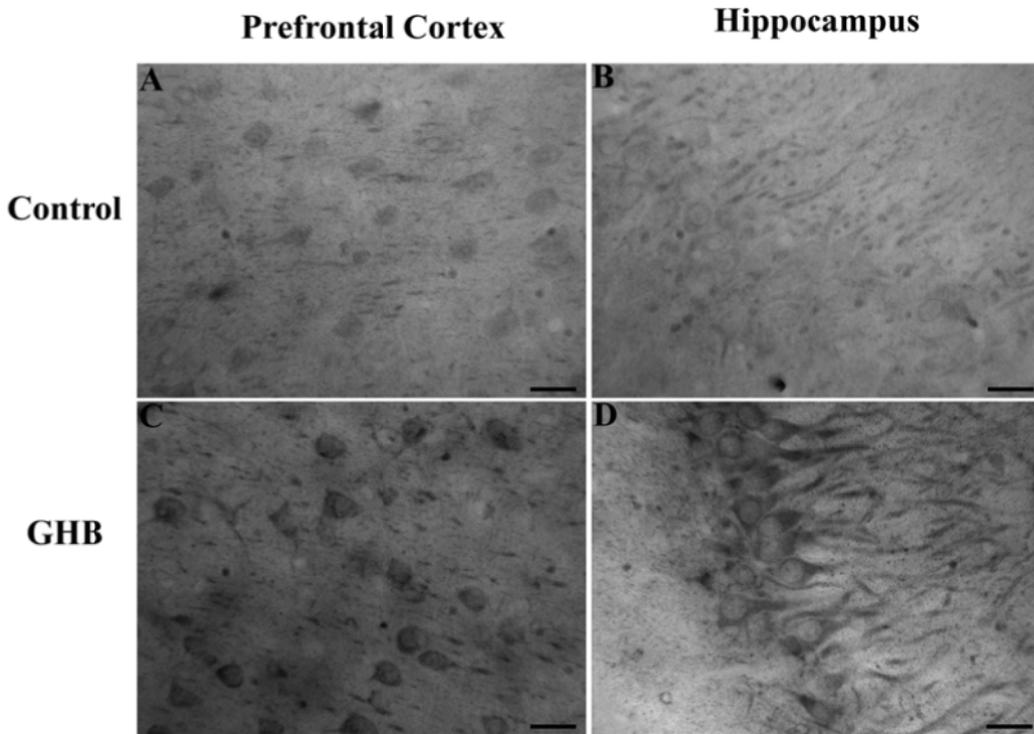


586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603

Figure 3: Representative photomicrographs illustrating the differences in the intensity of labeling of Baiap2 neurons in the Prefrontal cortex and in the Hippocampus of control rats or rats treated with 1g/kg of GHB. Control rats and treated rats were administered either with saline or GHB (1 g/kg) via IP route and then killed 2 hr later as described in materiel and methods.

Immunostainings were simultaneously carried out for all slides during the same limited amount of time in order to compare the intensity of labeling.

Note that the micrographs also revealed differences in protein content between treated and non-treated in both structures. (A) Controls in the prefrontal cortex presented a very slight staining compared to rats treated with GHB in the same region which exhibited both an increase in the labeling intensity and in the number of neurons labeled. This difference phenomenon exists also in the Hippocampus: the labeling of baiap2 neurons is very discrete in control rats (B), however in treated rats the number of neurons stained increased considerably together with the intensity of labeling (D).

Figure 4

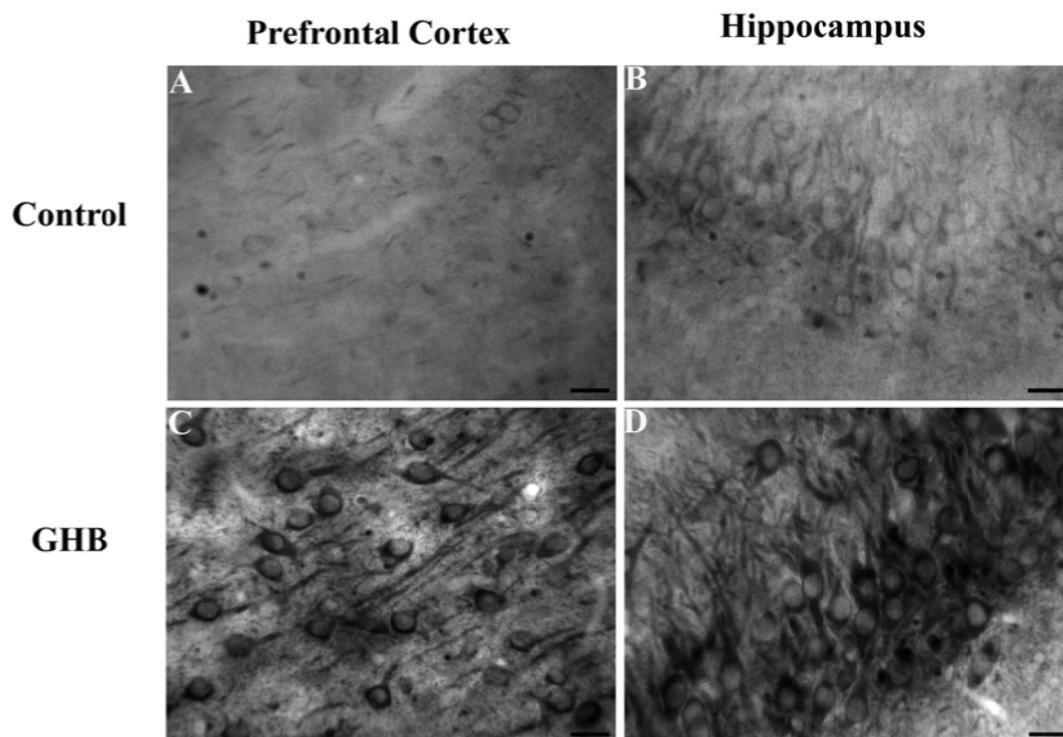
605

606

607 **Figure 4:** Representative photomicrographs illustrating the differences in the intensity of
 608 labeling of DUSP1 neurons in the Prefrontal cortex and in the Hippocampus of control rats or
 609 treated rats. Immunostainings were made under the same conditions in order to compare the
 610 intensity of labeling in brain slices with or without treatment

611 The micrographs confirmed the difference existing between treated or non-treated rats in both
 612 structures. (A) Controls in the prefrontal cortex presented a very slight staining compared to
 613 rats treated with GHB (C) which presented an increase in labeling intensity and in the number
 614 of neurons labeled. This difference existed also in the Hippocampus where the labeling of
 615 DUSP1 neurons was very discrete in control rats (B). However, in treated rats, the number of
 616 neurons stained increases considerably with the intensity of labeling (D).

617

Figure 5

619

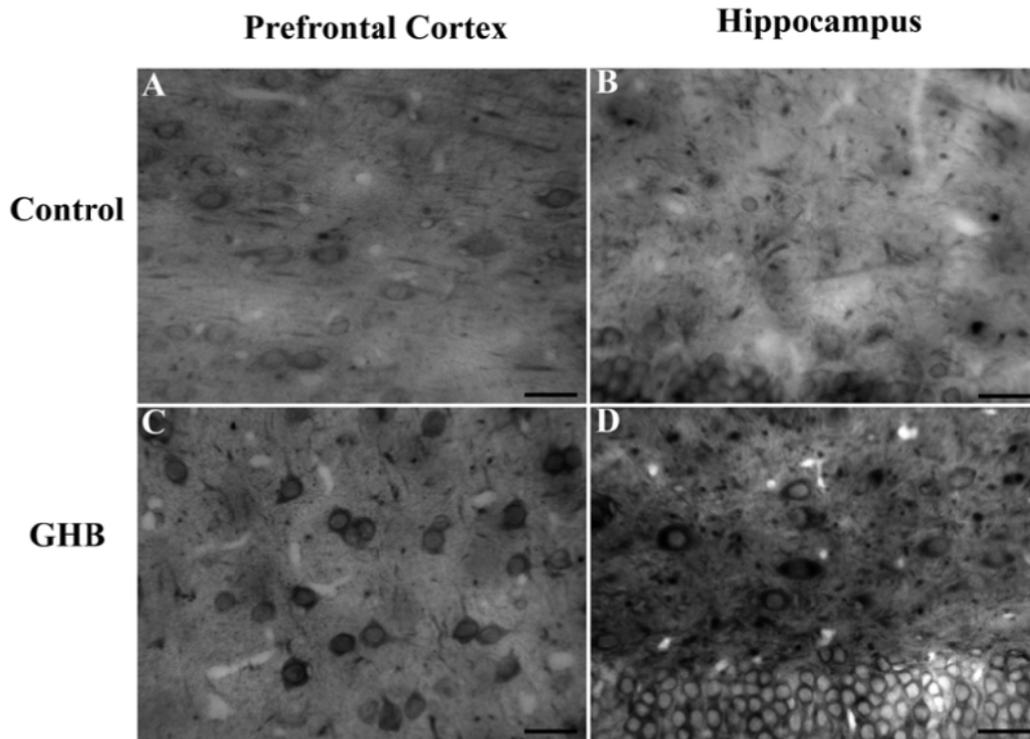
620

621

622 **Figure 5:** Same comments as for figure 3 concerning the differences in the intensity of
 623 labeling of sgk neurons in the Prefrontal Cortex and in the Hippocampus of control and
 624 treated rats. (A) Controls in the prefrontal cortex and (C) same regions in rats treated with
 625 GHB. (B) Control images in naïve rats compared to treated animals (D).

626

627

Figure 6

629

630

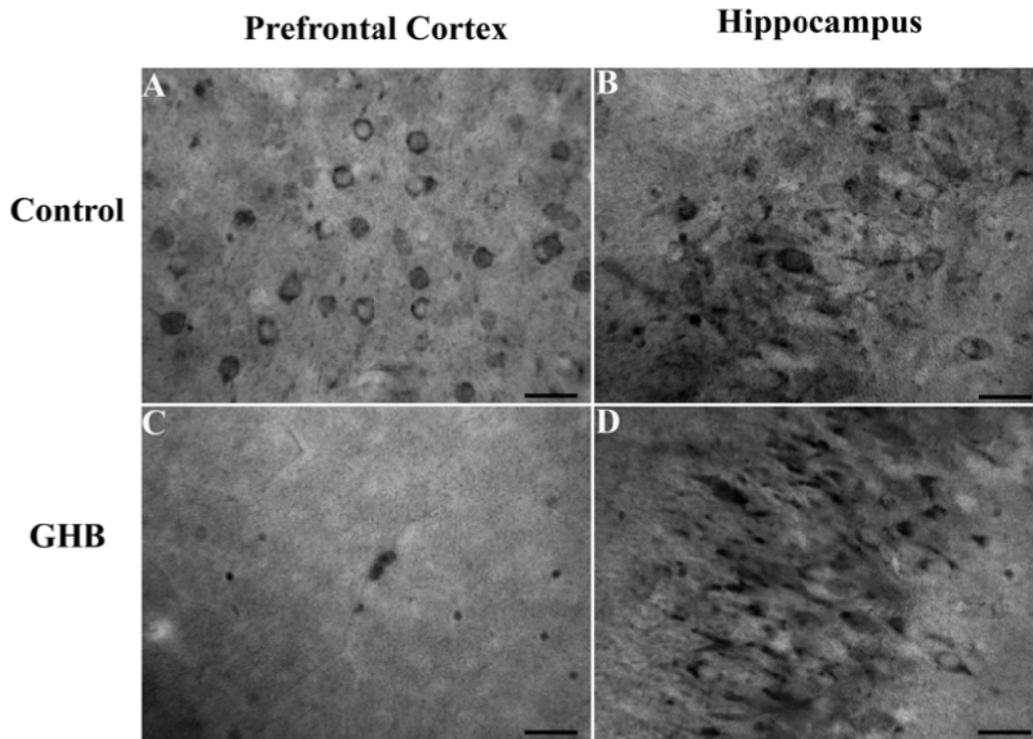
631

632 **Figure 6:** Representative photomicrographs illustrating the differences in the intensity of
 633 labeling of M4R neurons in the Prefrontal cortex or in the Hippocampus of controls and
 634 treated rats. Immunostaining experiments under the same conditions for both groups of rats.

635 (A) Controls in the prefrontal cortex: light staining compared to treated rats (C) which
 636 presented an increase in labeling, particularly at the synaptic endings. This difference
 637 phenomenon exists also in the Hippocampus and particularly in the polymorphic layer of the
 638 Hippocampus: (B) = control rats; (D) = treated rats.

639

640

Figure 7

642

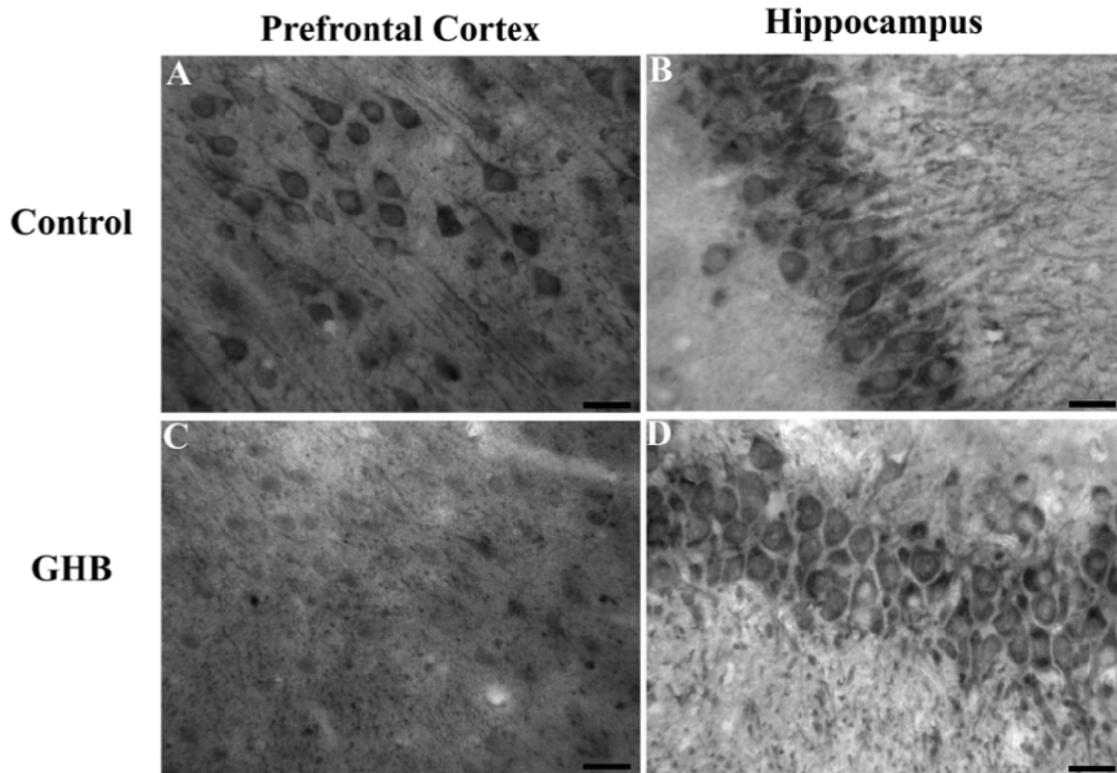
643

644 **Figure 7:** Representative photomicrographs illustrating the differences in the intensity of
 645 labeling of PRLR neurons in the Prefrontal cortex and in the Hippocampus of controls or
 646 treated rats. Same conditions as for the other figures..

647 The micrographs demonstrated difference between the two groups of rats only in the
 648 Prefrontal Cortex. (A): Controls in the prefrontal cortex presented a light labeling especially
 649 circumferentially around the neurons while in the Prefrontal cortex of treated rats (C), there
 650 was no labeling. This difference did not exist in the Hippocampus; the labeling of PRLR
 651 neurons was similar in control (B) and in treated rats (D).

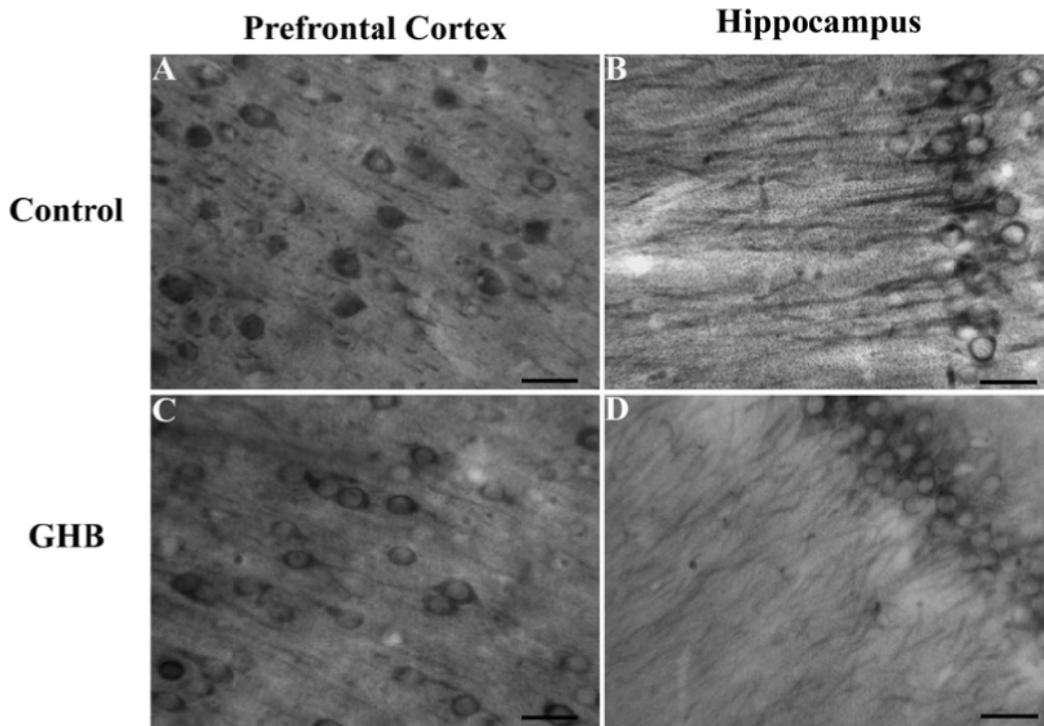
652

Figure 8



653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665

Figure 8: Representative photomicrographs illustrating the differences in the intensity of labeling of the GABA-A gamma 2 subunit in neurons of the Prefrontal cortex or in the Hippocampus of control versus treated rats. Immunostaining experiments were carried out in order to make quantitative comparisons of labeling intensity between the two groups of rats. A difference between the intensity of staining was seen only in the prefrontal cortex but not in the hippocampus. (A): Controls in the prefrontal cortex presented a very high staining as compared to treated rats (C) which showed a decrease in labeling with only ghost of neurons. In the Hippocampus, the labeling of GABA-A gamma 2 subunits was identical in control (B) and in treated rats (D).

Figure 9

667

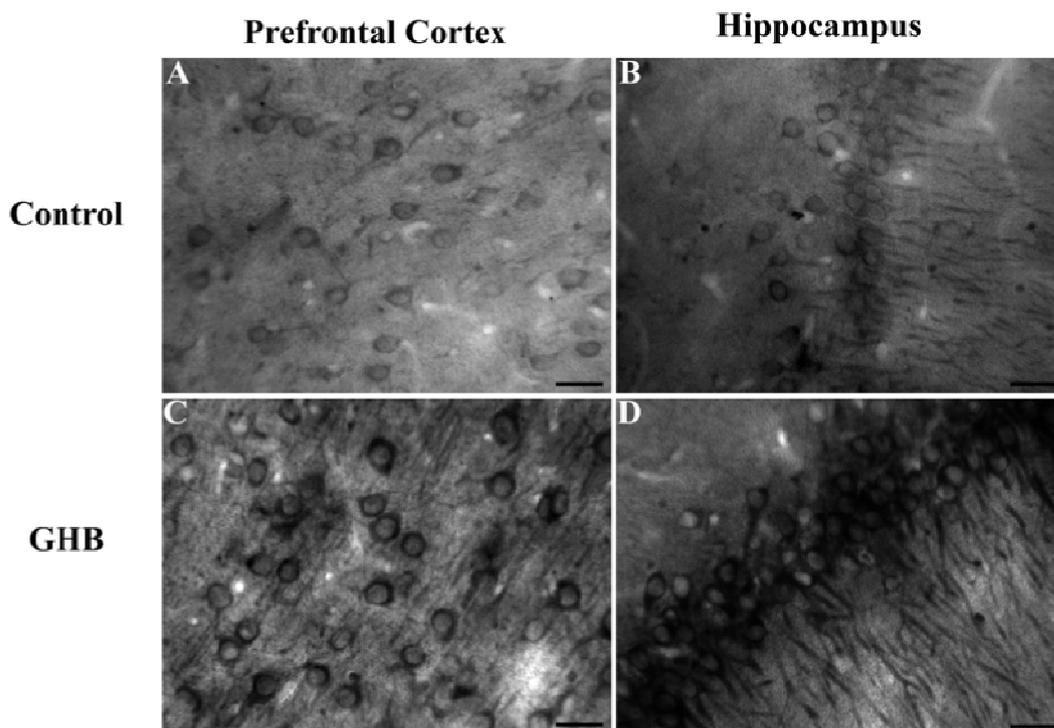
668

669 **Figure 9:** Representative photomicrographs illustrating the differences in the intensity of
 670 labeling of D3R neurons in the Prefrontal cortex and in the Hippocampus of controls versus
 671 treated rats. Same technical conditions as for the other immunocytochemical experiments.

672 Differences occurred only in the hippocampus but not in the prefrontal cortex. (B): Controls
 673 in the Hippocampus presented a very high staining while in tissue slices of treated rats (D), a
 674 decrease in labeling was seen and only ghost of neurons and processes were labeled. This
 675 difference did not exist in the Prefrontal Cortex; the labeling of D3R neurons was identical in
 676 control (A) and in treated animals (C).

677

678

Figure 10

680

681

682

683 **Figure 10:** Representative photomicrographs illustrating the differences in the intensity of
684 labeling of cFos in neurons of the Prefrontal cortex or Hippocampus in control or treated rats.
685 The immunostaining was made quantitative by using calibrated conditions of incubation.

686 The micrographs confirmed a difference in the expression of cfos protein between control and
687 treated rats. (A,B): Controls in hippocampus and prefrontal cortex and (C,D): high intensity of
688 labeling in both regions of animals treated with the drug.

689

690

691

TABLE 1-1: Genes whose expression were changed more than 3 fold in the hippocampus

<i>Gene Name</i>	<i>Symbol</i>	<i>Probe set ID</i>	<i>Gene Id</i>	<i>Chromosomal Location</i>	<i>SwissProt</i>	<i>RefSeq Transcript ID</i>	<i>Student -t-test</i>	<i>FC</i>
<u>Up regulated genes</u>								
Metabolic processing								
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1	1369560_at 1371363_at	<u>60666</u>	7q36	<u>Q35077</u>	<u>NM_022215</u>	0.00039 0.00181	4.62 1.84
Protein chaperone and protein interaction								
Heat shock 70kD protein 1A	Hspa1a	1368247_at	<u>24472</u> <u>294254</u>	20p12	<u>Q07439</u> <u>Q6LA95</u>	<u>NM_031971</u> <u>NM_212504</u>	3.2E-05	7.13
F-box protein 39	Fbxo39	1377129_at	<u>303287</u>	10q24	<u>Q66H10</u>	<u>NM_001039018</u> <u>XM_001080142</u> <u>XM_220647</u>	0.00311	3.87
Regulation of Transcription								
Jun-B oncogene	Jun b	1387788_at	<u>24517</u>	19q11	P24898	<u>NM_021836</u>	0.01933	4.35
Transcription elongation factor B (SIII). polypeptide 3	Tceb3	1368997_at	<u>25562</u>	5q36	<u>Q63187</u> <u>Q66HK4</u>	<u>NM_017103</u>	0.01172	3.05
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	cFos	1375043_at	<u>314322</u>	6q31	<u>P12841</u> <u>Q5G6W2</u> <u>Q5G6W3</u> <u>Q5U873</u> <u>Q5U874</u> <u>Q5U875</u> <u>Q63752</u> <u>Q9EQC2</u>	<u>NM_022197</u>	1.8E-05	5.51
Bromodomain containing 4	Brd4	1393567_at	<u>362844</u>	7q11	<u>Q497A6</u>	<u>XM_001065925</u> <u>XM_001066148</u> <u>XM_001077931</u> <u>XM_343175</u>	0.04656	3.74
Nuclear protein transport								
Transportin 1	Tnpol	1381364_at	<u>309126</u>	2q12		<u>XM_001070389</u> <u>XM_219500</u>	0.00095	12.26

<i>Down regulated genes</i>								
Ion transport								
Transmembrane channel-like gene family 4	Tmc4	1385436_at	<u>308310</u>	1q12	<u>Q496Z4</u>	<u>NM_001034104</u>	0.01018	-3.84
Control of signal transduction								
Mitogen-activated protein kinase 4	Mapk4	1378751_at	54268	18q12.2	Q63454	XM_001053505 XM_225726	0.00154	-3.70
Control of synaptic vesicles transport								
Rabphilin 3A-like (without C2 domains)	Rph3al	1387176_at	<u>171123</u>	10q24	<u>O54880</u>	<u>NM_133591</u>	0.03435	-3.99
Brain tissue developpment								
Alpha-2-HS-glycoprotein	Ahsg	1368161_a_a t	<u>25373</u>	11q23	<u>P24090</u> <u>Q01134</u> <u>Q7TP75</u>	<u>NM_012898</u>	0.01149	-3.22
Membrane protein								
Peroxisomal membrane protein 4	Pxmp4	1393421_at	<u>282634</u>	3q41	<u>P59382</u>	<u>NM_172223</u>	0.00374	-3.22

TABLE 1-2: Genes whose expression were changed more than 2 fold in the prefrontal cortex

Gene Name	Gene Symbol	Probe set ID	GeneBank Accession N°	Chromosomal Location	SwissProt EMBL-EBI	RefSeq Transcript ID NCBI	Student t-test	FC
<u>Up regulated genes</u>								
Control of signal transduction								
Serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	1367802_at	29517	1p12	<u>Q06226</u>	<u>NM_019232</u>	0.00032	2.11
Metabolic processing								
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1	1371360_at	<u>60666</u>	7q36	<u>Q35077</u>	<u>NM_022215</u>	0,00190	2,74
Neuronal growth and Structure								
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Gadd45b	1372016_at	<u>299626</u>	7q11	<u>Q5U3Z2</u>	<u>NM_001008321</u>	0.00235	2.28
Transcription regulation								
Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	1389538_at	25493	6q23	<u>Q63746</u>	<u>XM_001075778</u> <u>XM_343065</u>	0.0007693	2.57
Kruppel-like factor 10	Klf10	1368650_at	<u>81813</u>	7q22	<u>O08876</u> <u>P97848</u>	<u>NM_031135</u>	0.00027	2.19
Early growth response 2	Egr2	1387306_a_at 1398266_a_at	<u>114090</u>	20p11	<u>P51774</u> <u>Q9QYG4</u>	<u>NM_053633</u>	0.00809	2.42
Period homolog 1	Per1	1374855_at	<u>287422</u>	10q24	<u>Q498T1</u> <u>Q8CHI5</u>	<u>NM_001034125</u>	0.01247	2.77
Hairy and enhancer of split 1	Hes1	1387036_at	<u>29577</u>	11q22	<u>Q04666</u>	<u>NM_024360</u>	1.15E-05	2.37
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). delta	Cebpd	1387343_at	<u>25695</u>		<u>Q03484</u>	<u>NM_013154</u>	0.00413	2.21
<u>Down regulated genes</u>								
Control of inflammation								
Chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	1392172_at	<u>360579</u>	10q26	<u>Q5FVN3</u>	<u>NM_001012357</u>	0.02852	-2.80
Serine protease								
Kallikrein, submaxillary gland S3	Klks3	1370289_x_at	<u>292868</u>	1q22	<u>P07647</u> <u>P15950</u>	<u>NM_175759</u>	0.00730	-2.97
Glycan binding protein								
C-type lectin domain family 14, member a	Clec14a	1390782_at	<u>314148</u>	6q23	<u>Q642B4</u> C-type lectin	<u>NM_001014077</u>	0.01497	-2.69

Table 2: Genes specifically modified in both prefrontal cortex and Hippocampus.

Gene Name	Gene Symbol	Probe set ID	Prefrontal Cortex		Hippocampus	
			Student t-test	Fold change	Student t-test	Fold change
<u>Up regulated genes</u>						
Neuronal signaling						
Cholinergic receptor, muscarinic 4	Chrm4	1388191_at	0,00314	1,50	0,00723	1,60
Potassium channel tetramerisation domain containing 14	Kctd14_predicted	1395966_at	0,00561	1,50	0,01963	2,36
Homer homolog 1	Homer1	1370997_at	0,01252	1,60	0,00978	1,84
Serum/glucocorticoid regulated kinase	Sgk	1367802_at	0,00032	2,11	0,00012	2,27
Serine/threonine kinase 4	Stk4_predicted	1392231_at	0,01235	2,25	0,04529	1,59
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	Baiap2	1374117_at	0,00548	1,93	0,00903	2,01
Metabolic processing						
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1	1371363_at 1369560_at	0,00199 0,00190	1,74 2,74	0,00181 0,00039	1,84 4,62
Stress response						
Dual specificity phosphatase 1	Dusp1	1368147_at	0,03759	1,67	0,00092	2,10
Interleukin 6 receptor, alpha	Il6ra	1386987_at	0,00556	1,55	0,00146	1,51
Regulation of transcription						
DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	1368025_at	0,00011	1,77	0,00112	1,54
Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	1389538_at	0,00076	2,57	0,00035	1,97
Activating transcription factor 3	Atf3	1369268_at	0,03947	1,97	0,00042	1,93
Early growth response 2	Egr2	1387306_a_at	0,00809	2,42	0,00395	1,65
<u>Down regulated genes</u>						
Stress response						
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	Tnfrsf11b	1369407_at	0,0084	0,59	0,01241	-1,60

TABLE 3: Genes coding for receptors and ions channels which were up or down regulated in hippocampus after an acute therapeutic dose of GHB

Gene Name	Symbol	Probe set ID	Gene Id	Chromosomal Location	SwissProt	RefSeq Transcript ID	Student -t-test	FC
<i><u>Up regulated genes: Receptors and ions channels</u></i>								
Neuropeptide Y receptor Y2	Npy2r	1387613_at	66024	2q31	O70424 Q9ERC0	NM_023968	0.01997	1.82
Cholinergic receptor, muscarinic 4	Chrm4	1388191_at	<u>25111</u>	3q32-q35	<u>P08485</u>	<u>XM_001078223</u> <u>XM_345403</u>	0.00723	1.60
G protein-coupled receptor 26	Gpr26	1370744_at	<u>192153</u>		<u>Q9QXI3</u>		0.04447	1.54
Opioid receptor, kappa 1	Oprk1	1368197_at	<u>29335</u>	5q12	<u>P34975</u>	<u>NM_017167</u>	0.03685	1.52
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	Kcnj2	1368793_at	<u>29712</u>	10q32.1	<u>Q64273</u>	<u>NM_017296</u>	0.01365	1.62
Potassium channel tetramerisation domain containing 14	Kctd14_predicted	1395966_at	<u>308836</u>	1q32		<u>XM_001064247</u> <u>XM_218935</u>	0.01963	2.36
<i><u>Down regulated genes: receptors and ions channels</u></i>								
Adrenergic receptor, beta 3	Adrb3	1368780_at	<u>25645</u>	16q12.3	<u>P26255</u>	<u>NM_013108</u>	0.02913	-1.75
G-protein coupled receptor 12	Gpcr12	1368786_at	<u>80840</u>	12p11	<u>P30951</u>	<u>NM_001037295</u> <u>NM_030831</u>	0.01846	-1.81
Dopamine receptor D3	Drd3	1387733_at	<u>29238</u>	11q21	<u>P19020</u>	<u>NM_017140</u>	0.01688	-2.12
Androgen receptor	Ar	1369159_at	<u>24208</u>	Xq22-q32	<u>P15207</u>	<u>NM_012502</u>	0.03273	-1.56
Olfactory receptor 1078	Olr1078	1370753_at	<u>299593</u>		<u>P23265</u>	<u>NM_207597</u>	0.00375	-1.61
Angiotensin II receptor, type 2	Agtr2	1369711_at	<u>24182</u>	Xq34		<u>NM_012494</u>	0.04679	-1.61
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	Kcnj3	1388292_at	<u>50599</u>		<u>O08869I</u> <u>O08871</u> <u>O08955</u> <u>P63251</u>	<u>NM_031610</u>	0.00206	-1.58

Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	Kcnj11	1369782_a_a t	<u>83535</u>	1q22	<u>P70673</u>	<u>NM_031358</u>	0.03051	-1.58
SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2	Spsb2	1373742_at	297592	4q42	<u>Q5M877</u>	NM_001009660	0.04077	-2.27
Transmembrane channel-like gene family 4	Tmc4	1385436_at	<u>308310</u>	1q12	<u>Q496Z4</u>	<u>NM_001034104</u>	0.01018	-3.84
Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3	Hcn3	1369416_at	<u>114245</u>	2q34	Q9JKA8 Q9QZW5	<u>NM_053685</u>	0.01320	-2.31
Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 2	Slc9a2	1368599_at	<u>24783</u>	9q21	P48763	<u>NM_012653</u>	0.04041	-1.53

TABLE 4: Genes coding for receptors and ions channels which were up or down regulated in prefrontal cortex after an acute therapeutic dose of GHB

Gene Name	Gene Symbol	Probe set ID	GeneBank Accession N°	Chromosomal Location	SwissProt EMBL-EBI	RefSeq Transcript ID NCBI	Student t-test	FC
<i><u>Up regulated genes: receptors and ions channels</u></i>								
Cholinergic receptor. muscarinic 4	Chrm4	1388191_at	<u>25111</u>	3q32-q35	<u>P08485</u>	XM_001078223 XM_345403	0.00314	1.50
Vasoactive intestinal peptide receptor 1	Vipr1	1383695_at	<u>24875</u>		<u>P30083</u>	NM_012685	0.00049	1.60
Prostaglandin E receptor 1	Ptger1	1375803_at	<u>25637</u>	19q11	<u>P70597</u>	<u>NM_013100</u>	0.00630	1.55
ATPase. H ⁺ /K ⁺ exchanging. beta polypeptide	Atp4b	1387331_at	<u>24217</u>	16q12.5	<u>P18598</u>	<u>NM_012510</u>	0.00011	1.590
Potassium channel tetramerisation domain containing 14	Kctd14_predicted	1395966_at	308836	1q32		<u>XM_001064247</u> <u>XM_218935</u>	0.00561	1.50
<i><u>Down regulated genes: receptors and ions channels</u></i>								
Gamma-aminobutyric acid A receptor, gamma 2	Gabrg2	1391653_at	29709	10q21	P18508 Q562A9 Q6PW52	NM_183327	0.0056	-1.50
Prolactin receptor	Prlr	1370789_a_at	24684	2q16	P05710 Q01472 Q58DZ7	NM_001034111 NM_012630	0.0182	-1.61
G protein-coupled receptor 110	Gpr110_predicted	1389768_at	<u>301266</u>	9q12		<u>XM_001068873</u> <u>XM_217359</u>	0.02108	-1.81
Solute carrier family 39 (zinc transporter). member 1	Slc40a1	1376972_at	<u>170840</u>	9q22	<u>Q923U9</u>	<u>NM_133315</u>	0.04651	-1.67

References

- Adelsberger H, Brunswieck S and Dudel J (1998) Modulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on a GABA(A) receptor from crayfish muscle. *Eur J Pharmacol* **350**:317-323.
- Andriamampandry C, Taleb O, Kemmel V, Humbert JP, Aunis D and Maitre M (2007) Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J* **21**:885-895.
- Andriamampandry C, Taleb O, Viry S, Muller C, Humbert JP, Gobaille S, Aunis D and Maitre M (2003) Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB). *FASEB J* **17**:1691-1693.
- Banerjee PK, Tillakaratne NJ, Brailowsky S, Olsen RW, Tobin AJ and Snead OC, 3rd (1998) Alterations in GABAA receptor alpha 1 and alpha 4 subunit mRNA levels in thalamic relay nuclei following absence-like seizures in rats. *Exp Neurol* **154**:213-223.
- Benavides J, Rumigny JF, Bourguignon JJ, Cash C, Wermuth CG, Mandel P, Vincendon G and Maitre M (1982) High affinity binding sites for gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci* **30**:953-961.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N and Golani I (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**:279-284.
- Brancucci A, Berretta N, Mercuri NB and Francesconi W (2004) Presynaptic modulation of spontaneous inhibitory postsynaptic currents by gamma-hydroxybutyrate in the substantia nigra pars compacta. *Neuropsychopharmacology* **29**:537-543.
- Cammalleri M, Brancucci A, Berton F, Loche A, Gessa GL and Francesconi W (2002) Gamma-hydroxybutyrate reduces GABA(A)-mediated inhibitory postsynaptic potentials in the CA1 region of hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **27**:960-969.
- Cash CD, Gobaille S, Kemmel V, Andriamampandry C and Maitre M (1999) Gamma-hydroxybutyrate receptor function studied by the modulation of nitric oxide synthase activity in rat frontal cortex punches. *Biochem Pharmacol* **58**:1815-1819.
- Castelli MP, Mocci I, Langlois X, Gommerendagger W, Luyten WH, Leysen JE and Gessa GL (2000) Quantitative autoradiographic distribution of gamma-hydroxybutyric acid binding sites in human and monkey brain. *Brain Res Mol Brain Res* **78**:91-99.
- Charles CH, Sun H, Lau LF and Tonks NK (1993) The growth factor-inducible immediate-early gene 3CH134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5292-5296.
- Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R and Gessa GL (1998) Involvement of GABA(A) and GABA(B) receptors in the mediation of discriminative stimulus effects of gamma-hydroxybutyric acid. *Physiol Behav* **64**:293-302.
- Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T and Ozato K (2003) The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8758-8763.
- Diana M, Mereu G, Mura A, Fadda F, Passino N and Gessa G (1991) Low doses of gamma-hydroxybutyric acid stimulate the firing rate of dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res* **566**:208-211.
- Follesa P, Mancuso L, Biggio F, Mostallino MC, Manca A, Mascia MP, Busonero F, Talani G, Sanna E and Biggio G (2003) Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* **63**:896-907.
- Gabor R, Regunathan S and Sourkes TL (1989) Central regulation of adrenal tyrosine hydroxylase: interaction between dopamine and GABA systems. *Neuropharmacology* **28**:521-527.
- Garcia FB, Pedraza C and Navarro JF (2006) [Update on gamma-hydroxybutyric acid]. *Rev Neurol* **43**:39-48.

- Ghorbel MT, Becker KG and Henley JM (2005) Profile of changes in gene expression in cultured hippocampal neurones evoked by the GABAB receptor agonist baclofen. *Physiol Genomics* **22**:93-98.
- Gobaille S, Hechler V, Andriamampandry C, Kemmel V and Maitre M (1999) gamma-Hydroxybutyrate modulates synthesis and extracellular concentration of gamma-aminobutyric acid in discrete rat brain regions in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:303-309.
- Gobaille S, Schmidt C, Cupo A, Herbrecht F and Maitre M (1994) Characterization of methionine-enkephalin release in the rat striatum by in vivo dialysis: effects of gamma-hydroxybutyrate on cellular and extracellular methionine-enkephalin levels. *Neuroscience* **60**:637-648.
- Goodwin AK, Froestl W and Weerts EM (2005) Involvement of gamma-hydroxybutyrate (GHB) and GABA-B receptors in the acute behavioral effects of GHB in baboons. *Psychopharmacology (Berl)* **180**:342-351.
- Hechler V, Gobaille S and Maitre M (1992) Selective distribution pattern of gamma-hydroxybutyrate receptors in the rat forebrain and midbrain as revealed by quantitative autoradiography. *Brain Res* **572**:345-348.
- Hwang K, Jeong DW, Lee JW, Kim IH, Chang HI, Kim HJ and Kim IY (1999) Alteration of the NAD⁺/NADH ratio in CHO cells by stable transfection with human cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase: resistance to oxidative stress. *Mol Cells* **9**:429-435.
- Imperato A, Dazzi L, Carta G, Colombo G and Biggio G (1998) Rapid increase in basal acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats induced by withdrawal from long-term ethanol intoxication. *Brain Res* **784**:347-350.
- Irizarry R GL, Cope L (2002) An R package for analyses of affymetrix oligonucleotide arrays. In: *The analysis of Gene Expression Data: . Methods and Software* edited by **Parmigiani G, Garrett ES, Irizarry RA, Zeger SL**, New York: Springer.
- Kamei Y, Yuba S, Nakayama T and Yoneda Y (1999) Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* **47**:363-372.
- Kaupmann K, Cryan JF, Wellendorph P, Mombereau C, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, van der Putten H, Mosbacher J, Brauner-Osborne H, Waldmeier P and Bettler B (2003) Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice. *Eur J Neurosci* **18**:2722-2730.
- Kemmel V, Taleb O, Andriamampandry C, Aunis D and Maitre M (2003) Gamma-hydroxybutyrate receptor function determined by stimulation of rubidium and calcium movements from NCB-20 neurons. *Neuroscience* **116**:1021-1031.
- Li C and Wong WH (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:31-36.
- Lingenhoehl K, Brom R, Heid J, Beck P, Froestl W, Kaupmann K, Bettler B and Mosbacher J (1999) Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology* **38**:1667-1673.
- Maitre M (1997) The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* **51**:337-361.
- McGregor IS, Callaghan PD and Hunt GE (2008) From ultrasocial to antisocial: a role for oxytocin in the acute reinforcing effects and long-term adverse consequences of drug use? *Br J Pharmacol* **154**:358-368.
- Muller C, Viry S, Miehe M, Andriamampandry C, Aunis D and Maitre M (2002) Evidence for a gamma-hydroxybutyrate (GHB) uptake by rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* **80**:899-904.
- Pardi D and Black J (2006) gamma-Hydroxybutyrate/sodium oxybate: neurobiology, and impact on sleep and wakefulness. *CNS Drugs* **20**:993-1018.
- Paxinos G WC (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press., New York.

- Ren X and Mody I (2006) gamma-Hydroxybutyrate induces cyclic AMP-responsive element-binding protein phosphorylation in mouse hippocampus: an involvement of GABA(B) receptors and cAMP-dependent protein kinase activation. *Neuroscience* **141**:269-275.
- Scharf MB (2006) Sodium oxybate for narcolepsy. *Expert Rev Neurother* **6**:1139-1146.
- Schmidt-Mutter C, Gobaille S, Muller C and Maitre M (1999) Prodynorphin and proenkephalin mRNAs are increased in rat brain after acute and chronic administration of gamma-hydroxybutyrate. *Neurosci Lett* **262**:65-68.
- Sethy VH, Roth RH, Walters JR, Marini J and Van Woert MH (1976) Effect of anesthetic doses of gamma-hydroxybutyrate on the acetylcholine content of rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **295**:9-14.
- Shiratsuchi T, Nishimori H, Ichise H, Nakamura Y and Tokino T (1997) Cloning and characterization of BAI2 and BAI3, novel genes homologous to brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). *Cytogenet Cell Genet* **79**:103-108.
- Snead OC, 3rd and Nichols AC (1987) gamma-Hydroxybutyric acid binding sites: evidence for coupling to a chloride anion channel. *Neuropharmacology* **26**:1519-1523.
- Teng CH, Huang WN and Meng TC (2007) Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress. *J Biol Chem* **282**:28395-28407.
- Tsai KJ, Chen SK, Ma YL, Hsu WL and Lee EH (2002) *sgk*, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3990-3995.
- Van Cauter E, Latta F, Nedeltcheva A, Spiegel K, Leproult R, Vandenbril C, Weiss R, Mockel J, Legros JJ and Copinschi G (2004) Reciprocal interactions between the GH axis and sleep. *Growth Horm IGF Res* **14 Suppl A**:S10-17.
- van Nieuwenhuijzen PS, McGregor IS and Hunt GE (2009) The distribution of gamma-hydroxybutyrate-induced Fos expression in rat brain: Comparison with baclofen. *Neuroscience* **158**:441-455.
- Vayer P, Mandel P and Maitre M (1987) Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci* **41**:1547-1557.
- Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC and Firestone GL (1993) Characterization of *sgk*, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* **13**:2031-2040.
- Wong CG, Gibson KM and Snead OC, 3rd (2004) From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid. *Trends Pharmacol Sci* **25**:29-34.

2) Modifications de l'expression de certaines métalloprotéinases sous l'effet du GHB

Parmi les résultats obtenus lors de l'analyse des expériences de microarrays, nous avons constaté que des gènes impliqués dans l'expression de divers types de protéases faisaient partie des gènes dont l'expression est modifiée.

Ainsi, nous avons constaté que le gène codant pour la néprilysine (Mme) présentait une augmentation d'activité de 1,95 fois dans l'hippocampe chez les rats traités par rapport aux rats témoins. La néprilysine, et d'autres membres de la famille des métalloprotéases, sont connus pour intervenir dans les processus neuroinflammatoires de divers types de neurodégénérescence (Marr et al., 2004). Des études ont ainsi démontré que la néprilysine (Iwata et al., 2005; Iwata et al., 2004; Iwata et al., 2001; Leissring et al., 2003a) possédait la capacité de digérer et d'éliminer les peptides A β (Leissring et al., 2003b; Marr et al., 2004; Marr et al., 2003; Mohajeri et al., 2002). La néprilysine est même considérée comme primordiale dans ce processus de dégradation (Carson and Turner, 2002; Johnson et al., 2009; Mohajeri et al., 2002).

Ce résultat nous a conduit à avancer l'hypothèse d'un rôle du GHB à doses thérapeutiques dans l'élimination de peptides/protéines délétères du cerveau qui s'accumulent dans certaines protéinopathies et plus particulièrement nous a amené à tester l'action du GHB sur la formation des plaques β amyloïdes intervenant dans les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

C. Peut-on modifier l'accumulation de certaines protéines toxiques par le GHB à doses thérapeutiques ?

1) Etat de la question : protéinopathies et maladie d'Alzheimer

Le phénotype des maladies neurodégénératives (Bard et al., 2000; Schenk et al., 1999; Selkoe, 2001; Weiner et al., 2000) est défini par la distribution des modifications cellulaires qui à leurs tours dépendent de la vulnérabilité à des anomalies spécifiques du métabolisme protéique. Ces anomalies entraînent le dépôt de protéines anormales et toxiques dans le

cerveau qui finit par entraîner la mort neuronale. Généralement, les maladies dégénératives du cerveau (maladie de Parkinson, sclérose latérale amyotrophique, chorée de Huntington, maladie d'Alzheimer) comportent des dépôts de protéines anormales, dans certaines régions du cerveau.

a) La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la pathologie cognitive et la pathologie neurodégénérative la plus fréquente, elle entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales (mémoire, apprentissage et raisonnement) (Selkoe, 2001). C'est la principale cause de démence chez les personnes âgées, et touche environ 24 millions de personnes à travers le monde (Ferri et al., 2005), mais elle est aussi très souvent associée à d'autres pathologies du système nerveux central (lésions vasculaires, maladie de Parkinson, ...) (Schneider et al., 2007).

Les causes exactes sont encore inconnues, mais on suppose que des facteurs environnementaux et génétiques y contribuent. En fait, la compréhension actuelle de la maladie est largement basée sur des descriptions anatomiques et histologiques qui datent du début du 20^{ème} siècle. L'existence de dépôts extracellulaires et d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires formants des agrégats protéiques appelés « plaques séniles » sont considérés comme les lésions spécifiques de la maladie (Hsiao et al., 1996). Ces plaques amyloïdes sont constituées essentiellement de peptides A β (Bard et al., 2000; Schenk et al., 1999; Selkoe, 2001; Weiner et al., 2000) et de protéine Tau (Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe, 2001) qui prédominent classiquement dans le cortex entorrhinal, l'hippocampe et les aires corticales d'association. Parallèlement, d'un point de vue anatomique, il existe une atrophie cérébrale surtout marquée dans ces mêmes régions. Cette atrophie est faite d'une perte neuronale et synaptique et d'une gliose réactionnelle importante (Iwatsubo et al., 1994). Les anomalies cellulaires et cliniques (démence) semblent être dues à la fois aux enchevêtrements neurofibrillaires, à la réaction gliale et à la densité des plaques amyloïdes (Figure 16).

Actuellement, compte tenu du fait que les stratégies médicamenteuses utilisées sont purement symptomatiques, les recherches s'orientent vers des modulateurs de la formation et de la

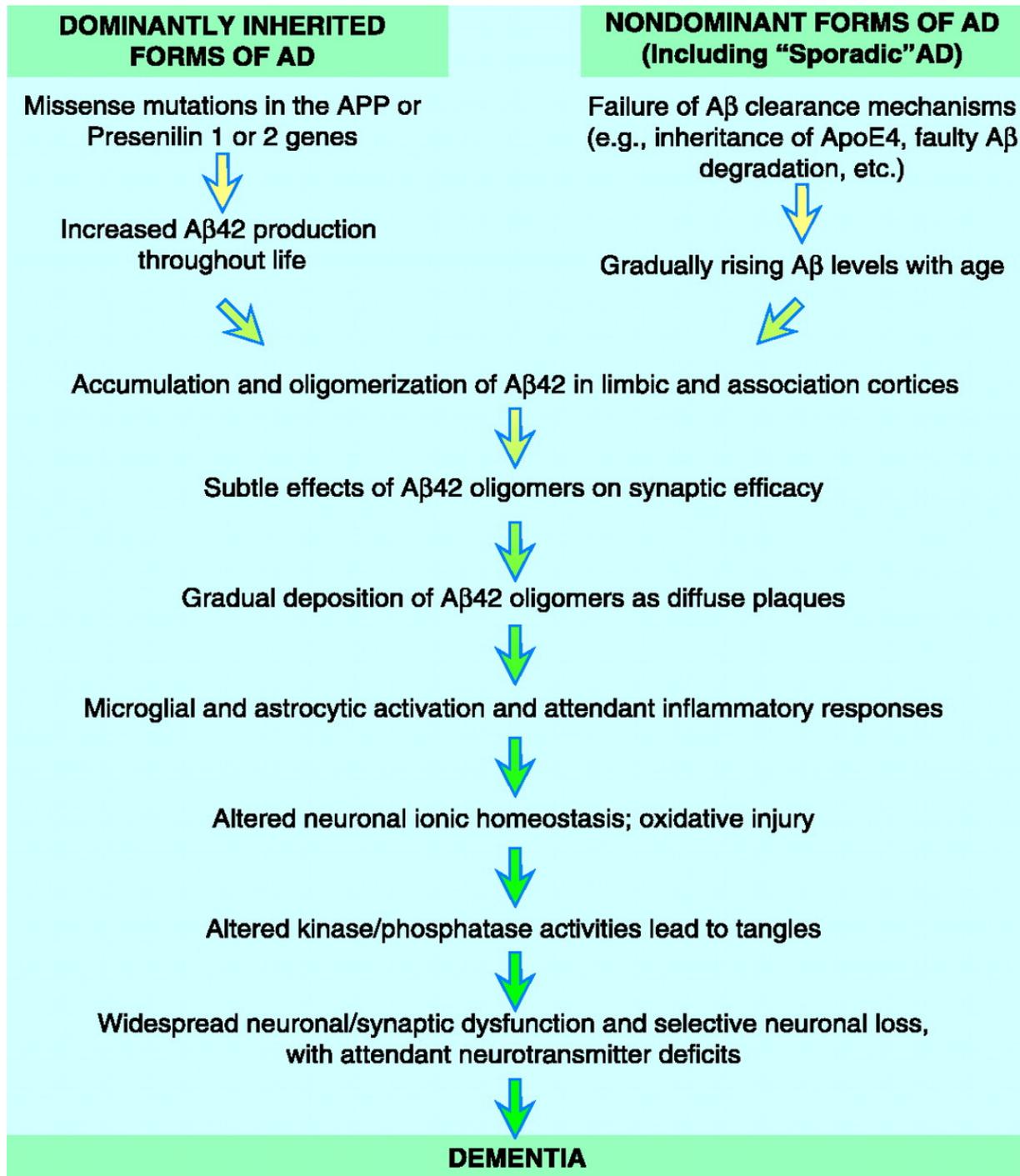


Figure 16 : *Déroulement hypothétique des étapes du développement de la pathologie de la Maladie d'Alzheimer basé sur les résultats disponibles actuellement. A β -42 est le fragment de 42 acides aminés du peptide A β . (Selkoe, 2002)*

protéolyse du peptide A β (Dodel et al., 2003; Gelinas et al., 2004; Leissring et al., 2003b; Schenk, 2002) ou des anti- γ secrétases (Behr, 2008; Peretto and La Porta, 2008)

b) Les mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer

Il existe deux niveaux de mécanismes : intra- et extracellulaires. Dans ces deux compartiments, on observe une accumulation de protéines entraînant un dysfonctionnement cellulaire.

Dans les neurones, les protéines Tau permettent la stabilisation des microtubules via des phosphorylations et des glycosylations qui modifient l'affinité de Tau pour les microtubules. Cette association/dissociation module le transport axonal (Mandelkow et al., 2007). Mais chez un sujet atteint de la maladie d'Alzheimer (Iwatsubo et al., 1994; Selkoe, 2001), le processus de phosphorylation-déphosphorylation des protéines Tau est altéré. Ces protéines Tau s'accumulent dans le cytosol cellulaire, ce qui accroît la possibilité d'anomalies de conformation et la survenue d'agrégats (Hernandez and Avila, 2007) qui, s'ils deviennent trop importantes, vont bloquer le fonctionnement du neurone et empêcher le transport axonal. Les causes les plus fréquentes de ces anomalies sont des mutations dans la structure de la protéine Tau, mais des causes accessoires sont fréquemment citées (toxicité du peptide β amyloïde, stress oxydatif, inflammation).

Dans le milieu extracellulaire, la protéine en cause est le peptide β amyloïde, le plus souvent composé de 42 acides aminés. En temps normal, une protéine membranaire, l'Amyloïd precursor protein (APP) est protéolysée par des protéases appelées secrétases (Figures 17 et 18). L'APP est clivée par l' α secrétase et la β secrétase libérant dans l'espace extracellulaire deux fragments solubles (respectivement α et β APP). Par la suite, la γ secrétase clive le fragment C terminal restant. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Selkoe, 2001), cette dégradation n'est pas totale et un fragment, appelé β -amyloïde (A β), sous la forme d'un fragment de 40 ou de 42 acides aminés, se forme (Iwatsubo, 1998; Iwatsubo et al., 1994; Iwatsubo et al., 1995; Selkoe, 2001).

Ce fragment est toxique pour les neurones sous ces deux formes, mais la forme 42 acides aminés est plus hydrophobe et s'agrège plus facilement en amas insolubles (plaques

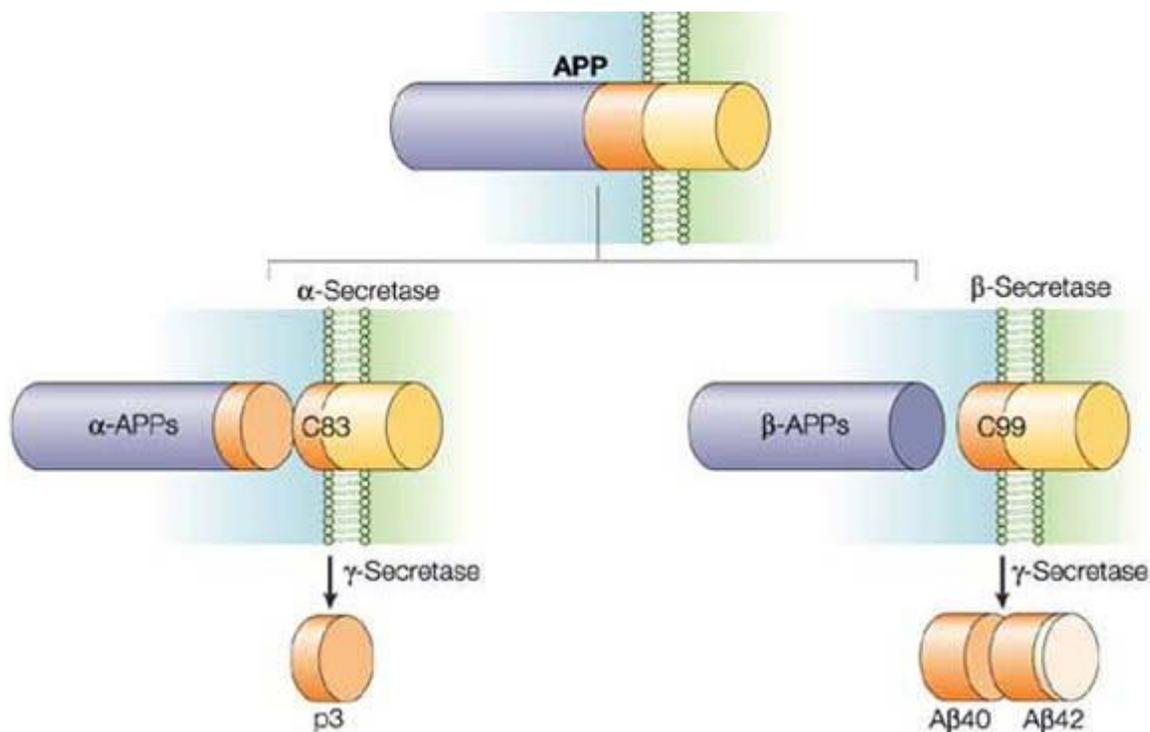


Figure 17 : Protéolyse de l'APP par des sécrétases aboutissant à la libération de 3 fragments. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer la protéolyse n'est pas complète et il y a apparition du peptide Aβ (40 ou 42 acides aminés) qui va s'agréger et former les plaques séniles. (figure de Nature Review Neurosciences)

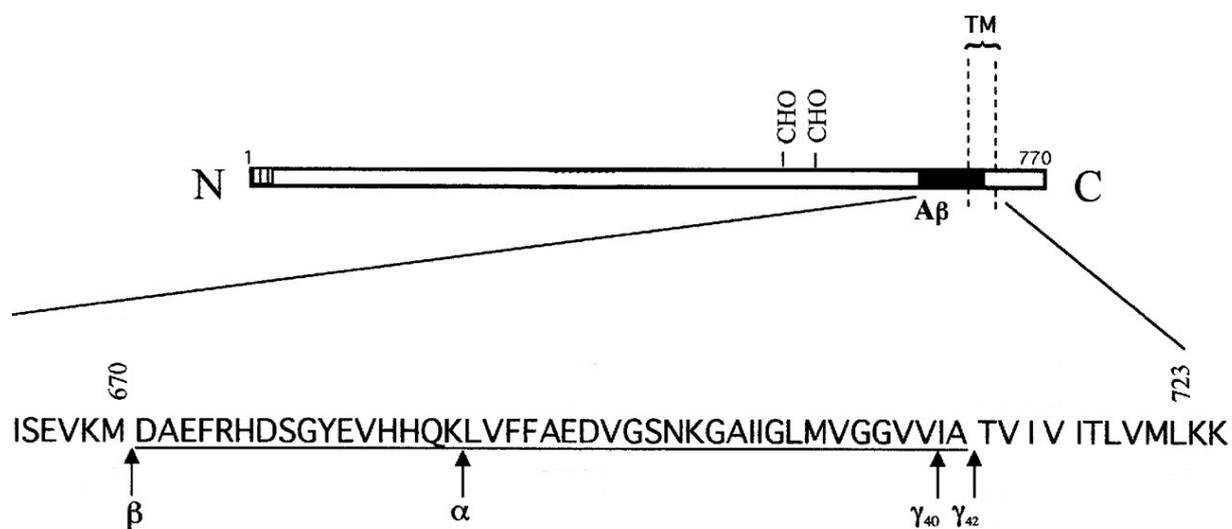


Figure 18 : Protéine APP avec localisation de la région transmembranaire. Agrandissement de la séquence qui contient la séquence des peptides Aβ ainsi que les sites de protéolyses par les sécrétases. Les résidus sous-lignés constituent la séquence du peptide Aβ1–42. (Selkoe and Podlisny, 2002)

amyloïdes) formant des oligomères sous forme de protofibrilles et de fibrilles. En s'accumulant dans le milieu extracellulaire, ces fibrilles qui comportent une large proportion de conformation en feuillets β résistant à la protéolyse et à la solubilisation, entraînent la mort neuronale (Lambert et al., 1998; Pike et al., 1993), une réaction inflammatoire et une gliose réactionnelle (Finder and Glockshuber, 2007; Zhang and Xu, 2007).

En outre, les plaques séniles vont libérer du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui va dégrader les membranes cellulaire et nucléaire, lésant l'ADN des neurones sensibles aux agressions externes et entraînant ainsi la destruction de la.

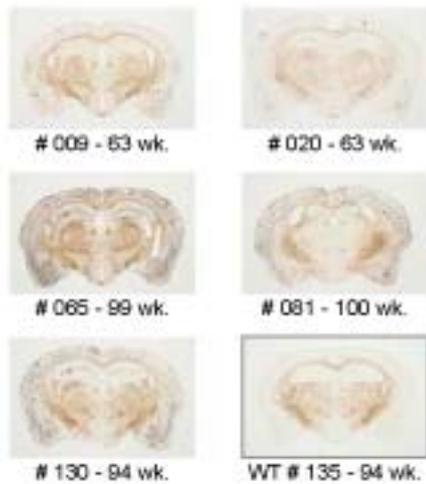
c) Les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer

Les modèles animaux sont fondamentaux pour la compréhension à la fois de la physiopathologie de la maladie et pour l'identification des cibles moléculaires pour des médicaments spécifiques.

Divers modèles ont été développés aussi bien chez la drosophile (Iijima and Iijima-Ando, 2008), que chez le vers *C. elegans* et chez les souris, ce dernier modèle étant le plus couramment utilisé. Parmi ces souris transgéniques certaines possèdent un gène codant muté (comme par exemple le gène de la protéine Tau (Gotz et al., 2001; Pennanen et al., 2004) ou de la protéine APP (Hsiao et al., 1996; Stalder et al., 2001; Sturchler-Pierrat et al., 1997)), d'autres en possèdent deux (Lewis et al., 2001), voir trois (Boutajangout et al., 2004).

Dans nos expériences nous avons utilisé des souris APPSWE (Amyloid precursor protein Swedish) (Leissring et al., 2003a) possédants un gène codant pour la protéine APP mutée (Hsiao et al., 1996; Wong et al., 2002). Les souris APPSWE (B6, SJL-Tg (APPSWE) 2576 Kha, Taconic Europe, Danemark) possèdent un transgène codant pour les 695 acides aminés de la protéine précurseur du peptide β -amyloïde humain des maladies d'Alzheimer de type protéique présentant une double mutation au niveau du site de clivage de la β secrétase. Elles expriment de fortes concentrations de peptides $A\beta$, qui s'accumulent avec l'âge de l'animal, en parallèle avec le développement des dépôts amyloïdes, en particulier dans le

A



B



C

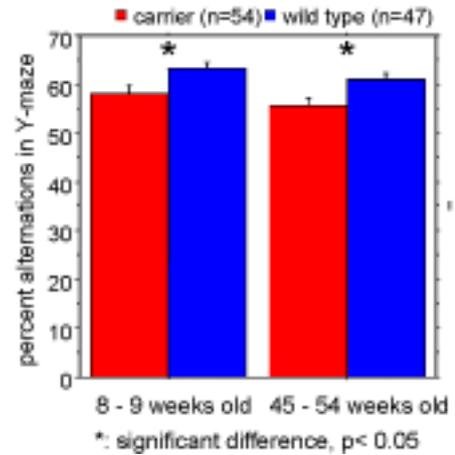


Figure 19 :

A. Les souris transgéniques APP-SWE développent des plaques β amyloïdes à partir de l'âge d'un an, elles possèdent déjà un fort taux de plaque à 22 mois. Les souris sauvages (WT) ne montrent pas de plaques.

B. Comme le montre les photos de l'hippocampe et des amygdales, les populations de plaques sont composées de plaques immatures (en noir) et de plaques matures (en orange).

C. Les animaux ayant une mémoire de travail intact ont tendance à explorer de nouvelles parties de leur environnement plutôt que de retourner dans les endroits connus. Dans le test en Y, la différence entre souris sauvages et souris APP-SWE est faible mais significative et ne dépend pas de l'âge.

(copyright TACONIC)

cortex et l'hippocampe (Figure 19). A côté de ces altérations les souris APPSWE Tg2576 possèdent une hyperactivité et une tendance à l'exploration des espaces ouverts. Ces symptômes cliniques rappellent les désinhibitions observées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Chez les souris transgéniques APPSWE, le développement de la maladie ne se déroule pas obligatoirement de la même façon que chez l'homme, mais ce modèle permet de documenter le rôle des plaques amyloïdes dans l'apparition et l'évolution de la maladie.

2) Le Gamma-hydroxybutyrate (GHB) possède-t-il un effet sur l'élimination des peptides A β ?

Nos expériences précédentes, visant à mettre en évidence la modulation de l'expression de certains gènes sous l'effet d'une dose massive aiguë de GHB ont permis de mettre en évidence une augmentation rapide de l'expression du gène de la néprilysine chez le rat et la souris. Ces résultats ont été confirmés sur l'hippocampe par des expériences complémentaires utilisant la PCR quantitative pour tester l'expression du gène et par des dosages de l'activité enzymatique. En utilisant ces techniques, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène de la néprilysine avec un maximum atteint au bout de 30 minutes (augmentation de 300 % par rapport au temps 0). Par ailleurs, l'activité néprilysine augmente d'environ 170 % par rapport au temps 0. L'augmentation de l'activité enzymatique apparaît environ 30 à 60 minutes après l'augmentation des messagers. La détermination de l'activité néprilysine a été confirmée par une quantification de la protéine par Western blot.

Nous avons alors cherché à comprendre le rôle de ces modifications sur l'accumulation des peptides A β dans l'hippocampe de souris femelles mutées APPSWE après administration chronique de GHB, par rapport à des souris APPSWE ne recevant pas de GHB. Pour ce faire nous avons traité pendant 5 semaines des souris APPSWE âgées de 5 mois en début de traitement par du GHB placé dans l'eau de boisson des animaux traités comparés aux contrôles ne recevant que de l'eau. Après 5 semaines de traitements, des expériences quantitatives de western blot et d'immunocytochimie ont été réalisées sur l'hippocampe.

L'étude de la densité des peptides A β par immunocytochimie montre une diminution d'environ 2 fois de ces derniers dans l'hippocampe des souris traitées par rapport aux souris

contrôles. Les expériences de western blot montrent que cette diminution concerne aussi bien les peptides A β 1-40, que les peptides A β 1-42, avec cependant une diminution plus importante pour les peptides A β 1-40 (environ 30 % contre environ 20 %). Ces résultats montrent que l'administration per os de GHB à dose pharmacologique réduit l'accumulation des peptides A β dans l'hippocampe, ce qui peut probablement prévenir la formation des plaques séniles.

Pour compléter les résultats obtenus dans l'hippocampe, nous avons comparé la distribution quantitative de la néprilysine et des peptides A β par microscopie confocale chez des souris APPSWE traitées per os par une dose thérapeutique de GHB et des souris témoins ne recevant pas de GHB. Les résultats montrent une augmentation de la présence de la néprilysine et une diminution des peptides A β .

Nous pouvons avancer l'hypothèse que le traitement chronique à doses thérapeutiques de GHB des souris APPSWE réduit la présence de peptides A β dans l'hippocampe des souris traitées. La raison de ce phénomène est très probablement l'induction de l'expression de la néprilysine par le GHB.

Des études comportementales sur les souris APPSWE, dans les mêmes conditions expérimentales, ne montrent pas d'amélioration mnésique ou cognitive significative des souris traitées par rapport aux souris témoins, ce qui est probablement dû au fait que ces souris, âgées de 5 mois environ, sont encore trop jeunes pour développer des anomalies comportementales détectables par les tests usuels. Le traitement des souris a cependant été fait à cet âge précoce car les plaques amyloïdes et les lésions irréversibles typiques de la maladie d'Alzheimer nécessitent plusieurs mois pour se mettre en place. Il est donc intéressant de traiter les souris précocement pour éviter la mise en place de lésions irréversibles à long terme.

Nos résultats suggèrent donc, que les doses thérapeutiques de GHB habituellement utilisées pour traiter les troubles du sommeil ou pour l'induire, potentialisent l'expression des gènes codant pour certaines métalloprotéases (et plus particulièrement celui de la néprilysine), ce qui contribue à la dégradation des peptides A β chez les souris transgéniques.

Publication 3 :

γ -Hydroxybutyrate (GHB) regulates brain amyloid β peptides through modulation of proteolytic degradation

Christian Klein, Véronique Kemmel, Chantal Mathis, Laurence Meyer, Omar Taleb, Dominique Aunis, Ayikoe G. Mensah-Nyagan et Michel Maitre

Manuscrit soumis

La diminution chronique des peptides A β dans le cerveau est une approche thérapeutique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer mais pour l'instant aucun traitement n'a obtenu de validation clinique. *In vivo*, certaines protéases, incluant la néprilysine, possèdent la capacité de digérer et d'éliminer les peptides A β et des résultats expérimentaux suggèrent qu'elles pourraient avoir un rôle dans les mécanismes de réduction de la concentration de peptides A β cérébraux dans la maladie d'Alzheimer.

L'objectif de cette étude a été de démontrer que l'administration per os de GHB à des souris transgéniques APP augmentait l'expression du gène de la néprilysine. Cette augmentation a été démontrée par des expériences de microarrays et de PCR quantitative.

Ces résultats indiquent que le GHB pourrait avoir un rôle dans le renouvellement d'A β et que l'administration chronique de GHB dans des cas pré-symptomatiques ou de maladie d'Alzheimer établie pourrait être une approche préventive ou thérapeutique pour cette maladie chez l'homme. Ces effets pourraient facilement et rapidement être testés car le GHB possède plusieurs indications cliniques chez l'homme. De plus, la modification de l'expression des gènes de la néprilysine par des analogues synthétiques du GHB pourrait constituer une nouvelle approche pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, mais aussi pour d'autres protéinopathies cérébrales.

γ -Hydroxybutyrate (GHB) regulates brain amyloid β peptides through modulation of proteolytic degradation

Christian Klein^{1,2,3}, Véronique Kemmel^{1,2,3}, Chantal Mathis⁴, Laurence Meyer³, Omar Taleb^{1,3}, Dominique Aunis¹, Ayikoe G. Mensah-Nyagan³ and Michel Maitre^{1,3}

¹INSERM U-575 and Faculty of Medicine, 11 rue human, 67085, Strasbourg, France.

²These authors contributed equally to this work.

³University of Strasbourg, laboratory for “Steroïds, neuromodulators and neuropathologies”, Faculty of Medicine, 11 rue Human, 67085, Strasbourg, France.

⁴University of Strasbourg, laboratory for “imagerie and neurosciences cognitive”, UMR 7191 CNRS, 12 rue Goethe, 67000, Strasbourg, France.

-Correspondence should be addressed to MM (maitre@neurochem.u-strasbg.fr). Phone: 0390243096; Fax: 0390243570.

Abstract

The chronic decrease of brain A β peptides is an emerging therapeutic approach for Alzheimer disease but no such treatment have achieved clinical validation. In vivo, some brain proteases, including neprilysin, possess the ability to digest and eliminate A β peptides and experimental data suggest their possible role as therapeutic mechanisms to reduce brain A β concentration in Alzheimer disease. The objective of this study was to demonstrate that per os chronic administration of γ -hydroxybutyrate (GHB) in APP transgenic mice decreases A β accumulation in brain. Acute GHB in rat and mice induces the rapid increase of neprilysin-genes expression as demonstrated by microarrays experiments and quantitative PCR. Accordingly, neprilysin activities are transiently increased in the brain of mice treated by GHB administered per os. These results indicate that endogenous GHB could have a role in A β turnover and that chronic administration of GHB to pre-symptomatic or established Alzheimer disease is a preventive or therapeutic approach for such disease in human. These effects can be rapidly and easily tested because GHB possesses several indications in human clinic. In addition, neprilysin genes expression modified by GHB synthetic analogues or mimetics could be of fundamental values for the treatment of AD, but also for other deleterious brain proteinopathies.

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous compound distributed heterogeneously in brain at micromolar concentration and which derived mainly from the catabolism of GABA. This compound possesses most of the properties of a brain neurotransmitter (Maitre, 1997) whose main functional role is the regulation of GABAergic brain activities through specific receptors (Andriamampandry et al., 2007; Andriamampandry et al., 2003). GHB is also used as a drug in several approved indications (narcolepsy/cataplexia (2002), anesthesia (Campbell, 1983), sleep induction (Kothare et al., 2007) and treatment of alcohol withdrawal (Navarro et al., 2007)) because of its GABA-mimetic profile when its brain concentration reaches several hundred micromolar (Williams et al., 1995). Like many other substances that potentiate the GABA system and which penetrates easily into the brain (benzodiazepines, alcohol, barbiturates and some other anesthetics), GHB is being sometimes used as a drug of abuse but with a low toxicity (Castelli, 2008).

At the level of gene expression, recent experiments have shown a specific distribution of GHB-induced Fos expression in rat brain that support a unique neuropharmacological profile for this substance (van Nieuwenhuijzen et al., 2009). In addition, pharmacological doses of GHB have been demonstrated to increase histone H3 acetylation in several brain region after inhibition of histone deacetylases activities (Klein et al., 2009). These results prompted us to investigate the modification of global gene expression induced by acute administration of GHB to rats, when the neuropharmacological effects of the drug were at its maximum.

Therefore, we explored the pattern of genes modified by a therapeutic dose of GHB (1g/kg) in the hippocampus of rats when the modification of behavior (sleep/anesthesia) was deeply installed. The results obtained by microarray studies using the Affimetrix protocol was compared to those obtained with control rats treated with saline. We found that some proteolytic enzymes implicated in the degradation of amyloid β peptides were significantly increased. In fact, among the 470 genes whose expression were significantly increased after GHB treatment, some were identified as genes implicated in the biological process of "proteolysis" (Gene ontology classification number: GO: 0006508, Fisher exact test; $p=0.049$). One of the most important was the neprilysin gene (*mme*) with a significant 1.95 fold change increase in the hippocampus of treated rats relative to controls ($p=0.0239$). This metalloproteinase and several members of its family possess beneficial roles in neuroinflammation and neurodegeneration, in particular those produced by the neurotoxic and inflammatory amyloid peptide ($A\beta$). In these regards, neprilysin enzyme is considered to be significantly involved in amyloid degrading processes (El-Amouri et al., 2007; Turner and Nalivaeva, 2007).

Gene Name	Symbol	Probe set ID	Gene Id	Chromosomal Location	SwissProt	RefSeq Transcript ID	Student t-test	Fold change
membrane metallo endopeptidase	Mme	1370072_at	24590	2q31	P07861	<u>NM_008604</u>	0,016	1,95

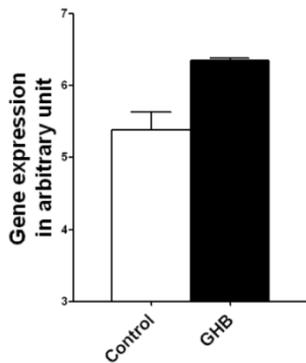


Figure 1 Acute administration of a therapeutic dose of GHB to rats induces a significant increase in the gene expression of neprilysin in the hippocampus using the microarrays analysis approach. Histograms of the fluorescent signal obtained after chip hybridization.

In order to confirm that acute GHB administration via oral route at a dose that was spontaneously ingested in the drinking water by APPSWE mice weighting about 20g (see below), we injected normal mice (Swiss albinos) with 3 mg GHB- Na^+ dissolved in 200 μl water/sucrose 4% via an intra gastric cannula. Animals were killed and decapitated at time 0, 30, 60, 90 and 120 min and the expression of neprilysin protein, activity and mRNA were followed in the hippocampus of these mice.

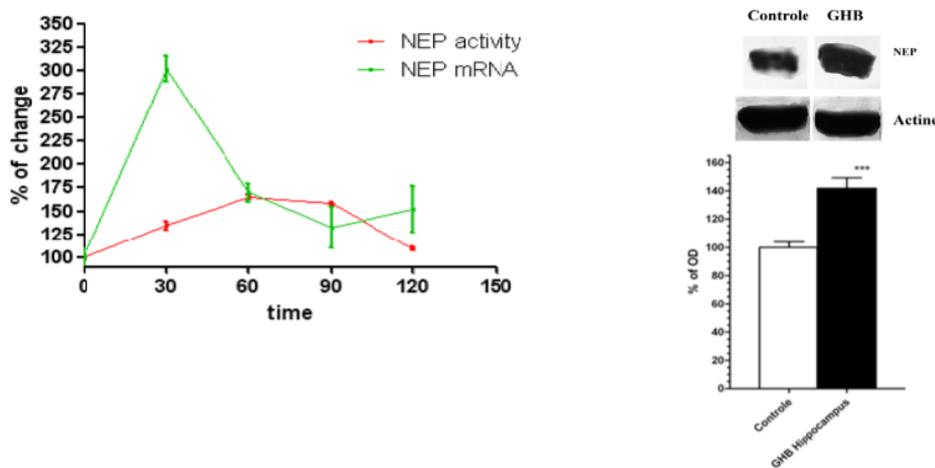


Figure 2 GHB treatment per os in mice overexpressed neprilysin protein, activity and corresponding mRNA in their hippocampus. Left panel shows the increase of both neprilysin activity (red curve) and the kinetic modification of corresponding mRNA (green curve). Basal neprilysin activity was 0.72 ± 0.01 O.D/mg protein and GHB treatment induced an increase of this activity by $171 \pm 11.7\%$ at 60-90 min by reference to zero time (100 ± 3.03 , $n=3$ animals in triplicate per experimental point). mRNA levels measured by quantitative PCR showed a peak 30 min after GHB administration. This peak reached about 300% increase compared to zero time ($n=3$ animals measured in triplicate at each point). Right panel showed the quantification by Western blot and image analysis of the neprilysin protein induced after one

hour treatment. The increase in protein was $141.8 \pm 7.4\%$ versus $100 \pm 4.1\%$ at zero time ($p = 0.0006$, student's t-test).

Overall, these results showed that the dose of GHB absorbed by mice (either by intragastric administration or by spontaneous drinking each day) induced a very significant increase in neprilysin protein and activity that followed an increase in neprilysin gene transcription in hippocampus. Then we explored a possible consequence of these modifications on the level of A β peptides in the hippocampus of APPSWE mice when submitted to chronic per os administration of GHB-Na⁺ in their drinking water, compared to the same transgenic mice that drank only tap water.

Female APPSWE mice (B6, SJL-Tg (APPSWE) 2576 Kha, Taconic Europe, Denmark) carries a transgene coding for the 695-aminoacid isoform of human Alzheimer β -amyloid precursor protein. They express high concentrations of the mutant A β which increase with the age of the animal, associated with the development of amyloid deposits in cortex, cerebellum and hippocampus (Carter et al., 2006; Kobayashi and Chen, 2005). Numerous studies have documented spatial, learning and memory impairments in these transgenic mice, beginning as early as age 3 months. We used 40 of these mice separated into two identical groups. The mice were obtained from Taconic (Denmark) at age 15 weeks and after one week of adaptation to our local animal facilities, half of these animals received in their drinking water a mixture of sucrose 4% + GHB-Na⁺ 1.66% while the rest of the colony received only tap water containing sucrose 4%. The treatment was carried out during 5 weeks.

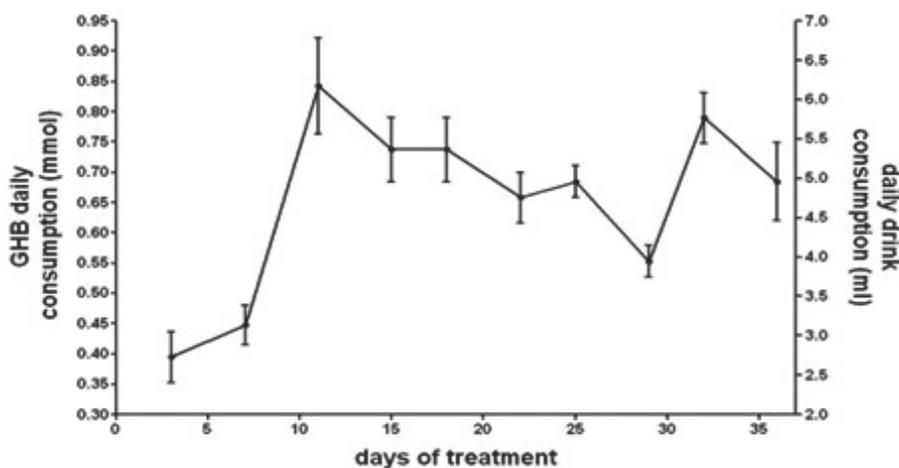


Figure 3 Daily GHB-Na⁺ intake by the group of treated mice which ingested the drug via the drinking water. After a short period of adaptation (about 5 days) where the volume of water/GHB ingested remained low (about 2.5-3 ml per day), the volume of water absorbed increased to reach 4-5 ml/day until the end of treatment. This represented a daily intake of about 0.7 mmol GHB-Na⁺ per animal.

At the end of the treatment, the animals were 21 weeks of age (about 5 months). Some of them (controls and treated) were killed and decapitated in order to examine the density of A β

peptides in their hippocampus using two methods: quantitative immunocytochemistry using both optical and confocal microscopy and western immunoblotting on protein extracts.

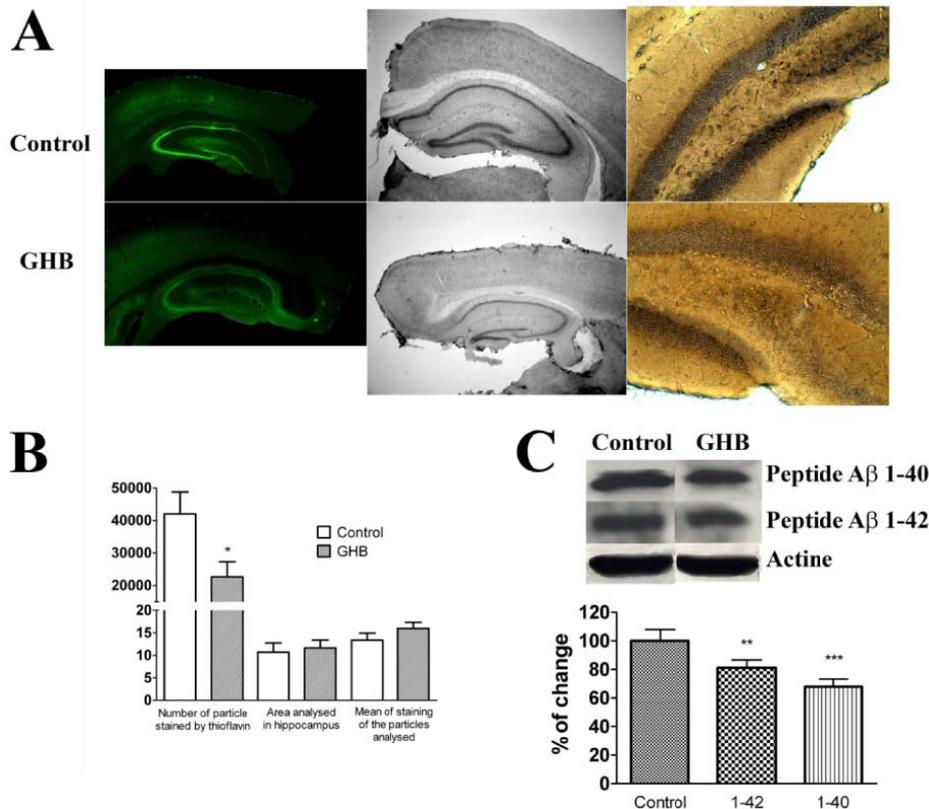


Figure 4 A : A β peptides density were explored using Thioflavin T staining (left panel) and immunolabeling by anti A β peptides antibody (right and middle panel). The A β depositions were visualized by macroscopy or microscopy with 1.6 or 20X magnification. Control mice drank tap water + sucrose 4% while treated mice drank tap water with sucrose 4% and GHB-Na⁺ 1.66%.

B: Images quantification for Thioflavine T experiments. Results showed that GHB treatment significantly decrease the concentration of A β amyloid peptides in the hippocampus by about 2 fold. (*p<0.05, *Student's t* test). The hippocampus areas analyzed presented the same surface and the same range of staining intensity for positive particles in the 2 groups of mice (GHB treated and Controls).

C: Hippocampus extracts of APPSWE mice treated with GHB and compared to controls were analyzed by Western blot. A β peptides 1-40 and A β peptides 1-42 were labelled by specific antibodies. β -Actin as internal control was detected by anti- β -Actin. Quantification showed a decrease of A β peptides after 5 weeks of treatment by GHB, compared to controls. The decrease was greater for A β 1-40 (67.9 \pm 10.7 vs 100 \pm 14.9 for controls, p = 0.0095) than for A β 1-42 (81.1 \pm 15.6 vs 100 \pm 15.8, p= 0.011).

These results indicates that GHB administered per os at therapeutic doses to transgenic mice that accumulate A β peptides in hippocampus, reduces this accumulation and may prevent the formation of senile plaques. These plaques are thought to be at the basis of neuroinflammatory and neurotoxic irreversible damages to the brain. To further documentate these molecular modifications due to GHB chronic consumption, we compare by confocal microscopy the relative quantitative distribution of neprilysin and A β peptides in the hippocampus of both treated and non-treated mice.

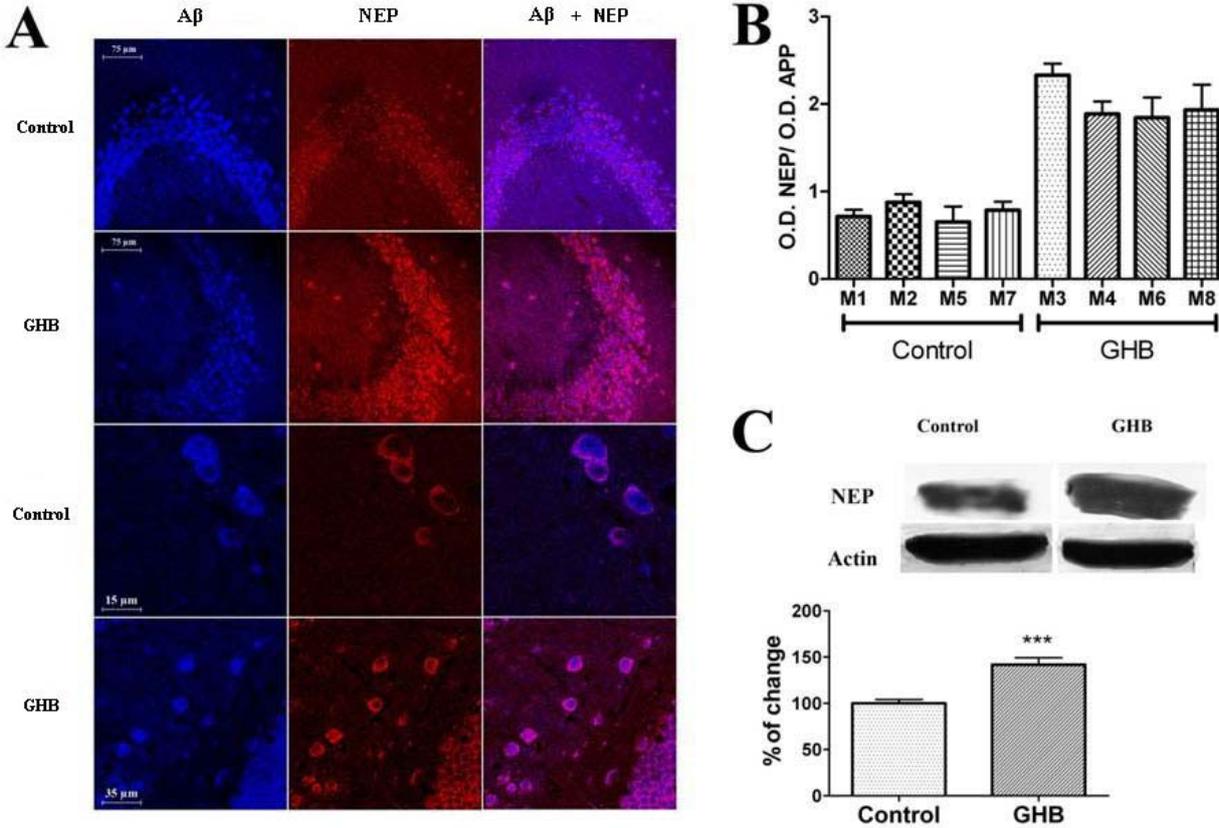


Figure 5 A : Immunofluorescence analysis showed that the relative presence of neprilysin staining compared to A β peptides staining in hippocampus increase in treated APPSWE transgenic mice relative to Controls.

B: Quantification of the dual staining of neprilysin and A β peptides showed an increase of the presence of neprilysin and a decrease of presence of A β peptides. The calculated ratio of surface stained by neprilysin/surface stained by A β peptides presented a significant increase compared to control mice (respectively 1.79 ± 0.18 vs 0.78 ± 0.10 , $p < 0.0001$, $n = 80$ images analysis per groups of mice $n = 4$, M1, M2, M5, M7 for controls and M3, M4, M6, M8 for GHB treated mice).

C: Quantification by western blot analysis of neprilysin showed that GHB treatment of APPSWE mice induced the expression of neprilysin by $141.8 \pm 7.4\%$ versus $100 \pm 4.1\%$ in controls. (***) $p < 0.001$ by Student's t test).

Finally we demonstrate that chronic treatment of APPSWE mice at 5 months of age during 5 weeks with GHB Na⁺ absorbed with the drinking water reduce the density of A β peptides in the hippocampus of these mice compared to controls. Chronic GHB increase in brain induced neprilysin gene expression. The treatment was undertaken at early age of the disease because several months are needed to install amyloid plaques and irreversible lesions. At the age of 5 months, these type of mice do not develop mnemonic or cognitive deficits that could be demonstrated by common behavioral testing. Beside these alterations, Tg2576 mice showed hyperactivity and willingness to explore central areas in the open field. These symptoms are clinically reminiscent of the disinhibition observed in Alzheimer-disease patients. Interestingly, despite their young age and the short period of treatment, APPSWE mice having received chronic GHB showed a reduced spontaneous activity compared to non-treated mice that exhibited a hyperactivity accompanied by several stereotypes.

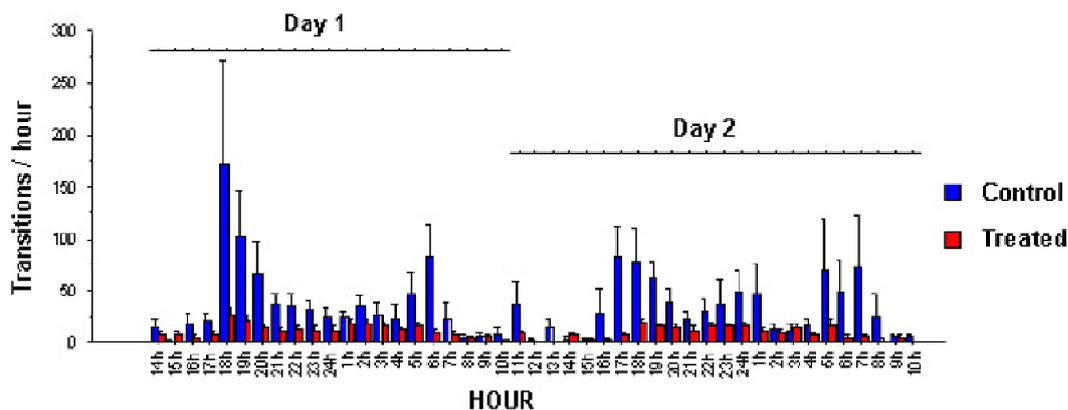


Figure 6 Spontaneous circadian activity of treated and non-treated mice measured during a period of two days. Treatment was stopped at the end of day 1. According to the pharmacokinetic data of the drug, it is completely eliminated in 3-4 hours. Despite this absence of treatment, no rebound activity was seen in previously treated mice, moreover a reduction of spontaneous activity was seen in these mice compared to controls.

Our findings suggest several interesting issues. Therapeutic doses of GHB, usually used in human clinic to induce deep sleep or to treat sleep disturbances, induce metalloproteinase genes whose products (namely neprilysin) contribute to the clearance of A β peptides in transgenic mice (Nalivaeva et al., 2008; Turner and Nalivaeva, 2007). These peptides are the precursors of amyloid plaques that produce neuroinflammation and neurotoxicity followed in aged mice by behavioral and cognitive deficits. Endogenous brain GHB, which is thought to possess neurotransmitter properties, could participate in the regulation of deleterious brain proteins deposits, at least in Alzheimer disease (AD). Clinical tests to evaluate the possible beneficial role of GHB in AD are easy to be performed because the drug is approved for

several therapeutic indications in many countries. Finally, GHB could represent a model to synthesize analogues and/or mimetics that were more active at lower doses.

Methods

1. Animals and drug treatments

Female Swiss mice (about 20g) were housed 3 per cage. All were kept at constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) with regular light/dark schedule (7 AM–7 PM), food and water were available *ad libitum*. However, animals for experiments were first starving for food during 24h, then received an intragastric injection of either 200 μl of a water solution of sucrose (4%, control mice) or 200 μl of the same mixture containing 3mg GHB, sodium salt (treated mice). Mice (3 mice at each point for each measurement) were killed by decapitation at various time after injection (0, 30, 60, 90 and 120 min), their brain were extracted and the hippocampi were removed rapidly. These brain samples were either used after RNA extraction for quantitative PCR of neprilysin mRNA after storage of the brain samples at -80°C for one week, or for measurement of neprilysin protein by western blot or for quantification of neprilysin activity.

Female APPSWE mice at 4 months of age (B6; SLJ-Tg (APPSWE) 2576Kha from Taconic) were housed 1 per cage. After an adaptative period of one week, the APPSWE mice were allowed to drink during 5 weeks either a solution of sucrose 4 % in tap water (controls), or a solution of sucrose 4 % containing 1.66 % GHB, Na^+ salt (treated). Mice body weight and the amount of water absorbed per animal were measured each day. On this basis, treated mice were calculated to drink about 4–5 ml of the GHB mixture in water, which represented a daily GHB intake of about 0.6 mmoles per day. During the treatment, the weight of the mice do not differ significantly from the weight of controls (about $20 \pm 1\text{g}$). At the end of treatment, one set of APPSWE mice were killed and decapitated, hippocampi were rapidly excised and immediately used or stored at -80°C for protein quantification by western blot.. A second set of APPSWE mice was used for quantitative immunohistochemical studies. All experiments were done by reference to APPSWE control mice.

Procedures involving animals and their care were conducted in compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) of November 24, 1986.

2. Tissue preparation for immunofluorescence studies

Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 1 ml (5.6 % w/v) pentobarbital sodium solution (CEVA, santé animal, Libourne, France) and perfused transcardially with a fixative solution. For the immunodetection of Neprilysin or APP peptides, the fixative consisted of a 4% freshly depolymerized paraformaldehyde solution (Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4). This solution was chilled before being injected into anesthetized animals with a peristaltic pump at a flow rate of 25 mL/min until 1 mL/g body weight was reached. The brains were quickly removed and left for 1 hour at room temperature in the same fixative solution. Following fixation, brains were rinsed six times for 5 min in TBS (Tris-buffered saline, pH 7.4) to block residual aldehyde groups. Brain sections were dissected according to the Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>). Coronal sections (50–80 μm) were cut with a vibratome (Leica VT 1000 M) and collected in TBS.

2.1. Thioflavin-T Staining

Floating sections from APPSWE mice were washed in TBS before being processed for Thioflavin-T staining as described previously (Klunk et al., 2003). Briefly, sections were washed in water and stained for 3 hours with a solution of 0.015% Thioflavin-T in PBS. Then the sections were washed in

water and finally were coverslipped with Fluorosave (calbiochem Laboratories). Fluorescent sections were observed using a Leica DMIRE2 fluorescence microscope using a UV filter set.

2.2. Immunofluorescence staining

Immunostaining was performed on free-floating sections or in culture dishes in TBS by the usual indirect method¹⁸. Sections and culture dishes were washed in TBS and incubated in 10% NBS in TBS for 1 hour to saturate nonspecific immunoreactive sites. After six TBS washes (5 min per wash), the sections or culture dishes were incubated overnight in the different antisera. These antibodies were Neprilysin (anti-CD-10 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA rabbit, IgG, 1/50.) APP peptide (Anti APP 1-4, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA goat IgG, 1/100.). In some multiple labeling experiments, antisera were used in a cocktail diluted in TBS. The above dilutions were used irrespective of the number of antisera employed in each preparation. Sections were washed in six baths of TBS (2 mL for 5 min each time) and the second immunoreaction step was performed with specific secondary antisera for 4 hours at room temperature, followed by extensive washes (six washes for 5 min each time) in TBS. These secondary antisera were antirabbit Cy3-conjugated AffiniPure (Jackson Immunoresearch; 711-165-152, donkey IgG (H_L), 1/800 dilution), or anti- goat Cy5-conjugated AffiniPure (Jackson Immunoresearch; 715-225-151, donkey IgG (H_L), 1/800 dilution). These antibodies were selected because they were isolated from antisera by immunoaffinity chromatographies and showed no cross-reaction with IgG from other species. Different controls were carried out to assess antibodies specificities and nonspecific immunoreactions. Primary antibodies were omitted and secondary antibodies were tested individually or in a mixture in the presence of control tissue sections. Finally, each antibody coming from a particular species was tested with secondary antibodies recognizing primary antibodies derived from the alternative species in order to estimate interspecies cross-reactivity.

2.3. Confocal microscopy observations

Immunofluorescent staining was monitored with a Leica laser scanning microscope (TCS-SP2 invert) equipped with a plan apo oil (40X) immersion lens. Cy3 emission was excited using the He/Ne laser 543 nm beam and CY-5 fluorescence was obtained by excitation with an He/Ne laser 643 nm beam. The emitted light was filtered through appropriate filters (TD 488/543/633) for Cy3 (from 555–610 nm) and Cy5 (from 650–725 nm). Tissue sections were subjected to optical serial sectioning to produce images in the X–Y plane. Each optical section was scanned six times for brain sections to obtain an average image. Pictures were recorded digitally in a 512 X 512 pixel format. Images were taken with a 40X objective, NA 1.25, with an electronic zoom of around 2- or 4-fold. A look-up table (glowoverglowunder, Leica) ensured that the full dynamic range of the photomultipliers was used. Image processing and fluorescence intensity measurements were performed on the Leica Confocal System software. Before each measurement a section series was acquired on the vertical axis in order to choose the equatorial section.

2.4. Preembedding immunoperoxidase studies

The sections were washed thoroughly with TBS and incubated in TBS containing 5% (v/v) NBS for 15 min. The anti Neprilysin antibody (anti-CD-10 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA rabbit, IgG, 1/50.) or APP peptide (Anti APP 1-4, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA goat IgG, 1/100.) were then added in TBS solution. Sections were incubated overnight at 4°C and after washing with TBS, they were treated with goat antirabbit IgG coupled to horseradish peroxidase in TBS (P.A.R.I.S. Compiegne, France; BI2407, , final dilution 1/200) or rabbit antigoat IgG coupled to horseradish peroxidase in TBS (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; ab8515, final dilution 1/200) for 3 hours. Sections were again washed with TBS. Peroxidase activity was detected with a freshly prepared solution of 4-chloro 1-naphthol (0.2 mg/mL) in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with TBS, the sections were mounted in glycerol/TBS (v/v) before

microscopic analysis using a microscope (Leica DMRB) equipped with a digital camera (Axiocam, Zeiss, Germany). Anatomical structures were identified by direct observation using the atlas and nomenclature of the Allen Brain Atlas (<http://www.brain-map.org>). Light microscopic sections were examined using a brightfield microscope Leica DMRB (objectives 1.6X to 20X). The photomicrographs were saved as tiff files and adjusted for color balance, brightness, and contrast. The images were processed using Adobe Photoshop 7.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA) which was used to generate figure plates.

2.5. Imaging analysis.

The RGB images were analysed by using Image J software (NIH, USA). After splitting the image into red, green and blue channels, the immunolabeling of NEP or APP was isolated by using thresholding and the thresholded area was measured. In the same time, the mean and maxima of optical density (OD) were measured for each image. The OD measurement for each image is the mean gray of the pixels inside the selected area of the image, with a 256 gray scale as a reference. OD increase with the intensity of labeling between a minimum (0 : white) and a maximum (255 : black).

3. RNA isolation and quantitative PCR.

Total RNA was extracted from frozen Swiss mice hippocampus, using the Nucleospin RNAL protocol (Macherey-Nagel, Düren, Germany). This protocol included a treatment of isolated RNA by DNase I. For each time and for each cerebral structure, three different mice were prepared. Integrity and purity of RNA were checked by spectrophotometry. Reverse transcription was performed with 1 µg RNA using Biorad iScriptTM cDNA synthesis kit. q-PCR was performed in iCycler thermal cycler (Biorad, Hercules, CA, USA) using SYBR Green dye (iQ SYBR green Supermix, Biorad). For each sample, the reaction mix was a makeup of 320 nM forward primer, 320 nM reverse primer, 200 nM probe, and 0.5 µl cDNA template in a total reaction volume of 25 µl (Benosman et al., 2007). Using the iCycler iQ optical system software (version 3.1, Bio-Rad), a standard curve based on successive cDNA dilutions was performed and was used to calculate starting quantities. To ensure a thorough calculation, starting quantities of genes of interest were reported to those of a housekeeping gene (RPL39) in the same plate. All samples were analyzed in triplicate, and the mean and standard deviation were calculated. After each q-PCR, specificity of the amplification was controlled by a melting curve ranging from 55 to 95°C whereby a single peak corresponding to the amplicon was present. The following primer pairs were used to amplify cDNAs after reverse transcription experiments: for mice Neprilysin (forward) 5' AGGCCCTTTACGGGACTACAT 3', (reverse) 5' GCCTCCCCACAGCATTCTC 3' and for housekeeping gene RPL39 (forward) 5' GATCCTCGCCATGTCTTCTC 3', (reverse) 5' GCTTCGTTCTCCTCGAGTGT 3'.

4. Western immunoblotting.

APPSWE mice hippocampus extracts (controls and GHB-treated) were analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis/immunoblotting with antibodies recognizing β Amyloid 1-40 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; 1/1000), β Amyloid 1-42 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; 1/1000), neprilysin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1/800) and actin (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; 1/1000) as described previously (Gaiddon et al., 1996). Equal amounts of protein samples were separated along with molecular weight markers (Fermentas, Inc., Hanover, MD, USA) in 10% polyacrylamide gels. Gel loading equivalence was confirmed by actin. Gels were transferred onto 0.2 µm nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Species-specific immunoglobulin G horseradish peroxidase (IgG-HRP) secondary antibodies (P.A.R.I.S, Compiegne, France) were used. Blots were developed with chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA), and autoradiography was performed utilizing BioMax MR Film (Kodak, Rochester, NY, USA).

Image analysis of the blots was performed on optical density-calibrated images captured with Adobe Photoshop software (Adobe Systems Incorporated). The protein level was quantified by measuring the integrated optical density of the bands, after subtracting background by Image J software.

5. Assay of Neprilysin Activity

Neprilysin activity was spectrophotometrically assayed as described previously (El-Amouri et al., 2007). Briefly, Swiss mice hippocampus were sonicated. Proteins in whole cell lysates were quantified using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Then, the whole cell lysates were separately incubated in a standard assay mixture consisted of 50 µg of cell lysates, 50 µM Z-Ala-Ala-Leu-p-nitroanilide (Peptide Institute, Osaka, Japan) as substrate, and 50 mM MES buffer (pH 6.5) in a total volume of 100 µl. The reaction was initiated by addition of substrate to the assay mixture, and carried out at 37°C for 45 min. The neprilysin activity was determined from the absorbance of the liberated p-nitroanilide at 405 nm and from the decrease in the rate of digestion caused by 10 µM thiorphan (Enzo Life Sciences International, Inc., formerly BIOMOL International, L.P., Plymouth Meeting, PA, USA), a specific inhibitor of neprilysin.

6. Microarray Analysis

6.1. Animals and Drug treatments.

Adult male Wistar rats (250 to 300 g body weight), were used for all experiments. They were housed 3 per cage and kept at constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) with regular light/dark schedule (7 AM–7 PM). Food and water were available ad libitum. Procedures involving animals and their care were conducted in compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) of November 24, 1986. Animals were injected intraperitoneally (i.p.) with saline (1 ml/kg) or GHB (1 g/kg) 2 hours prior to be killed and decapitated. Hippocampus were rapidly excised under sterile conditions and immediately used or stored at -80°C until RNA extraction.

6.2. RNA isolation for Microarray Analysis.

Total RNA was extracted from frozen hippocampus, using the Nucleospin RNAL protocol (Macherey-Nagel, Düren, Germany). This protocol included a treatment of isolated RNA by DNase I. The different batches of RNA were further purified using RNeasy columns (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Three biological replicates from three different rats were prepared for each cerebral structure. Integrity and purity of RNA were checked by spectrophotometry and capillary electrophoresis with the Bioanalyser 2100 RNA and 6000 Nano Kit from Agilent Technologies (Palo Alto, CA). cDNA were synthesized with the Superscript Choice system (Invitrogen), and then biotin-labelled cRNA were obtained with the Affymetrix IVT labelling kit (Affymetrix, Santa Clara, CA). After purification, 10 µg of fragmented cRNA was hybridized to the Affymetrix GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (31,042 probe sets including >28,000 rat genes), and the chips were automatically washed and stained with streptavidin-phycoerythrin using an Affymetrix fluidics station 450. Finally, arrays were scanned at 570 nm with a resolution of 1.56 µm/pixel with the Gene Chip Scanner 3000 7G from Affymetrix. Raw images (CEL format files) were generated with Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS 1.4).

6.3. Microarray Data Analysis.

6.3.1. Gene expression values.

The calculation for selecting genes differentially expressed was based on data processed using the dChip algorithm (Li and Wong, 2001). Data were first normalized using the rank invariant method at probe level, then the Model Based Index algorithm was used with the PM/MM for calculating gene expression indexes. The dChip algorithm also allows associating detection level (P for present, A for absent and M for marginal) to probe set. The replicate samples from of the test and the reference were averaged and a Fold Change (FC) was calculated for each probeset. For any of the above steps, except for the comparative analysis, we used the R affy package of Bioconductor (Irizarry R, 2002).

6.3.2. *Replicates reproducibility.*

To assess reproducibility, we computed the correlation between the expression values of the three biological replicate of each cerebral structure. All values were above $r = 0.97$, which indicate good reproducibility.

6.3.3. *Gene selection.*

Stringent filtering criteria were used to identify genes whose expression level was significantly changed between two stages. We performed a student t-test analysis to compare treated versus non treated rats for each structure. We selected genes that met all of the following requirements:

- 1) student t-test p value < 0.05 for the three replicates of each treated versus non treated rat.
- 2) Mean of MASS 5 fold change over the three replicated was either ≥ 1.5 or ≤ 0.67 (-1.5 fold change) for both comparisons.
- 3) At least one of the values of the microarray signal must be superior to 4 for each sample group.

6.3.4 *Analysis of results.*

FatiGO was used to extract relevant GO terms (<http://godatabase.org/>) for ours groups of genes with respect to a set of genes of reference (typically the rest of genes) (Al-Shahrour et al., 2004)The terms are considered to be relevant by the application of a Fisher's exact test that considers the multipletesting nature of the statistical contrast performed.

In a second analysis, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/) and UniProt (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>) were used to provide information on gene and protein functions. OMIM and the Gene Expression Omnibus Database are provided in the public domain by National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD).

1. Maitre, M. The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* **51**, 337-361 (1997).
2. Andriamampandry, C., et al. Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB). *FASEB J* **17**, 1691-1693 (2003).
3. Andriamampandry, C., et al. Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J* **21**, 885-895 (2007).
4. Gamma hydroxybutyrate (Xyrem) for narcolepsy. *Med Lett Drugs Ther* **44**, 103-105 (2002).

5. Campbell, I.T. Gammahydroxybutyrate. *Anaesthesia* **38**, 1105-1106 (1983).
6. Kothare, S.V., Adams, R., Valencia, I., Faerber, E.C. & Grant, M.L. Improved sleep and neurocognitive functions in a child with thalamic lesions on sodium oxybate. *Neurology* **68**, 1157-1158 (2007).
7. Nava, F., *et al.* Gamma-hydroxybutyrate reduces both withdrawal syndrome and hypercortisolism in severe abstinent alcoholics: an open study vs. diazepam. *Am J Drug Alcohol Abuse* **33**, 379-392 (2007).
8. Williams, S.R., Turner, J.P. & Crunelli, V. Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABAB_A receptor-mediated hyperpolarization. *Neuroscience* **66**, 133-141 (1995).
9. Castelli, M.P. Multi-faceted aspects of gamma-hydroxybutyric acid: a neurotransmitter, therapeutic agent and drug of abuse. *Mini Rev Med Chem* **8**, 1188-1202 (2008).
10. van Nieuwenhuijzen, P.S., McGregor, I.S. & Hunt, G.E. The distribution of gamma-hydroxybutyrate-induced Fos expression in rat brain: Comparison with baclofen. *Neuroscience* **158**, 441-455 (2009).
11. 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).
12. Turner, A.J. & Nalivaeva, N.N. New insights into the roles of metalloproteinases in neurodegeneration and neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* **82**, 113-135 (2007).
13. El-Amouri, S.S., *et al.* Neprilysin protects neurons against Abeta peptide toxicity. *Brain Res* **1152**, 191-200 (2007).
14. Carter, T.L., Pedrini, S., Ghiso, J., Ehrlich, M.E. & Gandy, S. Brain neprilysin activity and susceptibility to transgene-induced Alzheimer amyloidosis. *Neurosci Lett* **392**, 235-239 (2006).
15. Kobayashi, D.T. & Chen, K.S. Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* **4**, 173-196 (2005).
16. Nalivaeva, N.N., Fisk, L.R., Belyaev, N.D. & Turner, A.J. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **5**, 212-224 (2008).
17. Klunk, W.E., *et al.* The binding of 2-(4'-methylaminophenyl)benzothiazole to postmortem brain homogenates is dominated by the amyloid component. *J Neurosci* **23**, 2086-2092 (2003).
18. Hedou, G., *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* **426**, 549-560 (2000).
19. Benosman, S., *et al.* Multiple neurotoxic stresses converge on MDMX proteolysis to cause neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* **14**, 2047-2057 (2007).
20. Gaiddon, C., Loeffler, J.P. & Larmet, Y. Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *J Neurochem* **66**, 2279-2286 (1996).
21. Li, C. & Wong, W.H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 31-36 (2001).
22. Irizarry R, G.L., Cope L. An R package for analyses of affymetrix oligonucleotide arrays. In: *The analysis of Gene Expression Data: . Methods and Software* edited by Parmigiani G, Garrett ES, Irizarry RA, Zeger SL, New York: Springer(2002).
23. Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. & Dopazo, J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* **20**, 578-580 (2004).

Discussion et conclusion générale

On a coutume de lire et d'écrire que le système cérébral utilisant le GABA comme neuromédiateur est le principal système inhibiteur du SNC. Ceci est vrai au niveau moléculaire, cellulaire et fonctionnel, allant de la polarisation membranaire neuronale jusqu'aux grandes fonctions neurologiques et mentales. Celles-ci comprennent classiquement la régulation de la vigilance, certains syndromes épileptiques, le sommeil et les rythmes circadiens, la régulation de l'humeur et de l'anxiété. Un dérèglement de ce système inhibiteur est impliqué dans de nombreux tableaux pathologiques qui vont de plusieurs types d'épilepsie, troubles du sommeil, anomalies de la survie neuronale jusqu'à plusieurs type de stress chronique/dépression, syndromes psychotiques ou schizophréniques et troubles addictifs divers. C'est dire l'ubiquité de ce système inhibiteur GABA et son importance dans le fonctionnement cérébral. On pense généralement qu'un dysfonctionnement de ce système, plus ou moins durable, perturbe l'équilibre avec les systèmes excitateurs cérébraux, faisant apparaître soit un phénotype comportemental particulier, soit une pathologie aigue à plus ou moins long terme.

Parmi les systèmes de neurotransmission, le système GABAergique découvert il y a une soixantaine d'années est l'un des plus étudiés et des mieux connus. Cette connaissance est largement due à l'existence de nombreux outils pharmacologiques, thérapeutiques ou récréatifs dont on a découvert que la ou les cibles principales étaient des constituants du (ou des) systèmes GABA cérébraux. Ceux-ci étant si fondamentalement impliqués dans le fonctionnement global du SNC, que les façons avec lesquels ils s'adaptent ou évoluent en fonction de l'environnement sensoriel, temporel, nutritionnel, relationnel, pharmacologique ... sont d'une importance très grande pour la compréhension des fonctions intégrées de l'organisme. La plasticité moléculaire à la base de la régulation fonctionnelle de l'activité des synapses GABA du cerveau a donc beaucoup été étudiée. Pour résumer de façon rapide les connaissances dans ce domaine, sans posséder de modèle intégré ou synthétique, les synapses GABA adaptent leur activité par un grand nombre de moyens combinés, dont les principaux sont schématiquement :

1. L'existence d'isoformes de la glutamate décarboxylase, possédant des propriétés cinétiques et une distribution particulière, une affinité différente pour le cofacteur pyridoxal phosphate, des modifications post-traductionnelles variées

(phosphorylation, palmytoylation par exemple). Ces activités enzymatiques sont alimentées en amont par une biodisponibilité variable du glutamate provenant de compartiments métaboliques différents et variables, largement contingent de l'énergétique neuronale, ceci compte tenu du rôle fondamental du glutamate dans l'excitabilité neuronale,

2. La problématique complexe de l'accumulation vésiculaire du GABA, fortement dépendante de l'oxygénation cellulaire et de l'activité mitochondriale, en compétition avec d'autres substances (glycine par exemple). On peut mentionner également toute la régulation du ballet vésiculaire qui aboutit à la libération extracellulaire du GABA et dans laquelle de subtiles modifications de polarisation membranaire et donc de canaux ioniques possèdent un rôle primordial,
3. Surtout l'énorme diversité moléculaire des sites GABA-A qui conditionne une importante diversité fonctionnelle en termes de spécificité, cinétique, distribution, plasticité, pharmacologie. L'importance du polymorphisme, des sous-unités isoformes, le nombre des ligands allostériques rendent la somme des possibilités théoriques innombrables. Les sites GABA-B jouent un rôle fondamental, en particulier comme autorécepteurs présynaptiques, les sites GABA-C sont moins bien connus,
4. Enfin, pour terminer ce survol rapide, il faut mentionner la multiplicité des transporteurs plasmiques, leurs spécificités inégales, leurs isoformes et leurs cinétiques spécifiques et l'existence, là aussi fort probable, de nombreux polymorphismes n'ayant pas toujours de retentissement fonctionnels. Ces transporteurs conduisent pour partie au lieu de catabolisme représenté par la GABA-transaminase mitochondriale et sa dépendance à la biodisponibilité au glutamate/alphacétoglutarate et au pyridoxal phosphate. La biosynthèse de ce dernier à partir de la pyridoxine est également fortement régulée.

On comprend bien que cette complexité, surtout si on envisage le système dans une évolution dynamique permanente, est nécessaire pour s'intégrer dans l'économie générale du SNC et ajuster continuellement son activité. Cette complexité et ces partenariats multiples permettent une adaptabilité très grande. Les cibles pharmacologiques potentielles exprimées par les synapses GABA sont très nombreuses et de nombreuses drogues ou médicaments, spécifiques à petites doses, sont souvent pluri-potentiels à fortes doses. Ces dernières sont souvent utilisées en pharmacologie ou en thérapeutique car elles ralentissent l'adaptation du SNC et

l'apparition d'une tolérance qui conditionnent l'affaiblissement de l'efficacité pharmacologique. Mais ces fortes doses sont au dépend de l'apparition d'effets secondaires indésirables.

Dans ce cadre, notre laboratoire a fortement contribué à démontrer l'existence d'un système de neuromodulation centrale ayant le gamma-hydroxybutyrate (GHB) comme médiateur. Cette fonctionnalité est maintenant largement reconnue. Notre modèle, qui tient compte de la quasi-totalité des résultats publiés dans ce domaine, prévoit pour le GHB un rôle régulateur pour certaines synapses GABA du SNC. Celles-ci ne semblent pas distribuées partout dans le cerveau, si on se fonde sur la répartition des sites récepteurs GHB de haute affinité (Castelli et al., 2000; Mandel et al., 1987). Il semble que les régions rostrales du cerveau soient particulièrement concernées (cortex, bulbes olfactifs, striatum, thalamus, hippocampe et certains noyaux dopaminergiques comme A9, A10 et A12), pour ce qui concerne le cerveau de rat. Dans ces régions (mais aussi dans d'autres zones du SNC, moins facilement décelable à l'analyse macroscopique), le GHB qui est produit du fait de la dégradation et du transport régulé du GABA et du SSA (semi aldéhyde succinique) participe à la modulation de l'activité de tout ou partie des synapses GABA. Plus le renouvellement du GABA dans ces régions est rapide, plus une forte quantité de GHB est produite. Ce GHB est accumulé dans des vésicules synaptiques par le même transporteur qui accumule le GABA, de ce fait les deux substances sont co-libérées dans l'espace synaptique en fonction de l'intensité du fonctionnement de ces synapses. Le GABA interagit avec ses récepteurs (GABA-A et GABA-B), le GHB stimule spécifiquement (si les concentrations sont les concentrations « endogènes » physiologiques) ses récepteurs, majoritairement situé au niveau pré-synaptique. Par l'intermédiaire d'une ou plusieurs protéines G sensibles à la toxine pertussis, les récepteurs GHB exercent un rétrocontrôle inhibiteur sur le fonctionnement de la synapse GABA via une limitation de l'entrée pré-synaptique de Ca^{2+} empruntant des canaux L. Ce type de régulation est peut-être, dans les régions concernées, en concurrence avec les autorécepteurs GABA-B couplés aux canaux calciques N/P/Q (Ladera et al., 2008). Récepteurs GABA-B et GHB exercent tous deux une limitation de la synthèse de cAMP. Notons seulement que la régulation GABA-B est directe, rapide et de première intention. La régulation GHB est plus lente car possédant une série d'intermédiaires, plus complexe et peut-être plus souple et plus sophistiquée.

De ce fait, dans les conditions et à doses physiologiques, le GHB apparaît comme une substance freinant l'activité de certaines synapses GABA et la libération de celui-ci, ajustant continuellement le tonus GABA dans le sens de la diminution. De ce fait, on peut expliquer

que le GHB à faibles doses, sollicitant uniquement les récepteurs GHB, induit une hyperthermie avec augmentation de la vigilance et anxiété, parfois agressivité et épilepsie de type petit mal dans certaines situations expérimentales (Hu et al., 2000). L'effet neurotoxique, également induit par de faibles doses de GHB, pourrait s'expliquer par une balance en faveur des activités excitatrices, les ligands GABA-A (neurostéroïdes, anesthésiques divers, anxiolytiques type benzodiazépines) ayant plutôt une activité neuroprotectrice bien connue et bien documentée (Costa et al., 2004). Si ce modèle est exact, alors la thérapeutique pourrait bénéficier d'antagonistes GHB spécifiques ingérés chroniquement à doses convenables, pour protéger le cerveau chez l'individu âgé ou ayant subi un stress traumatique ou ischémique.

En fait, la situation qui vient d'être décrite est depuis longtemps mise à profit dans plusieurs indications thérapeutiques : patients narcoleptiques chez lesquels on veut améliorer la qualité et la quantité de sommeil lent profond réparateur pour diminuer la fréquence des somnolences diurnes, anesthésiologie, sevrage à la dépendance à l'éthanol, neuroprotection après traumatisme crânien induite par l'installation d'un coma vigil (Ottani et al., 2003). La situation est la même pour le cas des personnes utilisant des anesthésiques, sédatifs, alcool, benzodiazépines ou GHB pour obtenir une anxiolyse, un sommeil, une diminution de l'anxiété et de la vigilance favorisant les contacts sociaux ou permettant le passage à l'acte. Dans ces derniers cas, l'usage du GHB (ou de l'alcool) est favorisé par le fait que le stimulus GABA désinhibe l'hypodopaminergie dans le VTA entretenue par l'hypoGABAergie lorsque le tonus GHB est physiologique (Gavello-Baudy et al., 2008). Dans toutes ces situations, cliniques et pharmacologiques ou récréatives, l'absence d'antagoniste(s) des récepteurs GHB facilement utilisable(s) pour favoriser l'activité GABA de certaines zones du cerveau, est remplacé par la désensibilisation ou le découplage des récepteurs GHB avec la réponse cellulaire induite par l'apport massif de GHB exogène. On observe alors une hyperGABAergie fonctionnelle liée en partie à la mise hors fonction des récepteurs GHB hyperpolarisant. De ce fait, des effets utilisables en thérapeutique ou des effets récompensants sont induits, mais les quantités de GHB à ingérer ou à administrer se mesurent en grammes (4,5 g x 2 pour une nuit de 8 heures chez le narcoleptique) (Robinson and Keating, 2007), de façon à ce que les concentrations cérébrales de GHB atteignent au minimum 400-800 μ M. Le système de rétrocontrôle inhibiteur du GHB sur la synapse GABA est alors désactivé, avec les conséquences pharmacologiques décrites. Une autre conséquence est l'hyperdopaminergie qui s'installe dans la voie méso-cortico-limbique (VTA et NA) et qui participe aux effets pharmacologiques. Cette hyperdopaminergie induite par de fortes doses de GHB a été confirmée par microdialyse in vivo dans le cortex frontal et le NA (Brancucci et al., 2004).

Elle est probablement due à l'augmentation du tonus GABA dans ces régions qui expriment des récepteurs GHB (au moins dans le VTA).

Un certain nombre d'auteurs pensent que l'augmentation du tonus GABA observée à la suite de fortes concentrations de GHB provient exclusivement d'une stimulation GABA-B (Lingenhoehl et al., 1999). A cela, deux raisons essentielles : il existe une affinité faible (les IC_{50} mesurés varient de 0.15 à 5 mM) du GHB pour les sites GABA-B (Mathivet et al., 1997). Cette stimulation GHB serait de nature agoniste, bloquée par un certain nombre d'antagonistes spécifiques des récepteurs GABA-B (Nissbrandt and Engberg, 1996). Dans ces situations expérimentales, les tenants de cette hypothèse font remarquer que l'antagoniste des récepteurs GHB (NCS-382) n'a pas d'effet et que le rôle des récepteurs GHB est obscur, quoique leur existence ne soit pas mise en doute. En second lieu, un résultat de Kaupmann et collaborateurs (Kaupmann et al., 2003) semble venir confirmer cette façon de voir. Chez les souris transgéniques GABA-B B1^{-/-} (dépourvues de récepteurs GABA-B), le GHB n'induit pas d'hypothermie, ni de modification d'activité spontanée ou de profil EEG et la prodrogue du GHB, la gamma-butyrolactone (GBL, transformé en GHB par une lactonase périphérique) ne modifie pas la synthèse de dopamine alors que celle-ci est augmentée chez les souris sauvages. Il semble donc qu'à fortes doses, le GHB n'exerce ses effets uniquement par une stimulation sélective des récepteurs GABA-B.

Dans ce domaine, le modèle que nous proposons pour l'action physiologique et pharmacologique du GHB d'une part, et les résultats présentés dans notre travail de thèse, permettent de moduler cette opinion et de contribuer à dégager la part qui revient en propre au système GHB dans l'action pharmacologique de cette substance. Cette part est distincte mais intimement liée au fonctionnement du système GABA cérébral endogène, en particulier aux récepteurs GABA-A et GABA-B.

Un premier problème provient de l'hétérogénéité des affinités du GHB pour les récepteurs GABA-B, mesurées pour des préparations cellulaires exprimant le GABA-B natif ou transfecté dans des cellules hétérologues. Ces affinités sont dans un rapport de 1 à 30 selon les expériences décrites. Il est possible que le GHB ne soit pas le réel ligand GABA-B supposé, mais que le GHB présent soit le précurseur (Vayer et al., 1985a) ou un facteur déclenchant pour la libération d'un compartiment de GABA qui serait l'élément, produit en quantités variables selon les conditions expérimentales, sollicitant des récepteurs GABA-B dont les effets seraient bloqués par les antagonistes GABA-B. Ceci expliquerait les affinités variables mesurées du GHB pour les récepteurs GABA-B (Hechler et al., 1997).

Toujours en accord avec le modèle proposé, on peut noter que le principal ligand spécifique GABA-B, agoniste de référence (p-chlorophényl GABA ou baclofen), ne possède ni les strictes propriétés pharmacologiques, ni les indications thérapeutiques du GHB. Le baclofen est un myorelaxant, sédatif et légèrement anxiolytique, qui a été proposé dans le sevrage alcoolique. Il ne possède ni les propriétés anesthésiques, hypnotiques, récréatives et addictives du GHB. Il est donc difficile de penser que le GHB est un ligand GABA-B spécifique, qui ne produirait ses effets à fortes doses que par une action de faible affinité avec les récepteurs correspondants. Depuis l'identification par Hill et Bowery (Hill and Bowery, 1981) des sites de binding GABA-B et leur clonage par Bettler et collaborateurs (Kaupmann et al., 1997), un grand nombre de ligand GABA-B ont été synthétisés (en particulier toute une série de dérivés phosphoniques de haute affinité), sans qu'aucun n'ait trouvé à ce jour une indication en thérapeutique, en particulier pour remplacer le GHB (Vacher and Bettler, 2003). Celui-ci, comme ligand naturel, est très vite métabolisé et son usage en thérapeutique nécessite des posologies élevées, peu maniables. Malgré tout, il n'a pas été remplacé à ce jour.

Au contraire, certains des travaux non publiés de notre laboratoire (en collaboration avec l'Université de Chicago) ont permis de tester sur le sommeil du rat un petit nombre de ligands de haute affinité, spécifiques des sites de binding GHB et sans rapport avec les sites GABA-B. La plupart de ces ligands entraînaient chez l'animal un sommeil lent profond du type de celui induit par le GHB, mais à posologie plus faible. Pour le moment, le caractère encore limité des connaissances sur le système GHB cérébral et la confusion avec le système GABA-B n'a pas permis le développement plus approfondi de ces substances.

Pour ce qui concerne les souris GABA-B B1^{-/-} qui ne réagissent plus au GHB à doses pharmacologiques (Kaupmann et al., 2003), seuls certains effets sur la sédation, l'EEG, la température corporelle de l'animal et l'activité de synthèse de dopamine ont été testés. Ces effets peuvent effectivement être dus à la composante GABA-B du mécanisme d'action du GHB à fortes doses car reproductible par l'administration de baclofen à des animaux normaux. Par contre, les effets anesthésiques, hypnotiques et récompensants du GHB sur ces animaux n'ont pas été testés et pourraient appartenir à la composante proprement GHB du mécanisme d'action de cette substance, passant par ses récepteurs spécifiques. Dans un autre domaine, les souris qui n'expriment plus de récepteurs GABA-B depuis leur développement cérébral jusqu'à l'âge adulte possèdent probablement un système GABAergique remanié, sans limitation exclusive de ces remaniements au système GABA. Les récepteurs GABA-B sont des entités moléculaires jouant un rôle fondamental dans le fonctionnement du système

GABA, mais également dans de nombreux autres systèmes neurotransmetteurs. Il est donc difficile d'attribuer à la seule perte de fonction GABA-B la disparition de certains des effets neuropharmacologiques du GHB, bien que les sites de binding GHB soient apparemment préservés, tout au moins quant à leur aptitude à fixer leur ligand de référence.

Finalement, notre modèle prévoit un fonctionnement de certaines synapses GABA du SNC sous le contrôle d'un système étroitement associé et dépendant du système GABA, ayant le GHB comme molécule signal. La saturation de ce système le désensibilise et libère l'activité GABA globale (GABA-A + GABA-B) avec une interaction directe sur les récepteurs GABA-B. Cette dualité d'action, la distribution spécifique de ce système dans le cerveau font qu'il exprime des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles spécifiques qui n'ont été reproduites par aucun ligand GABAergique connu actuellement. L'intérêt thérapeutique de la modélisation de ligands synthétiques ayant une double affinité d'agonistes GHB + GABA-B semble évident dans le futur.

Mais le présent travail permet d'aller un peu plus loin que le modèle précédent qui décrit des interactions fonctionnelles à court terme, purement métabolomiques, à la suite de l'administration de doses thérapeutiques ou récréatives de GHB. Une substance naturelle comme le GHB, possédant de fortes propriétés neuromodulatrices et allumant tout un panel de réponses cellulaires via des récepteurs spécifiques, régule fort probablement l'expression d'une série de gènes selon une distribution inégale dans le cerveau. Les études de ces modifications ont plusieurs intérêts. Tout d'abord montrer que le mécanisme d'action du GHB ne se réduit pas à la stimulation de quelques récepteurs pour des neurotransmetteurs connus avec des conséquences plus ou moins importantes pour la libération de ces transmetteurs, pour les polarisations membranaires et pour l'excitabilité neuronale. En second lieu, il est important de mettre en évidence la « signature » du remaniement de l'expression génétique que peut induire le GHB au moment de son effet pharmacologique maximal, de façon à pouvoir comparer les similitudes ou les différences existant entre des substances apparentées, mais ayant des indications différentes en clinique humaine. En troisième lieu, la modification inattendue de l'expression de certains gènes dans certaines régions cérébrales peut permettre d'orienter les recherches ultérieures sur un mécanisme métabolomique ou de transduction du signal, ou même de régulation transcriptionnelle qui n'avait pas été soupçonné dans un premier temps. De nouvelles pistes pharmacologiques peuvent ainsi être mises en évidence.

Partant de ces hypothèses, nous voulions éviter une description purement phénoménologique des événements concernant le remaniement du transcriptome cérébral après GHB et explorer, autant que possible, certains aspects mécanistiques. Compte tenu des données concernant certains analogues structuraux du GHB, tous d'origine synthétique (butyrate, phénylbutyrate, valproate), concernant leur aptitude à moduler la transcription du génome par remaniement de la compaction de la chromatine, nous avons pensé qu'à doses thérapeutiques le GHB (gamma-hydroxybutyrate) pouvait avoir des propriétés similaires. En effet, les produits synthétiques précédents sont tous connus comme étant des inhibiteurs de faible affinité de la famille des histones déacétylases (HDAC) cérébrales, donc agissant significativement à doses assez élevées. Nous avons donc montré sans équivoque qu'à doses anesthésique et hypnotique, le GHB induisait au moment de son action pharmacologique maximum, une hyperacétylation des histones H3, selon une distribution hétérogène dans le cerveau. Cette démonstration a été réalisée à la fois par western blot et immunocytochimie quantitative. Cet effet est dû à une inhibition de l'activité HDAC cérébrale totale, sans que l'on sache si cela concerne tout ou partie des isoformes. *In vitro*, le GHB inhibe les HDAC d'un extrait cérébral total de rat avec une IC_{50} d'environ 1,5 mM, or cette concentration de GHB est atteinte dans le cerveau du rat ou dans le plasma de patients traités avec des doses thérapeutiques de GHB. Cet effet du GHB sur des modifications post-traductionnelles affectant les histones H3 doit avoir des conséquences quant à son mode d'action, on sait en effet qu'une décompaction de la chromatine remanie le transcriptome et donc le phénotype protéique des cellules (ici neurones ou cellules gliales), leur conférant pendant quelques heures des propriétés particulières. Le problème fondamental ici est de savoir si, de façon naturelle et dans certaines cellules, les taux nucléaires de GHB peuvent être suffisants pour moduler la lecture du génome. Dans ce cas, le GHB serait le premier inhibiteur naturel de HDAC décrit à ce jour, ayant une importance dans la modulation de phénomènes épigénétiques. Nos expériences préliminaires, qui seraient à compléter en culture de cellules et autoradiographie, montrent que des noyaux isolés de cellules cérébrales sont perméables au GHB.

Ces modifications dans la microarchitecture de la chromatine, induites par des concentrations thérapeutiques de GHB, laissent suggérer un important remaniement dans l'expression de nombreux gènes. A cet égard, des résultats expérimentaux semblent indiquer des effets bénéfiques de certains inhibiteurs de HDAC (utilisables *in vivo*) dans la différenciation cellulaire, l'apoptose, certaines maladies mentales et neurodégénératives, dans l'addiction à certaines drogues. L'ensemble de ces propriétés nous ont conduits à étudier le remaniement du transcriptome cérébral (dans l'hippocampe et le cortex frontal plus particulièrement) au

niveau du cerveau de rat, dont les fonctionnalités avaient été modifiées par des doses thérapeutiques de GHB. L'idée principale était de recueillir d'éventuelles pistes mécanistiques pour les effets du GHB, l'hypothèse GABA-B nous semblant une approximation très simplificatrice et très réductrice. Nous avons pu montrer, bien que n'ayant pu avoir la possibilité de réaliser des effets/doses ou des comparaisons avec des agonistes/antagonistes GABA-B spécifiques, qu'une simple administration d'une dose hypnotique de GHB provoquait des modifications majeures dans l'expression du génome cérébral. Plus de 200 gènes dans les deux structures cérébrales étudiées voient leur expression significativement modifiée. Parmi ceux-ci, plusieurs gènes codant pour des récepteurs de neurotransmetteurs (en particulier GABA et dopamine) et pour des canaux ioniques, mais aussi plusieurs gènes dont les produits régulent les phénomènes de transcription en général.

Le nombre de pistes moléculaires suggérées ou dévoilées par l'étude précédente est très important et met en lumière la complexité du remaniement phénotypique transitoire que subit le SNC à la suite de la stimulation GHB massive. Un mécanisme univoque décrivant la pluralité des cibles modifiées, s'il existe, ne sera pas simple à caricaturer ou à schématiser. Néanmoins, ces études sont intéressantes parce qu'elles peuvent contribuer à mettre en place des choses utiles, sur le plan pharmacologique, thérapeutique et médical.

Ainsi parmi la panoplie apparemment disparate des gènes modifiés par le GHB, nous avons remarqué une série de gènes codant pour des protéines chaperonnes ou des protéases membranaires (métalloprotéases, endoprotéases). Ces dernières enzymes participent à de nombreuses fonctions cellulaires (signalisation, maturation par protéolyse, élimination de dépôts ou de peptides délétères...etc.). A cet égard, les métalloprotéinases de type néprilysine ont été impliquées dans l'élimination des peptides A β et des plaques amyloïdes dans des modèles transgéniques de maladie d'Alzheimer (Carter et al., 2006; Ciaccio et al., 2009; El-Amouri et al., 2007). La controverse sur les plaques séniles, cause ou conséquence des phénomènes conduisant à la neurodégénérescence, n'est pas close mais la majorité des auteurs pensent que les peptides β amyloïdes (particulièrement le 1-42 A β , plus hydrophobe) sont neurotoxiques. Un grand nombre de stratégies, vaccinales ou médicamenteuses, sont et ont été testées pour favoriser l'élimination de ces peptides du cerveau à un stade précoce de la maladie, avant l'apparition de lésions neuronales ou synaptiques irréversibles qui sont à l'origine de la symptomatologie.

L'induction par le GHB à doses thérapeutiques d'une augmentation de la transcription du gène néprilysine, au moins dans les régions cérébrales explorées, nous a conduits à vérifier

chez l'animal la réalité de l'augmentation de la protéine enzymatique et de l'activité correspondante. Nous avons montré que, à la suite d'une dose de GHB d'environ 250 μ moles de GHB- Na^+ administrée par voie intra-gastrique chez une souris de 20 g, le messager et la protéine néprilysine étaient augmentés significativement dans l'hippocampe et le cortex frontal des animaux traités par rapport à des témoins. Cette augmentation démarrait environ 30 minutes après l'ingestion du GHB et durait plus de deux heures. Il était légitime de se demander si le traitement chronique de mutants APP (APPSWE) produisant des peptides A β en abondance, pouvait améliorer l'élimination de ces peptides délétères et réduire l'apparition des plaques séniles qui se constituent à partir du 8^{ème} mois dans le cerveau de l'animal transgénique. Pour ce faire, nous avons choisi un traitement chronique par le GHB absorbé avec l'eau de boisson. La thérapeutique per os ayant fait ses preuves chez l'homme, bien sûr dans d'autres indications que les protéinopathies, il semblait plus séduisant de valider la prise de la drogue par voie orale plutôt que de recourir à des injections multiples et répétées, dangereuses pour la survie de l'animal à long terme. Des essais de tolérance ont été entrepris au préalable chez des animaux témoins et un cocktail fait de 1,66 % GHB + 4 % sucrose a été retenu. Le poids des animaux et leur consommation liquidienne par individu ont été mesurés chaque jour. La durée du traitement a été fixée arbitrairement à 5 semaines et a été entreprise chez des animaux âgés de 5 mois. L'objectif, dans un premier temps, était de ralentir la constitution des plaques séniles et des lésions neurodégénératives irréversibles, contemporaines des troubles mnésiques et cognitifs que l'on peut mettre en évidence chez ces animaux à un âge plus avancé. Toutes ces expériences ont été réalisées avec comme groupe témoin, des souris transgéniques identiques aux animaux traités, mais recevant uniquement de l'eau sucrée comme boisson (4 % de sucrose).

Dans les conditions expérimentales que nous avons choisies, nous avons pu calculer que chaque animal du groupe « traité » ingérait en moyenne 300 μ moles de GHB par 24 heures. A la fin des 5 semaines de traitement, une série d'expériences de western blot et d'immunocytochimie quantitative a pu montrer que la clairance des peptides β amyloïdes (1-40 et 1-42) avait été nettement augmentée chez les souris traitées, ce qui se traduisait par un taux de peptides résiduels réduit par rapport aux témoins, dans l'hippocampe en particulier. Néanmoins, compte tenu du jeune âge des souris et de l'absence de détérioration des performances mnésiques chez les animaux contrôles, une amélioration éventuelle chez les souris traitées n'a pu être mise en évidence.

A ce stade de notre étude, plusieurs informations et stratégies pour l'avenir sont à prendre en compte :

1. Le GHB, substance naturelle endogène, régule à doses pharmacologiques les taux de peptides A β cérébraux. La question que l'on peut poser concerne le rôle du GHB endogène sur la régulation de l'expression du gène néprilysine et d'autres protéases qui possèdent de nombreuses fonctions dans l'économie cellulaire. Est-ce que les taux de GHB endogène peuvent atteindre des concentrations suffisantes pour avoir un rôle dans ce domaine ? quelles sont les mécanismes de l'induction de ces gènes ?
2. En criblant des substances analogues au GHB ou possédant des propriétés GHB-mimétiques, est-il possible de sélectionner des substances synthétiques plus actives, agissant à doses plus faibles et selon une meilleure pharmacocinétique ?
3. Quelles pourraient être le ou les rôles du GHB dans d'autres maladies dégénératives avec protéinopathie ?
4. L'action du GHB à long terme peut-il améliorer les performances cognitives et mnésiques des souris malades ?
5. Est-il légitime et possible de tester le GHB chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer à un stade précoce, sachant que ces malades présentent souvent des troubles du sommeil, indication pour laquelle l'usage du GHB est validé en clinique humaine ?

Plus généralement, nos expériences montrent que les cibles mis en jeu en potentialisant le système endogène GHB cérébral semblent loin de se résumer à une simple stimulation des récepteurs GABA-B. Certes, ces derniers récepteurs ont certainement un rôle important à jouer dans la médiation des effets du GHB à fortes doses, mais ils ne résument pas les mécanismes d'action du gamma-hydroxybutyrate qui apparaissent beaucoup plus complexes et qui régulent des fonctions cérébrales multiples et variées, à court et moyen terme de leurs actions pharmacologiques spécifiques en thérapeutique.

Références

- Aasland, R., and Stewart, A. F. (1995). The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res* 23, 3168-3173.
- Aasland, R., Stewart, A. F., and Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci* 21, 87-88.
- Adelsberger, H., Brunswieck, S., and Dudel, J. (1998). Modulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on a GABA(A) receptor from crayfish muscle. *Eur J Pharmacol* 350, 317-323.
- Andriamampandry, C., Taleb, O., Kemmel, V., Humbert, J. P., Aunis, D., and Maitre, M. (2007). Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J* 21, 885-895.
- Andriamampandry, C., Taleb, O., Viry, S., Muller, C., Humbert, J. P., Gobaille, S., Aunis, D., and Maitre, M. (2003). Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB). *FASEB J* 17, 1691-1693.
- Armstrong, J. A., and Emerson, B. M. (1998). Transcription of chromatin: these are complex times. *Curr Opin Genet Dev* 8, 165-172.
- Arts, J., Angibaud, P., Marien, A., Floren, W., Janssens, B., King, P., van Dun, J., Janssen, L., Geerts, T., Tuman, R. W., *et al.* (2007). R306465 is a novel potent inhibitor of class I histone deacetylases with broad-spectrum antitumoral activity against solid and haematological malignancies. *Br J Cancer* 97, 1344-1353.
- Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R. A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P. P., and Kundu, T. K. (2004a). Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. *J Biol Chem* 279, 33716-33726.
- Balasubramanyam, K., Varier, R. A., Altaf, M., Swaminathan, V., Siddappa, N. B., Ranga, U., and Kundu, T. K. (2004b). Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* 279, 51163-51171.
- Bannister, A. J., Miska, E. A., Gorlich, D., and Kouzarides, T. (2000). Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol* 10, 467-470.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., *et al.* (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916-919.
- Basaki, Y., Chikahisa, L., Aoyagi, K., Miyadera, K., Yonekura, K., Hashimoto, A., Okabe, S., Wierzba, K., and Yamada, Y. (2001). gamma-Hydroxybutyric acid and 5-fluorouracil, metabolites of UFT, inhibit the angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 4, 163-173.
- Behr, D. (2008). Gamma-secretase modulation and its promise for Alzheimer's disease: a rationale for drug discovery. *Curr Top Med Chem* 8, 34-37.
- Benavides, J., Rumigny, J. F., Bourguignon, J. J., Cash, C., Wermuth, C. G., Mandel, P., Vincendon, G., and Maitre, M. (1982a). High affinity binding sites for gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci* 30, 953-961.

- Benavides, J., Rumigny, J. F., Bourguignon, J. J., Wermuth, C. G., Mandel, P., and Maitre, M. (1982b). A high-affinity, Na⁺-dependent uptake system for gamma-hydroxybutyrate in membrane vesicles prepared from rat brain. *J Neurochem* *38*, 1570-1575.
- Berton, F., Brancucci, A., Beghe, F., Cammalleri, M., Demuro, A., Francesconi, W., and Gessa, G. L. (1999). Gamma-Hydroxybutyrate inhibits excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* *380*, 109-116.
- Bertos, N. R., Wang, A. H., and Yang, X. J. (2001). Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol* *79*, 243-252.
- Bourguignon, J. J., Schoenfelder, A., Schmitt, M., Wermuth, C. G., Hechler, V., Charlier, B., and Maitre, M. (1988). Analogues of gamma-hydroxybutyric acid. Synthesis and binding studies. *J Med Chem* *31*, 893-897.
- Boutajangout, A., Authelet, M., Blanchard, V., Touchet, N., Tremp, G., Pradier, L., and Brion, J. P. (2004). Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis* *15*, 47-60.
- Brancucci, A., Berretta, N., Mercuri, N. B., and Francesconi, W. (2004). Presynaptic modulation of spontaneous inhibitory postsynaptic currents by gamma-hydroxybutyrate in the substantia nigra pars compacta. *Neuropsychopharmacology* *29*, 537-543.
- Broide, R. S., Redwine, J. M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F. E., and Winrow, C. J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci* *31*, 47-58.
- Broughton, R., and Mamelak, M. (1979). The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci* *6*, 1-6.
- Buggy, J. J., Sideris, M. L., Mak, P., Lorimer, D. D., McIntosh, B., and Clark, J. M. (2000). Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J* *350 Pt 1*, 199-205.
- Carson, J. A., and Turner, A. J. (2002). Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metalloproteinases? *J Neurochem* *81*, 1-8.
- Carter, L. P., Flores, L. R., Wu, H., Chen, W., Unzeitig, A. W., Coop, A., and France, C. P. (2003). The role of GABAB receptors in the discriminative stimulus effects of gamma-hydroxybutyrate in rats: time course and antagonism studies. *J Pharmacol Exp Ther* *305*, 668-674.
- Carter, L. P., Koek, W., and France, C. P. (2009). Behavioral analyses of GHB: receptor mechanisms. *Pharmacol Ther* *121*, 100-114.
- Carter, T.L., Pedrini, S., Ghiso, J., Ehrlich, M.E., and Gandy, S. (2006). Brain neprilysin activity and susceptibility to transgene-induced Alzheimer amyloidosis. *Neurosci Lett* *392*, 235-239.
- Cash, C. D., Hechler, V., Mersel, M., and Maitre, M. (1996). Kinetic characterisation and solubilisation of gamma-hydroxybutyrate receptors from rat brain. *Neurosci Lett* *209*, 25-28.
- Castelli, M. P. (2008). Multi-faceted aspects of gamma-hydroxybutyric acid: a neurotransmitter, therapeutic agent and drug of abuse. *Mini Rev Med Chem* *8*, 1188-1202.
- Castelli, M. P., Mocchi, I., Langlois, X., Gommerendagger, W., Luyten, W. H., Leysen, J. E., and Gessa, G. L. (2000). Quantitative autoradiographic distribution of gamma-hydroxybutyric acid binding sites in human and monkey brain. *Brain Res Mol Brain Res* *78*, 91-99.
- Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F. J., Huang, C. L., and Bading, H. (2003). Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem* *85*, 151-159.
- Ciaccio, C., Tundo, G.R., Grasso, G., Spoto, G., Marasco, D., Ruvo, M., Gioia, M., Rizzarelli, E., and Coletta, M. (2009). Somatostatin: a novel substrate and a modulator of insulin-degrading enzyme activity. *J Mol Biol* *385*, 1556-1567.

- Colombo, G., Agabio, R., Balaklievskaia, N., Diaz, G., Lobina, C., Reali, R., and Gessa, G. L. (1995). Oral self-administration of gamma-hydroxybutyric acid in the rat. *Eur J Pharmacol* 285, 103-107.
- Colombo, G., Agabio, R., Lobina, C., Reali, R., and Gessa, G. L. (1998). Involvement of GABA(A) and GABA(B) receptors in the mediation of discriminative stimulus effects of gamma-hydroxybutyric acid. *Physiol Behav* 64, 293-302.
- Cosgrove, M. S., and Wolberger, C. (2005). How does the histone code work ? *Biochem Cell Biol* 83, 468-476.
- Costa, C., Leone, G., Saulle, E., Pisani, F., Bernardi, G., and Calabresi, P. (2004). Coactivation of GABA(A) and GABA(B) receptor results in neuroprotection during in vitro ischemia. *Stroke* 35, 596-600.
- Cress, W. D., and Seto, E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 184, 1-16.
- Cruz, H. G., Ivanova, T., Lunn, M. L., Stoffel, M., Slesinger, P. A., and Luscher, C. (2004). Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nat Neurosci* 7, 153-159.
- Davie, J. R. (1998). Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev* 8, 173-178.
- Davie, J. R., and Chadee, D. N. (1998). Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 203-213.
- Davie, J. R., and Spencer, V. A. (1999). Control of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* 32-33, 141-148.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370, 737-749.
- Diana, M., Mereu, G., Mura, A., Fadda, F., Passino, N., and Gessa, G. (1991). Low doses of gamma-hydroxybutyric acid stimulate the firing rate of dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res* 566, 208-211.
- Dodel, R. C., Hampel, H., and Du, Y. (2003). Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2, 215-220.
- Doherty, J. D., Hattox, S. E., Snead, O. C., and Roth, R. H. (1978). Identification of endogenous gamma-hydroxybutyrate in human and bovine brain and its regional distribution in human, guinea pig and rhesus monkey brain. *J Pharmacol Exp Ther* 207, 130-139.
- Dokmanovic, M., Clarke, C., and Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 5, 981-989.
- Dokmanovic, M., and Marks, P. A. (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 96, 293-304.
- Ehrhardt, J. D., Vayer, P., and Maitre, M. (1988). A rapid and sensitive method for the determination of gamma-hydroxybutyric acid and trans-gamma-hydroxycrotonic acid in rat brain tissue by gas chromatography/mass spectrometry with negative ion detection. *Biomed Environ Mass Spectrom* 15, 521-524.
- El-Amouri, S.S., Zhu, H., Yu, J., Gage, F.H., Verma, I.M., and Kindy, M.S. (2007). Neprilysin protects neurons against Abeta peptide toxicity. *Brain Res* 1152, 191-200.
- Eli, M., and Cattabeni, F. (1983). Endogenous gamma-hydroxybutyrate in rat brain areas: postmortem changes and effects of drugs interfering with gamma-aminobutyric acid metabolism. *J Neurochem* 41, 524-530.

- Facchetti, F., Previdi, S., Ballarini, M., Minucci, S., Perego, P., and La Porta, C. A. (2004). Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 9, 573-582.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., *et al.* (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-2117.
- Finder, V. H., and Glockshuber, R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis* 4, 13-27.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 172-183.
- Forsberg, E. C., and Bresnick, E. H. (2001). Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays* 23, 820-830.
- Frankowska, M., Filip, M., and Przegalinski, E. (2007). Effects of GABAB receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. *Pharmacol Rep* 59, 645-655.
- Gabor, R., Regunathan, S., and Sourkes, T. L. (1989). Central regulation of adrenal tyrosine hydroxylase: interaction between dopamine and GABA systems. *Neuropharmacology* 28, 521-527.
- Galasinski, S. C., Resing, K. A., Goodrich, J. A., and Ahn, N. G. (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem* 277, 19618-19626.
- Gallimberti, L., Canton, G., Gentile, N., Ferri, M., Cibin, M., Ferrara, S. D., Fadda, F., and Gessa, G. L. (1989). Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of alcohol withdrawal syndrome. *Lancet* 2, 787-789.
- Gao, B., Kilic, E., Baumann, C. R., Hermann, D. M., and Bassetti, C. L. (2008). Gamma-hydroxybutyrate accelerates functional recovery after focal cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 26, 413-419.
- Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277, 25748-25755.
- Gavello-Baudy, S., Le Merrer, J., Decorte, L., David, V., and Cazala, P. (2008). Self-administration of the GABAA agonist muscimol into the medial septum: dependence on dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 201, 219-228.
- Gelinas, D. S., DaSilva, K., Fenili, D., St George-Hyslop, P., and McLaurin, J. (2004). Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14657-14662.
- Ghorbel, M. T., Becker, K. G., and Henley, J. M. (2005). Profile of changes in gene expression in cultured hippocampal neurones evoked by the GABAB receptor agonist baclofen. *Physiol Genomics* 22, 93-98.
- Gobaille, S., Hechler, V., Andriamampandry, C., Kemmel, V., and Maitre, M. (1999). Gamma-Hydroxybutyrate modulates synthesis and extracellular concentration of gamma-aminobutyric acid in discrete rat brain regions in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 290, 303-309.
- Godschalk, M., Dzoljic, M. R., and Bonta, I. L. (1977). Slow wave sleep and a state resembling absence epilepsy induced in the rat by gamma-hydroxybutyrate. *Eur J Pharmacol* 44, 105-111.
- Goll, M. G., and Bestor, T. H. (2002). Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev* 16, 1739-1742.
- Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R. M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293, 1491-1495.
- Grant, P. A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biol* 2, REVIEWS0003.

- Gregory, P. D., Wagner, K., and Horz, W. (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res* 265, 195-202.
- Gupta, M., Greven, R., Jansen, E. E., Jakobs, C., Hogema, B. M., Froestl, W., Snead, O. C., Bartels, H., Grompe, M., and Gibson, K. M. (2002). Therapeutic intervention in mice deficient for succinate semialdehyde dehydrogenase (gamma-hydroxybutyric aciduria). *J Pharmacol Exp Ther* 302, 180-187.
- Hansen, J. C., Tse, C., and Wolffe, A. P. (1998). Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37, 17637-17641.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harris, N. C., Webb, C., and Greenfield, S. A. (1989). The effects of gamma-hydroxybutyrate on the membrane properties of guinea-pig pars compacta neurons in the substantia nigra in vitro. *Neuroscience* 31, 363-370.
- Hechler, V., Gobaille, S., and Maitre, M. (1989). Localization studies of gamma-hydroxybutyrate receptors in rat striatum and hippocampus. *Brain Res Bull* 23, 129-135.
- Hechler, V., Ratomponirina, C., and Maitre, M. (1997). Gamma-hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacement of GABAB binding that is blocked by valproate and ethosuximide. *J Pharmacol Exp Ther* 281, 753-760.
- Hechler, V., Schmitt, M., Bourguignon, J. J., and Maitre, M. (1990). Trans-gamma-hydroxycrotonic acid binding sites in brain: evidence for a subpopulation of gamma-hydroxybutyrate sites. *Neurosci Lett* 110, 204-209.
- Hechler, V., Weissmann, D., Mach, E., Pujol, J.F., and Maitre, M. (1987). Regional distribution of high-affinity gamma-[³H]hydroxybutyrate binding sites as determined by quantitative autoradiography. *J Neurochem* 49, 1025-1032.
- Hedou, G., Chasserot-Golaz, S., Kemmel, V., Gobaille, S., Roussel, G., Artault, J. C., Andriamampandry, C., Aunis, D., and Maitre, M. (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. *J Comp Neurol* 426, 549-560.
- Hernandez, F., and Avila, J. (2007). Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64, 2219-2233.
- Hill, D.R., and Bowery, N.G. (1981). ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature* 290, 149-152.
- Hrzenjak, A., Moinfar, F., Kremser, M. L., Strohmeier, B., Staber, P. B., Zatloukal, K., and Denk, H. (2006). Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther* 5, 2203-2210.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilson, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.
- Hu, R.Q., Banerjee, P.K., and Snead, O.C., 3rd (2000). Regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) release in cerebral cortex in the gamma-hydroxybutyric acid (GHB) model of absence seizures in rat. *Neuropharmacology* 39, 427-439.
- Husain, A. M., Ristanovic, R. K., and Bogan, R. K. (2008). Weight loss in narcolepsy patients treated with sodium oxybate. *Sleep Med*.
- Iijima, K., and Iijima-Ando, K. (2008). Drosophila models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42. *J Alzheimers Dis* 15, 523-540.

- Ikeda, K., Steger, D. J., Eberharter, A., and Workman, J. L. (1999). Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* *19*, 855-863.
- Iwata, N., Higuchi, M., and Saido, T. C. (2005). Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* *108*, 129-148.
- Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Ozawa, K., and Saido, T. C. (2004). Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* *24*, 991-998.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. J., and Saido, T. C. (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* *292*, 1550-1552.
- Iwatsubo, T. (1998). A beta 42, presenilins, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* *19*, S11-13.
- Iwatsubo, T., Hasegawa, M., and Ihara, Y. (1994). Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics. *Acta Neuropathol* *88*, 129-136.
- Iwatsubo, T., Mann, D. M., Odaka, A., Suzuki, N., and Ihara, Y. (1995). Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann Neurol* *37*, 294-299.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.
- Johnson, V. E., Stewart, W., Stewart, J. E., Graham, D. I., Praestgaard, A. H., and Smith, D. H. (2009). A Neprilysin Polymorphism and Amyloid-beta Plaques Following Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*.
- Kamei, Y., Yuba, S., Nakayama, T., and Yoneda, Y. (1999). Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* *47*, 363-372.
- Kaufman, E. E., and Nelson, T. (1991). An overview of gamma-hydroxybutyrate catabolism: the role of the cytosolic NADP⁽⁺⁾-dependent oxidoreductase EC 1.1.1.19 and of a mitochondrial hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase in the initial, rate-limiting step in this pathway. *Neurochem Res* *16*, 965-974.
- Kaufman, E. E., Porrino, L. J., and Nelson, T. (1990). Pyretic action of low doses of gamma-hydroxybutyrate in rats. *Biochem Pharmacol* *40*, 2637-2640.
- Kaupmann, K., Cryan, J. F., Wellendorph, P., Mombereau, C., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Froestl, W., van der Putten, H., Mosbacher, J., *et al.* (2003). Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice. *Eur J Neurosci* *18*, 2722-2730.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., and Bettler, B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* *386*, 239-246.
- Kemmel, V., Taleb, O., Andriamampandry, C., Aunis, D., and Maitre, M. (2003). Gamma-hydroxybutyrate receptor function determined by stimulation of rubidium and calcium movements from NCB-20 neurons. *Neuroscience* *116*, 1021-1031.
- Kemmel, V., Taleb, O., Perard, A., Andriamampandry, C., Siffert, J. C., Mark, J., and Maitre, M. (1998). Neurochemical and electrophysiological evidence for the existence of a functional gamma-hydroxybutyrate system in NCB-20 neurons. *Neuroscience* *86*, 989-1000.
- Kim, H. J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J. S., Chen, P. S., and Chuang, D. M. (2007). Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* *321*, 892-901.

- Kim, S. Y., Anderson, I. B., Dyer, J. E., Barker, J. C., and Blanc, P. D. (2007). High-risk behaviors and hospitalizations among gamma hydroxybutyrate (GHB) users. *Am J Drug Alcohol Abuse* 33, 429-438.
- Kleinschmidt, S., Grundmann, U., Janneck, U., Kreienmeyer, J., Kulosa, R., and Larsen, R. (1997). Total intravenous anaesthesia using propofol, gamma-hydroxybutyrate or midazolam in combination with sufentanil for patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Eur J Anaesthesiol* 14, 590-599.
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-294.
- Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 9, 40-48.
- Ladera, C., del Carmen Godino, M., Jose Cabanero, M., Torres, M., Watanabe, M., Lujan, R., and Sanchez-Prieto, J. (2008). Pre-synaptic GABA receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 107, 1506-1517.
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., *et al.* (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6448-6453.
- Lau, O. D., Kundu, T. K., Soccio, R. E., Ait-Si-Ali, S., Khalil, E. M., Vassilev, A., Wolffe, A. P., Nakatani, Y., Roeder, R. G., and Cole, P. A. (2000). HATs off: selective synthetic inhibitors of the histone acetyltransferases p300 and PCAF. *Mol Cell* 5, 589-595.
- LeBeau, M. A., Montgomery, M. A., Morris-Kukoski, C., Schaff, J. E., Deakin, A., and Levine, B. (2006). A comprehensive study on the variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB). *J Anal Toxicol* 30, 98-105.
- Ledent, V., and Vervoort, M. (2006). Comparative genomics of the class 4 histone deacetylase family indicates a complex evolutionary history. *BMC Biol* 4, 24.
- Lee, K. K., and Workman, J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 284-295.
- Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M. P., and Selkoe, D. J. (2003a). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40, 1087-1093.
- Leissring, M. A., Lu, A., Condron, M. M., Teplow, D. B., Stein, R. L., Farris, W., and Selkoe, D. J. (2003b). Kinetics of amyloid beta-protein degradation determined by novel fluorescence- and fluorescence polarization-based assays. *J Biol Chem* 278, 37314-37320.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., *et al.* (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-1491.
- Lingenhoehl, K., Brom, R., Heid, J., Beck, P., Froestl, W., Kaupmann, K., Bettler, B., and Mosbacher, J. (1999). Gamma-hydroxybutyrate is a weak agonist at recombinant GABA(B) receptors. *Neuropharmacology* 38, 1667-1673.
- Liu, Z., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1999). Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) enhances ligand-dependent and receptor-dependent cell-free transcription of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9485-9490.
- Lobina, C., Agabio, R., Reali, R., Gessa, G. L., and Colombo, G. (1999). Contribution of GABA(A) and GABA(B) receptors to the discriminative stimulus produced by gamma-hydroxybutyric acid. *Pharmacol Biochem Behav* 64, 363-365.

- Lobina, C., Colombo, G., Orru, A., Maccioni, P., Gessa, G. L., and Carai, M. A. (2005). GHB-C rats: the control line of GHB-sensitive (GHB-S) and GHB-resistant (GHB-R) rats. *Brain Res Brain Res Protoc* *15*, 1-5.
- Lu, H., Pise-Masison, C. A., Linton, R., Park, H. U., Schiltz, R. L., Sartorelli, V., and Brady, J. N. (2004). Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* *78*, 6735-6743.
- Lyon, R. C., Johnston, S. M., Panopoulos, A., Alzeer, S., McGarvie, G., and Ellis, E. M. (2009). Enzymes involved in the metabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y cells: identification of an iron-dependent alcohol dehydrogenase ADHFe1. *Chem Biol Interact* *178*, 283-287.
- Lyon, R. C., Johnston, S. M., Watson, D. G., McGarvie, G., and Ellis, E. M. (2007). Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *J Biol Chem* *282*, 25986-25992.
- Maccioni, P., Fantini, N., Froestl, W., Carai, M. A., Gessa, G. L., and Colombo, G. (2008). Specific reduction of alcohol's motivational properties by the positive allosteric modulator of the GABAB receptor, GS39783--comparison with the effect of the GABAB receptor direct agonist, baclofen. *Alcohol Clin Exp Res* *32*, 1558-1564.
- Madden, T. E., and Johnson, S. W. (1998). Gamma-hydroxybutyrate is a GABAB receptor agonist that increases a potassium conductance in rat ventral tegmental dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* *287*, 261-265.
- Maitre, M. (1997). The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* *51*, 337-361.
- Maitre, M., Cash, C., Weissmann-Nanopoulos, D., and Mandel, P. (1983a). Depolarization-evoked release of gamma-hydroxybutyrate from rat brain slices. *J Neurochem* *41*, 287-290.
- Maitre, M., Rumigny, J. F., Cash, C., and Mandel, P. (1983b). Subcellular distribution of gamma-hydroxybutyrate binding sites in rat brain principal localization in the synaptosomal fraction. *Biochem Biophys Res Commun* *110*, 262-265.
- Malaspina, P., Picklo, M. J., Jakobs, C., Snead, O. C., and Gibson, K. M. (2009). Comparative genomics of aldehyde dehydrogenase 5a1 (succinate semialdehyde dehydrogenase) and accumulation of gamma-hydroxybutyrate associated with its deficiency. *Hum Genomics* *3*, 106-120.
- Mandel, P., Maitre, M., Vayer, P., and Hechler, V. (1987). Function of gamma-hydroxybutyrate: a putative neurotransmitter. *Biochem Soc Trans* *15*, 215-217.
- Mandelkow, E., von Bergen, M., Biernat, J., and Mandelkow, E. M. (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* *17*, 83-90.
- Marks, P., McGeehan, J., Wilson, G., Errington, N., and Kneale, G. (2003). Purification and characterisation of a novel DNA methyltransferase, M.AhdI. *Nucleic Acids Res* *31*, 2803-2810.
- Marks, P. A. (2004). The mechanism of the anti-tumor activity of the histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Cell Cycle* *3*, 534-535.
- Marks, P. A., and Jiang, X. (2005). Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle* *4*, 549-551.
- Marks, P. A., Richon, V. M., Miller, T., and Kelly, W. K. (2004). Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* *91*, 137-168.
- Marks, P. A., Richon, V. M., and Rifkind, R. A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* *92*, 1210-1216.

- Marr, R. A., Guan, H., Rockenstein, E., Kindy, M., Gage, F. H., Verma, I., Masliah, E., and Hersh, L. B. (2004). Neprilysin regulates amyloid Beta peptide levels. *J Mol Neurosci* 22, 5-11.
- Marr, R. A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M. S., Hersh, L. B., Gage, F. H., Verma, I. M., and Masliah, E. (2003). Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci* 23, 1992-1996.
- Mathivet, P., Bernasconi, R., De Barry, J., Marescaux, C., and Bittiger, H. (1997). Binding characteristics of gamma-hydroxybutyric acid as a weak but selective GABAB receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 321, 67-75.
- McCormick, S. J., and Tunnicliff, G. (1998). Inhibitors of synaptosomal gamma-hydroxybutyrate transport. *Pharmacology* 57, 124-131.
- Miska, E. A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S. J., Pines, J., and Kouzarides, T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *Embo J* 18, 5099-5107.
- Mohajeri, M. H., Wollmer, M. A., and Nitsch, R. M. (2002). A beta 42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J Biol Chem* 277, 35460-35465.
- Muller, C., Viry, S., Mieke, M., Andriamampandry, C., Aunis, D., and Maitre, M. (2002). Evidence for a gamma-hydroxybutyrate (GHB) uptake by rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* 80, 899-904.
- Navarro, J. F., Davila, G., Pedraza, C., and Arias, J. L. (2008). Anxiogenic-like effects of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in mice tested in the light-dark box. *Psicothema* 20, 460-464.
- Navarro, J. F., Pedraza, C., and Gonzalez, F. (2007). Acute and subchronic effects of gamma-hydroxybutyrate on isolation-induced aggression in male mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 29, 379-382.
- Nelson, T., Kaufman, E., Kline, J., and Sokoloff, L. (1981). The extraneural distribution of gamma-hydroxybutyrate. *J Neurochem* 37, 1345-1348.
- Nicholson, K. L., and Balster, R. L. (2001). GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend* 63, 1-22.
- Nissbrandt, H., and Engberg, G. (1996). The GABAB-receptor antagonist, CGP 35348, antagonises gamma-hydroxybutyrate- and baclofen-induced alterations in locomotor activity and forebrain dopamine levels in mice. *J Neural Transm* 103, 1255-1263.
- Ottani, A., Saltini, S., Bartiromo, M., Zaffe, D., Renzo Botticelli, A., Ferrari, A., Bertolini, A., and Genedani, S. (2003). Effect of gamma-hydroxybutyrate in two rat models of focal cerebral damage. *Brain Res* 986, 181-190.
- Pardi, D., and Black, J. (2006). gamma-Hydroxybutyrate/sodium oxybate: neurobiology, and impact on sleep and wakefulness. *CNS Drugs* 20, 993-1018.
- Parker, J. A., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H., and Neri, C. (2005). Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* 37, 349-350.
- Pazin, M. J., and Kadonaga, J. T. (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89, 325-328.
- Pedraza, C., Garcia, F. B., and Navarro, J. F. (2009). Neurotoxic effects induced by gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in male rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-13.
- Pennanen, L., Welzl, H., D'Adamo, P., Nitsch, R. M., and Gotz, J. (2004). Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 15, 500-509.
- Peretto, I., and La Porta, E. (2008). Gamma-secretase modulation and its promise for Alzheimer's disease: a medicinal chemistry perspective. *Curr Top Med Chem* 8, 38-46.

- Peterson, C. L., and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14, R546-551.
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. (1993). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13, 1676-1687.
- Poldrugo, F., and Snead, O. C., 3rd (1986). 1,4-Butanediol and ethanol compete for degradation in rat brain and liver in vitro. *Alcohol* 3, 367-370.
- Ratomponirina, C., Hode, Y., Hechler, V., and Maitre, M. (1995). gamma-Hydroxybutyrate receptor binding in rat brain is inhibited by guanyl nucleotides and pertussis toxin. *Neurosci Lett* 189, 51-53.
- Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A., and Marks, P. A. (1998). A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3003-3007.
- Robinson, D.M., and Keating, G.M. (2007). Sodium oxybate: a review of its use in the management of narcolepsy. *CNS Drugs* 21, 337-354.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.
- Rumigny, J. F., Cash, C., Mandel, P., Vincendon, G., and Maitre, M. (1981). Evidence that a specific succinic semialdehyde reductase is responsible for gamma-hydroxybutyrate synthesis in brain tissue slices. *FEBS Lett* 134, 96-98.
- Russell, I. J., Perkins, A. T., and Michalek, J. E. (2009). Sodium oxybate relieves pain and improves function in fibromyalgia syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. *Arthritis Rheum* 60, 299-309.
- Sadasivan, S., Maher, T. J., and Quang, L. S. (2006). Gamma-Hydroxybutyrate (GHB), gamma-butyrolactone (GBL), and 1,4-butanediol (1,4-BD) reduce the volume of cerebral infarction in rodent transient middle cerebral artery occlusion. *Ann N Y Acad Sci* 1074, 537-544.
- Sambucetti, L. C., Fischer, D. D., Zabudoff, S., Kwon, P. O., Chamberlin, H., Trogani, N., Xu, H., and Cohen, D. (1999). Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem* 274, 34940-34947.
- Schenk, D. (2002). Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci* 3, 824-828.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., *et al.* (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.
- Schneider, J. A., Arvanitakis, Z., Bang, W., and Bennett, D. A. (2007). Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology* 69, 2197-2204.
- Scolnick, D. M., Chehab, N. H., Stavridi, E. S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S. L., and Halazonetis, T. D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 57, 3693-3696.
- Selkoe, D. J. (2001). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32, 177-180.
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-791.
- Selkoe, D. J., and Podlisny, M. B. (2002). Deciphering the genetic basis of Alzheimer's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3, 67-99.
- Sengupta, N., and Seto, E. (2004). Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem* 93, 57-67.

- Snead, O. C., 3rd (1987). gamma-Hydroxybutyric acid in subcellular fractions of rat brain. *J Neurochem* 48, 196-201.
- Snead, O. C., 3rd (1994). The ontogeny of [3H]gamma-hydroxybutyrate and [3H]GABAB binding sites: relation to the development of experimental absence seizures. *Brain Res* 659, 147-156.
- Snead, O. C., 3rd (1996). Presynaptic GABAB-and gamma-hydroxybutyric acid-mediated mechanisms in generalized absence seizures. *Neuropharmacology* 35, 359-367.
- Snead, O. C., 3rd (2000). Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor. *J Neurochem* 75, 1986-1996.
- Snead, O. C., 3rd, and Liu, C. C. (1984). Gamma-hydroxybutyric acid binding sites in rat and human brain synaptosomal membranes. *Biochem Pharmacol* 33, 2587-2590.
- Stalder, M., Deller, T., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2001). 3D-Reconstruction of microglia and amyloid in APP23 transgenic mice: no evidence of intracellular amyloid. *Neurobiol Aging* 22, 427-434.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., *et al.* (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13287-13292.
- Thorpy, M. (2007). Therapeutic advances in narcolepsy. *Sleep Med* 8, 427-440.
- Tomita, A., Towatari, M., Tsuzuki, S., Hayakawa, F., Kosugi, H., Tamai, K., Miyazaki, T., Kinoshita, T., and Saito, H. (2000). c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* 19, 444-451.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., and Hansen, J. C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18, 4629-4638.
- Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836-845.
- Vacher, C. M., and Bettler, B. (2003). GABA(B) receptors as potential therapeutic targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2, 248-259.
- Van Cauter, E., Latta, F., Nedeltcheva, A., Spiegel, K., Leproult, R., Vandenbril, C., Weiss, R., Mockel, J., Legros, J. J., and Copinschi, G. (2004). Reciprocal interactions between the GH axis and sleep. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A, S10-17.
- van Nieuwenhuijzen, P. S., McGregor, I. S., and Hunt, G. E. (2009). The distribution of gamma-hydroxybutyrate-induced Fos expression in rat brain: Comparison with baclofen. *Neuroscience* 158, 441-455.
- Vayer, P., Cash, C. D., and Maitre, M. (1988). Is the anticonvulsant mechanism of valproate linked to its interaction with the cerebral gamma-hydroxybutyrate system? *Trends Pharmacol Sci* 9, 127-129.
- Vayer, P., Charlier, B., Mandel, P., and Maitre, M. (1987). Effect of anticonvulsant drugs on gamma-hydroxybutyrate release from hippocampal slices: inhibition by valproate and ethosuximide. *J Neurochem* 49, 1022-1024.
- Vayer, P., and Maitre, M. (1988). Regional differences in depolarization-induced release of gamma-hydroxybutyrate from rat brain slices. *Neurosci Lett* 87, 99-103.
- Vayer, P., Mandel, P., and Maitre, M. (1985). Conversion of gamma-hydroxybutyrate to gamma-aminobutyrate in vitro. *J Neurochem* 45, 810-814.
- Vayer, P., Mandel, P., and Maitre, M. (1987). Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci* 41, 1547-1557.

- Vayer, P., Schmitt, M., Bourguignon, J. J., Mandel, P., and Maitre, M. (1985). Evidence for a role of high Km aldehyde reductase in the degradation of endogenous gamma-hydroxybutyrate from rat brain. *FEBS Lett* 190, 55-60.
- Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H. G. (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19, 286-293.
- Vergoni, A. V., Ottani, A., Botticelli, A. R., Zaffe, D., Guano, L., Loche, A., Genedani, S., Gessa, G. L., and Bertolini, A. (2000). Neuroprotective effect of gamma-hydroxybutyrate in transient global cerebral ischemia in the rat. *Eur J Pharmacol* 397, 75-84.
- Wade, P. A., and Wolffe, A. P. (1997). Histone acetyltransferases in control. *Curr Biol* 7, R82-84.
- Weiner, H. L., Lemere, C. A., Maron, R., Spooner, E. T., Grenfell, T. J., Mori, C., Issazadeh, S., Hancock, W. W., and Selkoe, D. J. (2000). Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48, 567-579.
- Wong, C. G., Gibson, K. M., and Snead, O. C., 3rd (2004). From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid. *Trends Pharmacol Sci* 25, 29-34.
- Wong, P. C., Cai, H., Borchelt, D. R., and Price, D. L. (2002). Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 5, 633-639.
- Workman, J. L., and Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67, 545-579.
- Wu, R. S., Panusz, H. T., Hatch, C. L., and Bonner, W. M. (1986). Histones and their modifications. *CRC Crit Rev Biochem* 20, 201-263.
- Yang, X. J., and Seto, E. (2003). Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 13, 143-153.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265, 17174-17179.
- Zhang, Y. W., and Xu, H. (2007). Molecular and cellular mechanisms for Alzheimer's disease: understanding APP metabolism. *Curr Mol Med* 7, 687-696.
- Zheng, Y., Balasubramanyam, K., Cebrat, M., Buck, D., Guidez, F., Zelent, A., Alani, R. M., and Cole, P. A. (2005). Synthesis and evaluation of a potent and selective cell-permeable p300 histone acetyltransferase inhibitor. *J Am Chem Soc* 127, 17182-17183.

Annexe

Etude du signal calcium dans le noyau cellulaire : production d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) nucléaire

Le calcium régule un grand nombre de processus biologiques (contraction, déplacement, morphogenèse, croissance, différenciation, sécrétion, transcription et régulation de certains gènes). Cependant, malgré l'existence de nombreuses preuves permettant d'affirmer que la répartition spatiale du signal calcium détermine la spécificité de ce même signal, il n'a pas été possible d'expliquer complètement comment un unique messenger secondaire pouvait coordonner des effets aussi divers dans les cellules. De même, si le rôle physiologique du calcium dans le noyau a été établi depuis plusieurs décennies, son origine continue d'être discuté.

Il a aussi été démontré que le calcium cytosolique libre peut seulement être transféré vers le nucléoplasme s'il a été produit à proximité de la membrane nucléaire. Ainsi des bouffées de calcium produites à moins de 6 µm du noyau sont ainsi transférées presque instantanément dans le nucléoplasme (Lipp et al., 1997), alors que ces bouffées de calcium produites à 19 µm, ou plus du noyau ne sont pas transférées dans le nucléoplasme. Mais en dépit de la présence de pores nucléaires (Pante and Aebi, 1996a; Pante and Aebi, 1996b), les résultats obtenus par de nombreux laboratoires (Echevarria et al., 2003; Humbert et al., 1996; Koppler et al., 1993; Malviya et al., 1990; Nicotera et al., 1990; Patterson et al., 2004; Rogue and Malviya, 1999; Stehno-Bittel et al., 1995) ont permis de mettre en évidence que les signaux calciques cytosolique et nucléaire (Leite et al., 2003) ne s'équilibrent pas rapidement l'un l'autre, ce qui renforce le concept de deux signaux calciques différents. Les preuves les plus probantes en faveur de ces deux signaux calciques différents viennent des études électrophysiologiques (Malviya and Rogue, 1998) réalisées sur des noyau isolés qui montrent que le transfert de calcium du cytosol vers le noyau est restreint et que la membrane nucléaire est une barrière à la diffusion passive du calcium vers le noyau.

Il existe aussi des preuves d'un rôle direct du calcium dans le noyau, différent de celui du calcium cytoplasmique. Par exemple, les calciums nucléaire et cytoplasmique contrôlent la transcription du gène précoce c-fos par des mécanismes différents (Dolmetsch et al., 1998). Il

a aussi été établi la présence de motifs spécifiques dans la séquence de l'ADN en amont de certains gènes, au niveau des promoteurs. Ceci serait la raison pour laquelle ces gènes sont sensibles au calcium. Ainsi, lors de la transcription des gènes, les séquences CRE (cAMP response element) et SRE (Serum Response Element) sont deux exemples de tels motifs (Chawla and Bading, 2001; Deisseroth et al., 1996; Rogue et al., 1998). L'augmentation du niveau de calcium nucléaire contrôle la transcription par CRE, alors que l'augmentation du niveau de calcium cytoplasmique active la transcription par SRE.

En dépit de diverses explications avancées sur le mécanisme du signal calcique nucléaire au niveau moléculaire, il a été difficile de déterminer la source du calcium nucléaire. Ainsi, si l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au calcium a permis d'augmenter la compréhension du signal calcique cellulaire, l'utilisation de ces mêmes sondes pour l'évaluation du calcium nucléaire a posé des difficultés. Ceci est principalement dû à la compartimentation des sondes et à l'altération de leur sensibilité causée par une fixation différente sur les protéines dans les organelles cellulaires. De la même façon, des dérivés de la photoprotéine Aequorine et de la protéine "Calcium Green fluorescente" se fixent sur des molécules ressemblant à la calmoduline donnant des résultats contradictoires. Cependant, malgré divers résultats discutables obtenus lors de l'utilisation de ces sondes, un consensus a émergé selon lequel le niveau de calcium nucléaire augmente indépendamment des modifications de la concentration de calcium cytosolique (Malviya and Rogue, 1998; Santella and Carafoli, 1997).

C'est à partir de ces éléments que notre laboratoire a développé et proposé un modèle de noyau isolé fonctionnel afin de déterminer le mécanisme du signal calcique nucléaire (Masmoudi et al., 1989). Les recherches auxquelles j'ai participé étaient concentrées sur le mécanisme par lequel le noyau produit son propre inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) indépendamment de celui produit au niveau du cytoplasme (Klein et al., 2004). IP₃ a été découvert par Lowell et Mabel Hokin en 1953 (Hokin and Hokin, 1953), mais ce n'est qu'en 1983 que son rôle central a été mis en évidence dans la mobilisation du calcium à partir des réserves de calcium du réticulum endoplasmique (Streb et al., 1983). Et c'est en 1990 que notre laboratoire (Malviya et al., 1990) a démontré que l'IP₃ mobilise aussi le signal calcique nucléaire et qu'un récepteur fonctionnel de l'IP₃ (IP₃R) est situé sur la membrane nucléaire interne (Hsu et al., 1998).

Publication 1 :

In vivo nuclear Ca²⁺-ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus

Claire Gensburger, Solange Freyermuth, Christian Klein et Anant N. Malviya

Biochemical and biophysical research communications. Avril 2003.

Volume 303(4), pages 1225 à 1228.

La protéine kinase cAMP-dépendante (PKA) phosphoryle la calcium-ATPase nucléaire (NCA). Cette phosphorylation stimule l'activité pompe à calcium de la NCA et le transport du Calcium Green dextran de 10 kDa vers le noyau (Rogue et al., 1998). Ceci a été confirmé par une étude *in vivo* sur des cultures de cellules HEK 293 traitées soit avec du dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP) ou de la forskoline (activateur de la PKA). Les cellules HEK 293 ont aussi été traitées avec ces 2 mêmes réactifs après avoir été transfectées avec un plasmide portant la protéine kinase inhibitrice (PKI α). La bande protéique de 105 kDa représentant la NCA a été obtenue après immunoprécipitation en employant un anticorps anti-Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) suivit d'un western blot du produit de l'immunoprécipitation induit par un anticorps monoclonal anti-phosphosérine. L'immunoblot obtenu révèle que le traitement au db-cAMP ou à la forskoline phosphoryle la NCA sur un résidu sérine. Ce qui n'est pas le cas dans les contrôles ou dans le cas de la transfection avec le plasmide PKI α avant le traitement.

Après avoir établi que PKA phosphoryle NCA, il était légitime de vérifier si cette stimulation de NCA déclenche le transport indépendant de la présence du signal de localisation nucléaire du Calcium Green dextran vers le noyau. En effet l'examen du Calcium Green dextran fluorescent au microscope confocal a montré que le dextran est stimulé par le db-cAMP ou la forskoline était transportée vers le noyau, ce qui n'était pas le cas dans les cellules transfectées avec le plasmide PKI α .

Ce mécanisme établi, il était intéressant d'étudier le mouvement du calcium dans les mêmes conditions expérimentales, ce qui a été fait en examinant les mouvements du Fluo-3-AM. En effet nous constatons que son accumulation autour de la membrane nucléaire, qui atteste de l'augmentation du niveau de calcium, n'a lieu qu'après stimulation avec du db-cAMP ou de la forskoline.

Ainsi cette étude nous a permis d'établir, dans un système *in vivo*, que le cAMP joue un rôle dans la voie du signal calcique du noyau cellulaire comme dans la relation entre la fonction du cAMP et le signal calcique cytoplasmique qui est bien connu (DeBernardi and Brooker, 1996).

In vivo nuclear Ca^{2+} -ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus

Claire Gensburger,¹ Solange Freyermuth, Christian Klein, and Anant N. Malviya*

Centre de Neurochimie CNRS, 5 rue Blaise Pascal, Strasbourg Cedex 67084, France

Received 10 March 2003

Abstract

Outer nuclear membrane is endowed with a SERCA type Ca^{2+} -ATPase which pumps calcium into the nuclear envelope lumen and creates calcium stores. Variation in this calcium pool, among other things, regulates nuclear transport. The transport of Nuclear Localization Signal (NLS)-containing molecules into the nucleus is well established. Intermediate size molecules lacking an NLS translocate to the nucleus and its mechanism remains obscure. It is observed here that the treatment of HEK 293 cells in culture with dibutyl cyclic AMP (db-cAMP) or forskolin (FK) triggered transport of Calcium Green 10 kDa dextran into the nucleus. Under similar conditions Fluo-3-AM accumulated around the nuclei. cAMP-dependent protein kinase phosphorylated 105 kDa nuclear Ca^{2+} -ATPase (NCA) which served as a trigger for NLS-independent transport into the nucleus.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Nuclear Ca^{2+} -ATPase; SERCA; Nuclear transport; Calcium Green dextran; Fluo-3-AM; Nuclear calcium; Protein kinase A; Phosphorylation; Immunoprecipitation; Confocal microscopy

The Ca^{2+} -ATPase, located on the outer nuclear membrane [1,2], pumps calcium into the nuclear envelope generating nuclear calcium pools [3]. Other mechanisms exist for filling nuclear luminal calcium stores [4,5]. The liberation of calcium, from nuclear envelope stores, generates intranuclear calcium signals. It is carried out through activation of second-messenger-regulated release channels located on the inner nuclear membrane. Two such release channels have been characterized: inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptors and ryanodine receptors. The introduction into the nucleus of IP_3 or cADP-ribose evokes the release of calcium stored in the nuclear lumen, into the nucleoplasm [6–9]. Some details of the calcium uptake and calcium release mechanism into the cell nuclei are known [10,11]. Its role in nuclear transport processes is debated [12–16].

While the transport of NLS-containing proteins into the nucleus has been extensively studied, little is known of the molecular mechanisms that regulate the transport

of small molecules lacking an NLS. It is beginning to be realized that filling or emptying nuclear envelope calcium stores subserves as a trigger for nuclear transport. It has been reported that depletion of the nuclear lumen calcium pool by IP_3 excluded Calcium Green 10 kDa dextran from the isolated nuclei [12]. We have documented earlier [13] that protein kinase A (PKA) phosphorylation of NCA stimulates its calcium pumping activity and transport of dextran into the isolated nuclei. Here we delineate, in an in vivo study, that PKA phosphorylates NCA which has a bearing on calcium accumulation around the nuclear envelope and transport of Calcium Green 10 kDa dextran into the nucleoplasm. To the best of our knowledge this report is the first one dealing with an in vivo study of NCA.

Materials and methods

Cell culture and transfection

HEK 293 cells were cultured in 100 mm Petri dishes in the DMEM supplemented with 10% calf serum. Upon attaining 70% confluence, the cells were deprived of serum for overnight. Cells were treated with either 1 mM db-cAMP or 1 μM FK for 30 min, or transfected with

* Corresponding author. Fax: +33-3-88-45-66-80.

E-mail address: malviya@neurochem.u-strasbg.fr (A.N. Malviya).

¹ Present address: INSERM unité 575, 5 rue Blaise Pascal 67084, Strasbourg Cedex, France.

Publication 2 :

A 120 kDa Nuclear Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ Protein Fragment Is Stimulated *in Vivo* by EGF Signal Phosphorylating Nuclear Membrane EGFR.

Christian Klein, Claire Gensburger, Solange Freyermuth, Bala C. Nair, Gérard Labourdette, et Anant N. Malviya

Biochemistry. Décembre 2004.
Volume 43(50), pages 15873 à 15883.

L'injection intrapéritonéale de "l'épidermal growth factor" (EGF) a comme conséquence la phosphorylation d'une tyrosine des protéines STAT (Signal Transducers and Activator of Transcription) dans les noyaux de cellules du foie de souris (Ruff-Jamison et al., 1993). Cette découverte a permis d'établir la voie du signal EGF dans le noyau. La $\text{PLC}\gamma 1$, en plus d'autres phosphatidylinositol-PLC (PI-PLC), est localisée dans le noyau et stimule PIKE (phosphatidylinositol-3-OH-kinase enhancer) (Ye et al., 2002), une GTPase nucléaire qui augmente l'activité de la phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI[3]kinase). Et bien que la localisation exacte de son site reste encore inconnue, EGFR a été localisé sur la membrane nucléaire (Lin et al., 2001).

C'est à partir de ces données que nous avons cherché à déterminer *in vivo*, dans le foie de souris, la localisation membranaire d'EGFR, son mécanisme de stimulation et si la $\text{PLC}\gamma 1$ était stimulée par le signal EGF. Le principal objectif de cette étude était de comprendre le mécanisme de la production de l' IP_3 . Cet objectif représente une avancée importante dans la compréhension du phénomène complexe qu'est le signal calcium dans le noyau, car aucune technique ne permettait de quantifier l' IP_3 nucléaire.

Les extraits nucléaires de foie de souris obtenus après injection d'EGF à différents temps et immunoblottés avec un anticorps spécifique de la $\text{PLC}\gamma 1$ permettent de mettre en évidence deux bandes de protéines, une à 150 kDa et l'autre à 120 kDa. L'utilisation d'un anticorps anti tyrosine phosphorylée permet de mettre en évidence que le traitement par l'EGF entraîne la phosphorylation au niveau des tyrosines de la protéine de 120 kDa. Par contre, si nous immunoprécipitons d'abord les extraits avec l'anticorps anti- $\text{PLC}\gamma 1$ avant de faire l'immunoblot avec l'anticorps anti-tyrosine phosphorylée, nous constatons une phosphorylation aux temps 10 et 30 minutes après l'injection d'EGF alors que ces phosphorylations n'existent pas chez les contrôles. L'utilisation d'un peptide inhibiteur

spécifique de la PLC γ 1 permet de mettre en évidence que les bandes de 150 et de 120 kDa précédemment obtenues dans le noyau sont reliées à la PLC γ 1. Les mêmes expériences réalisées sur des extraits cytoplasmiques ne révèlent qu'une bande de 150 kDa qui est aussi phosphorylée au niveau des tyrosines sous l'action d'EGF.

La séparation des membranes nucléaires externes et internes (Humbert et al., 1996) des cellules de foie de souris permet de mettre en évidence que la bande de 170 kDa, obtenue par western blot et correspondant à l'EGFR est uniquement localisée au niveau de la membrane interne des noyaux. De plus, cette bande est phosphorylée au niveau des tyrosines aux temps 10 et 30 minutes. En parallèle, l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-EGFR actif (Tyr¹¹⁷³) ou (Tyr¹⁰⁶⁸) suivi d'un immunoblot avec les anticorps respectifs, confirme qu'aux temps 10 et 30 minutes après l'injection d'EGF, l'EGFR membranaire était phosphorylé et donc activé.

Pour explorer encore plus le mécanisme de l'activation de la PLC γ 1 nucléaire, nous avons étudié les interactions entre EGFR et le fragment de 120 kDa dans le noyau. Nous avons donc immunoprécipité des extraits nucléaires de foie de souris avec l'anticorps anti-EGFR puis nous avons immunobloté le produit de l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PLC γ 1. Nous avons observé à chaque fois une bande à 120 kDa. De même en utilisant l'anticorps anti-PLC γ 1 pour l'immunoprécipitation et l'anticorps anti-EGFR pour le blot, nous observons la bande de 170 kDa. Cette association entre PLC γ 1 et EGFR n'est observée qu'aux temps 10 et 30 minutes après l'injection d'EGF.

Le séquençage de la protéine de 120 kDa permet de mettre en évidence qu'elle présente la même séquence que la protéine PLC- γ 1, mais dépourvue des résidus amino acides 1-243 de l'extrémité N-terminale.

En tenant compte des résultats concernant la protéine de 120 kDa (immunoprécipitation par l'anticorps anti PLC- γ 1, blocage par le peptide inhibiteur de la PLC- γ 1, séquençage et détermination d'une activité phosphatidylinositol hydrolytique) nous avons donc proposé que cette protéine de 120 kDa dérive par clivage de la PLC γ 1 de 150 kDa.

A 120 kDa Nuclear Phospholipase C γ 1 Protein Fragment Is Stimulated in Vivo by EGF Signal Phosphorylating Nuclear Membrane EGFR

Christian Klein,[‡] Claire Gensburger,[§] Solange Freyermuth,[‡] Bala C. Nair,^{||} Gérard Labourdette,[§] and Anant N. Malviya^{*‡}

Centre de Neurochimie du CNRS and Physiopathologie du Système Nerveux INSERM U575, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France, and Advanced BioScience Laboratories Inc., 5510 Nicholson Lane, Kensington, Maryland 20895

Received July 2, 2004; Revised Manuscript Received August 26, 2004

ABSTRACT: Intraperitoneal injection of epidermal growth factor (EGF) into mice resulted in the phosphorylation of liver nuclei phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) at the tyrosine, coincident with the time course of nuclear membrane epidermal growth factor receptor (EGFR) activation. The function of PLC γ 1 in mice liver nuclei was attributed to a 120 kDa protein fragment. This 120 kDa protein was immunoprecipitated with the isozyme specific PLC γ 1 antibody and was found to be sensitive to a PLC γ 1 specific blocking peptide. The 10-partial sequence analysis revealed that the 120 kDa protein contains the PELCQVSLSE sequence at its N-terminal end and the RTRVNGDNRL sequence at its C-terminal end, which reveals that this protein is a major fragment of PLC γ 1 devoid of an amino acid portion at the N-terminal end. The tyrosine-phosphorylated 120 kDa protein interacts with activated EGFR, binds phosphatidylinositol-3-OH-kinase enhancer (PIKE), enhances nuclear phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI[3]K) activity, and generates diacylglycerol (DAG) in response to the EGF signal to the nucleus in vivo. The immunoprecipitated 120 kDa protein fragment displayed phosphatidylinositol (PI) hydrolysis activity. These results establish the capacity of EGF-triggered nuclear signaling which is mediated by EGFR itself, located on the inner nuclear membrane. This is the first report identifying a 120 kDa PLC γ 1 fragment generated in vivo in the nucleus and capable of discharging the function of nuclear PLC γ 1.

Since the discovery that inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)¹ mobilizes calcium from the nuclear envelope to the nucleoplasm (1, 2) and that the nuclear pools of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) are metabolized in a manner different from that of the cytoplasm (3), one remaining unresolved question is the mechanism by which PLC γ 1 is activated in the nucleus. In the cytoplasm, growth factor-dependent (4) tyrosine phosphorylation of PLC γ 1 generates IP₃ and DAG upon PIP₂ hydrolysis (5). Considerable efforts have been made to understand the autonomous phosphoinositide (6) and calcium (7) signaling in the nucleus. In addition to its action mobilizing calcium from the endoplasmic reticulum (8), IP₃ binds to the nuclear inositol trisphosphate receptor (IP₃R) spanning the inner nuclear membrane (9, 10) with its binding domain facing the nucleoplasm. Phospholipase C (11) and other components necessary for IP₃ generation are located on the inner nuclear membrane (6, 7). The nucleus also contains other forms of PI-PLC (6) and diacylglycerol kinase (12). The nuclear localization of PLC γ 1 is reinforced by the

finding that it stimulates PIKE (13), a nuclear GTPase that enhances nuclear PI[3]K activity.

In 1993, Cohen (14) showed that within 6 min of the intraperitoneal injection of EGF into mice, STAT proteins were tyrosine phosphorylated in the liver nuclei. However, the specific tyrosine kinase activated in this process remained obscure. Moreover, at that time, the actual nuclear membrane location of EGFR was not so definitive (15).

In the study reported here, we have shown that EGF intraperitoneally injected into mice resulted, in liver, in nuclear PLC γ 1 phosphorylation at the tyrosine, coincident with the time course of nuclear membrane EGFR tyrosine phosphorylation. This PLC γ 1 is a 120 kDa protein derived from the 150 kDa native nuclear enzyme cleaved at the N-terminal end. It can be immunoprecipitated from the EGF-treated mice liver nuclear extract with the isozyme specific PLC γ 1 antibody, and it hydrolyzes phosphatidylinositol. The tyrosine-phosphorylated 120 kDa protein fragment interacts with activated nuclear membrane EGFR, binds PIKE, and stimulates nuclear PI[3]K activity in response to the EGF signal to the nucleus in vivo. These data reveal the capacity of EGF nuclear signaling, which is mediated by EGFR located on the inner nuclear membrane. The elusiveness of how the nuclear calcium signal is regulated is dispelled with the knowledge of the mechanism of nuclear PLC γ 1 activation.

MATERIALS AND METHODS

EGF Injection and Preparation of Nuclear and Cytoplasmic Extracts. Solutions of EGF (1 mg/mL) in phosphate-

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: 33 388 8165 24. Fax: 33 388 4566 80. E-mail: Prof.Anant.Malviya@free.fr.

[‡] Centre de Neurochimie du CNRS.

[§] Physiopathologie du Système Nerveux INSERM U575.

^{||} Advanced BioScience Laboratories Inc.

¹ Abbreviations: IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLC γ 1, phospholipase C γ 1; EGFR, epidermal growth factor receptor; PIKE, phosphatidylinositol-3-OH-kinase enhancer; PI[3]K, phosphatidylinositol-3-OH-kinase; PI, phosphatidylinositol; RT, room temperature.

Publication 3 :

Mechanism regulating nuclear calcium signaling.

Anant N. Malviya et Christian Klein.

Canadian journal of physiology and pharmacology. Mars-Avril 2006.

Volume 84(3-4), pages 403 à 422. Review.

Dans cette revue nous avons compilé les résultats obtenus concernant le mécanisme de régulation du signal calcium nucléaire.

Bien que la membrane nucléaire externe soit en continuité avec le réticulum endoplasmique, il est possible d'isoler les noyaux intacts et exempts des contaminants, de même pour les membranes nucléaires externes et internes. Les données appuyant une régulation autonome de la signalisation du calcium nucléaire reposent sur les recherches avec des noyaux isolés.

Il a été suggéré que le mécanisme à la base du signal calcium se trouvait au niveau nucléaire. Deux systèmes de transport du calcium, une Ca^{2+} -ATPase et un récepteur de l'inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphate (IP₄R) stimulé par l'inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphate (IP₄) sont situés sur la membrane nucléaire externe. Ainsi, l'ATP et l'IP₄, selon les concentrations de calcium libre cytoplasmiques, sont responsables du remplissage du réservoir calcique de l'enveloppe nucléaire. Le récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate est situé sur la membrane nucléaire interne et son domaine de fixation au ligand est dirigé vers le nucléoplasme. Le récepteur à la ryanodine est aussi situé sur la membrane nucléaire interne et son ligand cADP-ribose est produit dans le noyau. Un fragment de protéine de 120 kDa de la PLC- γ 1 nucléaire est stimulé *in vivo* par le signal EGF nucléaire, ce qui coïncide avec l'évolution temporelle de l'activation du récepteur de l'EGF de la membrane nucléaire. Le fragment de protéine de 120 kDa stimulé interagit avec PIKE, une GTPase nucléaire, et ensemble ils forment un complexe avec la PI[3]kinase, servant de module pour la stimulation de la PI[3]K nucléaire. Ainsi, le noyau a son propre système de production de l'IP₃.

Mechanism regulating nuclear calcium signaling¹

Anant N. Malviya and Christian Klein

Abstract: Although the outer nuclear membrane is continuous with the endoplasmic reticulum, it is possible to isolate nuclei both intact and free from endoplasmic reticulum contaminants. The outer and the inner nuclear membranes can be purified free from cross-contamination. Evidence in support of autonomous regulation of nuclear calcium signaling relies upon the investigations with isolated nuclei. Mechanisms for generating calcium signaling in the nucleus have been identified. Two calcium transporting systems, an ATP-dependant nuclear Ca^{2+} -ATPase and an IP_4 -mediated inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor, are located on the outer nuclear membrane. Thus, ATP and IP_4 , depending on external free calcium concentrations, are responsible for filling the nuclear envelope calcium pool. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located on the inner nuclear membrane with its ligand binding domain facing toward the nucleoplasm. Likewise, the ryanodine receptor is located on the inner nuclear membrane and its ligand cADP-ribose is generated within the nucleus. A 120 kDa protein fragment of nuclear PLC- γ 1 is stimulated *in vivo* by epidermal growth factor nuclear signaling coincident with the time course of nuclear membrane epidermal growth factor receptor activation. Stimulated 120 kDa protein fragment interacts with PIKE, a nuclear GTPase, and together they form a complex with PI[3]kinase serving as a module for nuclear PI[3]K stimulation. Thus, the nucleus has its own IP_3 generating system.

Key words: calcium, nuclear calcium, nuclear envelope, nuclear PKC, EGF nuclear signal, nuclear EGFR, inositol phosphates, inositol trisphosphate receptor, phospholipase C gamma 1, PIKE, phosphorylation, proteolysis.

Résumé : Bien que la membrane nucléaire externe soit en continuité avec le réticulum endoplasmique, il est possible d'isoler les noyaux, intacts et exempts des contaminants du réticulum endoplasmique. Les membranes nucléaires externes et internes peuvent être purifiées sans trace de contamination croisée. Les données appuyant une régulation autonome de la signalisation du calcium nucléaire reposent sur les recherches avec des noyaux isolés. Il a été mis de l'avant que le mécanisme de production de la signalisation du calcium se trouve dans le noyau. Deux systèmes de transport du calcium, une Ca^{2+} ATPase nucléaire dépendante de l'ATP et un récepteur de l'inositol 1,3,4,5-tétrakisphosphate véhiculé par l' IP_4 , sont situés sur la membrane nucléaire externe. Ainsi, l'ATP et l' IP_4 , selon les concentrations de calcium libre externe, sont responsables du remplissage du pool calcique de l'enveloppe nucléaire. Le récepteur de l'inositol 1,4,5-trisphosphate est situé sur la membrane nucléaire interne et son domaine de fixation au ligand est dirigé vers le nucléoplasme. Le récepteur à la ryanodine est aussi situé sur la membrane nucléaire interne et son ligand cADP-ribose est produit dans le noyau. Un fragment de protéine de 120 kDa de la PLC- γ 1 nucléaire est stimulé *in vivo* par la signalisation nucléaire du facteur de croissance de l'épiderme (EGF), ce qui coïncide avec l'évolution temporelle de l'activation du récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (REGF) de la membrane nucléaire. Le fragment de protéine de 120 kDa stimulé interagit avec PIKE, une GTPase nucléaire, et ensemble ils forment un complexe avec la PI[3]kinase, servant de module pour la stimulation de la PI[3]K nucléaire. Ainsi, le noyau a son propre système de production de l' IP_3 .

Mots clés : calcium, calcium nucléaire, enveloppe nucléaire, PKC nucléaire, signal nucléaire de l'EGF, REGF nucléaire, inositol phosphates, récepteur de l'inositol trisphosphate, phospholipase C gamma 1, PIKE, phosphorylation, protéolyse.

[Traduit par la Rédaction]

Received 14 June 2005. Published on the NRC Research Press Web site at <http://cjpp.nrc.ca> on 2 June 2006.

A.N. Malviya² and C. Klein,³ Ex-CNRS, 18 rue du Windstein, 67800 Hoenheim, France.

¹This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled *The Nucleus: A Cell Within A Cell*.

²Corresponding author (e-mail: Prof.Anant.Malviya@free.fr).

³Present address: INSERM U575, Universiy Louis Pasteur, 11 rue Humann 67000 STRASBOURG, France.

Introduction

"The Nucleus: A Cell Within A Cell", the focal theme of this Special Issue, poses 2 challenging questions. How does the nucleus function isolated from the cell (Malviya et al. 1990)?, and how does the nuclear envelope (NE) become devoid of the endoplasmic reticulum (Mattaj 2004) since the perinuclear space is continuous with the lumen of the endoplasmic reticulum (ER)? Before we address these crucial questions, it may be relevant to recapitulate the architecture of the nuclei *in situ*. The eukaryotic cell nucleus is separated from the cytoplasm by the NE. The NE is a unique structure comprising 2 membrane bilayers, the inner

and outer nuclear membranes, which are separated by a lumen. The inner and outer nuclear membranes join periodically to one another at the sites where the nuclear pore complexes (NPCs) are embedded. The NPC is a large macromolecular assembly that spans the inner and outer nuclear membranes (Pante and Aebi 1996). The inner nuclear membrane, the outer nuclear membrane and NPC define the eukaryote NE.

Structural changes at the level of the individual pore complex have been studied (Hinshaw et al. 1992; Pante and Aebi 1993). The NPC is a tripartite architecture consisting of a basic framework made of multi-domain spokes embracing a central pore from which 8 kinked fibrils radiate and a nuclear ring, capped with a basket assembled from 8 filaments joined distally into a 30–40 nm diameter central ring. The central pore harbors a gated channel, which has also been called a “plug” or “transporter”. Thus, the nuclear pore is a highly organized molecular architecture and detailed information on it from contribution from the Ueli Aebi group (Pante and Aebi 1995, 1996) has dispelled a commonly held notion that the nuclear pore allows free passage of ions, small molecules, proteins, RNAs, and ribonucleoprotein particles in and out of the nucleus.

Evidence in support of independent regulation of nuclear calcium (Leite et al. 2003) has centered on the existence of a mechanism for generating calcium signals in the nucleus (Rogue and Malviya 1999). Studies from our laboratory (Malviya et al. 1990; Matter et al. 1993; Humbert et al. 1996; Köppler et al. 1993), which have been confirmed by others (Gerasimenko et al. 1995; Echevarria et al. 2003), have demonstrated that the isolated nuclei are capable of functioning, especially insofar as their calcium signaling mechanism (Stehno-Bittel et al. 1995) is concerned. We have provided experimental evidence that the nucleus can be isolated from endoplasmic reticulum contaminants (Malviya et al. 1990; Masmoudi et al. 1989). In this article we have reviewed the situation from the initial evidence of the location of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) on the nucleus to our latest finding (Klein et al. 2004) that nuclear PLC- γ 1 can be stimulated in the nucleus *in vivo*, separately and distinctly from the much-studied mechanism of cytoplasmic PLC- γ 1 activation (Berridge 1993).

The understanding of the mechanism by which nuclear PLC- γ 1 is stimulated established that the nucleus is endowed with its own mechanism of generating IP₃, distinct from that of the cytoplasmic IP₃. We hope that that the data documented here will help to dispel any doubt regarding autonomous calcium signaling in the nucleus.

Methods

Preparation of rat liver nuclei

Rat liver nuclei were prepared as previously described (Masmoudi et al. 1989). Briefly, small pieces of liver were homogenized in a medium containing 1.3 mol/L sucrose, 1.0 mmol/L MgCl₂, and 10 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 6.8. The homogenate, after filtration through 4 layers of cheesecloth, was centrifuged for 15 min at 1000g and the resulting pellet was suspended in a minimum volume of homogenization medium. This suspension was mixed with a medium containing 2.4 mol/L sucrose,

1.0 mmol/L MgCl₂, and 10 mmol/L potassium phosphate buffer, pH 6.8, to give a final 2.2 mol/L sucrose concentration and was centrifuged for 1 h at 100 000g. The nuclear pellet was suspended in a medium containing 0.25 mol/L sucrose, 4.0 mmol/L MgCl₂, and 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, and centrifuged for 10 min at 1000g. The resulting pellet constituted the final nuclear preparation.

Purification of inner and outer nuclear membranes

Isolated rat liver nuclei were suspended in a medium containing 0.25 mol/L sucrose, 4.0 mmol/L MgCl₂, 1.0 mmol/L dithiothreitol, 10 μ g/mL leupeptin, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4 (buffer A), at a protein concentration of 2 mg/mL (Humbert et al. 1996). Sodium citrate 1% (w/v) was added to this nuclear suspension, which was incubated for 30 min on ice while stirring gently and was centrifuged for 15 min at 500g. The resulting supernatant consisted of outer nuclear membrane, whereas the pellet contained the inner nuclear membrane (Gurr et al. 1963; Gilchrist and Pierce 1993). The pellet was suspended in buffer A at a protein concentration of 5 mg/mL and was digested with DNase I (250 μ g/mL) for 14 h at 4 °C. The digested material was then separated on a sucrose gradient (0.25, 1.6, and 2.4 mol/L) after centrifugation for 2 h at 10 000g in a SW28 swinging bucket rotor. The inner membrane was recovered at the 0.25–1.6 mol/L sucrose interface, recentrifuged for 20 min at 100 000g and finally suspended in buffer A. The supernatant obtained after sodium citrate treatment was centrifuged at 100 000g for 20 min, resuspended in buffer A, layered over 1.6 mol/L sucrose medium, and centrifuged as above. The membrane fraction collected at the 0.25–1.6 mol/L sucrose interface constituted the outer nuclear membrane.

Marker enzyme activity

The isolated nuclei and the inner and outer nuclear membranes were subjected to NAD pyrophosphorylase, mannose-6-phosphatase, and NADPH cytochrome *c* reductase activity as described previously (Humbert et al. 1996).

Electron microscopic studies

Each of the outer and inner nuclear membrane preparations were suspended in a medium containing 0.12 mol/L cacodylate buffer, pH 7.4, and 2.5% glutaraldehyde, incubated for 1 h at room temperature, and centrifuged for 10 min at 12 000g. The pellet was post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.12 mol/L cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 h, dehydrated with serial ethanol concentrations and propylene oxide, and embedded in spurr resin followed by thin sectioning.

The inner nuclear membrane was incubated with anti-lamin antibodies (1:100 dilution) for 3 h at room temperature. This was centrifuged for 15 min at 12 000g. The resulting pellet was washed 3 times with a phosphate buffer saline (PBS). The final pellet was suspended in PBS, incubated with secondary antibody (anti-IgG labeled with colloidal gold, particle size 12 nm) at a 1:50 dilution, and incubated for 3 h at room temperature, washed 3 times as before, fixed, embedded, and thin sectioned. To render anti-lamin antibody accessible to the site of antigen (i.e., interior to the inner nuclear membrane), it was necessary to suspend

Publication 4 :

Mechanism of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate produced in the nucleus, nuclear located protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase.

Christian Klein et Anant N. Malviya.

Frontiers in bioscience. Janvier 2008.

La PLC γ 1 peut être phosphorylée par l'EGFR membranaire en réponse au signal EGF dans le noyau. L'activité de la PLC γ 1 du foie de souris est attribuée à un fragment protéique de 120 kDa qui est un produit de la protéolyse de l'enzyme natif de 150 kDa. La protéine de 120 kDa, phosphorylée au niveau des tyrosines, interagit avec l'EGFR activé, se fixe sur le PIKE pour activer la PI[3]kinase nucléaire et est capable de produire du diacyl Glycérol en réponse au signal EGF dans le noyau *in vivo*, expliquant le mécanisme de production de l'inositol-1,4,5-trisphosphate nucléaire. Cet IP₃ nucléaire interagit avec le récepteur de l'IP₃ (IP₃R) localisé sur la membrane interne nucléaire et retient le calcium dans le nucléoplasme. L'IP₃R est phosphorylé par une protéine kinase d'origine nucléaire qui favorise l'interaction ligand-récepteur. La calcium-ATPase nucléaire et le récepteur de l'IP₄ sont localisés sur la membrane nucléaire externe, facilitant le transport du calcium du cytoplasme dans le lumen de l'enveloppe nucléaire grâce à l'ATP ou à l'IP₄ en fonction du calcium libre présent dans le cytoplasme. La calcium-ATPase nucléaire est phosphorylée par une protéine kinase cAMP-dépendante qui augmente son activité de pompe à calcium. Ces données sont à la base d'un système complexe comprenant une phosphorylation au niveau des tyrosines et des sérines faisant partie de fragments clés participant à la régulation du signal calcique nucléaire.

Mechanism of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate produced in the nucleus, nuclear located protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase

Christian Klein¹, Anant N. Malviya²

¹ INSERM U575, University Louis Pasteur, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France, ² ex CNRS, 18 rue du Windstein 67800 Hoenheim, France

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Discussion
 - 3.1. Isolated nuclei – rupturing and resealing of the nuclear membrane
 - 3.2. Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R)
 - 3.3. IP₃R located on the Inner nuclear membrane
 - 3.4. Nuclear PKC phosphorylates IP₃R in vivo
 - 3.5. Mechanism of nuclear IP₃ generation
 - 3.6. Nuclear Ca²⁺-ATPase (NCA) - location and characterization
 - 3.7. Effect of PKA phosphorylation of NCA on nuclear envelope Ca²⁺ transport activity
 - 3.8. Nuclear 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor (IP₄R)
 - 3.9. IP₄-mediated calcium transport
 - 3.10. A holistic view emerges
6. Acknowledgment
7. References

1. ABSTRACT

Nuclear phospholipase C-gamma 1 can be phosphorylated by nuclear membrane located epidermal growth factor receptor sequel to epidermal growth factor-mediated signaling to the nucleus. The function of mouse liver phospholipase C-gamma 1 is attributed to a 120 kDa protein fragment which has been found to be a proteolytic product of the 150 kDa native nuclear enzyme. The tyrosine-phosphorylated 120 kDa protein band interacts with activated EGFR, binds phosphatidyl-3-OH kinase enhancer, and activates nuclear phosphatidylinositol-3-OH-kinase, and is capable of generating diacylglycerol in response to the epidermal growth factor signal to the nucleus *in vivo*. Thus a mechanism for nuclear production of inositol-1,4,5-trisphosphate is unraveled. Nuclear generated inositol-1,4,5-trisphosphate interacts with the inner membrane located inositol-1,4,5-trisphosphate receptor and sequesters calcium into the nucleoplasm. Nuclear inositol-1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by native nuclear protein kinase C which enhances the receptor-ligand interaction. Nuclear calcium-ATPase and inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor are located on the outer nuclear membrane, thus facilitating calcium transport into the nuclear envelope lumen either by ATP or inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate depending upon the external free calcium concentrations. Nuclear calcium ATPase is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase with enhanced calcium pumping activity. A holistic picture emerges here where tyrosine phosphorylation compliments serine phosphorylation of key moieties regulating nuclear calcium signaling. Evidence are forwarded in favor of proteolysis having a profound implications in nuclear calcium homeostasis in particular and signal transduction in general.

2. INTRODUCTION

The discovery that inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) mobilizes calcium from the ⁴⁵Ca²⁺ loaded isolated rat liver nuclei (1, 2) and that the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) is located on the nuclear membrane (1) established for the first time a signal transduction role of both inositol phosphate (3) and calcium (4, 5) at the level of the cell nucleus. An earlier discovery that IP₃ is an intracellular Ca²⁺-releasing messenger in permeabilized pancreatic acinar cells (6) provided a biological function to the IP₃, seeking a physiological role since its serendipitous discovery in 1953 (7). The elucidation of the primary structure of the IP₃R (8) and that it functions both as a calcium channel and a specific IP₃-binding protein universally located in all mammalian systems (9) laid the foundation for understanding the mechanism of IP₃-mediated cellular function. It is now well founded that nuclear calcium signaling is independently regulated from its cytosolic counterpart (10, 11). Autonomous nuclear calcium signaling pathways find support from the nuclear location of enzymes (12, 13) and phosphoinositides (14, 15, 16) involved in IP₃ generation.

Phospholipase C (PLC) catalyzes phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) hydrolysis to generate IP₃ and diacylglycerol (DAG). Several isoforms of PLC have been identified in the nucleus and the nuclear beta isozyme is characterized in some detail (3). The role of PLC-gamma 1 in the nucleus has also been investigated which, upon stimulation, associates with phosphatidylinositol-3-OH-kinase enhancer (PIKE), a nuclear GTPase (12) and consequently activates nuclear (17) phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI(3)K) activity. PIKE may be a widespread regulator of nuclear PI(3)K activity. *In vivo* studies, in mouse liver nuclei, revealed that epidermal growth factor (EGF) signaling

Inositol and calcium signals in the nucleus

Table 1. [³²P]IP₃ binding and microsomal marker enzyme activity

Fraction derived from rat liver	Protein, mg	[³² P]IP ₃ binding		NADH cytochrome c reductase activity		NADPH cytochrome c reductase (insensitive to antimycin A) activity	
		Specific fmol per mg of protein per min	Total pmol per min	Specific μmol per mg of protein per min	Total μmol per min	Specific μmol per mg of protein per min	Total μmol per min
Homogenate	4100 ± 205.0 (100)	80 ± 4.0	328 ± 16.4 (100)	0.008 ± 0.00040	32.8 ± 1.640 (100)	0.42 ± 0.0200	1723 ± 86.0 (100)
Nuclei	250 ± 12.5 (6.1)	87 ± 4.3	22 ± 1.1 (6.7)	0.0014 ± 0.00007	0.34 ± 0.017 (1.0)	0.025 ± 0.0012	6.25 ± 0.3 (0.4)
Final postnuclear material	337 ± 16.5 (8.2)	104 ± 5.0	35 ± 1.7 (10.7)	0.012 ± 0.00060	4.1 ± 0.197 (12.4)	0.41 ± 0.0200	138 ± 6.9 (8.0)
Homogenate with added microsomes*	4480 ± 223.5 (100)	87 ± 4.3	390 ± 19.5 (100)	0.012 ± 0.00060	53.7 ± 2.580 (100)	0.50 ± 0.0250	2240 ± 112.0 (100)
Nuclei	296 ± 14.7 (6.6)	85 ± 4.2	25 ± 1.2 (6.4)	0.0017 ± 0.00008	0.49 ± 0.024 (0.9)	0.03 ± 0.0015	8.8 ± 0.4 (0.4)
Final postnuclear material	324 ± 16.0 (7.1)	210 ± 10.5	68 ± 3.4 (17.4)	0.035 ± 0.00175	11.3 ± 0.528 (21)	0.95 ± 0.0465	309 ± 15.4 (13.8)

Total protein in the homogenate was 4102 mg. Total microsomal protein was 380 mg. [³²P]IP₃ specific and total binding were 158 fmol per mg of protein per min and 60 pmol per min, respectively; NADPH cytochrome c reductase specific and total activity were 0.06 μmol per mg of protein per min and 22.8 μmol per min, respectively; antimycin A-insensitive NADH cytochrome c reductase specific and total activity were 1.45 μmol per mg of protein per min and 551 μmol per min, respectively. Livers were homogenized in 1.3 M sucrose medium and the homogenate was centrifuged at 1000 xg. The resulting pellet was suspended in the same medium and was adjusted to 2.2 M sucrose by adding 2.4 M sucrose medium, followed by centrifugation at 100,000 x g for 1 hr. Nuclei were sedimented, whereas other cytoplasmic material, including contaminating microsomes, stayed above sucrose in the tube (this is termed final postnuclear material). The final concentration of [³²P]IP₃ was 0.5 nmol in the binding assay. The radioligand was displaced by 10 μM IP₃. The reduction of cytochrome c was monitored at 550 nm and the reductase activity was determined by using an extinction coefficient of 21.1 mM⁻¹·cm⁻¹. Antimycin A concentration was 5 mM. These data are mean ± SEM of two independent preparations. Numbers in parentheses represent percentage.

activates nuclear PLC-gamma 1 and generates DAG (18). The activated PLC-gamma 1 binds nuclear located (19) epidermal growth factor receptor (EGFR), thus an independent mechanism of IP₃ generation in the nucleus, divorced from the cytosolic events, is established (18).

The D3-phosphorylated inositol 3,4,5-trisphosphate (3,4,5-IP₃), which is a product of PI(3)K, is also present in the nucleus (20) and serves as a recruiting agent to the nucleus protein kinase C – zeta (PKC – zeta). Nuclear 3,4,5-IP₃ has been shown to mimic the anti-apoptotic effect of NGF (20). Protein kinase C beta – a classical PKC is located in the nucleus (21). It phosphorylates nuclear IP₃R *in vivo* and consequently enhances IP₃-mediated nuclear calcium release (22).

While the action of IP₃ and IP₃R in the nucleus has been well defined the role of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate (IP₄) in the nucleus has not received the attention it deserves, although it recruits a calcium pool in the nuclear envelope (23, 24) and its receptor IP₄R, has been located on the nuclear membranes (25). High affinity nuclear IP₄R has been purified and it is a 74 kDa protein (26) distinct from various other IP₄Rs (27, 28, 29). Inositol hexakisphosphate (IP₆) is also implicated in the nuclear function (30).

Studies performed with the purified inner and outer nuclear membranes demonstrated that the nucleus is endowed with its own nuclear Ca²⁺-pump ATPase, a SERCA2b isozyme located on the outer nuclear membrane (25). The nuclear Ca²⁺-ATPase (NCA) is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) leading to its enhanced calcium pumping activity (31) as well as facilitating transport of 10 kDa Calcium Green -1 dextran to the nuclear envelope.

In this review, we highlight that nuclear Calcium signaling occurs by the transport of calcium into the nuclear envelope by nuclear located specific molecules, such as Ca²⁺-ATPase and IP₃R are located on the outer nuclear membrane (25). The nuclear Ca²⁺-ATPase discharges its function depending on the external free calcium concentration and phosphorylation (31) by PKA. This establishes a cross-talk between cAMP and calcium at the level of cell nucleus. The nuclear envelope, in this scenario, serves as a transient store for the nuclear calcium. The calcium is released from the nuclear envelope into the nucleoplasm by the opening of IP₃R channel, located on the inner nuclear membrane (25), on the availability of IP₃. The action of inner membrane IP₃R is regulated through its phosphorylation by native nuclear PKC (22). According to the mechanism outlined in this review, a holistic picture has emerged where PKA, PKC, Ca²⁺-ATPase and IP₃R are key players in modulating an independent regulation of nuclear calcium homeostasis.

3. DISCUSSION

3.1. Isolated nuclei – rupturing and resealing of the nuclear membrane

In the beginning when claims for the nuclear events were advanced, particularly the nuclear location of IP₃R (1) or ryanodine receptor (32, 33), the most formidable challenge confronted was that the isolated nuclear studies were in fact free from cytoplasmic contaminants. In particular there was serious concern of microsomal contaminants of nuclei since the outer nuclear membrane, *in situ*, is continuous with the endoplasmic reticulum. We have addressed this concern in some detail (1, 25). Based on the [³²P]IP₃ binding studies and microsomal marker enzymes activity at each step of nuclei purification procedure (Table 1), we have established

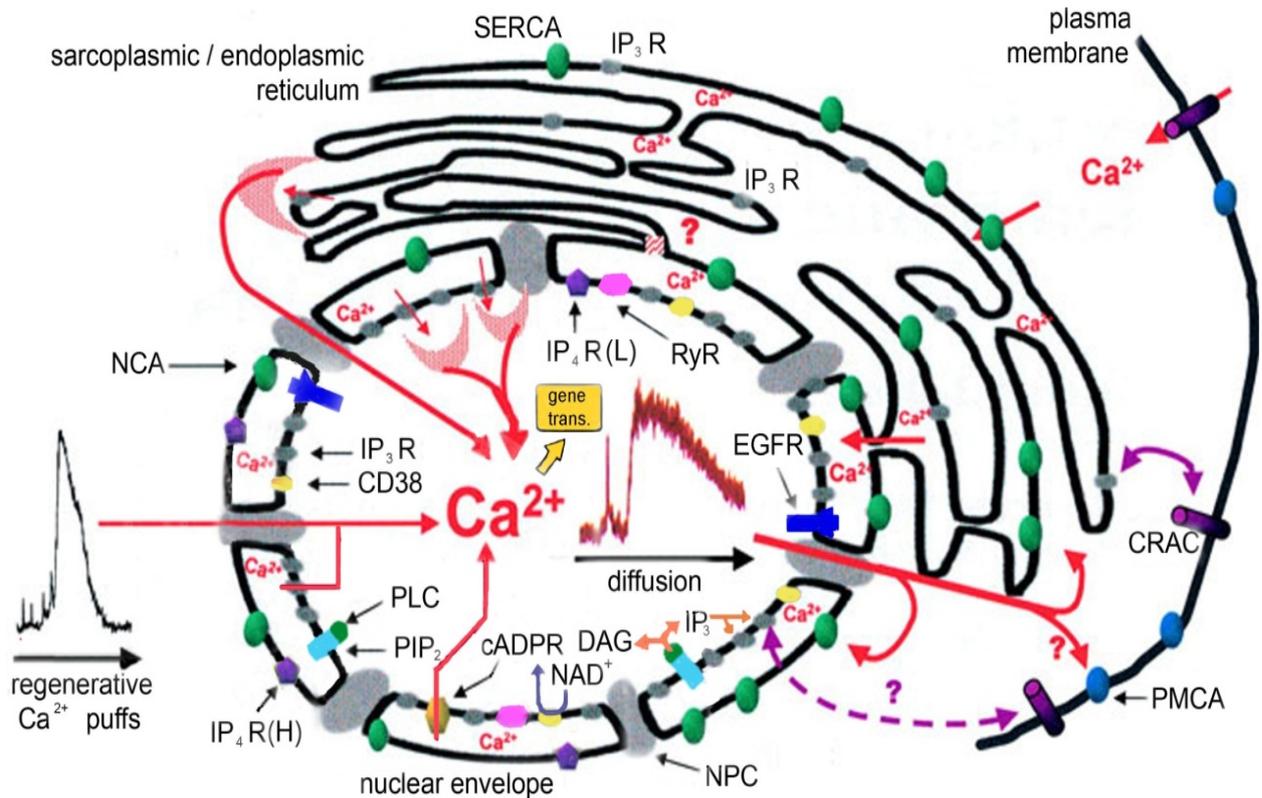


Figure 20 : Dynamique du signal calcium nucléaire.

L'entrée du calcium dans le noyau se déroule en deux étapes. Le réservoir de calcium de la membrane nucléaire, qui sert de réserve temporaire de calcium, est rempli grâce à la calcium-ATPase (NCA) nucléaire ou à l'IP₄R localisés sur la membrane externe du noyau. La libération du calcium dans le nucléoplasme s'effectue grâce à l'IP₃R ou au récepteur de la ryanodine (RyR) localisés sur la membrane interne du noyau.

Le cADP-ribose est produit par l'action de la CD38/ADP ribosyl cyclase sur le NAD⁺ et sert de ligand pour le RYR. IP₃ qui est produit dans le noyau par l'activateur du signal EGF nucléaire situé sur la membrane (EGFR), va ensuite stimuler la PLCγ1 nucléaire. La NCA et l'IP₃R sont activés (phosphorylation au niveau de sérines), respectivement, par la protéine kinase cAMP-dépendante (PKA) et la Protéine Kinase C. La PLCγ1 stimulée par la phosphorylation au niveau de tyrosines va se fixer sur l'EGFR.

Le réservoir de calcium de la membrane nucléaire peu aussi être rempli grâce à la NCA phosphorylée par la PKA.

La concentration de calcium libre cytoplasmique joue un rôle important dans le mécanisme d'activation de la NCA et dans le fonctionnement de l'IP₄R.

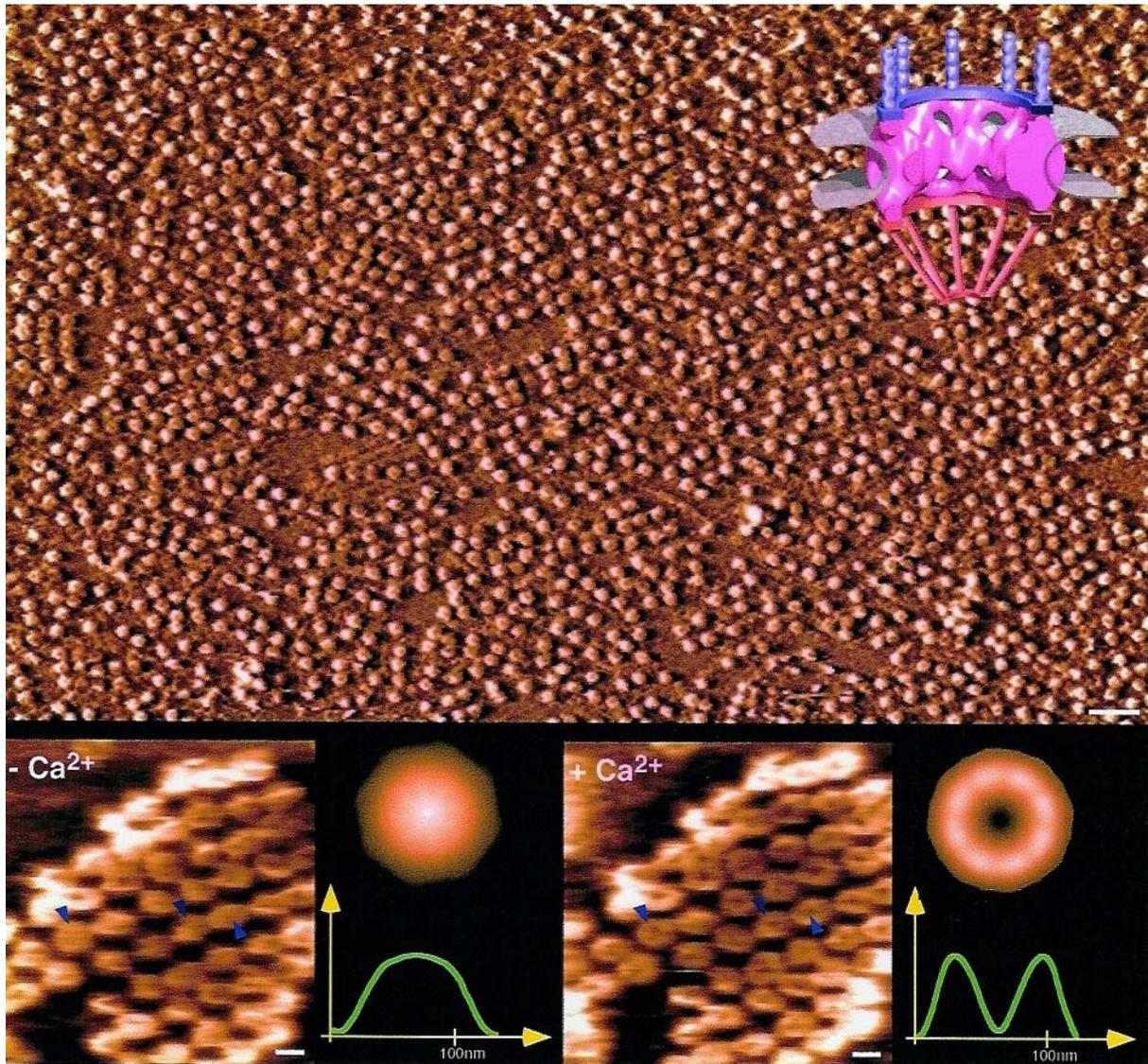


Figure 21 : *aspect des pores nucléaires par microscopie à force atomique*

Les images du complexe du pore nucléaire obtenues, dans des conditions minimisant les dénaturations, par microscopie à force atomique révèlent une asymétrie de la surface des deux extrémités. Alors que le côté nucléaire montre un aspect de "dôme", le côté cytoplasmique montre plutôt un aspect de "donut".

L'ouverture et la fermeture du complexe est modulée par le calcium.

Le calcium est exporté du noyau à partir de la face nucléaire du complexe du pore nucléaire avant d'être séquestré dans le réticulum endoplasmique (Stoffler et al., 1999).

Image obtenue avec la gracieuse permission du Professeur U. Aebi de Bale.

Références

- Chawla, S., and Bading, H. (2001). CREB/CBP and SRE-interacting transcriptional regulators are fast on-off switches: duration of calcium transients specifies the magnitude of transcriptional responses. *J Neurochem* 79, 849-858.
- DeBernardi, M. A., and Brooker, G. (1996). Single cell Ca^{2+} /cAMP cross-talk monitored by simultaneous Ca^{2+} /cAMP fluorescence ratio imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4577-4582.
- Deisseroth, K., Bito, H., and Tsien, R. W. (1996). Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16, 89-101.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K., and Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933-936.
- Echevarria, W., Leite, M. F., Guerra, M. T., Zipfel, W. R., and Nathanson, M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5, 440-446.
- Hokin, M. R., and Hokin, L. E. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of P^{32} into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem* 203, 967-977.
- Hsu, A. L., Lu, P. J., and Chen, C. S. (1998). Regulation of nuclear calcium uptake by inositol phosphates and external calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 653-656.
- Humbert, J. P., Matter, N., Artault, J. C., Koppler, P., and Malviya, A. N. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem* 271, 478-485.
- Klein, C., Gensburger, C., Freyermuth, S., Nair, B. C., Labourdette, G., and Malviya, A. N. (2004). A 120 kDa nuclear phospholipase C γ 1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR. *Biochemistry* 43, 15873-15883.
- Koppler, P., Matter, N., and Malviya, A. N. (1993). Evidence for stereospecific inositol 1,3,4,5- $[^3H]$ tetrakisphosphate binding sites on rat liver nuclei. Delineating inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate interaction in nuclear calcium signaling process. *J Biol Chem* 268, 26248-26252.
- Leite, M. F., Thrower, E. C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A. M., Ehrlich, B. E., and Nathanson, M. H. (2003). Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2975-2980.
- Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., and Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3, 802-808.
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M. J., and Bootman, M. D. (1997). Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *Embo J* 16, 7166-7173.
- Malviya, A. N., Rogue, P., and Vincendon, G. (1990). Stereospecific inositol 1,4,5- $[^{32}P]$ trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9270-9274.
- Malviya, A. N., and Rogue, P. J. (1998). "Tell me where is calcium bred": clarifying the roles of nuclear calcium. *Cell* 92, 17-23.

- Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M., Huang, F. L., Huang, K. P., Vincendon, G., and Malviya, A. N. (1989). Protein kinase C located in rat liver nuclei. Partial purification and biochemical and immunochemical characterization. *J Biol Chem* *264*, 1172-1179.
- Nicotera, P., Orrenius, S., Nilsson, T., and Berggren, P. O. (1990). An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 6858-6862.
- Pante, N., and Aebi, U. (1996a). Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *31*, 153-199.
- Pante, N., and Aebi, U. (1996b). Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Curr Opin Cell Biol* *8*, 397-406.
- Patterson, R. L., Boehning, D., and Snyder, S. H. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* *73*, 437-465.
- Rogue, P. J., Humbert, J. P., Meyer, A., Freyermuth, S., Krady, M. M., and Malviya, A. N. (1998). cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9178-9183.
- Rogue, P. J., and Malviya, A. N. (1999). Calcium signals in the cell nucleus. Strasbourg, France, August 20-23, 1998. *Embo J* *18*, 5147-5152.
- Ruff-Jamison, S., Chen, K., and Cohen, S. (1993). Induction by EGF and interferon-gamma of tyrosine phosphorylated DNA binding proteins in mouse liver nuclei. *Science* *261*, 1733-1736.
- Santella, L., and Carafoli, E. (1997). Calcium signaling in the cell nucleus. *Faseb J* *11*, 1091-1109.
- Stehno-Bittel, L., Perez-Terzic, C., and Clapham, D. E. (1995). Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca^{2+} store. *Science* *270*, 1835-1838.
- Stoffler, D., Goldie, K. N., Feja, B., and Aebi, U. (1999). Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol* *287*, 741-752.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* *306*, 67-69.
- Ye, K., Aghdasi, B., Luo, H. R., Moriarity, J. L., Wu, F. Y., Hong, J. J., Hurt, K. J., Bae, S. S., Suh, P. G., and Snyder, S. H. (2002). Phospholipase C gamma 1 is a physiological guanine nucleotide exchange factor for the nuclear GTPase PIKE. *Nature* *415*, 541-544.