



**HAL**  
open science

**Dynamique spatio-temporelle et régulation de l'activité  
de laprotéine kinase activée par l'adénosine  
monophosphate cycliquedans des préparations de  
neurones en trancheetLes mécanismes cellulaires  
d'action du GHB dans le thalamusventrobasal.**

Nicolas Gervasi

► **To cite this version:**

Nicolas Gervasi. Dynamique spatio-temporelle et régulation de l'activité de laprotéine kinase activée par l'adénosine monophosphate cycliquedans des préparations de neurones en trancheetLes mécanismes cellulaires d'action du GHB dans le thalamusventrobasal.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT: . tel-00069635v2

**HAL Id: tel-00069635**

**<https://theses.hal.science/tel-00069635v2>**

Submitted on 12 Jul 2006

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

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

**Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 6**

*Spécialité : Neurosciences*

*Présentée par*

**GERVASI Nicolas**

*Pour obtenir le grade de*

**Docteur de l'Université Paris 6.**

*Sujet de la thèse :*

**Dynamique spatio-temporelle et régulation de l'activité de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate cyclique dans des préparations de neurones en tranche**

**et**

**Les mécanismes cellulaires d'action du GHB dans le thalamus ventrobasal.**

*Soutenue le 10 mars 2006*

*Devant le jury composé de :*

Dr Rodolphe FISCHMEISTER, Rapporteur

Pr Urs GERBER, Rapporteur

Pr Philippe ASCHER, Examineur

Pr Marc VIGNY, Examineur

Dr Pierre VINCENT, Examineur

Pr Danièle TRITSCH, Directeur de thèse

*Je tiens tout d'abord à remercier Pierre VINCENT pour son encadrement passionné et passionnant au cours de ces quelques années de thèse. Il a su me faire partager son grand enthousiasme pour la science et pour toutes les avancées technologiques. Sa très grande rigueur et son sens du détail, même s'ils n'ont pas toujours été compris sur le moment, ainsi que la grande confiance et liberté qu'il m'a témoignées m'ont permis de m'épanouir pleinement au sein du laboratoire.*

*Je remercie Danièle TRITSCH de m'avoir accueilli dans son équipe et permis de découvrir ce métier passionnant. Je la remercie particulièrement pour la grande liberté qu'elle m'a offerte et pour m'avoir toujours soutenu et encouragé dans mes choix.*

*Je souhaite également remercier Jean MARIANI de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son action quotidienne qui a permis de créer un environnement aussi riche et formateur. Je le remercie également pour la très grande écoute et les conseils qu'il a su m'apporter.*

*Je remercie également les membres du jury : Philippe ASCHER, Rodolphe FISCHMEISTER, Urs GERBER et Marc VIGNY pour avoir accepté de relire et d'examiner ma thèse dans un délai assez court. Merci à tous, j'ai éprouvé un grand plaisir à assister à vos cours, à lire vos articles et à enseigner à vos côtés.*

*Merci à Nathalie LERESCHE de m'avoir rendu dépendant du GHB et surtout un grand merci pour sa très grande gentillesse, sa disponibilité, son écoute et sa présence tout au long de ces années.*

*Je remercie Vincenzo CRUNELLI avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer et qui nous a fait passer de très longues heures dans la salle de réunion. Sa très grande culture et son esprit si vif m'ont beaucoup appris.*

*Merci à tous les anciens, Jean-Marc, Jean-Marie, Marta, Sophie, Sébastien qui tous en post-doc, ont laissé un grand vide derrière eux. Leur dynamisme, leur joie, leur écoute, la richesse de leurs discussions et des heures passées à parler de tout me furent d'un grand secours.*

*Un grand merci à toute l'équipe NDSM et RNRP, qui restera toujours pour moi Neurobiologie Cellulaire, avec qui j'ai pu partager de nombreuses discussions, repas animés et balade à vélo. Un grand merci pour leur accueil, leur disponibilité, leur compétence et leur diversité de personnalité à : Sylvie, Régine, Ludovic, Estelle, Régis, Thierry, Laurence, Bertrand, Marie-Jo, et Daniel.*

*Je remercie aussi l'ensemble des étudiants du laboratoire et plus spécialement Emilie avec qui j'ai partagé de grandes joies et beaucoup de désillusions. Un grand merci aussi à Thomas et Julien avec qui j'ai passé pas mal de temps à discuter science et de pleins d'autres choses sous le chaud soleil des arènes.*

*Merci à Susan de nous avoir offert un espace de liberté si précieux et d'avoir partagé à de nombreuses reprises une partie de son immense savoir.*

*Je n'oublierai pas Pascal mon tonton scientifique qui par son intelligence, son écoute et son art du second degré très prononcé m'ont permis de réfléchir un peu plus de temps en temps.*

*Je tiens à remercier maintenant les personnes du laboratoire qui par leur hétérogénéité ont influencé ma conception de la science et ont grandement contribué à améliorer mon ouverture d'esprit.*

*Un grand merci à toute l'équipe enseignante du LV207 et plus particulièrement Odile MICHEL et Chantal BIZET pour leur accueil, leur conseil, leur amitié et la confiance qu'ils ont su me témoigner. Merci de m'avoir fait découvrir votre passion pour l'enseignement. Et un énorme merci à mes étudiants qui par leur gentillesse (souvent), leur écoute (parfois) et leur question (rarement) ont su me sortir de mon petit domaine scientifique et m'ont permis d'améliorer ma culture générale.*

*Merci à mes parents et à mon frère pour m'avoir toujours laissé faire ce que je voulais, pour m'avoir soutenu et entouré tout au long de ses années.*

*Et enfin un dernier merci à la seule et l'unique.*

## Résumé

Dans le système nerveux central, le principal effecteur de la voie de transduction de l'AMPC est la protéine kinase activée par l'AMPC (PKA). L'activation de la PKA est impliquée dans de nombreux processus comme la modulation de l'excitabilité neuronale par phosphorylation de canaux ioniques, de l'homéostasie cellulaire par phosphorylation de cibles cytosoliques et de la régulation génique par phosphorylation de facteurs de transcription. La régulation de l'activité de la PKA ainsi que son activation spatiale et temporelle sont des paramètres indispensables à la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine des effets de cette voie de seconds messagers. Faute d'approches méthodologiques adaptées, très peu d'études se sont intéressées à la dynamique spatiale et temporelle, à la spécificité et à la régulation de l'activité de la PKA dans les neurones.

Grâce aux sondes fluorescentes codées génétiquement, il est possible maintenant d'avoir accès à ces paramètres. A l'aide d'un vecteur viral, nous avons fait exprimer une sonde sensible à l'activité PKA (sonde AKAR pour A-kinase activity reporter) dans des préparations de neurones en tranches. Cette sonde utilise le principe du transfert d'énergie par résonance (FRET) et permet de mesurer par imagerie ratiométrique l'activité kinase de la PKA. Nous avons montré que la sonde AKAR2, exprimée dans les neurones, modifie son spectre d'émission en réponse à une stimulation de la voie AMPc. L'utilisation d'une sonde mutante, dont le site de phosphorylation a été modifié, démontre que les changements observés dans le spectre d'émission de la sonde AKAR2 sont bien attribuables à une phosphorylation.

Dans une première partie, nous avons étudié la phosphorylation de protéines cibles de la PKA dans différents compartiments subcellulaires en réponse à différentes stimulations extracellulaires. La phosphorylation de la sonde AKAR2, nous a permis de suivre en temps réel l'activité de la PKA dans le cytosol. Afin de mesurer l'activité de la PKA dans le noyau, nous avons adressé la sonde AKAR2 en utilisant un signal de localisation nucléaire (NLS). Enfin, la mesure de l'activité de la PKA à la membrane a été réalisée grâce à l'étude de la phosphorylation des canaux responsables du courant de l'AHP lente (IsAHP). Nous avons montré que la phosphorylation des canaux ioniques est plus rapide que la phosphorylation des cibles cytosoliques, elles-mêmes plus rapide que la phosphorylation des protéines nucléaires. De plus, nous avons montré que l'activité de la PKA stimulée par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est différente de l'activation directe des adénylyl cyclases (AC). En effet, l'activation de la PKA résultant de la stimulation des RCPG produit des amplitudes de phosphorylation plus faible de la sonde AKAR2 dans le cytosol et le noyau.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le rôle des phosphodiesterases de type 4 (PDE4) dans la régulation des réponses  $\beta$ -adrénergiques. L'inhibition des PDE4 produit une activation de la PKA dans les neurones traduisant ainsi une activité tonique des AC. Nous montrons également que l'inhibition des PDE4 permet de potentialiser l'activité de la PKA en réponse à de faibles concentrations d'agonistes  $\beta$  adrénergiques. Cette famille de PDEs, en dégradant l'AMPC, participe donc à la régulation et la propagation des signaux PKA dans les neurones.

Enfin, au cours de ma thèse, je me suis également intéressé au  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB) composé qui est utilisé pour soigner certains troubles du sommeil et provoque chez le rat l'apparition de signes comportementaux et de tracés encéphalographiques similaires à ceux observés chez l'humain lors de crises d'épilepsie de type absence. L'ensemble de ces effets du GHB passe probablement par une action sur la boucle thalamocorticale mais les mécanismes cellulaires à leurs origines sont inconnus. Nous avons montré grâce à l'utilisation d'enregistrements électrophysiologiques, que les courants post-synaptiques inhibiteurs sont beaucoup moins sensibles au GHB que les courants post-synaptiques excitateurs et les courants potassiques à rectification entrante (GIRK). Cette différence de sensibilité serait à l'origine d'un déséquilibre de la balance excitation/inhibition reçue par les neurones thalamocorticaux ce qui participerait à la genèse d'une activité oscillante du potentiel membranaire de ces neurones.

## Listes des abréviations

5-CT : 5-carboxamidotryptamine  
AC : adénylyl-cyclase  
AHP : after hyperpolarization  
AKAP : A-kinase anchoring protein  
AKAR : A-kinase activity reporteur  
AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
ATP : adénosine tri-phosphate  
ATV : aire tegmentale ventrale  
Ca-CaM : calmoduline ayant liée le calcium  
CaMKII : calmoduline kinase II  
CaMKIV : calmoduline kinase IV  
CFP : cyan fluorescent protein  
CFTR : cAMP-regulated cystic fibrosis transmembrane conductance factor  
CHO : chinese hamster ovary cells  
CNG : cyclic nucleotide-gated channel  
CPSE : courant post synaptique excitateur  
CPSI : courant post synaptique inhibiteur  
CRE : cAMP response element  
CREB : cAMP reponse element binding protein  
EEG : électroencéphalogramme  
Epacs : protéines d'échange activées par l'AMPc  
FSK : forskoline  
FRET : fluorescence par transfert d'énergie de résonance  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GABA<sub>B</sub> : récepteur GABA de type B  
GBL :  $\gamma$ -butyrolactone  
GC : guanylyl cyclase  
GDP : guanosine diphosphate  
GFP : green fluorescent protein  
GHB : acide  $\gamma$ -hydroxybutyrique  
GIRK : canaux potassiques à rectification entrante activés par les protéines G  
GMPc : guanosine monophosphate cyclique  
GTP : guanosine triphosphate  
HARBS : high affinity rolipram binding site  
HCN : hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel  
HEK 293 : human embryonic kidney cells  
IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine  
ICUE : indicator for cAMP using Epac

KID : kinase inductible domaine  
LARBS : low affinity rolipram binding site  
NLS : signal de localisation nucléaire  
NMDA : N-methyl-D-aspartic acid  
nRT : noyau réticulé thalamique  
PDE : phosphodiesterase  
PLC : phospholipase C  
PKA : protéine kinase AMPc dépendante  
PKC : protéine kinase C  
PKI : protein kinase inhibitor  
PP : protéine phosphatase  
RCPG : récepteurs couplés aux protéines G  
SNC : système nerveux central  
TC : neurone thalamocorticaux  
VB : thalamus ventrobasal  
YFP : yellow fluorescent protein

**Partie 1 : Dynamique spatio-temporelle et régulation de l'activité de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate cyclique dans des préparations de neurones en tranche..... 5**

**Introduction..... 6**

**I. La voie de signalisation de l'AMPC dans les neurones..... 9**

1. Les récepteurs couplés aux protéines G .....	9
1.1 Structure et activation.....	9
1.2 Les récepteurs adrénérgiques.....	11
1.2.1 Voie de signalisation des récepteurs adrénérgiques.....	13
1.2.2 Localisation des récepteurs $\beta$ adrénérgiques.....	13
1.3 Le récepteur 5HT <sub>7</sub> .....	14
1.3.1 Voie de signalisation associée au récepteur 5-HT <sub>7</sub> .....	14
1.3.2 Localisation des récepteurs 5HT <sub>7</sub> .....	14
2. Les Adénylyl-Cyclases.....	15
2.1 Structure .....	15
2.2 Régulation.....	17
2.3 Expression des AC et implications fonctionnelles .....	18
3. Les phosphodiésterases .....	18
3.1 Structure et régulation .....	19
3.2 Les PDEs dégradant l'AMPC.....	19
4. La Protéine Kinase dépendante de l'AMPC.....	22
4.1 Structure .....	22
4.2 Diversité .....	23
4.3 Régulation.....	25
4.4 Localisation tissulaire et subcellulaire : Les AKAPs.....	25
4.4.1 Interaction entre les AKAPs et les différentes sous-unités régulatrices de la PKA.....	27
4.4.2 Localisation des AKAPs.....	27
4.4.3 Les autres protéines liées par les AKAPs .....	28
5. Les canaux régulés par les nucléotides cycliques.....	28
5.1 Les canaux CNG.....	30
5.2 Les canaux HCN.....	30
6. Les protéines d'échanges activées par l'AMPC : Epacs.....	32

**II. Les cibles de la PKA dans les neurones et leur effet sur l'homéostasie cellulaire..... 34**

1. A la membrane.....	34
1.1 Le courant de l'AHP lente .....	34
1.1.1 Cinétique .....	34
1.1.2 Régulation .....	36
2. La régulation génique.....	36

2.1 CREB .....	37
2.1.1 Structure et activation .....	37
2.1.2 Régulation par la PKA .....	38
<b>III. Comment se crée la spécificité des signaux : la compartimentation.....</b>	<b>39</b>
1. Mise en évidence de microdomaines d'AMPC .....	39
2. Implication des PDEs .....	41
3. Implications des AKAPs.....	43
4. Importance de la localisation et du couplage des RCPG .....	43
5. Le modèle actuel de la compartimentation cellulaire.....	45
<b>IV. Les sondes fluorescentes AMPC et PKA et leur utilisation en biologie.....</b>	<b>48</b>
1. Principe de la fluorescence .....	48
2. Le FRET : principe et technique d'imagerie utilisée.....	50
3. Les sondes AMPC et PKA codées génétiquement et leurs utilisations en biologie.....	50
3.1 La sonde basée sur la PKA .....	52
3.1.1 Principe .....	52
3.1.2 Mise en évidence de microdomaines d'AMPC dans les cardiocytes néonataux de rat .....	52
3.2 Les sondes basées sur Epac.....	54
3.2.1 Principe .....	54
3.2.2 Vitesse de diffusion de l'AMPC dans des cellules vivantes.....	54
3.3 La sonde AKAR rapporteur de l'activité PKA .....	56
3.3.1 Principes.....	56
3.3.2 Importance de la localisation des substrats de la PKA dans la régulation temporelle de leur phosphorylation.....	56
<b><i>Article 1 (en soumission) : Subcellular integration of cyclic-AMP-dependant protein kinase A activity dynamics in neurons in mouse brain slices .....</i></b>	<b>59</b>
<b>Contexte et but de l'étude .....</b>	<b>60</b>
<b>Techniques utilisées .....</b>	<b>60</b>
<b>Principaux résultats de l'étude qui viennent d'être présentés sont : .....</b>	<b>62</b>
<b><i>Article 2 (en préparation) : Les PDE4 régulent l'activation de la PKA en réponse à la stimulation des récepteurs <math>\beta</math> adrénergiques. ....</i></b>	<b>63</b>
<b>Contexte de l'étude .....</b>	<b>64</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>66</b>
Réponses $\beta$ -adrénergique dans les neurones corticaux et comparaison avec les réponses FSK. ....	66
Le blocage des PDEs produit une activation de la PKA. ....	66
Les PDE4 sont actives et dégradent l'AMPC dans les neurones corticaux et thalamiques. ....	68
Les PDE4 régulent les réponses $\beta$ -adrénergiques dans les neurones corticaux.....	68



En conclusion :	70
<b>Discussion</b>	<b>71</b>
1. Les AC sont toniquement actives dans les neurones corticaux	71
2. L'inhibition des sites de haute et de basse affinités des PDE4 est-elle à l'origine de l'activation de la PKA dans les neurones corticaux ?	71
3. Le rolipram à faible concentration augmente la discrimination des réponses $\beta$ adrénergiques dans les neurones pyramidaux.	72
4. L'activation généralisée de la voie AMPc/PKA dans le cerveau peut-il produire un déficit d'apprentissage ?	73
<b>Discussion générale</b>	<b>75</b>
<b>A. Absence d'effet des RCPG liés aux protéines de type Gi/Go sur la phosphorylation de la sonde AKAR2.</b>	<b>75</b>
1. Résultats complémentaires	75
2. Les effets électrophysiologiques des récepteurs couplés aux protéines Gi/Go	76
3. Spécificité des protéines Gi/Go impliquées dans le couplage des récepteurs	76
4. Rôle des protéines $\beta\gamma$	77
5. Activité tonique de l'AC implique-t-elle une activation tonique de la PKA ?	78
<b>B. La détection des microdomaines d'AMPc est-elle compatible avec l'imagerie de fluorescence ?</b>	<b>78</b>
1. Les limites des systèmes d'imagerie traditionnels	79
2. La diffusion des protéines	79
3. Les modes de stimulation de la voie AMPc/PKA	80
<b>C. La compartimentation fonctionnelle de la voie AMPc/PKA dans les neurones</b>	<b>81</b>
2.1. Le modèle de barrière de diffusion physique	81
2.2. Implication des PDEs dans la barrière de diffusion	83
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>85</b>
<b><i>Partie 2 : Les mécanismes cellulaires d'action du GHB dans le thalamus à l'origine de l'apparition des crises d'épilepsie de type absence et de la diminution des états de vigilance</i></b>	<b>89</b>
<b><i>Introduction</i></b>	<b>90</b>
<b><i>I. Le GHB est-il un neurotransmetteur du système nerveux central ?</i></b>	<b>91</b>
1. Voie de biosynthèse du GHB et libération dans la fente synaptique	91
2. Les sites de liaison du GHB, leur distribution et leur couplage	93
3. Le clonage du récepteur du GHB	95

3.1 Le récepteur spécifique du GHB .....	95
3.2 Homologie de séquence avec les récepteurs tétraspanines .....	95
3.3 Distribution tissulaire du récepteur cloné .....	97
3.4 Différences dans les effecteurs activés.....	97
3.5 Pertes d'effets des antagonistes spécifiques. ....	99
<b><i>II. Le GHB active les récepteurs GABA de type B.....</i></b>	<b>100</b>
<b>1. Les récepteurs GABA<sub>B</sub> et leurs fonctions dans le SNC .....</b>	<b>100</b>
<b>2. Le GHB se lie et active les récepteurs GABA<sub>B</sub>.....</b>	<b>102</b>
<b>3. L'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> est à l'origine des effets exogènes du GHB : étude des souris invalidées pour le récepteur GABA<sub>B</sub>R1.....</b>	<b>103</b>
<b><i>III. Les effets du GHB sur l'excitabilité thalamique. ....</i></b>	<b>105</b>
<b>1. La boucle thalamocorticale .....</b>	<b>105</b>
<b>2. Les effets du GHB exogène dans le thalamus.....</b>	<b>107</b>
<b>3. L'action thalamique du GHB .....</b>	<b>107</b>
<b><i>Article 3 : Pathway-specific action of <math>\gamma</math>-hydroxybutiric acid in sensory thalamus and its relevance to absence seizures.....</i></b>	<b>109</b>
<b><i>Discussion .....</i></b>	<b>110</b>
<b>Mécanismes cellulaires d'action du GHB. ....</b>	<b>110</b>
1. Crise d'épilepsie absence .....	110
2. Augmentation des périodes de sommeil de stade 3 et 4.....	112
3. Action bi-directionnelle des agonistes GABA <sub>B</sub> dans l'aire tegmentale ventrale. ....	113
<b><i>Perspectives .....</i></b>	<b>115</b>
<b><i>Bibliographie.....</i></b>	<b>116</b>

**Partie 1 : Dynamique spatio-temporelle et  
régulation de l'activité de la protéine kinase  
activée par l'adénosine monophosphate  
cyclique dans des préparations de neurones en  
tranche**

# Introduction

Les études sur l'activation de la glycogène phosphorylase hépatique par le glucagon et l'adrénaline ont conduit Earl Sutherland à proposer que le message hormonal est transduit à l'intérieur de la cellule par un second messenger. C'est entre 1956 et 1957, que plusieurs études ont mis en évidence pour la première fois l'existence d'un facteur soluble capable de transformer, par une phosphorylation, la phosphorylase B (inactive) en phosphorylase A (active) en réponse à l'hormone. En 1958, Sutherland et Rall ont purifié et caractérisé ce facteur diffusible qui se trouve être composé d'une adénine, d'un ribose et d'un phosphate, nommé 3,5-AMP ou AMPc (Sutherland & Rall, 1958).

Ce concept de second messenger intracellulaire a été accueilli avec un certain scepticisme notamment par manque de moyens techniques pour l'étudier. En effet, seuls quelques laboratoires étaient capables de produire des mesures fiables et renouvelables de la concentration intracellulaire d'AMPc. Puis, en 1968, le groupe de Krebs a réussi à purifier la protéine capable de lier l'AMPc et d'activer par une série de phosphorylation la phosphorylase B : la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Walsh *et al.*, 1968). Cette enzyme a permis la mise au point d'un dosage simple et sensible de l'AMPc au début des années 70. Ce dosage radioimmunologique permettant de mesurer des concentrations physiologiques d'AMPc a produit une explosion des études centrées sur ce second messenger (Beavo & Brunton, 2002; Pawson & Scott, 2005).

Mais comment l'hormone messenger extracellulaire peut-elle produire une augmentation intracellulaire d'AMPc ? A cette époque, les deux enzymes participant à la régulation de la concentration de l'AMPc étaient connues :

- l'adénylyl-cyclase (AC) qui catalyse la formation d'AMPc à partir de l'ATP.
- la phosphodiesterase (PDE) qui dégrade l'AMPc en une molécule non cyclique le 5'-AMP.

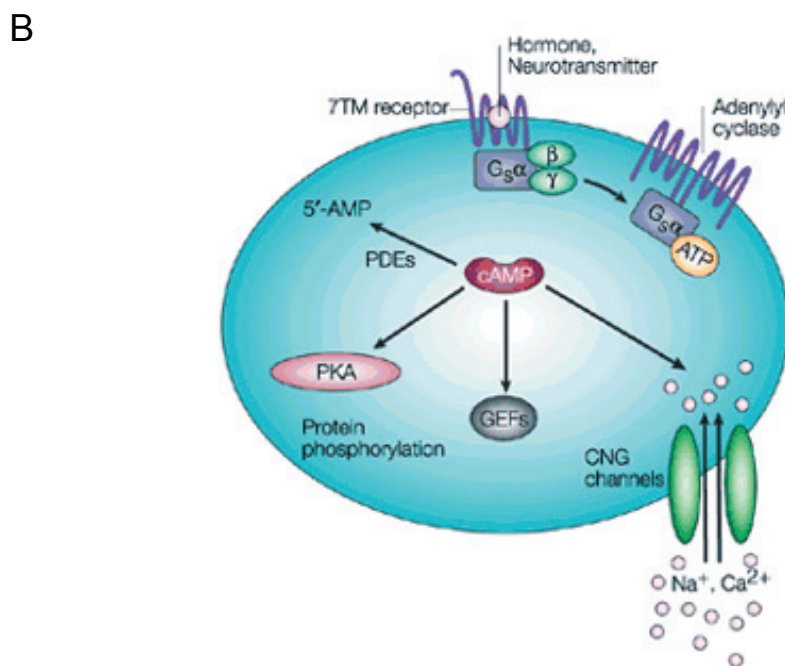
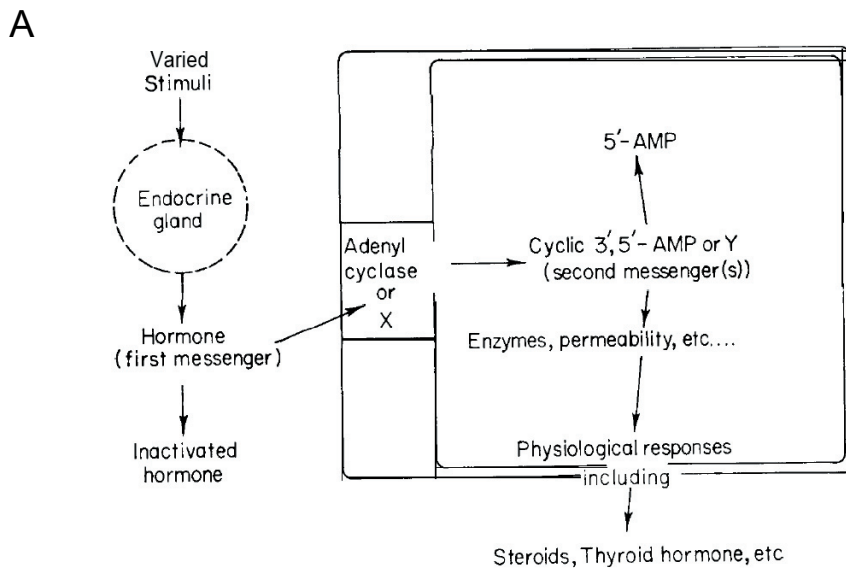
Seule l'AC semblait être activée en présence de l'hormone. Elle a donc été considérée comme le générateur de messenger intracellulaire et comme le récepteur du signal extracellulaire. Cependant, si cette hypothèse était vraie, il aurait fallu autant de type d'AC que de stimulus extracellulaire. Rodbell a été l'un des premiers à proposer que l'AC ne jouait pas le rôle de discriminateur car il avait observé que l'application de différentes hormones ne produisait pas

d'effet cumulatif sur la synthèse d'AMPc. Il proposa donc l'existence de récepteurs différents capable d'interagir avec un pool commun d'AC (Birnbaumer & Rodbell, 1969). Enfin les travaux du groupe de Gilman ont permis de montrer que le couplage entre le récepteur et l'AC est assuré par l'intermédiaire de protéines hétérotrimériques, les protéines G (figure 1) (Ross *et al.*, 1977).

L'ensemble de ces découvertes a permis de caractériser la voie de l'AMPc, le modèle de référence des voies de signalisation impliquant les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Le schéma général de cette voie de signalisation est resté le même pendant près de 20 ans. Ces dernières années, il a été modifié par de nombreuses avancées technologiques. Les progrès en biologie moléculaire ont montré l'existence de nombreuses isoformes de l'ensemble des protagonistes de cette voie. Les récepteurs couplés aux protéines G constituent sans conteste la famille de protéines la plus vaste chez les mammifères (>1000), on dénombre 20 protéines G $\alpha$ , 9 types d'AC et environ 50 types de PDE, sans compter les différents sous type de protéines  $\beta\gamma$ , de phosphatases ou de protéines intervenant dans l'édification de complexes moléculaires.

Les nombreuses isoformes de ces protéines révèlent des possibilités immenses dans la régulation spatiale et temporelle de cette voie de signalisation. Le challenge actuel repose donc sur la compréhension des interactions protéiques à l'origine de la spécificité de cette voie de signalisation. Comment l'augmentation intracellulaire de l'AMPc peut permettre d'obtenir des effets physiologiques différents ? La PKA semble être un point central dans cette discrimination de part sa localisation subcellulaire finement réglée. De plus, les cinétiques de son activation semblent être essentielles dans l'expression et la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (Wong & Scott, 2004).

C'est dans cette perspective que doit être analysée une autre révolution, celle de l'imagerie, dont les technologies ont littéralement explosé au cours des dix dernières années. Cette révolution est la résultante de progrès continus de l'optique, de l'informatique, de la chimie et de la biochimie des molécules fluorescentes et de la biologie moléculaire et cellulaire. En développant les interfaces entre ces domaines scientifiques, de nouvelles techniques ont vu le jour, qui permettent d'aborder des questions liées à l'intégration des fonctions des édifices moléculaires complexes dans l'espace et dans le temps. La voie de l'AMPc/PKA n'a pas échappé à cette révolution et de nombreuses sondes ont été développées afin de suivre l'activation spatiale et temporelle des effecteurs de cette voie de signalisation.



**Figure 1** : Représentation schématique du concept de second messenger et de la voie de l'AMPc.

**A**, Une libération d'hormones dans le milieu intérieur a lieu lors de la détection de stimulus variés. L'hormone circulante constitue le premier messenger qui peut se lier sur un récepteur membranaire. Cette liaison active l'AC est conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Cet AMPc produit va ensuite réguler de nombreuses fonctions cellulaires par activation de différents effecteurs. La spécificité des effets de la voie de l'AMPc est assurée par l'expression de récepteurs et d'effecteurs spécifiques au type cellulaire (d'après Sutherland 1977). **B**, Représentation schématique de la voie de synthèse et de régulation de l'AMPc (d'après Beavo et Brunton 2002).

# ***I. La voie de signalisation de l'AMPC dans les neurones.***

## **1. Les récepteurs couplés aux protéines G**

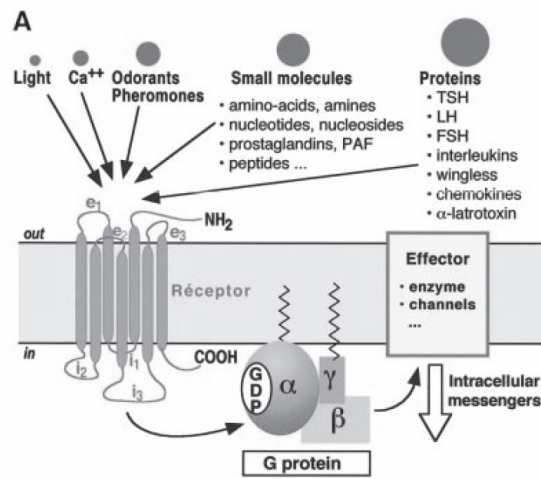
La famille des récepteurs couplés aux protéines G constitue la plus grande famille de gènes chez les vertébrés, comprenant plusieurs milliers de membres et représentant plus de 1 % du génome chez les mammifères. Cette diversité est encore accrue par les modifications post-transcriptionnelles (épissage alternatif, édition des ARNm) et les modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou glycosylation par exemple). Cette famille de récepteurs est capable de reconnaître des messagers aux structures aussi variées que les photons, les ions, les nucléotides, les peptides et les protéines (figure 2). On estime que 60% des médicaments utilisés actuellement utilisent une cible liée au mécanisme de transduction de ces récepteurs (Bockaert & Pin, 1999).

### **1.1 Structure et activation**

L'analyse du profil hydrophatique des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) prédit que ces récepteurs sont composés de 7 domaines transmembranaires, de trois boucles intracellulaires (i1, i2, i3), d'une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire (figure 2). Ces récepteurs ont un rôle catalytique et favorise l'échange GDP-GTP au sein des protéines G lors de la liaison des agonistes. Les protéines G sont composées de trois sous-unités ( $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ ) (Gilman, 1987). La sous-unité  $G\alpha$  lie le GDP et les sous-unités  $G\beta\gamma$  sont indissociables sauf en milieu dénaturant.

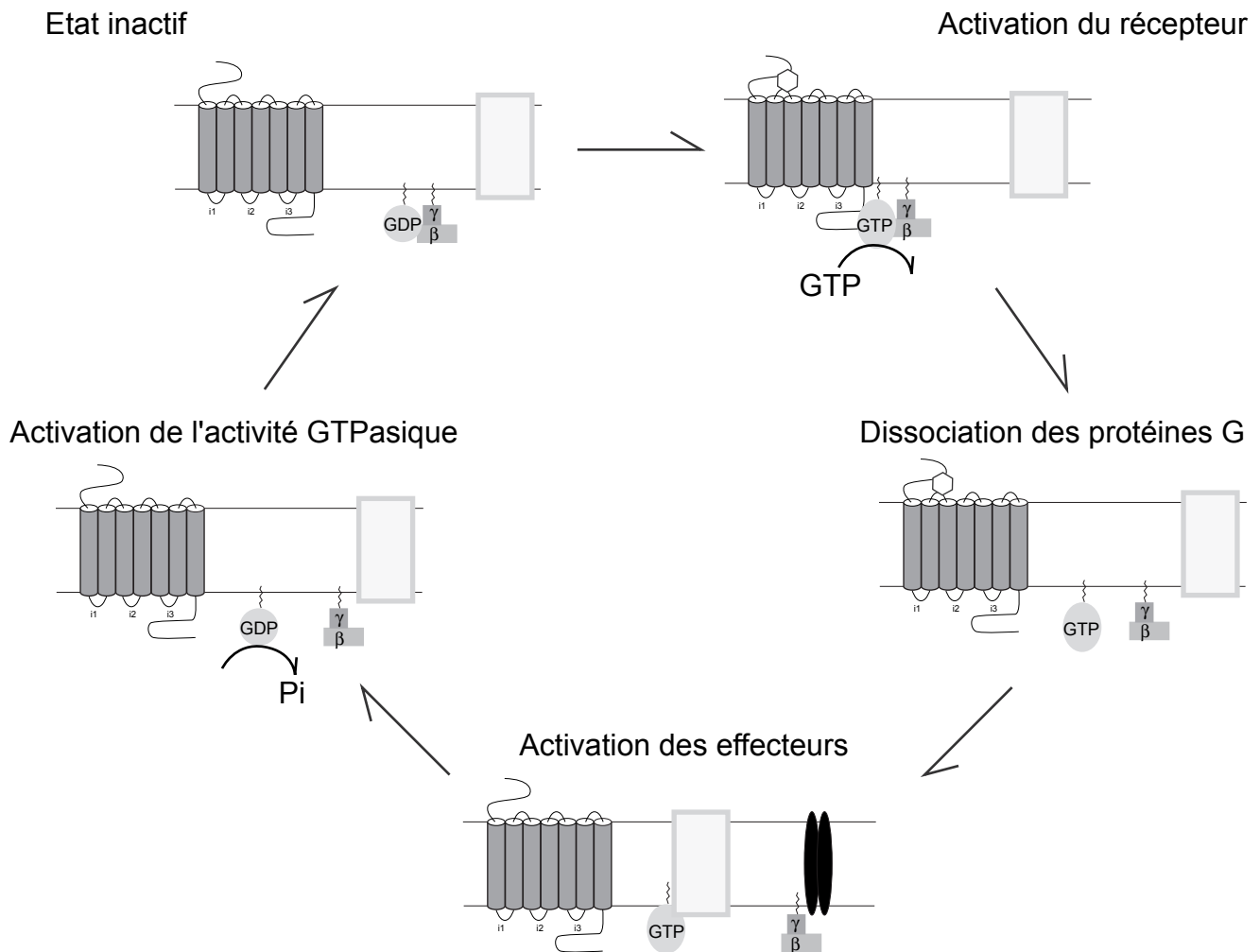
L'activation des protéines G est résumée sur la figure 3.

Le type de sous-unité  $G\alpha$  intervenant dans la réponse varie en fonction du récepteur et dicte l'association du récepteur à des effecteurs particuliers : on distingue ainsi les sous-unités  $G\alpha_s$  (stimulatrices de l'adénylyl-cyclase),  $G\alpha_i$  (inhibitrices de l'adénylyl-cyclase),  $G\alpha_q$



**Figure 2 :** Structure des récepteurs couplés aux protéines G.

Les récepteurs couplés aux protéines G ont une structure commune faite de sept domaines transmembranaires connectés par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Ces récepteurs sont activés par des messagers très variés (d'après Bockaert et pin 1999).



**Figure 3 :** Cycle d'activation des récepteurs couplés aux protéines G.

Lors de la liaison du ligand, le récepteur est stabilisé dans une conformation active qui permet l'interaction avec les sous-unités  $\alpha$  des protéines G. Dans cet état, le récepteur stimule la libération du GDP de la sous-unité  $\alpha$ . Il se produit alors une dissociation des partenaires et les sous-unités  $\alpha$ -GTP et  $\beta\gamma$  s'associent ensuite à des effecteurs (AC, canaux ioniques par exemple). La sous-unité  $\alpha$  possède une activité GTPasique qui met fin aux interactions des protéines G avec leurs effecteurs et conduit à la réassociation des sous-unités  $\alpha\beta\gamma$ .



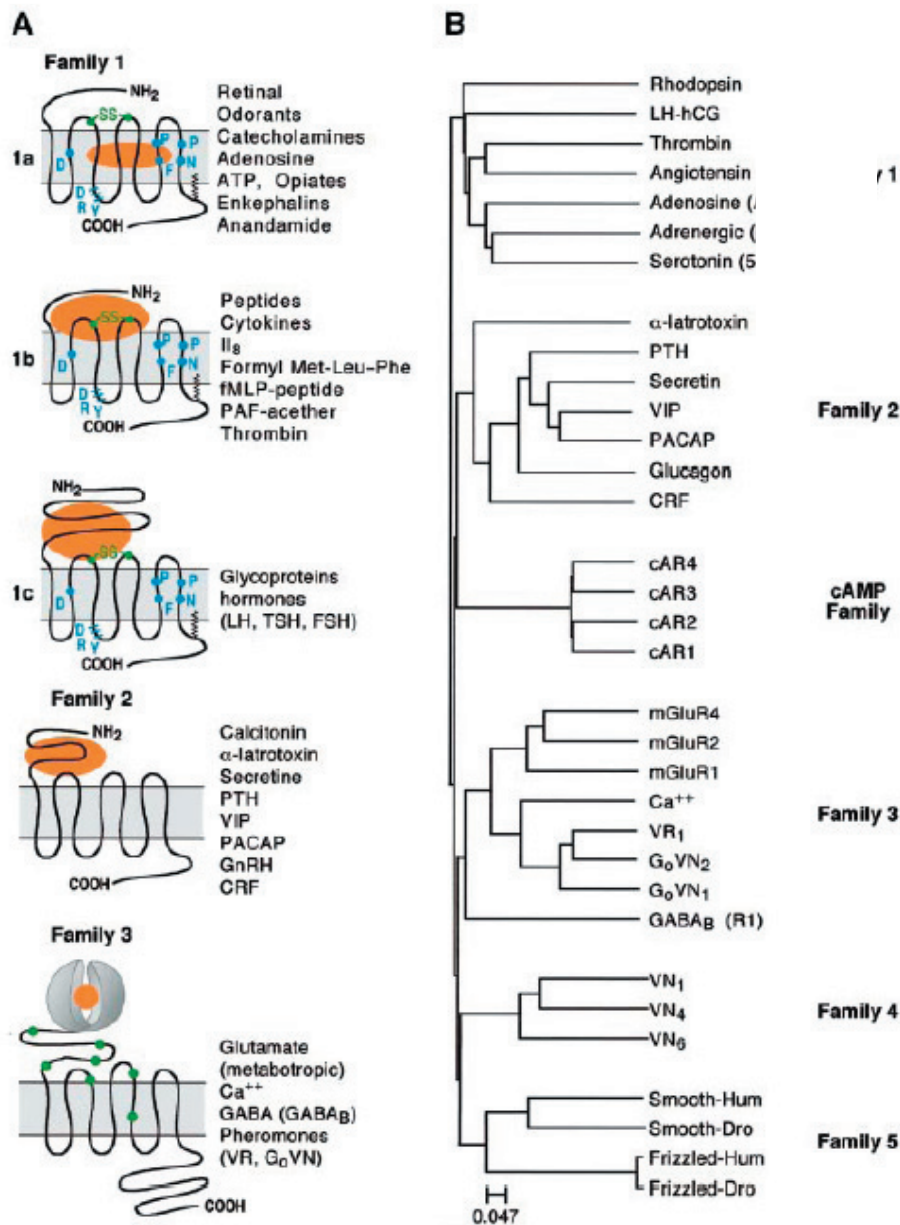
(stimulatrices de la phospholipase C) et  $G\alpha_{12/13}$  (stimulatrices de la phospholipase A2). Ces protéines ont été définies en fonction des effecteurs cités mais agissent en réalité sur des effecteurs variés. Cette diversité est amplifiée par l'existence de nombreuses isoformes pour chaque type de sous-unité  $\alpha$ . De plus les protéines  $G\beta\gamma$  qui peuvent s'associer avec tous les types de sous-unités  $\alpha$  peuvent moduler un grand nombre d'effecteurs (Bockaert & Pin, 1999).

Chez les vertébrés, plusieurs familles de RCPG peuvent être définies selon que ces protéines partagent ou non des similarités au niveau de leur séquence en acides aminés (figure 4). Les récepteurs de la famille 1, de loin les plus nombreux sont avec ceux des familles 2 et 3 les mieux caractérisés. Le couplage aux protéines G des récepteurs des autres familles reste à démontrer pour la plus part d'entre eux (Bockaert & Pin, 1999; Foord *et al.*, 2005).

Parmi les très nombreux RCPG qui modulent l'activité des AC, au cours de ma thèse je me suis intéressé aux récepteurs  $\beta$  adrénergiques et 5-HT7 qui appartiennent tout les deux à la famille 1a (figure 4).

## 1.2 Les récepteurs adrénergiques

La première classification des récepteurs adrénergiques s'est effectuée en tenant compte de leurs effets physiologiques et de leurs localisations anatomiques. Les récepteurs  $\alpha$  provoquent une vasoconstriction des tissus cibles en réponse à l'adrénaline alors que les récepteurs  $\beta$  produisent une vasodilatation. Puis, ces récepteurs ont été classés en fonction de leur couplage aux voies de seconds messagers. Cette classification ne tenait pas compte de l'affinité des différents types de récepteurs pour leurs agonistes (Nicholas *et al.*, 1996). Par la suite, on a pu distinguer les récepteurs  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$  grâce à l'action et l'efficacité différentes de la noradrénaline, de l'adrénaline et de l'isoprotérénol. Enfin, le clonage des récepteurs a permis de confirmer l'existence de différentes familles et montrer l'existence d'isoformes des récepteurs adrénergiques. C'est le récepteur  $\beta_2$  adrénergique des mammifères qui a été cloné le premier (Dixon *et al.*, 1986). Actuellement, on distingue 3 sous-types de récepteurs  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  et  $\alpha_{1D}$ ), 4 sous-types de récepteurs  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A-D}$ ) et trois récepteurs  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ ) (Berridge & Waterhouse, 2003).



**Figure 4:** Classification des récepteurs couplés aux protéines G.

**A**, les trois familles classiques de RCPG représentées avec leur domaine de liaison du ligand (orange). **B**, Arbre phylogénétique réalisé à partir d'un multi-alignement de séquences des régions transmembranaires des cinq familles de RCPG (d'après Bockaert et pin 1999).

### ***1.2.1 Voie de signalisation des récepteurs adrénergiques***

Les voies de signalisations intracellulaires associées à ces différents types de récepteurs sont les suivantes :

- La fixation d'agonistes sur les récepteurs  $\alpha_1$  produit la libération d'une protéine  $G_{\alpha q}/G_{\alpha_{11}}$  qui active la PLC. Cette activation va produire une augmentation de calcium intracellulaire et une activation de la PKC.

- Les récepteurs  $\alpha_2$  sont couplés aux protéines  $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$ . La liaison de l'agoniste libère les protéines  $G_{\alpha}$  qui vont inhiber les AC alors que les protéines  $G_{\beta\gamma}$  vont moduler de nombreux effecteurs.

- Les récepteurs  $\beta$  sont couplés aux protéines  $G_{\alpha s}$  et leur activation provoque une stimulation des AC et une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc.

Les couplages présentés précédemment ne sont pas totalement exclusifs. Certains récepteurs adrénergiques possèdent différents couplages qui se trouvent démasqués lors de conditions physiologiques particulières. En effet, les expériences réalisées par Pohjanoksa et coll. sur le récepteur  $\alpha_{2B}$ -adrénergique montrent que son couplage à Gs est modulé en fonction de l'activité de l'AC (Pohjanoksa *et al.*, 1997) : le couplage à Gs n'a été mis en évidence que pour des niveaux faibles d'activité de l'AC alors que seul le couplage à Gi est visible lorsque l'AC est stimulée par la forskoline (FSK diterpène végétal qui active directement l'AC). Des résultats obtenus sur les récepteurs  $\beta_2$  et  $\beta_3$ -adrénergiques montrent que ces récepteurs, préférentiellement couplés à Gs, peuvent être couplés à Gi mais ce couplage dépend du niveau d'activité de la PKA (Daaka *et al.*, 1997). Cette possibilité de changer le couplage en fonction du niveau d'activité de l'AC ou de la PKA pourrait constituer un mécanisme de régulation survenant à la suite d'une forte activation de la voie de l'AMPc.

### ***1.2.2 Localisation des récepteurs $\beta$ adrénergiques.***

Les récepteurs  $\alpha$  adrénergiques sont exprimés dans la majorité des neurones du cerveau chez le rongeur (Nicholas *et al.*, 1996). Les récepteurs  $\beta_1$  sont majoritaires dans le cerveau à l'exception du cervelet où les récepteurs  $\beta_2$  sont prédominants. D'une manière

générale, les récepteurs  $\beta$  présentent une densité élevée dans les couches superficielles du cortex, dans le noyau accumbens, la substance noire. La distribution de ces récepteurs n'est pas strictement corrélée avec la distribution des terminaisons noradrénergiques. Les neurones pyramidaux des couches profondes du cortex expriment les trois types de récepteurs adrénérgiques :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ .

Il est à noter que la seule source d'innervation noradrénergique du cerveau antérieur provient du Locus Cœruleus.

### **1.3 Le récepteur 5HT<sub>7</sub>**

Ce récepteur a été identifié sur la base d'homologie de séquence avec différents récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Cependant son degré d'homologie avec les récepteurs 5-HT de mammifères est relativement faible. Ces résultats ont suggéré que ce récepteur était l'unique membre d'un nouveau sous-groupe de récepteurs à la sérotonine, d'où le choix du nom de récepteur 5-HT<sub>7</sub> (Lucas & Hen, 1995). Le groupe Heidmann a démontré chez le rat et chez l'homme que le récepteur peut exister sous trois isoformes différentes : deux isoformes (5-HT<sub>7a</sub> et 5-HT<sub>7b</sub>) sont présentes dans les deux espèces et considérées comme homologues alors que les isoformes 5-HT<sub>7c</sub> et 5-HT<sub>7d</sub> sont respectivement spécifiques du rat et de l'homme (Heidmann *et al.*, 1997).

#### ***1.3.1 Voie de signalisation associée au récepteur 5-HT<sub>7</sub>***

Les trois isoformes sont couplées aux protéines Gs et régulent positivement la production d'AMPc. Leur efficacité de couplage aux protéines G est d'ailleurs très similaire (Heidmann *et al.*, 1998).

#### ***1.3.2 Localisation des récepteurs 5HT<sub>7</sub>***

L'isoforme 5-HT<sub>7a</sub> est la forme prédominante du récepteur dans toutes les structures cérébrales, représentant au moins 80 % des copies d'ARNm du récepteur. Les isoformes 5-HT<sub>7b</sub> et 5-HT<sub>7c</sub> sont donc minoritaires.

Le thalamus présente un très fort taux d'ARNm des différentes isoformes du récepteur et ce sont les noyaux de la ligne médiane et intralaminaires qui fournissent le signal le plus

important alors que les noyaux sensoriels ne contiennent pas d'ARNm 5-HT<sub>7</sub>. Le récepteur est également retrouvé au niveau cortical et hippocampique mais à des niveaux moins importants (Vizuete *et al.*, 1997).

La sérotonine libérée dans les structures du SNC provient des trois noyaux sérotoninergiques principaux du raphé (raphé magnus, dorsalis et medianus).

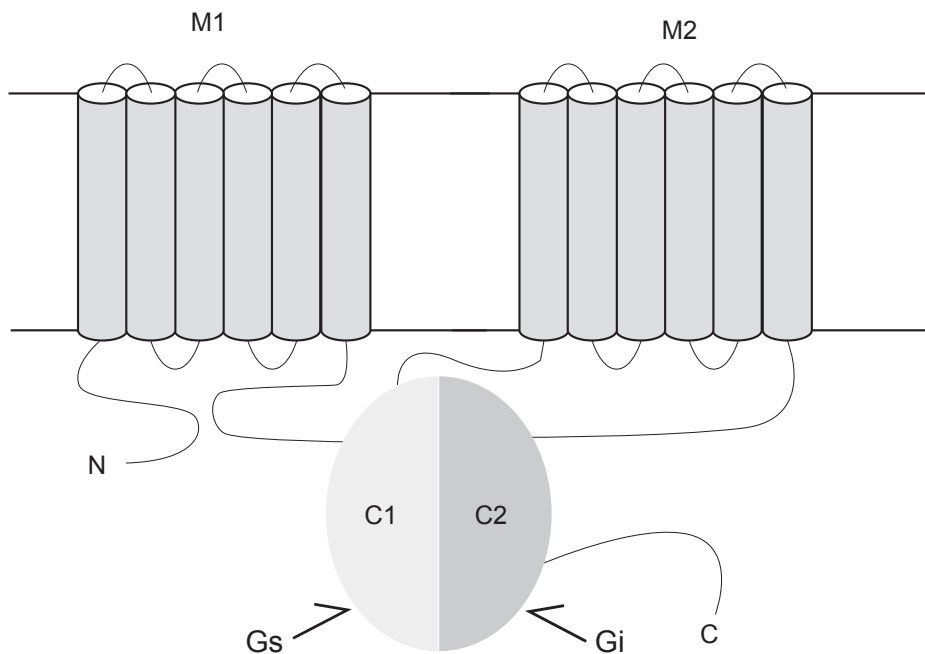
## 2. Les Adénylyl-Cyclases

Dans les années 1970, la purification partielle de l'AC a permis de déterminer son poids moléculaire et d'effectuer des caractérisations biochimiques de cette enzyme. Ces données ont montré l'existence deux types d'AC : les AC sensibles à la calmoduline ayant liée le calcium (Ca-CaM) et les AC insensibles. Nous verrons par la suite que cette séparation reste toujours d'actualité. C'est seulement au début des années 1990 que la première AC a été clonée à partir d'une banque d'ADNc de cerveau bovin (Krupinski *et al.*, 1989).

### **2.1 Structure**

Actuellement chez les mammifères, on compte 9 isoformes membranaires d'AC qui sont le résultat du produit de gènes différents (AC1-9). Seules les isoformes des AC5, 6 et 8 possèdent des variants d'épissage. Il existe également une forme soluble de l'AC qui est exprimée essentiellement au niveau des testicules (sAC). Toutes les isoformes membranaires sont exprimées dans le SNC (Tasken & Aandahl, 2004).

La séquence en acides aminés et la structure hypothétique de l'AC ont été déterminées pour l'AC1 lors de son clonage (Krupinski *et al.*, 1989). L'AC1 est une grosse glycoprotéine membranaire d'environ 120kDa. L'analyse de son profil hydrophatique et de sa séquence ont suggéré une structure formée de deux domaines très similaires M1 et M2 chacun constitué de six segments transmembranaires. Ces deux domaines ne présentent aucune homologie avec d'autres protéines. Au niveau de la boucle intracellulaire qui lie M1 et M2 (domaine C1) et au niveau de l'extrémité C-terminale intracellulaire (domaine C2) on retrouve deux régions très conservées (C1 et C2, figure 5). La très grande conservation de ces deux régions, chez tous



**Figure 5 :** Représentation schématique de la topographie fonctionnelle de l'AC. Les cylindres représentent les segments transmembranaires (M1 et M2). Les deux domaines C1 et C2 représentent les zones de fortes homologie qui s'associent en un hétérodimère pour former le site catalytique de l'enzyme. Le site de liaison de la FSK se situe à l'interface des deux domaines C1 et C2 et les sites de liaison pour les régulateurs Gs et Gi sont indiqués (d'après Dessauer et al. 1999).

AC isoform	Response to cAMP signaling pathway component <sup>a</sup>					
	G $\alpha$ s	G $\alpha$ i	G $\beta\gamma$	FSK	Calcium	Protein kinases
AC1	↑	↓ (CaM- or FSK-stimulated activities)	↓	↑	↑ (CaM) ↓ (CaM kinase IV)	↑ PKC (weak) ↓ (CaM kinase IV)
AC2	↑	→	↑ (when stimulated by G $\alpha$ s)	↑		↑ (PKC)
AC3	↑	↓		↑	↑ (CaM) (in vitro) ↓ (CaM kinase II)	↑ (PKC) (weak) ↓ (CaM kinase II)
AC4	↑		↑	↑		↑ (PKC)
AC5	↑	↓	↓ ( $\beta$ 1 $\gamma$ 2)	↑	↓ (<1 $\mu$ M)	↓ (PKA) ↑ (PKC $\alpha$ / $\zeta$ )
AC6	↑	↓	↓ ( $\beta$ 1 $\gamma$ 2)	↑	↓ (<1 $\mu$ M)	↓ (PKA, PKC)
AC7	↑		↑	↑		↑ (PKC)
AC8	↑	↓ (Ca <sup>2+</sup> rises)		↑	↑ (CaM)	→ (PKC)
AC9	↑	↓		↑ (weak)	↓ (calcineurin)	
sAC	→	→		→		

positive regulatory response; ↓, negative regulatory response; →, neutral response.

**Figure 6 :** Propriétés de régulation des adénylyl cyclases des mammifères. Les AC dont l'activité enzymatique est stimulée par le calcium sont représentées en gris (d'après Hanoune et Defer, 2001).

les membres de la famille des AC, a été considérée comme une preuve de la présence de l'activité catalytique dans les régions C1 et C2 (Dessauer *et al.*, 1999; Hanoune & Defer, 2001).

## 2.2 Régulation

L'interaction entre les deux domaines intracellulaires (C1 et C2) est nécessaire pour l'activité catalytique de l'enzyme, et la plupart des régulateurs intracellulaires connus agissent sur ces domaines catalytiques. Ces domaines intracellulaires conservent une activité catalytique même en absence des domaines transmembranaires. Les domaines transmembranaires pourraient ne servir qu'à la localisation des AC (Ishikawa & Homcy, 1997). Les propriétés de régulation communes aux 9 formes membranaires de l'AC décrites jusqu'à présent montrent toutes une activité basale qui est stimulée par les protéines Gs. Les protéines Gs se fixent sur la région C2 pour exercer leur effet activateur alors que les protéines Gi se lient à la région C1. De plus, toutes les isoformes sauf l'AC9 peuvent être stimulées par la FSK (figure 6) (Hanoune & Defer, 2001). Les variations structurales confèrent aux AC des propriétés de régulation très diverses. Dans le SNC, la distinction des différentes classes d'AC se fait le plus souvent en fonction de leur sensibilité à la voie de signalisation du calcium :

- les AC régulées positivement par le calcium sont les AC1, AC3 et AC8.
- les AC régulées négativement par le calcium, AC5 et AC6, sont inhibées par des concentrations de calcium inférieures à 1 $\mu$ M alors que l'isoforme AC9 est sensible à la calcineurine.
- les AC insensibles au calcium sont les AC2, AC4 et AC7.

La plupart des ACs sont régulées par les sous-unités  $\beta\gamma$  libérées lors de l'activation des protéines G (Figure 6). On notera par exemple que les AC1, AC5 et AC6 sont inhibées par  $G\beta\gamma$  alors que les AC2, l'AC4 et l'AC7 sont stimulées (Hanoune & Defer, 2001). Certains éléments suggèrent que ces régulations produisent des interactions complexes entre des récepteurs couplés positivement et négativement à l'AC (*voir discussion : absence d'effet des protéines Gi*). De plus, les ACs possèdent des sites de phosphorylation pour la PKC, la PKA et la CaMKinase II (CaMKII). D'un point de vue biophysique, les sites d'actions de ces régulateurs se situent au niveau du domaine C1 (Gi, Ca-CaM, PKA, CaMKIV) ou du domaine C2 (Gs, PKC, Ca-CaMKII, figure 5) (Tasken & Aandahl, 2004). Les AC sont donc capables d'intégrer des signaux provenant d'autres voies de signalisation (Cooper, 2003).

## **2.3 Expression des AC et implications fonctionnelles**

L'ensemble des AC membranaires est exprimé dans le SNC des mammifères. Pourtant la distribution de ces isoformes est très hétérogène. Il apparaît donc que la distribution des isoformes dans un noyau particulier influencera à la fois la localisation et l'amplitude des variations de concentration d'AMPC en réponse à un stimulus. Certaines études suggèrent que l'expression de certaines isoformes d'AC permettrait des régulations physiologiques particulières. Par exemple, les AC1, 2 et 8 sont exprimées essentiellement au niveau de l'hippocampe (cellules pyramidales de CA1 et CA2, cellules granulaires), du cortex cérébral et du cervelet et ces AC pourraient être associées dans la mise en place des processus mnésiques et cognitifs. La localisation préférentielle des AC1 et 8 au niveau des aires hippocampiques ainsi que leur sensibilité au calcium a amené certains auteurs à proposer que ces isoformes pourraient jouer un rôle de détecteur de coïncidence entre le signal calcique provenant de l'activation de récepteurs ionotropiques du glutamate et l'activation des de la voie AMPc/PKA provenant de l'activation des RCPG (Mons & Cooper, 1995).

La distribution subcellulaire précise des AC est très difficile à obtenir du fait de la très faible expression de ces protéines et de la faible discrimination des anticorps existants. La distribution des AC se fait le plus souvent grâce à la présence d'ARNm, ce qui ne permet pas de connaître précisément leurs localisations subcellulaires (Hanoune & Defer, 2001).

## **3. Les phosphodiésterases**

Les PDEs sont les enzymes responsables de l'hydrolyse des nucléotides cycliques (AMPC et GMPc). Elles jouent un rôle très important dans la régulation des concentrations intracellulaires d'AMPC et de GMPc. C'est principalement l'activité des PDEs qui va apporter une dimension temporelle aux signaux PKA. En effet, ce sont ces enzymes, qui en dégradant l'AMPC, vont ramener les concentrations de second messager en dessous du seuil d'activation des effecteurs.



### 3.1 Structure et régulation

La super-famille des PDEs contient actuellement plus de 50 membres regroupés en 11 familles selon leurs propriétés structurales, enzymatiques, et leurs propriétés de régulation par des agents endogènes ou exogènes. Chaque famille est codée par 1 à 4 gènes qui peuvent subir des épissages alternatifs, ce qui explique les 50 PDEs obtenues à partir des 11 familles principales. La nomenclature suit cette organisation : par exemple la PDE4D3 est la PDE de la famille 4 codée par le gène D et produite par l'épissage alternatif 3 de ce gène. Parmi ces familles, les PDEs 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 sont capables de dégrader l'AMPc dans des conditions physiologiques (Mehats *et al.*, 2002).

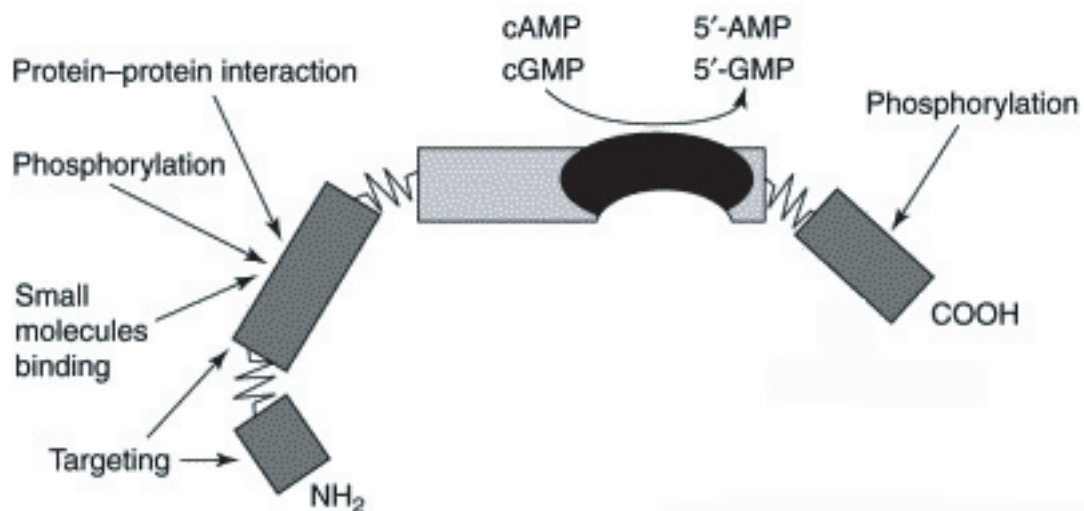
Les PDEs de mammifères partagent une organisation structurale commune, avec un domaine catalytique conservé situé près de l'extrémité C-terminale et des domaines de régulation et d'adressage situés essentiellement près de l'extrémité N-terminale. Les motifs de régulation incluent des domaines liaison des nucléotides cycliques, des motifs d'interaction protéine-protéine et des sites consensus de phosphorylation (Figure 7) (Mehats *et al.*, 2002; Tasken & Aandahl, 2004). D'un point de pharmacologique, les xanthines (IBMX, caféine, théophylline) sont des inhibiteurs des PDEs.

### 3.2 Les PDEs dégradant l'AMPc

Dans le cadre de cette étude, les PDEs qui ont retenu notre attention sont plus particulièrement les PDEs qui dégradent l'AMPc (figure 8) :

- PDE1 : Cette famille de PDEs est codée par trois gènes différents qui produisent des isoformes avec des régions C et N terminales différentes. Ces enzymes ont un Km relativement élevé pour l'AMPc et jouent un rôle important dans la réduction des concentrations élevées d'AMPc obtenues en réponse à une activation de l'AC. L'association du calcium et de la calmoduline potentialise l'activité de ces isoformes. Les sources de calcium sont très diverses (ouverture de canaux calciques, libération des stocks intracellulaires...) et pourraient par l'intermédiaire de ces PDEs réguler la concentration intracellulaire d'AMPc (Houslay, 1998).

- PDE2 : Il existe deux isoformes principales de cette famille de PDEs. Une des isoformes se trouve adressée à la membrane plasmique alors que l'autre est cytosolique. La



**Figure 7 :** Représentation schématique de la structure des PDEs de mammifères. Le site catalytique apparaît en noir et constitue le coeur de la protéine. Les autres domaines indiqués en gris foncés ont un rôle régulateur. Les flèche représentent la localisation des sites de régulation et de localisation des PDEs (d'après Mehats et al. 2002).

Family	Name	Camp Km ( $\mu\text{m}$ )	cGMP	Number of genes	Selective inhibitors	IBMX Sensitivity
PDE1	Ca <sup>2+</sup> -CaM-stimulated	1-30	3	3	8-methoxy-IBMX, phenothiazines	+
PDE2	cGMP-stimulated	30-100	10-30	1	EHNA	+
PDE3	cGMP-inhibited	0.1-0.5	0.1-0.5	2	Cilostamide, milrinone	+
PDE4	cAMP-specific	0.5-4	> 50	4	Rolipram, roflumilast, Atriflo <sup>TM</sup>	+
PDE5	cGMP-specific	> 40	1.5	1	Zaprinast, sildenafil (Viagra <sup>TM</sup> )	+
PDE6	Photoreceptor	2000	60	4	-	+
PDE7	cAMP-high affinity	0.2	> 1000	2	-	+
PDE8	cAMP-high affinity	0.7	> 100	2	-	-
PDE9	cGMP-high affinity	> 100	0.07	1	-	-
PDE10	Dual substrate	0.5	3	1	-	+
PDE11	Dual substrate	1	0.5	1	-	+

**Figure 8 :** Propriétés des différentes familles de PDEs des mammifères et leurs sensibilités aux différents inhibiteurs. Les PDEs capable d'hydrolyser l'AMPc apparaissent en gris (d'après Mehats et al. 2002).

différence entre ces deux PDE2 se trouve au niveau de la région N terminale. Ces enzymes hydrolysent l'AMPc et le GMPc et possèdent un site régulateur qui lie le GMPc avec une forte affinité ce qui potentialise l'activité catalytique de ces PDEs. Une augmentation de GMPc peut donc stimuler la dégradation de l'AMPc (Mehats *et al.*, 2002). Ces PDEs sont réparties de façon hétérogène dans le cerveau des rongeurs : le cortex olfactif, l'amygdale et l'hippocampe présentant une forte densité d'ARNm (Van Staveren *et al.*, 2003).

- PDE3 : Deux gènes codent pour cette famille de PDEs qui ont une très grande affinité pour l'AMPc et qui sont inhibées par le GMPc. Ces enzymes sont activées par la PKA et aussi par la voie de signalisation de l'insuline (PI3kinase) qui diminuerait la concentration d'AMPc (Houslay, 1998). La régulation de ces PDEs apparaît comme complexe car la production de GMPc peut augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc par inhibition de ces enzymes. Les PDE3 sont exprimées de façon relativement homogène dans les différents noyaux du SNC et seul les ARNm des PDE3A présentent une plus forte densité dans le striatum et l'hippocampe (Reinhardt & Bondy, 1996).

- PDE4 : C'est la famille la plus large de PDEs. Il existe 4 gènes capables de produire chacun au moins 6 variants d'épissage. Les différences principales entre ces variants d'épissage reposent sur la taille de la partie N terminale. Il existe des isoformes de PDE4 courtes et d'autres longues. Au niveau de la région N terminale, il a été trouvé deux domaines très conservés : UCR 1 et 2 qui sont des domaines régulateurs qui contrôlent la conformation du site catalytique. Les formes longues possèdent les deux régions UCR alors que les formes courtes seulement la région UCR 2. La présence de ces domaines intervient directement dans la régulation du site catalytique de ces enzymes et dans leur localisation. La phosphorylation des formes longues des PDE4 par le PKA augmente leur activité catalytique. Les PDE4 dégradent spécifiquement l'AMPc et joueraient un rôle fondamental de régulateurs homéostatiques de la concentration intracellulaire d'AMPc (Houslay, 1998; Conti *et al.*, 2003). Les PDE4A, B et D sont exprimées tout au long du cerveau, seule la PDE4C est exprimée uniquement dans le bulbe olfactif (Perez-Torres *et al.*, 2000).

- PDE 7 : Famille de PDEs spécifique de l'AMPc ayant une affinité très basse. Ces PDEs sont exprimées dans le cerveau antérieur des rongeurs (Reyes-Irisarri *et al.*, 2005).

- PDE 8 : PDEs ont un Km très bas et spécifique de la dégradation de l'AMPc. Cette PDE n'est pas inhibée par l'IBMX. On ne connaît pas bien ses fonctions cellulaires. Ces enzymes possèdent un domaine PAS qui permet de réaliser des interactions protéine-protéine

et intervient dans la localisation subcellulaire des protéines (Soderling & Beavo, 2000). Cette famille de PDEs est très peu exprimée dans le cerveau (Perez-Torres *et al.*, 2003).

- PDE 10 : Ces PDEs ont la capacité de dégrader l'AMPc et le GMPc. Le Km de ces enzymes est favorable à l'AMPc, par contre la vitesse de dégradation de l'AMPc est beaucoup plus lente que celle du GMPc. Ceci suggère que lors d'une augmentation de la concentration d'AMPc, l'activité de dégradation du GMPc sera réduite (Soderling & Beavo, 2000). Ces PDEs sont spécifiques du striatum et du noyau accumbens (Hebb *et al.*, 2004).

La combinaison en PDEs exprimée par une cellule participe donc directement à la régulation des réponses AMPc et PKA. De plus, les nombreuses régulations croisées capables de moduler l'activité des PDEs font de ces enzymes une cible de choix pour modifier la concentration d'AMPc.

## 4. La Protéine Kinase dépendante de l'AMPc.

La PKA appartient à la famille des protéines kinases, grande famille de protéines représentant environ 2% du génome humain. La PKA a été une des premières protéines kinases découvertes, séquencées, clonées et cristallisées. Le domaine catalytique de la PKA a d'ailleurs été utilisé comme un prototype structural pour l'ensemble des protéines de cette famille (Taylor *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 2004).

### **4.1 Structure**

La PKA à l'état inactif (en absence d'AMPc) est un hétérotétramère constitué de 2 sous-unités catalytiques (C<sub>2</sub>) liées à un dimère de sous-unités régulatrices (R<sub>2</sub>) : R<sub>2</sub>C<sub>2</sub> constitue l'holoenzyme. Les sous-unités régulatrices sont liées entre elles au niveau N-terminal tandis que les sous-unités catalytiques lient les sous-unités régulatrices au niveau d'un motif pseudo-substrat (ou substrat dans le cas de RII) qui inhibe l'activité catalytique de l'enzyme. Chaque sous-unité régulatrice possède deux sites de liaison pour l'AMPc dont l'un avec une haute affinité pour l'AMPc (site B) et l'autre une faible affinité (site A). L'AMPc se lie coopérativement sur les sites A et B de la sous-unité régulatrice. Lorsque la PKA est

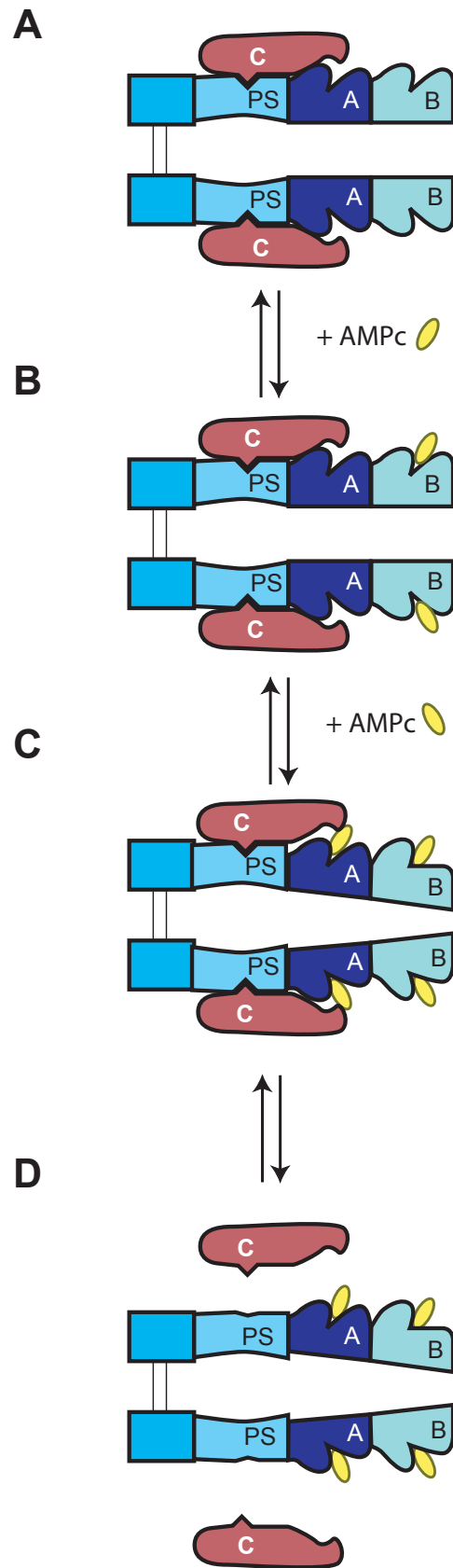
inactive seul le site B est démasqué et utilisable par l'AMPc. Quand l'AMPc est lié, il crée un changement intramoléculaire stérique qui augmente l'affinité du site A pour l'AMPc. La liaison de 4 molécules d'AMPc entraîne la dissociation des sous-unités régulatrices et catalytiques. Les deux sous-unités catalytiques libérées peuvent alors diffuser dans la cellule et phosphoryler différents substrats (figure 9). Il existe deux motifs reconnus par la PKA sur ces cibles : Arg-Arg-X-Ser/Thr-résidu hydrophobe et Arg-X-X-Arg-X-X-Ser/Thr-résidu hydrophobe, X pouvant être n'importe quel acide aminé (Taylor *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 2004).

## 4.2 Diversité

Initialement, deux isoformes de la PKA avaient été décrites en fonction de leur profil d'élution sur des colonnes DEAE et avaient été nommées PKA de type I et de type II. Il a été démontré par la suite que ces deux types contenaient des sous-unités catalytiques en association avec deux types de sous-unités régulatrices, RI et RII. Cependant, les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité d'isoformes, aussi bien pour les sous-unités régulatrices que catalytiques.

A l'heure actuelle, on différencie deux sous-unités RI nommées RI $\alpha$  et RI $\beta$  et deux sous-unités RII nommées RII $\alpha$  et RII $\beta$ . Les sous-unités RI se différencient des sous-unités RII d'un point de vue structural : alors que RI contient un site pseudo-substrat, RII contient un site réel de phosphorylation donc l'inhibition de l'activité catalytique d'une holoenzyme contenant RII est obtenue par autophosphorylation sur RII. Les sous-unités RI et RII se différencient aussi par leur affinité pour l'AMPc : alors que l'holoenzyme contenant RI présente *in vitro* une constante d'activation ( $K_a$ ) légèrement inférieure à 100 nM, la constante d'activation de l'holoenzyme contenant RII est d'environ 400 nM (Ishikawa & Homcy, 1997; Taylor *et al.*, 2004).

Trois types de sous-unités catalytiques ont été identifiés par clonage moléculaire et nommés C $\alpha$ , C $\beta$  et C $\gamma$ . Trois variants d'épissage existent pour la sous-unité C $\alpha$  (C $\alpha$ 1, C $\alpha$ 2, C $\alpha$ -s) qui diffèrent au niveau de l'extrémité N-terminale. Les sous-unités catalytiques C $\alpha$  sont exprimées constitutivement dans toutes les cellules alors que les sous-unités C $\beta$  sont exprimées dans des tissus plus spécifiques comme le cerveau et C $\gamma$  a été trouvée dans les testicules.



**Figure 9 :** Activation de la Protéine Kinase A.

**A,** L'holoenzyme inactivée est composée par la sous-unité catalytique (C, rouge) qui est liée sur le site pseudo-substrat (PS) de la sous-unité régulatrice (bleu). **B,** la liaison de l'AMPc (jaune) a lieu sur le seul site démasqué : le site B. **C,** La liaison de l'AMPc produit un changement de conformation qui augmente l'affinité du site A. **D,** la liaison de quatre molécules d'AMPc permet une libération des sous-unités catalytiques.

### 4.3 Régulation

L'activité catalytique de la PKA est régulée par un inhibiteur endogène, le PKI. Le PKI présente une très forte affinité pour la sous-unité catalytique de la PKA ( $K_d = 0,2 \text{ nM}$  en présence d'ATP) qu'il lie au niveau du site catalytique. Le PKI est non seulement un inhibiteur compétitif mais aussi un transporteur de la sous-unité catalytique. En effet, lors d'une augmentation d'AMPc, l'holoenzyme présente à l'extérieur du noyau se dissocie et la sous-unité catalytique libre peut alors diffuser librement dans le noyau. On suppose que cette diffusion est suffisante pour expliquer la translocation de la PKA et la phosphorylation de différentes protéines dans le noyau. La durée d'action de la PKA à l'intérieur du noyau est ensuite dépendante de son extrusion : celle-ci ne repose pas uniquement sur sa diffusion mais aussi sur sa liaison avec le PKI qui contient un signal d'exportation nucléaire et accélère l'extrusion de la PKA du compartiment nucléaire (Wen *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 1995a). L'expression du PKI ainsi que sa distribution intracellulaires pourraient varier en fonction de l'état de la cellule et expliquer certaines variations temporelles des effets nucléaires de la PKA : par exemple, le PKI $\alpha$  est surexprimé au moment de la mitose, et l'inhibition de la PKA à ce moment du cycle cellulaire est nécessaire pour que la cellule puisse rentrer en mitose (Wen *et al.*, 1995b).

### 4.4 Localisation tissulaire et subcellulaire : Les AKAPs

Il existe plus de 50 AKAPs (A-kinase anchoring protein) structurellement différentes qui ont été identifiées et chacune semble offrir à la PKA des interactions avec des protéines particulières et un adressage subcellulaire. MAP-2 (microtubule associated protein 2) a été la première AKAPs caractérisée du fait de sa copurification avec la sous-unité RII de la PKA. Toutes les AKAPs partagent un certain nombre de points communs dont un domaine de liaison à la PKA, un domaine d'adressage et une association avec différentes protéines (le plus souvent impliquées dans les voies de signalisation). En général, les AKAP sont classifiées en fonction de leurs poids moléculaire comme l'AKAP250 qui a un poids moléculaire de 250kDa (table 1). L'importance des AKAPs dans la fonction de la PKA

AKAP (Gene Nomenclature Committee Name)	Tissue	Subcellular Localization	Properties/Function
S-AKAP84/D-AKAP1/AKAP12//AKAP149 (AKAP1)	Testis, thyroid, heart, lung, liver, skeletal muscle, and kidney	Outer mitochondrial membrane/endoplasmic reticulum/nuclear envelope/sperm midpiece	Dual-specific AKAP; binds lamin B and PPI; multiple splice variants
AKAP-KL (AKAP2)	Kidney, lung, thymus, and cerebellum	Actin cytoskeleton/apical membrane of epithelial cells	Multiple splice variants
AKAP110 (AKAP3)	Testis	Axoneme	Binds G <sub>1,3α</sub>
AKAP82/FSCI (AKAP4)	Testis	Fibrous sheath of sperm tail	Potential role in sperm motility and capacitation; multiple splice variants; binds both RI and RII
AKAP75/79/150 (AKAP5)	Bovine/human/rat orthologs; brain	Plasma membrane/postsynaptic density	Polybasic domains target to plasma membrane and dendrites; binds PKC, calcineurin (PP2B), β-Ar, SAP97, and PSD-95
mAKAP (AKAP6)	Heart, skeletal muscle, and brain	Nuclear membrane	Binds PDE4D3; spectrin repeat domains involved in subcellular targeting
AKAP1518 <sub>α,β,γ,δ</sub> (AKAP7)	Brain, skeletal muscle, pancreas, and heart	Basolateral (α) and apical (β) plasma membrane, cytoplasm (?), secretory vesicles (δ)	Targeted to plasma membrane via fatty acid modifications; modulation of Na <sup>+</sup> and L-type Ca <sup>2+</sup> channels (α); ADH-mediated translocation of AQP2 from vesicles to apical membrane in distal kidney tubules
AKAP95 (AKAP8)	Heart, liver, skeletal muscle, kidney, and pancreas	Nuclear matrix	Involved in initiation of chromosome condensation; binds Fg7 condensin; zinc-finger motif
AKAP450/AKAP350/Yotiao/CG-NAP/Hyperion (AKAP9)	Brain, pancreas, kidney, heart, skeletal muscle, thymus, spleen, placenta, lung, and liver	Postsynaptic density/neuromuscular junction/centrosomes/Golgi	Binds PDE4D3, PPI, PP2A, PKN, and PKC; targets PKA and PPI to the NMDA receptor; multiple splice variants
D-AKAP2 (AKAP10)	Liver, lung, spleen, and brain		Dual-specific AKAP
AKAP220/hAKAP220 (AKAP11)	Testis and brain	Vesicles/peroxisomes/centrosome	Binds PPI; dual-specific AKAP
Gravin (AKAP12)	Endothelium	Actin cytoskeleton/cytoplasm	Binds PKC and β-Ar; Xgravin-like (Xg) is also a putative AKAP
AKAP-Lbc/Hg31/RG31 (AKAP13)	Ubiquitous	Cytoplasm	Hg31 RII binding site used in peptides to disrupt PKA anchoring; Rho-GEF that couples G <sub>1,2α</sub> to Rho
MAP2B	Ubiquitous	Microtubules	Binds tubulin; modulation of L-type Ca <sup>2+</sup> channels

Ezrin/AKAP78	Secretory epithelia	Actin cytoskeleton	Linked to CFTR via EBPS0/NHERF
T-AKAP80	Testis	Fibrous sheath of sperm tail	
SSeCKS (Src-suppressed C kinase substrate)	Testis, elongating spermatids	Actin remodeling	Gravin-like
Pericentrin	Ubiquitous	Centrosome	Binds dynein and γ-tubulin; unique RII-binding domain
WAVE-1/Scar	Brain	Actin cytoskeleton	Binds Abl and Wrp; involved in sensorimotor and cognitive function
Myosin VIIA	Ubiquitous	Cytoskeleton	
PAP7	Steroid-producing cells (adrenal gland and gonads)	Mitochondria	Hormonal regulation of cholesterol transport into mitochondria; binds RI in vivo
Neurobeachin	Brain	Golgi	
AKAP28	Primary airway cells	Ciliary axonemes	Modulation of ciliary beat frequency
Myeloid translocation gene (MTG) 8 and 16b	Lymphocytes	Golgi	
AKAP140	Granulosa cells and meiotic oocytes		Upregulated by FSH in granulosa cells; phosphorylated by CDK1 in oocytes; not cloned
AKAP85	Lymphocytes	Golgi	Not cloned
BIG2 (brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2)		Cytosol and Golgi	GEF for ADP ribosylation factor GTPases; binds R1e/R1β and R1e/R1β through three separate PKA binding domains; cAMP regulated translocation of BIG from cytosol to Golgi
Rab32		Mitochondria	Regulation of mitochondrial dynamics and fission
AKAPCE	<i>Caenorhabditis elegans</i>		Binds to RI-like subunit; RING-finger protein with FYVE and TGF-β receptor binding domain
DAKAP550	<i>Drosophila</i>	Plasma membrane/cytoplasm	Contains two RII-binding sites
DAKAP200	<i>Drosophila</i>	Plasma membrane	Binds F-actin and Ca calmodulin
AKAP97/radial spoke protein 3 (RSP3)	<i>Chlamydomonas</i>	Flagellar axonemes	Located near inner arm dyneins and possibly regulate flagellar motility

**Figure 10** : Résumé de la nomenclature de quelques AKAPs, de leurs localisations tissulaires et subcellulaires ainsi que de leurs partenaires et leurs fonction (d'après Tasken et Aandahl 2004).



paraît fondamentale puisque cette interaction peut impliquer jusqu'à 75 % de la PKA dans une cellule (Tasken & Aandahl, 2004; Wong & Scott, 2004).

#### ***4.4.1 Interaction entre les AKAPs et les différentes sous-unités régulatrices de la PKA***

Les AKAPs interagissent avec la PKA par l'intermédiaire d'une hélice amphipathique de 14 à 18 acides aminés qui contacte directement les hélices  $\alpha$  du domaine de dimérisation de la sous-unité régulatrice de la PKA. Cette liaison impliquerait des interactions de type hydrophobe (Newlon *et al.*, 1999). La liaison se ferait au niveau de la région N-terminale de la sous-unité régulatrice de la PKA qui intervient dans la dimérisation (région N-terminale), et il semble que la dimérisation des sous-unités régulatrices soit essentielle à la liaison avec les AKAPs. L'importance de l'hélice amphipathique des AKAPs a été mise en évidence notamment par introduction du peptide Ht31 (Human thyroid protein 31, fragment peptidique de l'AKAP-Lbc isolée à partir de tissu thyroïdien) qui abolit la formation du complexe AKAP-PKA (Carr *et al.*, 1992).

La comparaison structurale de la première hélice  $\alpha$  de RI $\alpha$  et RII $\alpha$  a permis de montrer une différence au niveau de quelques acides aminés qui expliquerait des modifications de l'affinité et de sélectivité de ces sous-unités pour les différents AKAPs. En effet, la majorité des AKAPs identifiées lie la sous-unité régulatrice RII, mais il existe quelques AKAPs spécifiques de RI et des AKAPs capables de lier les deux types de sous-unités régulatrices appelées D-AKAP (pour dual-AKAP). L'affinité des AKAPs est généralement nanomolaire pour la sous-unité régulatrice qu'elles reconnaissent le mieux. En résumé, on peut considérer que lorsque les deux types de sous-unités RI et RII sont exprimées dans une même cellule, RII présente une probabilité plus forte que RI de se lier aux AKAPs. Ce n'est pas pour autant qu'il faut considérer que les PKA de type I n'ont pas de rôle spécifique dans les cellules.

#### ***4.4.2 Localisation des AKAPs***

En plus de leur domaine d'interaction avec les sous-unités régulatrices, les AKAPs possèdent des domaines responsables de l'adressage du complexe AKAP/PKA au niveau de différents compartiments cellulaires. Il apparaît aujourd'hui, que différentes AKAPs peuvent être adressées dans les mêmes compartiments cellulaires et que des variants d'épissage du

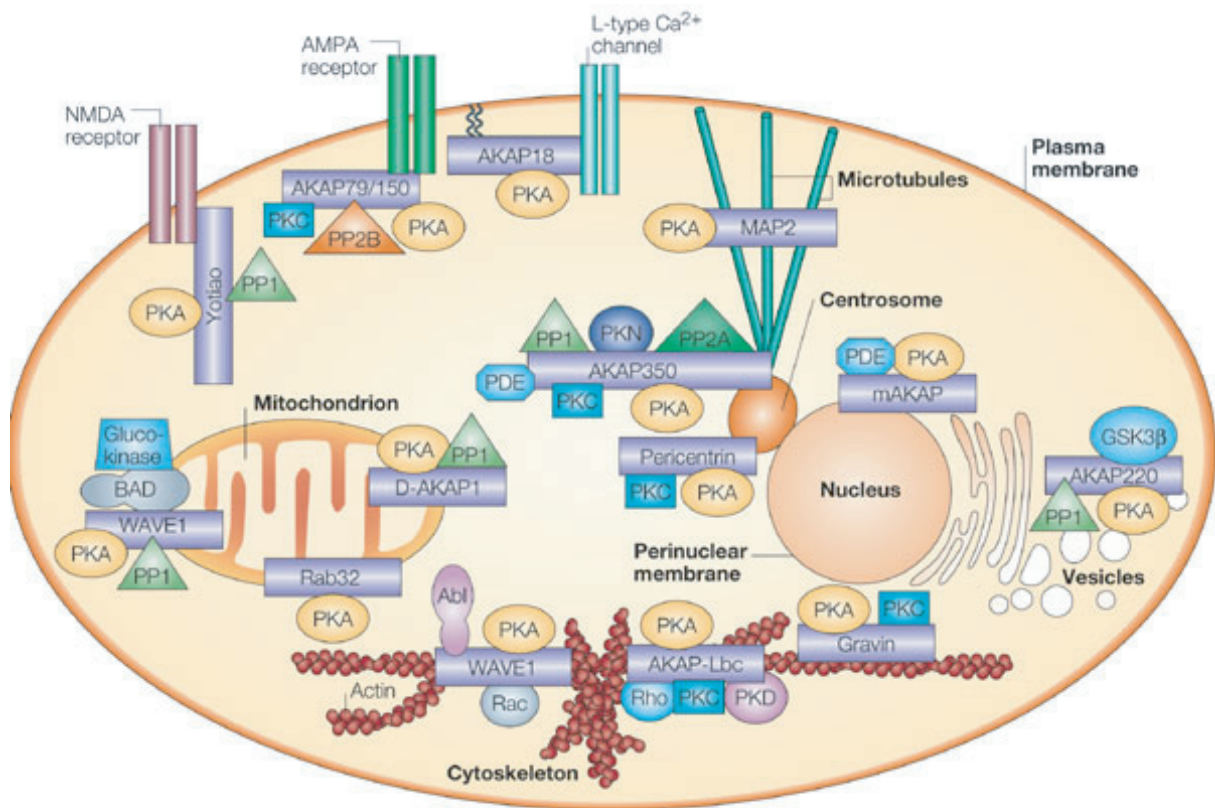
même gène peuvent être adressés dans des compartiments différents. Les études immunocytochimiques et de fractionnement cellulaire ont permis de démontrer la présence d'AKAPs différentes au niveau de quasiment tous les compartiments cellulaires (figure 11).

#### ***4.4.3 Les autres protéines liées par les AKAPs***

La propriété biologique la plus importante des AKAPs est leur capacité de colocaliser la PKA avec d'autres protéines comme les protéines kinases, les PDEs ou les protéines phosphatases. Ces complexes macromoléculaires incluent le plus souvent des enzymes impliquées dans la genèse et la terminaison des voies de transduction. Par exemple, l'AKAP79 est capable de lier la PKA, la PKC et la PP2B (protéine phosphatase 2B, dépendante du calcium) (Klauck *et al.*, 1996). L'AKAP 79 est adressée à la membrane plasmique et elle est capable de créer un complexe de signalisation en favorisant les régulations croisées. Plusieurs auteurs ont proposé que la formation de ce complexe permettrait de réguler le niveau de phosphorylation et le niveau d'activité de protéines transmembranaires comme les canaux ioniques. Cette hypothèse a été confirmée par des études démontrant que ce complexe régule entre autres la phosphorylation des canaux AMPA et les canaux calciques de type L (Gao *et al.*, 1997; Colledge *et al.*, 2000). De même, l'AKAP220 constitue un échaffaudage entre la PKA et la PP1; et l'AKAP Yotiao joue le rôle de protéine adaptatrice entre la PKA, la PP1 et les récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR1A (Fraser & Scott, 1999; Westphal *et al.*, 1999).

## **5. Les canaux régulés par les nucléotides cycliques**

Les canaux régulés par les nucléotides cycliques sont les seuls effecteurs dont l'activation directe par l'AMPc produit des variations de la concentration ionique et du potentiel membranaire. Il existe deux grandes familles de canaux régulés par les nucléotides cycliques : les canaux CNG (pour Cyclic Nucleotide-Gated) et les canaux HCN (pour Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated). Ces deux familles partagent la même organisation structurale sûrement due à l'héritage d'un ancêtre commun. Les canaux fonctionnels sont formés par l'assemblage de quatre sous unités et chaque sous-unité est composée de six segments transmembranaires (S1 à S6), d'une boucle P située entre S5 et S6



**Figure 11** : Localisation subcellulaire des quelques AKAPs et de leurs partenaires. Les AKAPs apparaissent en violet (d'après Wong et Scott 2004).

(formant le pore du canal) et d'un domaine de liaison aux nucléotides cycliques situé dans la région C terminale (figure 12). Ces deux familles de canaux diffèrent par leur mode d'activation, leur perméabilité ionique et la liaison de l'AMPc et du GMPc.

## 5.1 Les canaux CNG

Les canaux CNG sont exprimés principalement dans les photorécepteurs de la rétine et les neurones olfactifs. Les canaux CNG fonctionnels sont des hétérotétramères composés de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$  (Kaupp & Seifert, 2002).

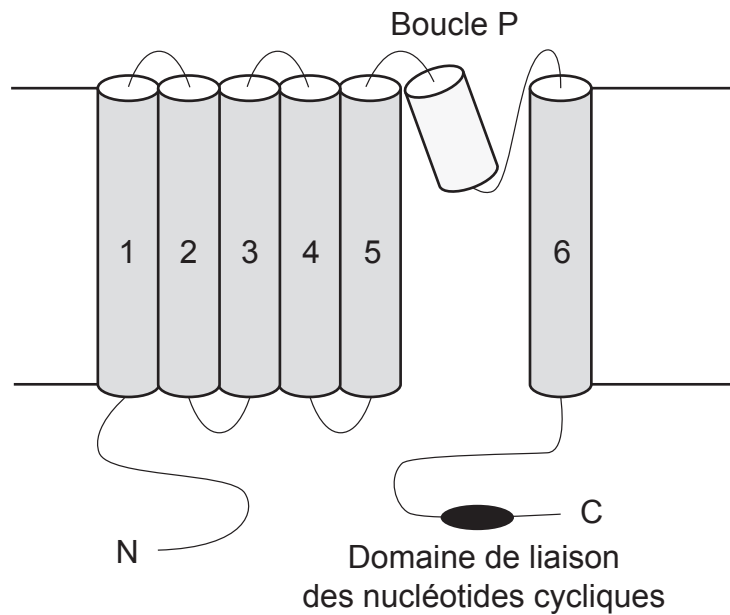
L'ouverture des canaux CNG se produit lors de la liaison de l'AMPc ou du GMPc. Les canaux CNG sont perméables aux ions calcium et aux cations monovalents. L'ouverture de ces canaux produit donc une dépolarisation des cellules et une forte entrée d'ions calcium. Le calcium, en liant la calmoduline, module de nombreuses cibles intracellulaires dont les canaux CNG. La liaison du complexe Ca-CaM diminue la sensibilité des canaux CNG pour les nucléotides cycliques. C'est, avec les PDE, le principal mécanisme de rétroaction négative contrôlant l'ouverture de ces canaux.

Des études combinant des approches d'électrophysiologie, de pharmacologie et de biologie moléculaire ont permis de détecter l'expression de canaux CNG dans le SNC. Pourtant, la fonction de ces canaux CNG est pour le moment encore mal connue à l'exception des canaux CNG présent dans la rétine et le bulbe olfactif (Wei *et al.*, 1998).

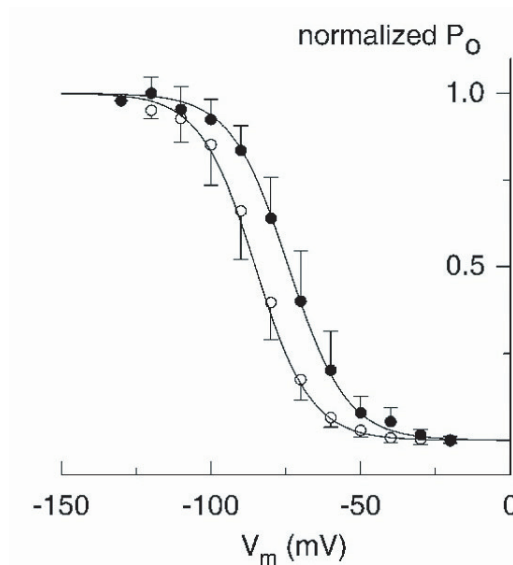
## 5.2 Les canaux HCN

Des courants cationiques qui sont activés lentement par l'hyperpolarisation ( $I_h$ ,  $I_f$  ou  $I_q$ ) sont exprimés dans une très grande variété de cellules excitables. L'activation de ces canaux participe aux oscillations du potentiel de membrane de ces cellules. Chez les mammifères, la famille des canaux HCN est composée de quatre membres. Les acides aminés chargés positivement du segment transmembranaire S4 rendent ces canaux sensibles aux potentiel (Ludwig *et al.*, 1998).

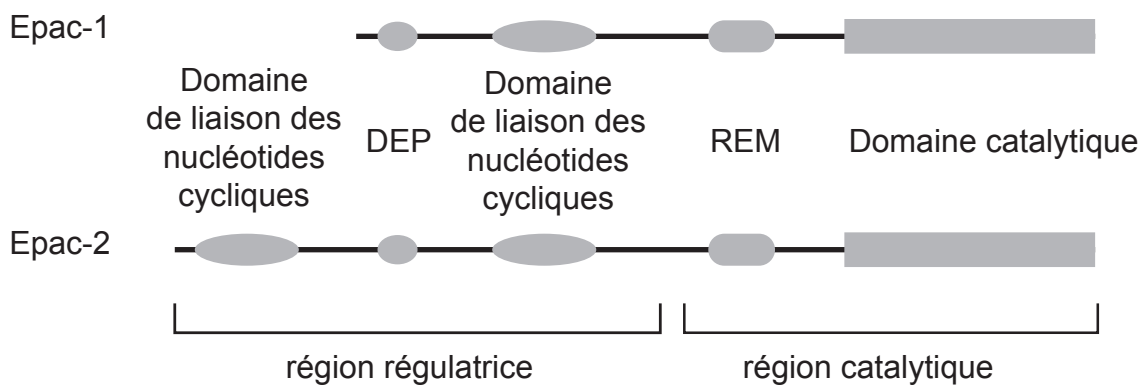
L'ouverture des canaux HCN a lieu lors de l'hyperpolarisation de la membrane plasmique et produit une dépolarisation lente. Une augmentation de la concentration d'AMPc



**Figure 12 :** Modèle structural des canaux régulés par les nucléotides cycliques.



**Figure 13 :** L'AMPC modifie la courbe d'activation du courant  $I_h$ . Probabilité d'ouverture normalisée des canaux HCN en fonction de la valeur du potentiel de membrane. En présence d'AMPC (rond noir) la probabilité d'ouverture des canaux HCN augmente pour une même valeur de potentiel décalant ainsi la courbe vers la gauche (*d'après Kaupp et Seifert 2001*).



**Figure 14 :** Représentation des domaines des protéines Epac.

produit un décalage de la courbe d'activation du courant vers des valeurs de potentiel membranaire plus dépolarisées (figure 13) (Pape, 1996; Kaupp & Seifert, 2001).

Dans les noyaux du thalamus sensoriels, l'ouverture des canaux HCN associée à l'ouverture des canaux calciques à bas seuil permet au potentiel membranaire des neurones thalamocorticaux d'osciller. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC, active le courant  $I_h$  qui dépolarise alors les neurones thalamocorticaux et permet ainsi de changer leur patron d'activité (*voir introduction Effet du GHB dans le thalamus*).

## 6. Les protéines d'échanges activées par l'AMPC : Epacs

En 1998, deux groupes indépendants ont identifié une nouvelle famille de protéines capables de lier l'AMPC : les protéines Epacs (pour Exchange protein directly activated by cAMP) ou cAMP-GEF (pour cAMP-Guanine nucleotide Exchange Factors) (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Ces protéines sont ubiquitaires et très conservées au cours de l'évolution. Elles accélèrent l'échange GDP-GTP des petites GTPase Rap1 et Rap2 (pour Ras-Related protéines). Les protéines Epacs constituent une voie de transduction des signaux AMPC indépendante de la PKA.

Il existe deux isoformes de Epac (Epac 1 et 2). Epac 1 est adressée à la membrane plasmique grâce à l'existence d'un domaine DEP (pour Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin) situé dans la région N terminale. On trouve ensuite un domaine de liaison à l'AMPC dont la séquence est très proche des domaines de liaison des nucléotides cycliques retrouvés sur la sous-unité régulatrice de la PKA ou des canaux CNG. On retrouve sur la région C terminale un domaine REM (pour Ras Exchange Motif) et un domaine catalytique. Epac 2 possède la même organisation que Epac 1 mais présente un domaine de liaison à AMPC supplémentaire (voir figure 14).

Les protéines Rap sont des GTPase monomériques qui sont inactives quand elles sont associées au GDP. La libération du GDP et l'association du GTP se fait grâce à l'intervention de Epac. En condition basale, le domaine catalytique de Epac est inhibé par le domaine de liaison à l'AMPC. En présence d'AMPC, Epac change de conformation et démasque le domaine catalytique qui peut alors activer les protéines Rap.

Les protéines Epacs ont été identifiées très récemment et leurs fonctions cellulaires sont encore mal connues. La synthèse d'agonistes spécifiques de Epacs a permis de démontrer son implication dans la régulation de l'exocytose. La stimulation de la voie AMPc produit une augmentation, indépendante de la PKA, des courants post-synaptiques excitateurs dans les neurones du calyx de Held (Seino & Shibasaki, 2005).

## ***II. Les cibles de la PKA dans les neurones et leur effet sur l'homéostasie cellulaire.***

Il est connu depuis de très nombreuses années que la phosphorylation est un élément important dans la régulation des protéines (Pawson & Scott, 2005). Les voies de signalisation s'appuient principalement sur ces modifications post-traductionnelles pour exercer leurs effets physiologiques. La PKA est capable de phosphoryler de très nombreuses cibles intracellulaires qui peuvent être localisées à la membrane plasmique, dans le cytosol ou dans le noyau. Je ne présenterai dans ce paragraphe que deux exemples de protéines dont l'activité est régulée par PKA : les canaux de l'AHP lente et le facteur de transcription CREB.

### **1. A la membrane**

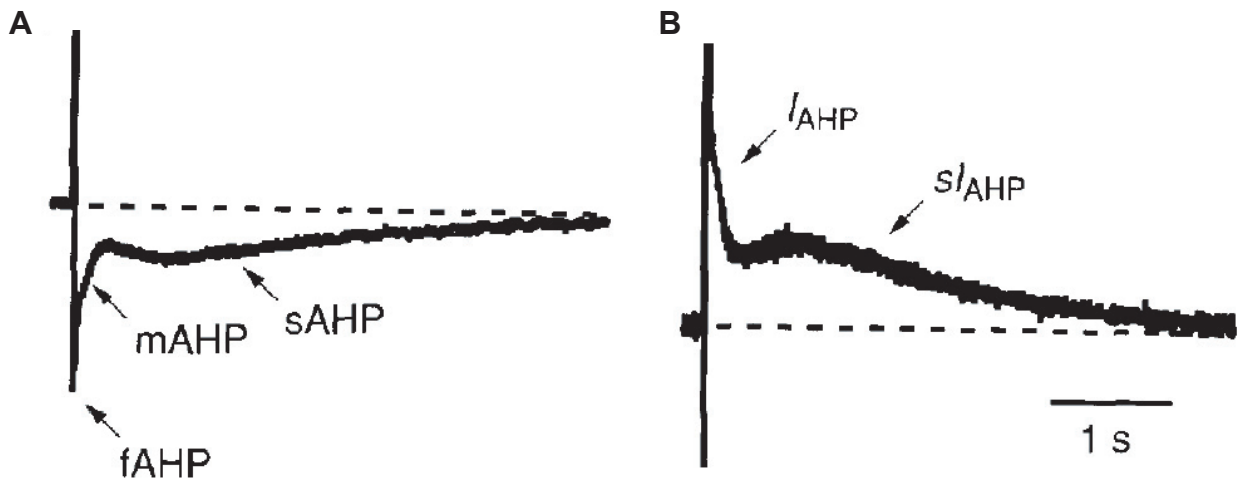
#### **1.1 Le courant de l'AHP lente**

On regroupe sous le nom d'AHP toute hyperpolarisation consécutive à un train de potentiels d'action. L'AHP lente est la conséquence de l'ouverture de conductances potassiques activées par le calcium. Néanmoins, plusieurs conductances potassiques activées par le calcium participent à l'hyperpolarisation globale consécutive à un train de potentiels d'action (Sah, 1996; Sah & Faber, 2002). La présence d'AHP lente a été rapportée dans de nombreuses structures comme les aires CA1 et CA3 de l'hippocampe ou les noyaux intralaminaires du thalamus (Madison & Nicoll, 1982; Haas & Konnerth, 1983; Gerber & Gahwiler, 1994; Pedarzani *et al.*, 1998; Goillard & Vincent, 2002).

##### ***1.1.1 Cinétique***

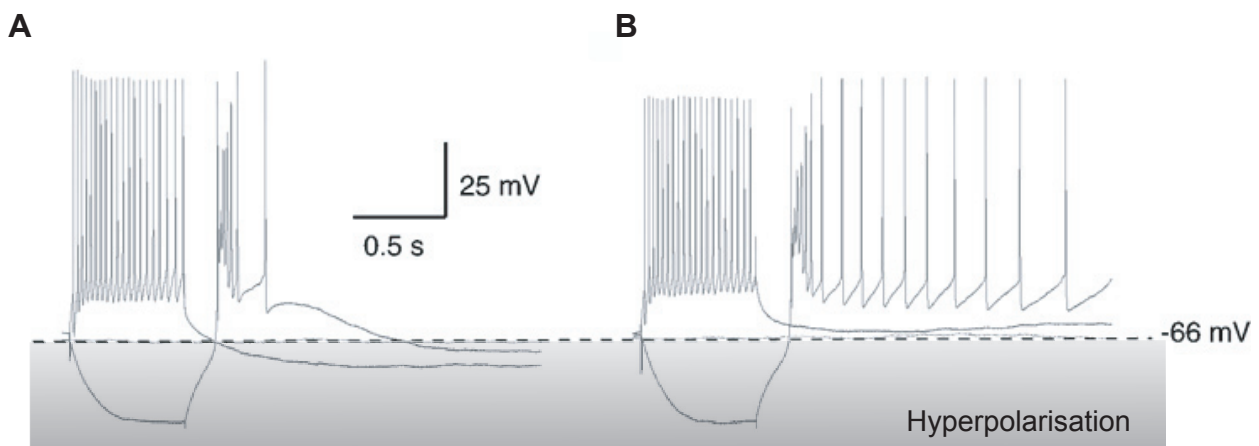
On distingue les différentes conductances potassiques activées par le calcium en fonction de leur cinétique et de leur pharmacologie (figure 15) :





**Figure 15 :** Les trois courants potassiques activés par le calcium à l'origine des hyperpolarisations obtenues après un train de potentiels d'action.

**A,** Enregistrement en mode courant imposé des trois différents type d'AHP : fAHP (AHP rapide), mAHP (AHP moyenne) et sAHP(AHP lente). **B,** Courants correspondants aux trois phases d'hyperpolarisation (d'après Sah 1996).



**Figure 16 :** La régulation de l'AHP lente par la sérotonine modifie l'excitabilité des neurones intralaminaires du thalamus.

**A,** En mode courant imposé, une dépolarisation des neurones intralaminaires provoque une décharge de PAs suivit par une hyperpolarisation de 11mV. Une hyperpolarisation de ces neurones provoque l'apparition d'un rebond calcique surmonté de PAs et suivit par une hyperpolarisation. **B,** En présence de 10µM de sérotonine, une dépolarisation des neurones provoque une décharge de PAs qui ne produit plus d'hyperpolarisation. Une hyperpolarisation des neurones intralaminaires provoque l'apparition d'un rebond calcique surmonté de PA qui se prolonge (d'après Goillard et Vincent 2002).

- La phase la plus rapide de l'hyperpolarisation fait intervenir les canaux BKCa (Big conductance Calcium-activated Potassium channels) qui s'activent très rapidement (1-2 ms) et s'inactivent en quelques millisecondes. Ces canaux sont bloqués par de faibles concentrations de TEA, la charybdotoxine et l'ibérottoxine. Leur activation produit l'AHP rapide.

- Les canaux sKCa (small conductance Calcium-activated Potassium channels), insensibles au TEA mais sensibles à des concentrations nanomolaires d'apamine sont responsables d'un courant qui se développe en 1 à 5 ms et décroît avec une constante de temps d'environ 150 ms. Leur activation constitue l'AHP médiane.

- Enfin, la phase la plus lente de l'hyperpolarisation est insensible au TEA et à l'apamine. le temps de montée du courant à l'origine de cette AHP lente, est compris entre 0,5 et 1 secondes et la constante de décroissance est d'environ 5 secondes (Sah, 1996).

### ***1.1.2 Régulation***

La sensibilité de l'AHP lente à divers neurotransmetteurs (sérotonine, noradrénaline, acétylcholine, histamine, glutamate, neuropeptides) constitue une caractéristique de ce courant. La modulation par les neurotransmetteurs fait intervenir dans la plupart des cas l'activation de récepteurs couplés positivement à la voie de l'AMPC. La PKA activée par l'AMPC phosphorylerait les canaux responsables de l'AHP lente ce qui provoquerait une inhibition de l'AHP lente (Nicoll, 1988; Pedarzani & Storm, 1993). Au repos, les canaux responsables de l'AHP lente seraient sous le contrôle d'un équilibre déphosphorylation/phosphorylation qui serait déplacé au profit de la phosphorylation lors de la stimulation de la voie de l'AMPC (Pedarzani *et al.*, 1998).

Dans les noyaux intralaminaires du thalamus, l'AHP lente est inhibée par l'activation spécifique du récepteur 5-HT<sub>7</sub> (par la 5-CT). Cet réduction du courant de l'AHP lente est médié par une activation de la PKA (figure 16) (Goaillard & Vincent, 2002).

## **2. La régulation génique**

A la fin des années 60, Langan note que l'augmentation de la concentration d'AMPC en réponse aux hormones n'induit pas seulement une phosphorylation des protéines

cytosoliques. Il montre que l'AMPc est également capable de phosphoryler les histones et propose que cette phosphorylation régule la synthèse d'ARN messagers (Langan, 1968, 1969).

Cette hypothèse s'est confirmée car depuis 20 ans de nombreuses études ont démontré un rôle de la voie AMPc/PKA dans l'activation des facteurs de transcription et dans la régulation génique. Il existe de très nombreux facteurs de transcriptions activés par la PKA comme CREB, CREM, ATF-1 ou nF-κB (Daniel *et al.*, 1998).

Nous allons nous intéresser à CREB qui est le membre le plus connu de cette famille.

## **2.1 CREB.**

CREB (cAMP response element binding protein) est un des liens les mieux caractérisés entre l'activation de la PKA et l'expression génique. Comme son nom l'indique, CREB se lie à la séquence CRE (cAMP response élément) pour exercer ses effets de facteur de transcription. C'est la présence de CRE sur la séquence promotrice d'un gène qui permet sa régulation par l'AMPc. Cette séquence CRE a été identifiée pour la première fois dans la séquence promotrice du gène de la somatostatine (Montminy *et al.*, 1986). Cette séquence est composée de 8 paires de base et forme un palindrome : TGACGTCA qui est très conservée dans l'ensemble des séquences promotrices des gènes régulés par l'AMPc. Pourtant certains gènes présentent une modification de cette séquence ce qui rend ces gènes un peu plus indépendant vis à vis de la voie de l'AMPc (Mayr & Montminy, 2001).

### ***2.1.1 Structure et activation***

CREB appartient au groupe des facteurs de transcription contenant des régions leucine zipper (région importante pour la dimérisation des protéines). Le domaine leucine zipper est retrouvé en C terminal et de deux domaines riches en glutamine entourent un domaine appelé KID (pour Kinase inductible domaine) qui possèdent le site de phosphorylation de la PKA (Mayr & Montminy, 2001).

Dans le noyau, c'est la forme non phosphorylée de CREB qui prédomine. CREB se lie à l'ADN sous forme de dimère et la phosphorylation de KID n'a aucun effet sur cette liaison (Montminy, 1997; Daniel *et al.*, 1998). L'effet principal de l'activation de la voie AMPc/PKA est de phosphoryler CREB sur la sérine 133 ce qui entraîne sa transactivation et permet son

association avec des cofacteurs (notamment CBP pour CREB binding protein). C'est le complexe CREB phosphorylé associé aux cofacteurs qui permet l'induction de la transcription génique des gènes ayant une séquence promotrice sensible à l'AMPc.

### ***2.1.2 Régulation par la PKA***

Il apparaît donc que la phosphorylation du domaine KID par la PKA est un processus essentiel dans l'induction de la transcription des gènes sous le contrôle de cette voie de signalisation. La phosphorylation de CREB n'est pas immédiate et l'effet maximum sur la transcription est observé environ 30 minutes après la stimulation de l'AC (Montminy, 1997). Cette phosphorylation relativement lente de CREB est expliquée par la vitesse de diffusion de la sous-unité catalytique de la PKA du cytosol vers le noyau. Lors d'une activation de l'AC, l'AMPc active la PKA, libère la sous-unité catalytique qui entre dans le noyau par un mécanisme de diffusion passive (Harootunian *et al.*, 1993).

La régulation génique par la voie AMPc/PKA n'est pas un phénomène de tout ou rien. La transcription des gènes ayant une séquence CRE dépend du taux de phosphorylation de CREB. Cette phosphorylation de CREB étant directement corrélée à l'activation de la PKA dans le cytosol. Lorsque la PKA est faiblement activée, très peu de sous-unités catalytiques vont diffuser dans le noyau et au final le signal AMPc ne produira aucun effet sur la transcription (Hagiwara *et al.*, 1993).

Ces deux paramètres vont jouer un rôle très important dans l'intégration des signaux extracellulaires. Les signaux courts et de faibles amplitudes ne seront pas relayés au noyau alors que les signaux plus longs ou plus forts pourront diffuser jusqu'au noyau et produire des modifications à long terme.

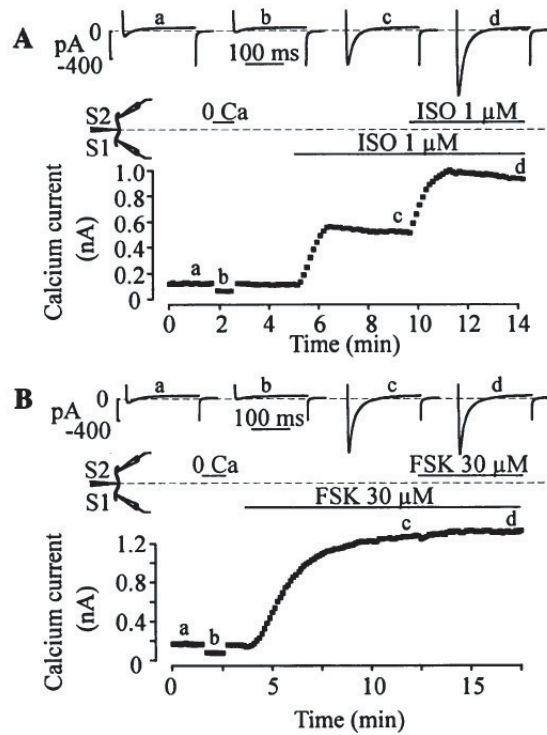
### ***III. Comment se crée la spécificité des signaux : la compartimentation.***

La notion de compartimentation a été initiée par Rall et démontrée par des données biochimiques (répartition des PKA de type I et PKA de type II) et par des données fonctionnelles démontrant que deux modulateurs activant la voie de l'AMPC pouvaient induire des réponses cellulaires différentes (Corbin *et al.*, 1977; Brunton *et al.*, 1981). La découverte des AKAPs a ouvert la voie à une série d'études qui ont montré que les différents protagonistes de la voie de signalisation de l'AMPC ne sont pas répartis de façon diffuse au sein de la membrane plasmique ou du cytosol mais sont ancrés à des compartiments de signalisations particuliers. Je vais décrire quelques expériences montrant l'existence de compartiments fonctionnels de la voie AMPC.

#### **1. Mise en évidence de microdomaines d'AMPC**

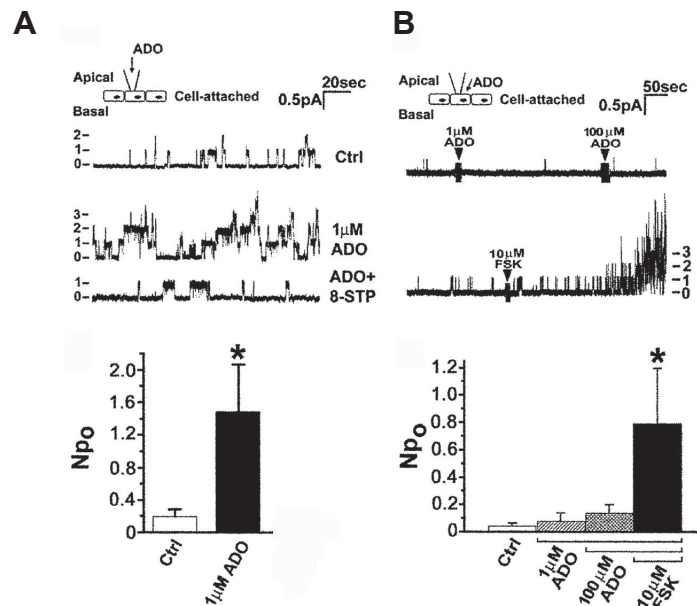
L'utilisation d'applications locales d'agonistes de la voie AMPC associées à des enregistrements du courant calcique de type L a permis à l'équipe de Fischmeister de démontrer une compartimentation du signal AMPC dans les cardiomyocytes ventriculaires de grenouille. L'isoprénaline (agoniste  $\beta$ -adrénergique) produit une forte potentialisation des courants calciques locaux alors qu'elle modifie peu le comportement des canaux calciques situés en dehors de la zone d'application (figure 17). Par contre, l'application de FSK provoque une potentialisation maximale des canaux calciques à l'intérieur et à l'extérieur de la zone d'application. Cet effet est la conséquence d'une diffusion libre de l'AMPC du site local vers le site distal (figure 17) (Jurevicius & Fischmeister, 1996).

L'utilisation de la technique de patch-clamp en configuration cellule attachée permet d'isoler physiquement un morceau de membrane contenu sous la pipette d'enregistrement. Des enregistrements de cellules Calu-3 (cellules modèles des cellules séreuses des épithéliums des voies aériennes) obtenus avec cette configuration montrent qu'une application d'adénosine dans la pipette de patch produit une augmentation de la probabilité d'ouverture



**Figure 17 :** Compartimentation du signal AMPc dans les cardiomyocytes ventriculaires de grenouille.

La cellule est saisie aux extrémités par des pipettes de patch et l'accollement d'un tube thêta permet de délimiter deux régions S1 et S2 sur lesquelles on peut appliquer des solutions extracellulaires. **A**, L'application d'isoprénaline au niveau de S1 provoque une potentialisation du courant calcique de type L (c) qui est augmentée par l'application ultérieure d'isoprénaline au niveau de S2 (d). **B**, L'application de FSK en S1 provoque une augmentation de l'amplitude du courant calcique (c) qui est inchangée par une application ultérieure de FSK en S2 (d'après Jurevicius et Fischmeister 1996).



**Figure 18 :** Compartimentation du signal AMPc dans les cellules calu-3.

**A**, L'application d'adénosine dans la pipette de patch produit une augmentation de la probabilité d'ouverture (Npo) du canal CFTR. **B**, L'application d'adénosine en dehors de la pipette de patch ne produit aucune augmentation significative de la probabilité d'ouverture du canal CFTR. Seule l'application de FSK dans le bain permet d'ouvrir les canaux CFTR sous la pipette d'enregistrement (d'après Huang et coll 2001).

des canaux CFTR (cAMP-regulated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ; canaux chlorures dont l'ouverture est régulée de la PKA). Par contre, l'adénosine appliquée dans le milieu extracellulaire ne modifie pas la probabilité d'ouverture des canaux CFTR contenus dans la pipette d'enregistrements (figure 18). Seule l'application de FSK dans le milieu extracellulaire produit une augmentation de la probabilité d'ouverture de ces canaux (Huang *et al.*, 2001).

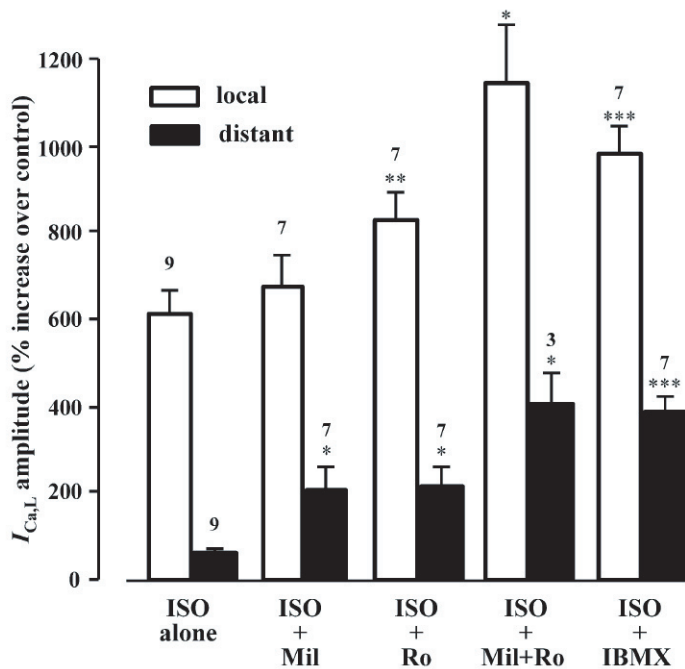
Une étude utilisant la même technique d'enregistrement montre que dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, l'application de l'albuterol (agoniste  $\beta_2$  adrénergique) en dehors de la pipette d'enregistrement ne produit pas de potentialisation des courants calciques. Par contre, lorsque l'albuterol est présent dans la pipette de patch, la probabilité d'ouverture des canaux calciques est augmentée (Davare *et al.*, 2001).

Ces résultats démontrent l'existence de microdomaines de signalisation de l'AMPc dans les cardiomyocytes de grenouille, les cellules calu-3 et les neurones hippocampiques. L'existence de ces microdomaines est révélée par des stimulations locales des RCPG et est absente lors d'une activation directe des AC par la FSK. Ceci suggère que les effets des RCPG restent locaux et ne diffusent pas à travers la cellule alors que les signaux AMPc produit par la FSK eux se propagent.

## 2. Implication des PDEs

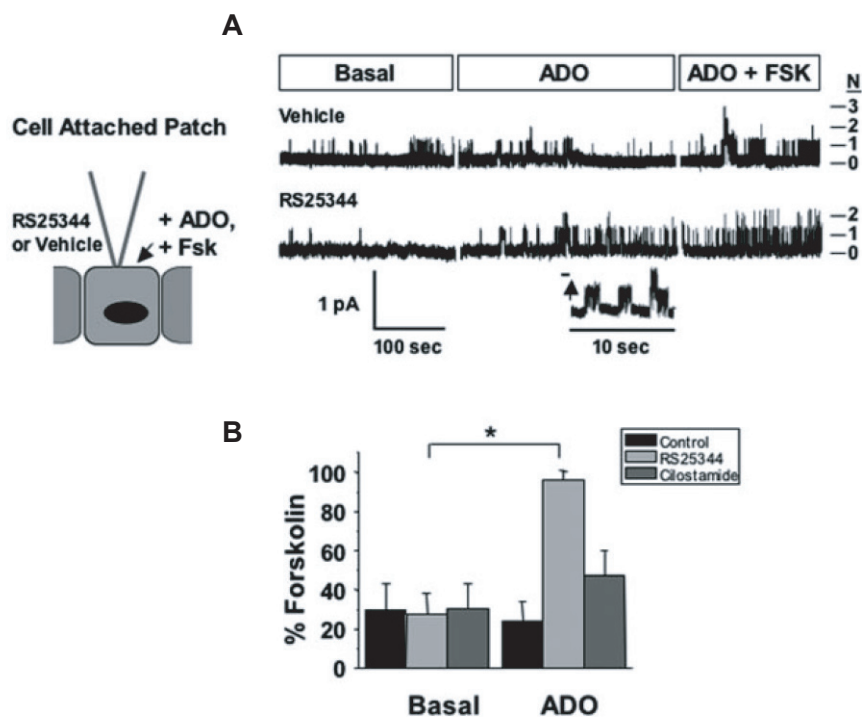
L'activité des PDEs participe à la restriction de ces signaux AMPc/PKA dans les cardiocytes et les cellules calu-3. En effet, l'application d'IBMX sur les cardiocytes augmentent l'effet distal de ces agonistes  $\beta$  adrénergiques (Jurevicius & Fischmeister, 1996) et les PDEs impliquées dans cette restriction sont les PDE3 et PDE4 (Jurevicius *et al.*, 2003) (figure 19). Dans les cellules calu-3, l'inhibition des PDE4 permet à l'adénosine appliquée en dehors de la pipette de patch de produire une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal CFTR présent dans l'électrode d'enregistrement (figure 20) (Barnes *et al.*, 2005).

L'existence de microdomaines mettant en jeu l'activité des PDEs a également été montrée en système d'expression (cellules HEK transfectées avec des canaux CNG). Dans ces cellules lors de l'activation des récepteurs aux prostaglandines, l'activation soutenue des PDEs empêche une diffusion de l'AMPc en dehors du microdomaine. Après inhibition des PDEs par l'IBMX, l'activation des récepteurs aux prostaglandines provoque une



**Figure 19** : Effet de l'activité des PDEs sur les réponses locales et distantes des canaux calciques en réponse à l'application d'isoprénaline.

L'isoprénaline produit une potentialisation locale des canaux calcique de type L. En présence d'inhibiteurs des PDEs, l'isoprénaline est capable de potentialiser les canaux calciques distants. Le Milrinone inhibite les PDE3 et le Rolipram inhibe les PDE4 (d'après Jurevicius et coll 2003).



**Figure 20** : L'inhibition des PDE4 altère la compartimentation des réponses à l'adénosine de cellules calu-3.

**A**, L'application d'adénosine dans le milieu extracellulaire ne modifie pas la probabilité d'ouverture des canaux CFTR présent sous la pipette de patch. Seule la FSK produit une augmentation de la probabilité d'ouverture de ces canaux. En présence de RS25344 (inhibiteur des PDE4) l'adénosine provoque une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux CFTR. **B**, histogramme représentant l'ensemble des données obtenues en absence et en présence d'inhibiteur des PDE4 ou des PDE3 (cilostamide). L'inhibition des PDE4 abolie la compartimentation des réponses à l'adénosine (d'après Barnes et coll 2005).



augmentation de l'AMPC dans le microdomaine et dans le cytosol (figure 21) (Rich *et al.*, 2001a).

### 3. Implications des AKAPs.

Les conséquences fonctionnelles de l'association de la PKA aux AKAPs ont été évaluées par l'utilisation de peptides inhibiteurs de l'association des AKAPs avec les sous-unités régulatrices de la PKA (généralement dérivés de l'AKAP Ht31).

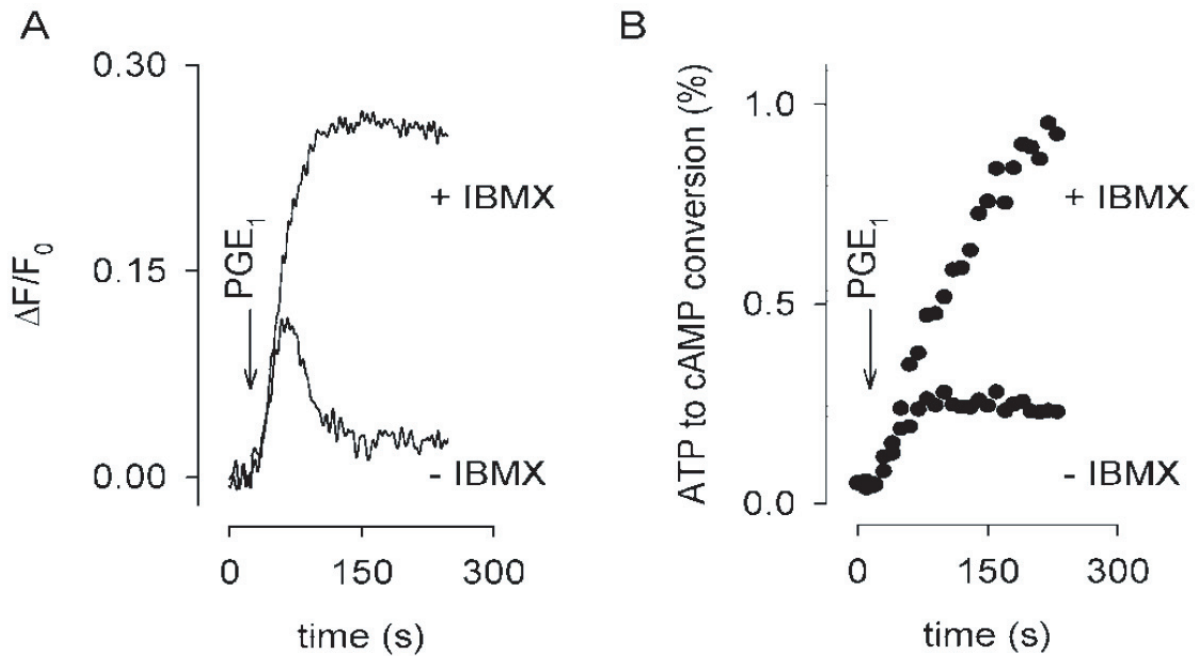
Dans les cardiocytes, l'ouverture des canaux calciques de type L est augmentée lors de l'activation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques. La perfusion du peptide Ht31 dans le milieu intracellulaire provoque une diminution de la potentialisation du courant calcique. Cette diminution est équivalente à celle obtenue en présence de PKI (le PKI inhibant l'activité catalytique de la PKA ; figure 22) (Gao *et al.*, 1997).

L'activité des récepteurs NMDA est régulée par les protéines kinases et phosphatases. Les courants NMDA sont potentialisés par l'activation de la PKA ou par l'inhibition des protéines phosphatase 1 (ou PP1). Le courant NMDA enregistré dans des cellules HEK, exprimant les sous-unités NR1A et NR2A des récepteurs NMDA, est potentialisé lors de l'application d'un analogue de l'AMPC. La potentialisation du courant est beaucoup plus importante dans les cellules HEK qui expriment les récepteurs NMDA et la protéine Yataio (ou AKAP 450). L'effet de l'expression de l'AKAP 450 sur les courants NMDA est aboli en présence de Ht31 ou de PKI dans le milieu intracellulaire (Westphal *et al.*, 1999).

Les AKAPs par leur association avec différents effecteurs de la voie de signalisation de l'AMPC participent directement à l'existence des microdomaines.

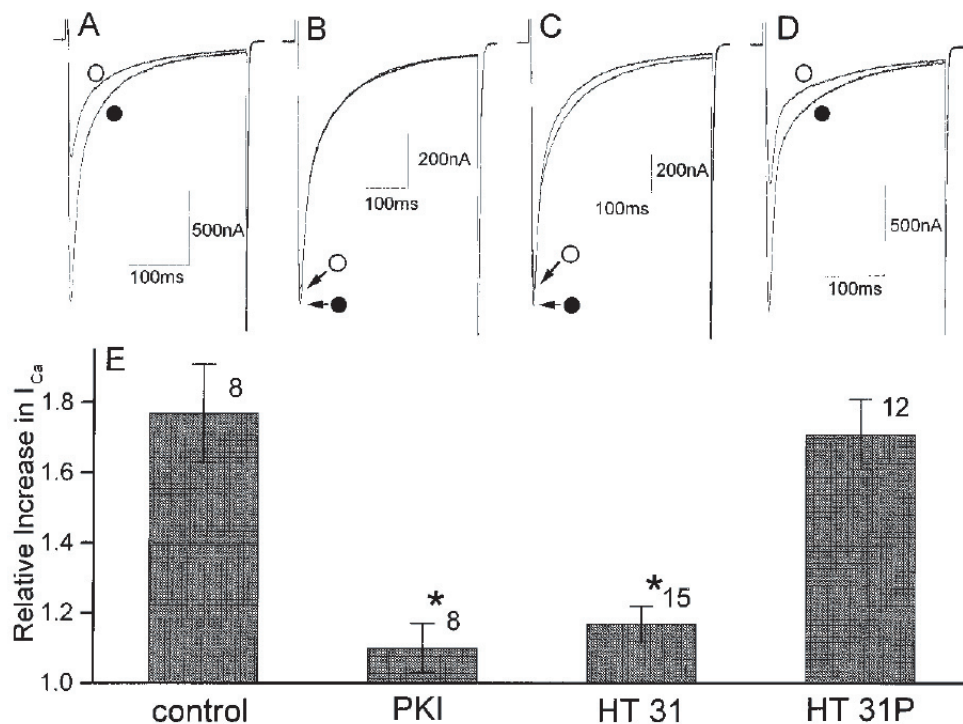
### 4. Importance de la localisation et du couplage des RCPG

L'application de zinterol (agoniste  $\beta_2$  adrénergiques) dans le bain ne produit aucune augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux calciques de type L enregistrés par en configuration cellule attachée (voir figure 23A) contrairement aux agonistes  $\beta_1$  (voir figure 23B) et à l'application d'agonistes  $\beta_1$  ou  $\beta_2$  dans la pipette de patch (figure 23C) (Chen-Izu *et*



**Figure 21** : Intégration des signaux PGE1 dans les cellules HEK-293.

**A**, Signaux AMPc en réponse à l'application de PGE1 détectés à la membrane de cellules HEK. L'ouverture des canaux CNG produit une entrée de calcium qui est détecté par l'utilisation de FURA-2. En absence d'inhibiteur des PDEs, le signaux AMPc est transitoire. Alors qu'en présence d'IBMX ce signal devient permanent **B**, Production d'AMPc en réponse à l'application de PGE1 mesurée dans toute la cellule (d'après Rich et coll 2001).



**Figure 22** : Les AKAPs régulent les réponses  $\beta$ -adrénergiques sur les courants calciques des cardiocytes.

Les courants calciques sont enregistrés par la technique de patch clamp. Les cercles noirs représentent les courants obtenus avant application d'isoprotérénol et les cercle blanc après application d'isoprotérénol **A**, courants obtenus en conditions contrôle. **B**, en présence de 10 $\mu$ M de PKI dans la pipette de patch. **C**, de 100 $\mu$ M de Ht31 et **D**, 100 $\mu$ M de Ht31P. **E**, Histogramme reprenant les potentialisations moyennes des courants calciques dans les différentes conditions (d'après Gao et coll 1997).

*al.*, 2000). Des effets similaires ont également été rapportés dans les neurones hippocampiques en culture (Davare *et al.*, 2001).

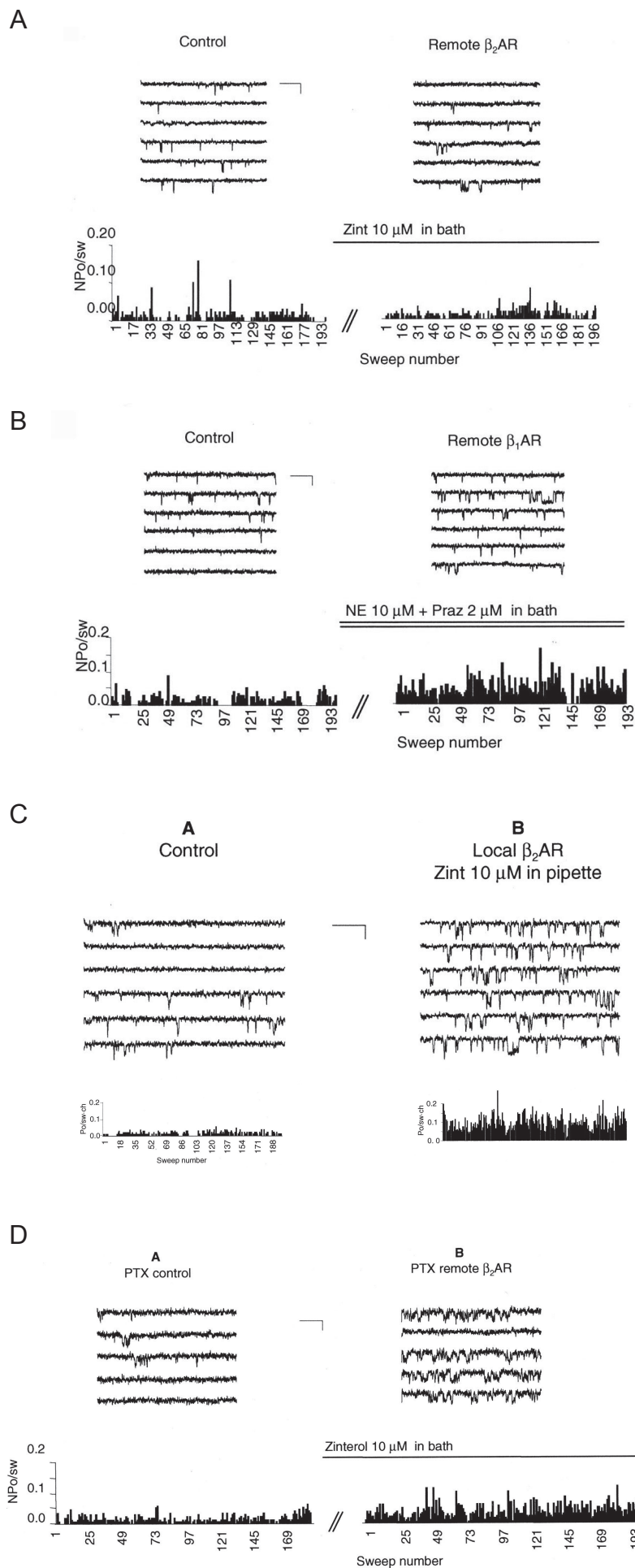
Les auteurs de cette étude ont démontré que cet effet local sur la potentialisation des courants calciques est dû au couplage des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques aux protéines Gs et Gi. En effet, un traitement à la toxine pertussique des cardiocytes, qui permet de réaliser un découplage des récepteurs  $\beta_2$  avec les protéines Gi, révèle une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux calciques lors d'une application dans le bain de zinterol (figure 23D). En empêchant l'interaction entre les récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques et les protéines Gi, les auteurs ont changé un signal local en un signal plus diffus (Chen-Izu *et al.*, 2000).

## 5. Le modèle actuel de la compartimentation cellulaire.

La compartimentation des signaux AMPc/PKA semble donc reposer sur de nombreux facteurs, en premier lieu par une localisation particulière des différents protagonistes de la voie de signalisation. A ce facteur de localisation se rajoutent les différences de couplage des récepteurs aux voies de seconds messagers, comme le couplage potentiel du récepteur  $\beta_2$  à la protéine Gi. Il faut également ajouter l'activité des PDEs qui intervient dans la compartimentation fonctionnelle entre les différents récepteurs présents à la membrane des cellules. Sans oublier les protéines phosphatases, les mécanismes de désensibilisation des récepteurs...(Steinberg & Brunton, 2001).

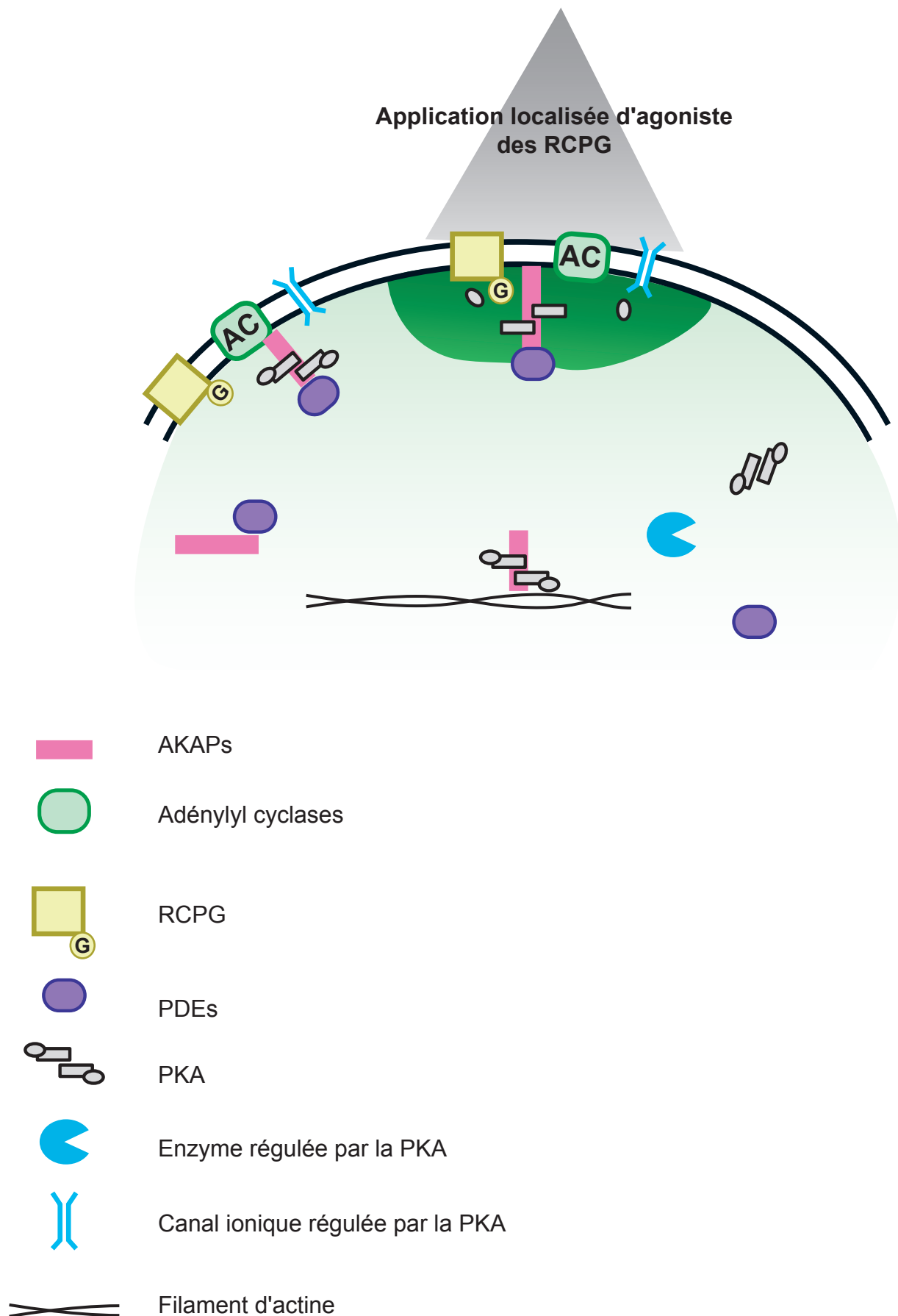
Il se dégage quatre idées importantes de l'ensemble des travaux sur la compartimentation de la voie AMPc/PKA (figure 24) :

- Tout l'AMPc produit par les AC n'a pas accès à toutes les PKA de la cellule.
- Tout l'AMPc n'a pas accès à toutes les PDEs.
- Toutes les PKA réparties dans les différents compartiments cellulaires n'ont pas accès à tous les substrats.
- Il existe une relation spatiale stricte entre les RCPG, les AC et certains effecteurs.



**Figure 23 :** Le couplage des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques restreint spatialement la potentialisation des canaux calciques.

Enregistrement de la probabilité d'ouverture des canaux calcique lors de l'application **A**, d'agonistes  $\beta_2$  dans la bain **B**, d'agonistes  $\beta_1$  dans le bain **C**, d'agonistes  $\beta_2$  dans la pipette de patch **D**, et d'agonistes  $\beta_2$  en présence de PTX (d'après *Chen-Izu et coll 2000*).



**Figure 24 :** Représentation schématique des microdomaines fonctionnels d'AMPc. L'application locale d'agoniste des RCPG produit une augmentation localisée de la concentration d'AMPc. Cette restriction spatiale fait intervenir la localisation des protagonistes de la voies, les PDEs et le couplage des récepteurs. Cette production locale d'AMPc n'active que la PKA à proximité de l'AC stimulée et la PKA activée ne phosphoryle que les cibles proches.

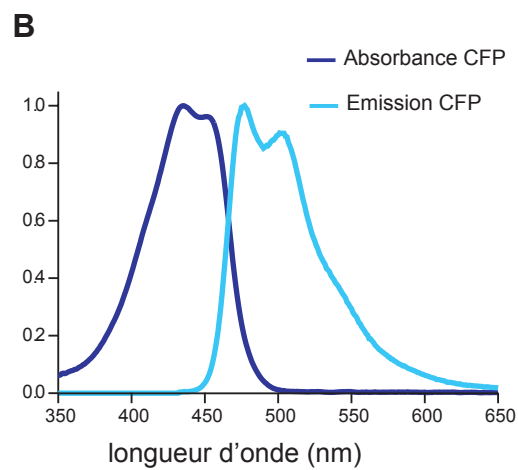
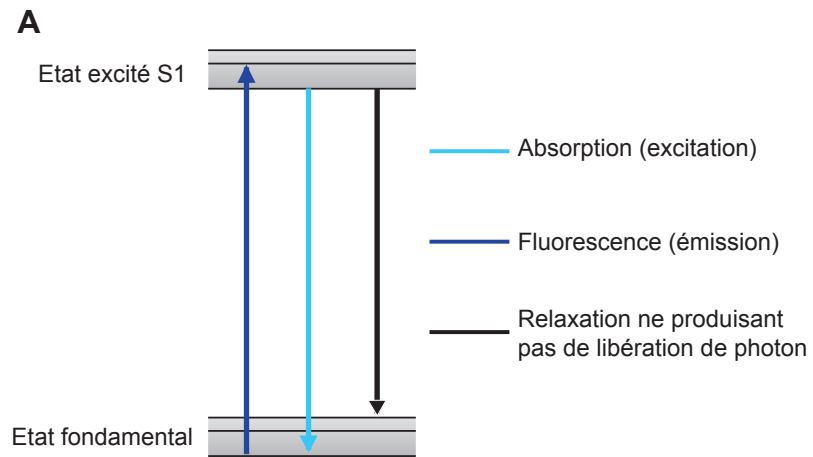
## ***IV. Les sondes fluorescentes AMPc et PKA et leur utilisation en biologie***

La microscopie à fluorescence s'est énormément développée ces dernières années autour de la détection de fluorophore unique. La fluorescence est une méthode de détection très sensible qui permet de mettre « en lumière » l'objet que l'on veut observer. Le contraste obtenu entre ce qui est intéressant (le signal) et ce qui ne l'est pas (le bruit de fond) est le principal intérêt de cette technique mais ce contraste est fortement dépendant du choix des filtres permettant d'exciter et de collecter le maximum de signal. Le développement par les chimistes de nombreuses molécules fluorescentes autorise aujourd'hui le suivi de plusieurs objets d'intérêt différents, de l'association des protéines ou des changements de conformation de protéines dans le temps et dans l'espace (Zhang *et al.*, 2002; Lichtman & Conchello, 2005).

### **1. Principe de la fluorescence**

La fluorescence est le phénomène qui produit l'émission de photons à partir d'une molécule se trouvant dans un état électronique excité. Les molécules présentant des propriétés de fluorescence possèdent au moins un électron délocalisé. Lorsque la molécule absorbe un photon, elle change de niveau d'énergie électronique passant de l'état fondamental à un état énergétique supérieur  $S_1$ . La molécule excitée va ensuite retourner à l'état fondamental, cette transition pouvant être accompagnée de la libération d'un photon. La fluorescence correspond au saut énergétique entre le niveau  $S_1$  et l'état fondamental simultanément à l'émission d'un photon (voir figure 25A) (pour plus d'information <http://microscopy.fsu.edu/>).

On qualifie de fluorophore une molécule ou groupement chimique capable d'émettre de la fluorescence. Ce sont les propriétés chimiques de ces composés qui définissent les longueurs d'onde des photons capables d'être absorbés par la molécule (excitation) et les longueurs d'onde des photons relaxés (émission). En excitation monophotonique, les photons émis ont toujours une longueur d'onde plus grande que les photons absorbés (figure 25B).



**Figure 25** : Diagramme de Jablowski simplifié et spectre d'absorption et d'émission de la CFP

## 2. Le FRET : principe et technique d'imagerie utilisée

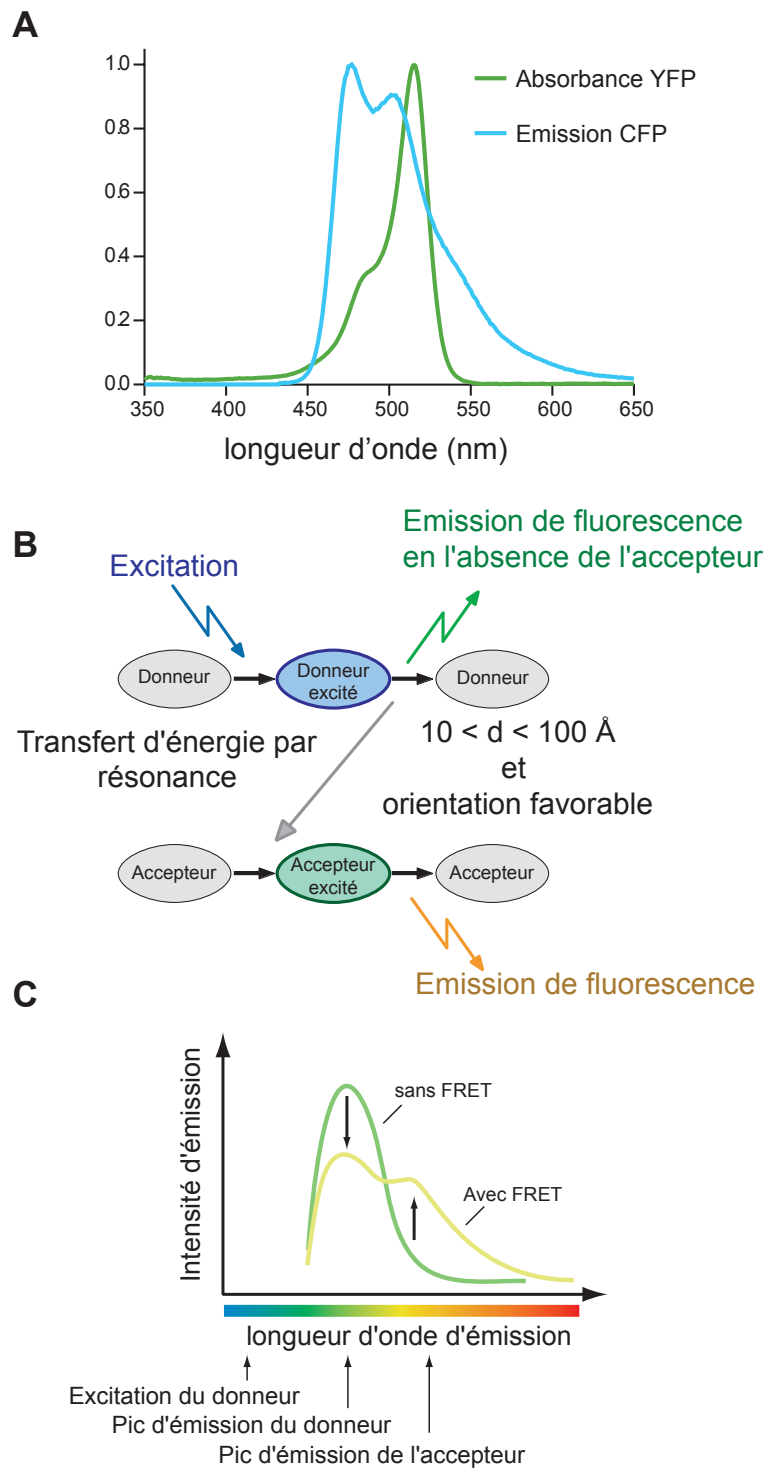
Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET pour Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer) a lieu lorsque deux fluorophores (le donneur et l'accepteur) ont des spectres d'émission qui se recouvrent. Le transfert d'énergie se produit lorsque le donneur dans un état excité transfère son énergie à l'accepteur, au lieu d'émettre un photon. L'accepteur se trouve alors excité et se relaxe en libérant un photon à sa propre longueur d'onde d'émission. Ce transfert d'énergie se traduit donc par une diminution de la fluorescence du donneur et une augmentation de la fluorescence de l'accepteur. Ce phénomène est dépendant de la distance et de l'orientation relative des deux fluorophores. Pour les paires de fluorophores utilisées en biologie, la distance de Förster est de l'ordre de grandeur de 50 Å (figure 26).

## 3. Les sondes AMPc et PKA codées génétiquement et leurs utilisations en biologie

Notre compréhension des phénomènes biologiques dépend fortement de la possibilité de visualiser et de quantifier les événements cellulaires avec une très grande précision spatiale et temporelle. L'identification et la caractérisation des mécanismes intervenant dans l'organisation intracellulaire de la voie de l'AMPc/PKA ont été étudiés grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes. Historiquement, la première sonde permettant de mesurer l'AMPc dans les cellules a été la sonde FICRhR (Adams *et al.*, 1991). Aujourd'hui, les principales études d'imagerie de la voie AMPc/PKA utilisent des sondes codées génétiquement. Ces sondes ont l'avantage de pouvoir être exprimées dans tous les types cellulaires et permettent suivre en temps réel sur des cellules vivantes les modifications spectrales. De plus, elles peuvent être adressées dans différents compartiments cellulaires ou être fusionnées à des protéines ou des complexes moléculaires d'intérêt.

Je vais présenter brièvement les principaux résultats obtenus grâce à l'utilisation de ces sondes codées génétiquement.





**Figure 26** : Présentation du FRET

**A**, Le transfert d'énergie a lieu lorsque le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'excitation de l'accepteur (ici sont présentés les spectres d'émission de la CFP et d'excitation de la YFP). **B**, le transfert d'énergie a lieu si l'orientation et la distance entre les deux fluorophores est favorable. **C**, Représentation schématique des modifications du spectre d'émission d'une sonde FRET avec (jaune) ou sans (vert) transfert d'énergie.

## 3.1 La sonde basée sur la PKA

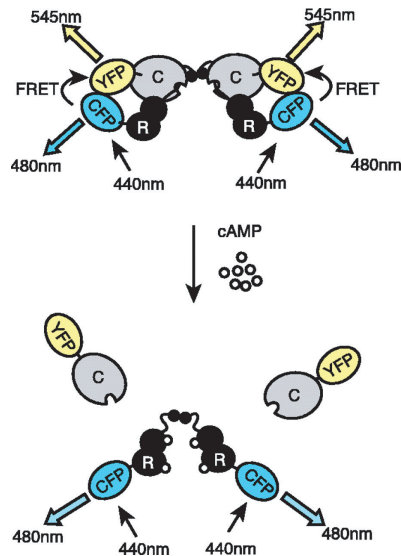
### 3.1.1 Principe

La sonde utilisée est une PKA basée sur la fusion des sous-unités régulatrices et catalytiques avec différents variants de la GFP. Plus précisément, les sous-unités catalytiques sont fusionnées avec un variant « jaune » de la GFP (YFP pour yellow fluorescent protein) alors que les sous-unités régulatrices sont fusionnées avec un variant « bleu » de la GFP (CFP pour cyan fluorescent protein) (figure 27). L'imagerie du signal AMPc est basée sur le transfert d'énergie entre les deux fluorophores, la CFP fusionnée à la sous-unité régulatrice jouant le rôle de donneur alors que la YFP constitue l'accepteur. La dissociation des sous-unités se traduit par une diminution du transfert d'énergie entre les deux fluorophores (figure 27).

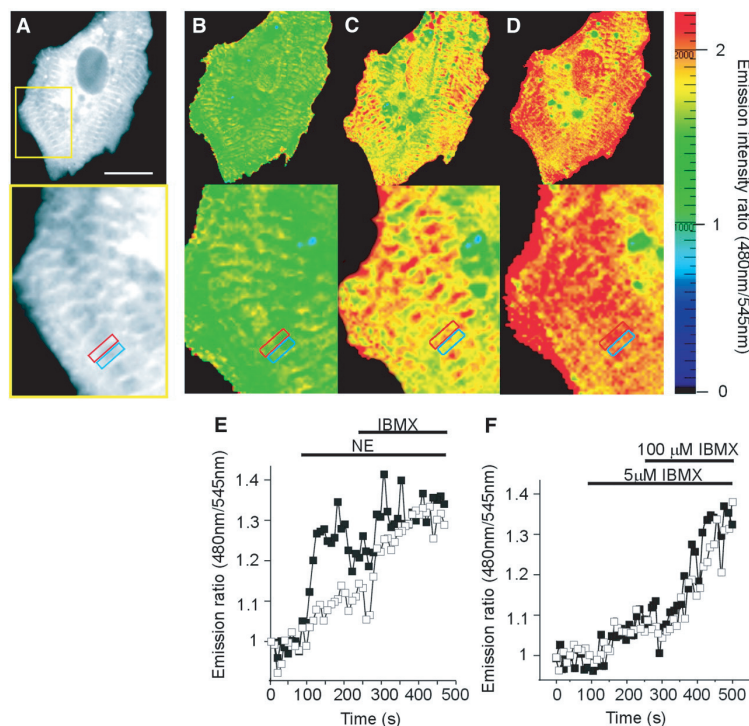
### 3.1.2 Mise en évidence de microdomaines d'AMPc dans les cardiocytes néonataux de rat

Zaccolo et Pozzan ont montré grâce à l'utilisation de cette sonde que les réponses  $\beta$  adrénergiques produisent des augmentations localisées de la concentration d'AMPc au niveau des tubules T des cardiocytes (figure 28). Cette localisation disparaît lors de l'utilisation d'IBMX (inhibiteur non spécifique des PDEs) et n'est pas présente lors de la stimulation des AC par la FSK (Zaccolo & Pozzan, 2002).

L'utilisation de la sonde PKA codée génétiquement a donc permis à ces auteurs de montrer l'existence de microdomaines d'AMPc capables d'activer la PKA dans des régions très localisées. Les conclusions de cette étude sont toutefois à minimiser notamment du fait de l'utilisation d'un système imagerie non confocal (*voir discussion*).



**Figure 27 :** Représentation du fonctionnement de la sonde codée génétiquement mise au point par Zaccolo et Pozzan.  
 En absence d'AMPC, la CFP fusionnée à la sous-unité régulatrice joue le rôle de donneur et excite la YFP fusionnée à la catalytique. En présence d'AMPC, la dissociation des sous-unités provoque une perte du transfert d'énergie entre la CFP et YFP (d'après Zaccolo et Pozzan 2002).



**Figure 28 :** Compartimentation de la réponse  $\beta$  adrénergique dans les cardiocytes néonataux.  
**A**, Distribution de la CFP dans les cardiocytes néonataux. **B à D**, images en fausses couleurs de la même cellule lors de l'application d'agonistes de la voie AMPC. **E**, Cinétique de la variation du rapport de fluorescence mesurée sur la région d'intérêt indiquée en rouge en A (carré plein) et sur la région d'intérêt indiquée en bleu en A qui se trouve entre deux stries (carré vide). **F**, Cinétique de la variation du rapport de fluorescence mesurée sur une strie (carré plein) ou entre deux stries (carré vide) (d'après Zaccolo et Pozzan 2002).

## 3.2 Les sondes basées sur Epac

### 3.2.1 Principe

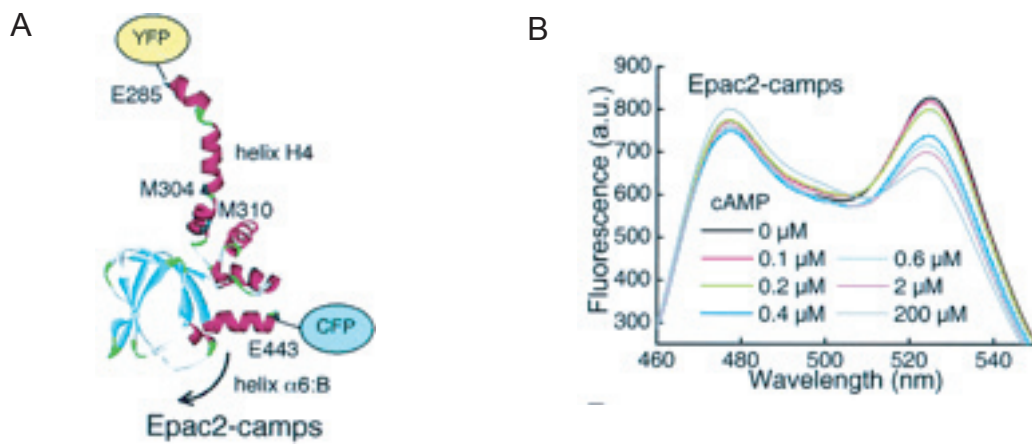
Deux sondes ont été développées à partir de la protéine Epac et ces deux sonde sont basées sur le principe du FRET. Deux GFP (CFP et YFP) ont été fusionnées aux deux extrémité de la protéine Epac, la CFP jouant le rôle de donneur et la YFP d'accepteur. Lorsque l'AMPc se lie sur Epac, il produit un changement de conformation de la molécule qui libère le site catalytique. Ce changement de conformation va diminuer le transfert d'énergie entre les deux fluorophores (figure 29).

### 3.2.2 Vitesse de diffusion de l'AMPc dans des cellules vivantes

La transfection de neurones hippocampiques en culture par la sonde Epac a permis de suivre les modifications spatiales et temporelles de la concentration d'AMPc. L'application focalisée d'isoprénaline (50nM) produit une propagation très rapide de la variation de fluorescence du point d'application à l'ensemble du neurone. Les auteurs ont calculé la vitesse de diffusion de l'AMPc dans ces cellules qui est d'environ 40 $\mu$ m/s (figure 30) (Nikolaev *et al.*, 2004).

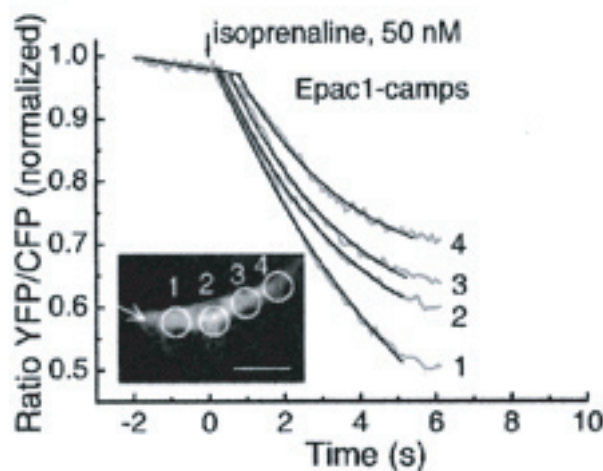
Le groupe de Zhang s'est intéressé à la dynamique des signaux AMPc dans différents compartiments de la cellule. Pour cela ils ont adressé la sonde Epac (ici appelé ICUE pour indicator of cAMP using Epac) à la membrane, dans le cytosol, dans les mitochondries et dans le noyau. Ces auteurs ont montré que la sonde ICUE membranaire permet de mesurer des augmentations de la concentration d'AMPc beaucoup plus rapide que dans le reste de la cellule alors que les sondes adressées dans le cytosol, la mitochondrie ou le noyau mettent en évidence des cinétiques d'augmentation de l'AMPc identiques (Dipilato *et al.*, 2004).

Ces deux études menées par les groupes de Lohse et de Zhang apportent des données très intéressantes sur la dynamique spatiale et temporelle de l'AMPc. En effet, alors qu'il existe un ralentissement des signaux AMPc de la membrane vers les autres compartiments cellulaires, les signaux une fois qu'ils sont dans le cytosol diffusent librement.



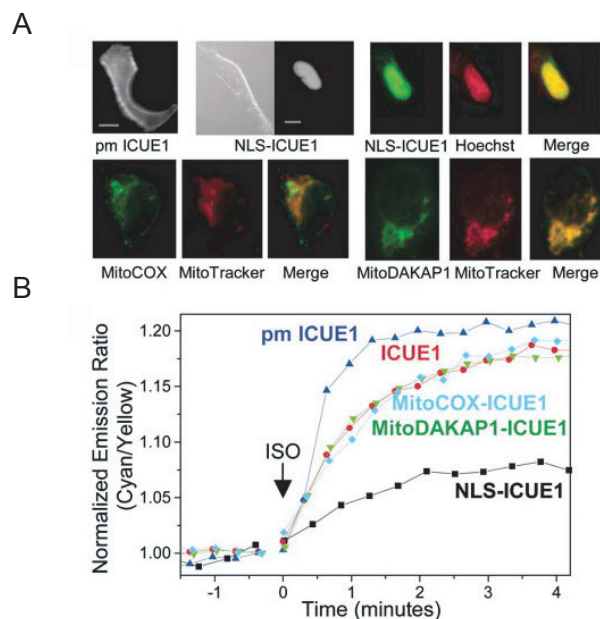
**Figure 29** : Les sondes FRET basées sur la protéine Epac.

**A**, Structure cristallisée de la protéine Epac2 avec le positionnement des deux GFP en N et C terminal. La flèche représente le changement de conformation attendu lors de la liaison de l'AMPc. **B**, Spectre d'émission de la sonde Epac2. La présence d'AMPc produit une diminution du transfert d'énergie entre la CFP et la YFP (d'après Nikolaev et coll 2004).



**Figure 30** : Propagation de l'AMPc dans les neurones hippocampiques en culture.

Neurone exprimant la sonde Epac et stimulé par une application locale d'isoprénaline (flèche blanche). La mesure de FRET a été effectuée sur les 4 régions dessinées sur l'image (d'après Nikolaev et coll 2004).



**Figure 31** : Cinétique d'activation de la sonde Epac (ICUE) localisée dans différents compartiments cellulaires.

**A**, distribution des différentes fusions de la sonde ICUE. pmICUE est adressée à la membrane, NLS-ICUE est adressée dans le noyau, MitoCOX et MitoDAKAP1-ICUE sont adressée dans les mitochondries. **B**, Variation du rapport de fluorescence des différentes fusions de ICUE (d'après DiPilato et coll 2004).

### 3.3 La sonde AKAR rapporteur de l'activité PKA

#### 3.3.1 Principes

La sonde AKAR (A kinase activity reporter) est composée de deux GFP (CFP et YFP) séparées par une chaîne polypeptidique portant un site consensus de phosphorylation de la PKA et d'un site de reconnaissance des acides aminés phosphorylés. Lorsque la PKA est activée, elle phosphoryle la sonde qui change alors de conformation grâce à une liaison du site de reconnaissance sur le site consensus (figure 32). Ce changement de conformation est à l'origine d'une augmentation du transfert d'énergie entre les deux fluorophores.

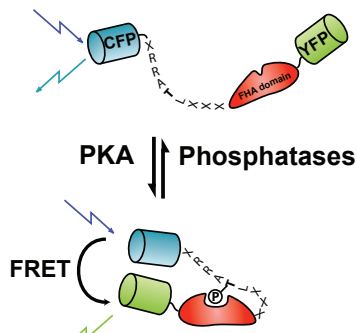
#### 3.3.2 Importance de la localisation des substrats de la PKA dans la régulation temporelle de leur phosphorylation.

La fusion de la sonde AKAR1 avec la sous-unité RII $\alpha$  ou avec un domaine des D-AKAP (domaine RPP8) permettant la liaison de RII $\alpha$  accélère grandement la phosphorylation de la sonde (figure 33). Les travaux de Zhang ont montré que la phosphorylation de la sonde AKAR1, est donc des substrats de la PKA, est plus rapide lorsque la PKA est localisée à proximité de sa cible (Zhang *et al.*, 2001).

Une étude similaire s'est intéressée aux effets des PDEs sur la phosphorylation des cibles de la PKA. Pour cela, les auteurs ont utilisé la sonde AKAR2 fusionnée avec un domaine de liaison des PKA (AKAR2-PKA) ou fusionnée avec un domaine de liaison des PKA et des PDE4D3 (AKAR2-PKA-PDE). La sonde AKAR2-PKA est phosphorylée et le reste tout au long de l'application de FSK. La sonde AKAR2-PKA-PDE est également phosphorylée lors de l'application de FSK mais cette phosphorylation est transitoire et beaucoup plus faible (figure 34). Ceci illustre bien que la localisation des PDEs à proximité de la PKA permet de modifier complètement l'amplitude et la durée de la phosphorylation des substrats de la PKA (Dodge-Kafka *et al.*, 2005).

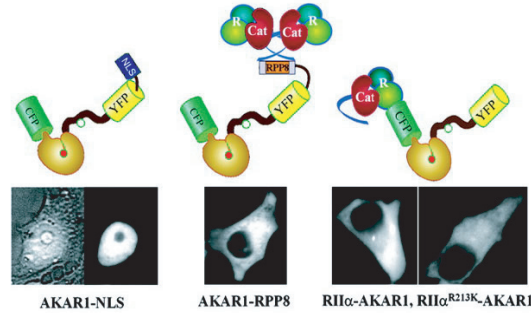
Les études réalisées grâce à l'imagerie cellulaire de la voie AMPc/PKA ont démontré ou confirmé que l'activation spatiale et temporelle de cette voie de signalisation est

particulièrement importante dans le codage et l'intégration des signaux extracellulaires, et la localisation des différents protagonistes de la voie permet de créer une activation localisée dans le temps et dans l'espace.

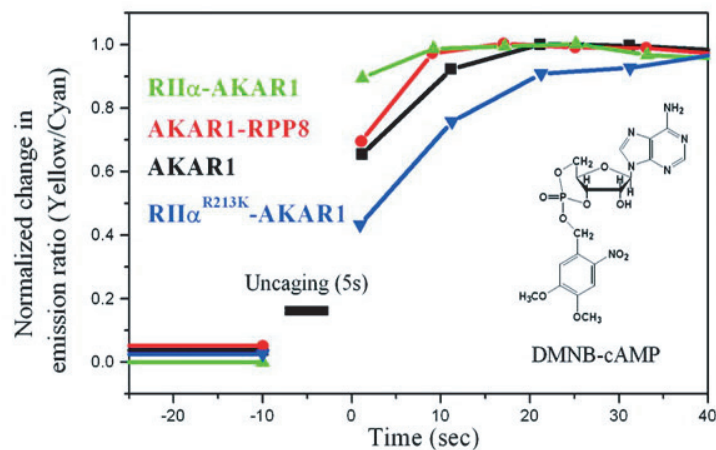


**Figure 32 :** Représentation schématique de la sonde AKAR2 et des changements de conformation obtenus après phosphorylation par la PKA.

A



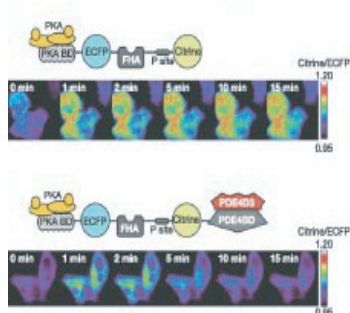
B



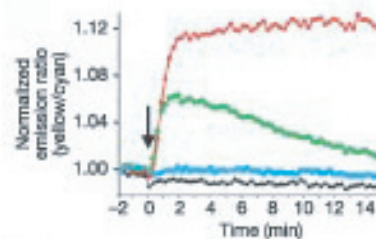
**Figure 33 :** La localisation de la PKA à proximité de la sonde AKAR1 accélère sa phosphorylation.

**A,** Représentation schématique des fusions de la sonde AKAR1 et leur distribution cellulaire. AKAR1-NLS est adressée au noyau, AKAR1-RPP8 et AKAR1-RIIa adressent la PKA à proximité de la sonde. **B,** Cinétique des sondes AKAR1 fusionnée en réponse à une augmentation globale de l'AMPC (d'après Zhang et coll 2001).

A



B



**Figure 34 :** La localisation des PDEs à proximité de la sonde AKAR2 modifie l'amplitude et la cinétique de la phosphorylation de la sonde.

**A,** Représentation schématique des fusions de la sonde AKAR2 et images en fausses couleurs obtenues lors de l'activation de la voie AMPC. **B,** Cinétique des réponses des sondes AKAR2-PKA et AKAR2-PKA-PDE en réponse à une application de FSK (d'après dodge-kafka et coll 2005).



**Article 1 (en soumission) : Subcellular integration of cyclic-AMP-dependant protein kinase A activity dynamics in neurons in mouse brain slices**

## ***Contexte et but de l'étude***

Il est bien établi que la PKA joue un rôle très important dans la régulation de nombreuses fonctions neuronales. Des signaux extracellulaires variés en se liant sur différents types de récepteurs membranaires vont provoquer une modification de la concentration intracellulaire d'AMPC et activer la PKA. Pourtant, chaque stimulation garde une spécificité dans la régulation de ces fonctions cellulaires. Les neurones sont donc capables de discriminer différents signaux extracellulaires mettant en jeu la même voie de signalisation. L'activation spatiale et temporelle de la PKA est un facteur déterminant dans l'intégration cellulaire de ces signaux. Malheureusement, par manque de techniques capables de résoudre ces paramètres, très peu de données sur l'activation de la PKA ont été obtenues dans les neurones. Pour avoir accès aux aspect temporel et spatial des réponses PKA, nous avons donc décidé d'utiliser des techniques d'imagerie cellulaire. L'utilisation de la sonde AKAR2 nous a permis de mesurer l'activité de phosphorylation de la PKA en temps réel et à l'échelle subcellulaire. Le but de cette étude était de mesurer l'activation de la PKA en réponse à des signaux extracellulaires dans différents compartiments neuronaux, et tenter ainsi de comprendre où et comment se fait l'intégration de ces différents signaux. L'activation de la PKA a été obtenue soit par une activation directe de l'AC par la FSK soit par une stimulation du récepteur 5-HT7 par la 5-CT. En suivant la phosphorylation de protéines localisées dans trois compartiments cellulaires différents, nous avons eu accès à l'activation de la PKA à proximité de ces effecteurs. L'activation de la PKA à la membrane a été mesurée par la phosphorylation des canaux responsables du courant de l'AHP lente. La sonde AKAR2 nous a permis d'obtenir des mesures au niveau cytosolique et la sonde AKAR2-NLS l'activation dans le noyau.

## ***Techniques utilisées***

L'ensemble de l'étude a été réalisé sur des tranches de cerveaux de souris. En effet, nous voulions garder une organisation fonctionnelle très proche de la situation physiologique. Pour faire exprimer la sonde AKAR2 dans les neurones, nous avons utilisé un vecteur viral à ARN qui permet une expression rapide et spécifique de la sonde dans les neurones. Nous

avons réalisé l'imagerie de type FRET grâce à un microscope à fluorescence équipé d'une lampe halogène pour éviter au mieux le phénomène de photoblanchiment des fluorophores très toxiques pour les cellules vivantes. Comme la diffusion de la fluorescence provoquée par l'utilisation d'un système d'imagerie non confocal est un facteur limitant pour une mesure spatiale précise des variations de fluorescence, nous avons utilisé une sonde ayant une répartition homogène dans les neurones et construit une sonde adressée spécifiquement dans le noyau permettant de garantir ainsi la spécificité spatiale des signaux. Enfin, la mesure de l'activation de la PKA au niveau membranaire a été obtenue par enregistrement électrophysiologique du courant de l'AHP lente. Ces enregistrements ont été effectués grâce à la technique de patch-camp en configuration cellule entière sur des tranches identiques aux tranches utilisées pour l'imagerie. Nous avons vérifié que la transfection des neurones par le virus et que l'expression de la sonde n'interféraient pas avec les cibles endogènes de la PKA grâce à des enregistrements simultanés d'imagerie et d'électrophysiologique. L'application des agonistes s'est effectuée grâce à un système de perfusion locale.

## **Subcellular integration of cyclic-AMP-dependant Protein Kinase A activity dynamics in neurons in mouse brain slices.**

Nicolas Gervasi<sup>1,2</sup>, Régine Hepp<sup>1,2</sup>, Ludovic Tricoire<sup>1,2</sup>, Franck Sureau<sup>3,4</sup>, Jin Zhang<sup>5,6</sup>, Bertrand Lambolez<sup>1,2</sup>, Danièle Paupardin-Tritsch<sup>1,2</sup> and Pierre Vincent<sup>1,2</sup>.

1: CNRS, UMR7102, Paris, F-75005 France; 2: Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR7102, Paris, F-75005 France; 3: CNRS, UMR7033, Paris, F-75005 France; 4: Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR7033, Paris, F-75005 France; Departments of Pharmacology and Molecular Sciences (5) and Neuroscience (6).

### **Introduction**

The importance of cyclic-AMP-dependent protein kinase A (PKA) has long been known in neurobiology (1): this kinase controls many key neuronal functions including excitability, synaptic transmission, plasticity, differentiation and gene expression. The subcellular location of the active kinase has important physiological significance: for example, PKA at the membrane will phosphorylate membrane conductances and thus affect neuronal excitability, whereas in the cytosol it will affect proteins of the cytoskeleton and metabolic enzymes. The translocation of the catalytic subunit of PKA into the nucleus results in the phosphorylation of nuclear factors, like CREB, which eventually regulate gene expression leading to long-term changes in cell function. Imaging experiments in invertebrate neurons showed that the PKA signals in response to focal serotonin application (2) or to endogenous neuromodulators (3) propagate from the dendrites towards the cell body, confirming the importance of the cellular architecture in the integration of neuromodulatory signals. A functional compartmentation of the cAMP/PKA signal has been demonstrated in cardiomyocytes (review in (4)) and biochemical and functional data indicate that neurons also possess spatially restricted

"signalling domains" (5, 6). However, to date, the dynamics of PKA activity in different subcellular compartments and the effects of different extracellular signals on signaling pathway spatial and temporal dynamics has not been studied in vertebrate neurons.

Several recently developed genetically-encoded fluorescent probes use a tandem of GFP-derived fluorophores CFP and YFP, sandwiching a domain whose conformational change is monitored by a modulation of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) efficacy (7-9). Among these (10), AKAR2 uses a phosphothreonine binding domain derived from yeast (FHA1: forkhead associated domain 1) and an optimized PKA substrate domain. When phosphorylated by PKA, the FHA domain binds to the substrate domain, increasing FRET between CFP and YFP. This reporter is a substrate for the endogenous PKA and therefore reports the phosphorylation level of intracellular proteins that are targets of PKA. This probe allowed us to monitor in real time PKA activation in the cytosol of neurons in brain slice preparations. PKA activation was also monitored specifically in the nuclear compartment using AKAR2 fused with a NLS targeting signal (10). Another genetically-encoded reporter of PKA activity has been described (11) using a PKA phosphorylation site of CREB but its performance in brain slices remains to be evaluated. Other genetically-encoded probes are sensitive to cAMP concentration (12-15), or report PKA dissociation upon cAMP binding (16), but these probes report the activity of the cAMP/PKA signaling cascade one or two steps above PKA phosphorylation and do not reflect the integrated physiological effect of PKA.

One well established PKA effect on neuronal excitability is the modulation of the slow after-spike hyperpolarization (sAHP). The sAHP is mediated by a calcium-dependent potassium current activated after a train of action potentials: it hyperpolarizes the neuron for ~ 5 seconds, preventing tonic firing (17, 18). The sAHP is suppressed in response to several neuromodulators via the activation of PKA (19) resulting in a suppression of rhythmic bursting

ability. A large sAHP is present in intralaminar thalamic neurons where it is under the strong negative control of serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptors coupled to the cAMP/PKA signaling cascade (20). This conductance provides a direct signal for monitoring PKA activity at the membrane. By combining electrophysiology with imaging, we monitored PKA activity at the membrane, in the cytosol and in the nucleus of neurons in brain slices. We observed that each of these compartments integrates the PKA signal with a specific efficacy and time course.

## Results

**Emission spectrum change.** To initially characterize the signaling properties of AKAR2, the emission spectrum of the probe was obtained from individual cultured BHK-21 cells expressing AKAR2, before and after continuous bath application of 13  $\mu$ M forskolin for 20 min (supporting data fig. 1A), conditions sufficient to reach a maximum PKA response (see below). The normalized emission spectrum displays the reciprocal reduction in the CFP and increase in YFP emission intensity giving a F535/F480 ratio increase of 31%. A control probe called AKAR2mut was constructed by replacing threonine 391 by an alanine residue in the consensus phosphorylation site of AKAR2. No change in the emission spectrum was observed with this probe upon bath application of 13  $\mu$ M forskolin (supporting data fig. 1B). Thus, AKAR2 responds to PKA-dependent phosphorylation by a change in fluorescence emission spectrum consistent with an increase in FRET between CFP and YFP.

**PKA responses in the somatosensory cortex.** We wanted to use this probe in brain slices, a preparation preserving the anatomical organization of the tissue and the functional properties of the neurons and used the Sindbis virus as a vector for gene transfer (see Methods). After 15 h, AKAR2 was present throughout the cytosol of the neurons and partially excluded from the nucleus (fig. 1). We first verified that AKAR2 was able to report the activation of PKA in somatosensory cortical brain slices following a direct stimulation of adenylyl cyclases. Forskolin, a direct activator of adenylyl cyclases, produced a strong increase in F535/480

emission ratio, consistent with a FRET increase (fig. 2 *A-B*). The ratio recovered after wash-out of forskolin (n=12 out of 12 cells tested, 4 slices), showing that endogenous phosphatases efficiently dephosphorylate the probe. The same experiment performed with AKAR2mut showed no change in emission intensities (fig. 2 *C-D*; n=29, 6 slices), confirming that the ratio change is indeed dependent on the phosphorylation of the probe. In all subsequent measurements, we controlled that AKAR2mut gave no response. Addition of the phosphodiesterase inhibitor isobutyl-methyl xanthine (IBMX, 200  $\mu$ M) at the plateau of the forskolin response produced no further increase (n=7, 3 slices), indicating that forskolin was sufficient to trigger a maximal AKAR2 ratio response.

As PKA exerts powerful effects on transcription factors, we monitored ratio changes specifically in the nucleus. As AKAR2 fluorescence was dim in the nucleus, the probe was targeted to the nuclear compartment by fusing its C-terminal to a nuclear localization signal (NLS) (10). With this probe, no fluorescence was present outside the nucleus (data not shown). Forskolin reversibly increased the AKAR2-NLS ratio (fig. 2 *E-F*; n=12, 4 slices). The baseline value and response amplitude were smaller than in the cytosol. As AKAR2mut also showed a lower ratio in the nucleus (data not shown), independently of any phosphorylation, the nuclear environment likely affects the spectral properties of the probe.

**Dynamics of PKA response in intralaminar thalamic nuclei.** In order to monitor PKA activity at the membrane, we studied neurons in intralaminar thalamic nuclei, which express high levels of 5-HT<sub>7</sub> receptors positively coupled to the cAMP/PKA cascade and we have shown previously (20) that the activation of this cascade in these neurones suppresses the sAHP. The potassium current underlying the sAHP hereafter called  $I_{sAHP}$  was used as a reporter of PKA activity at the membrane.

We first verified that the expression of AKAR2 did not perturb the modulation of the potassium currents by PKA. During simultaneous patch-clamp recording and imaging of the

same neuron (fig. 3), fast focal application of 13  $\mu$ M forskolin decreased  $I_{sAHP}$  amplitude by  $78 \pm 4\%$  ( $n=9$ ; fig. 5B), which is similar to previously published experiments (20). This shows that expression of AKAR2 does not prevent PKA-dependent modulation of this target membrane channel. In addition, the kinetics of the AKAR2 response onset in the patched cell is identical to that of a neighbouring cell (fig. 3), showing that whole-cell dialysis does not perturb the onset of the PKA response. However, the patched cell exhibited a decrease in fluorescence intensity of  $\approx 10\%$  after 10 min, due to a partial wash-out of the probe.

We compared the effect of pharmacological stimulation of adenylyl cyclases with activation of the 5-HT<sub>7</sub> receptor. The 5-HT<sub>7</sub> agonist 5-carboxamidotryptamine (5-CT) was applied at a concentration (100 nM) known to maximally inhibit  $I_{sAHP}$  (20); indeed,  $I_{sAHP}$  decreased by  $83 \pm 5\%$  ( $n=7$ ; fig. 5B), not significantly different from the inhibition obtained with 13  $\mu$ M forskolin and previously published data (20). This effect developed very rapidly and the reduction in  $I_{sAHP}$  amplitude was complete within  $45 \pm 8$  s ( $n=4$ ) after bath application of 5-CT. In order to improve the temporal resolution of our recordings, we monitored the potassium current underlying the sAHP which is partially active at resting potential. This tonic outward potassium current is also strongly sensitive to PKA (20-22) and suppressed in parallel with  $I_{sAHP}$  following PKA activation (fig. 4). This tonic current was therefore used to report the kinetics of PKA activation at the membrane (fig. 5A). The time of drug arrival on the neuron was monitored by applying 10 mM TEA (fig 5A, light gray). Both forskolin (fig 5A, dark gray) and 5-CT (fig 5A, black) reduced the tonic outward current with a marked delay compared to the TEA control. In addition, we observed that the response to 5-CT started with a significant delay of 5 s compared to forskolin ( $12.2 \pm 1.2$  s  $n=7$  vs  $6.8 \pm 1.9$  s  $n=9$ ). This delay probably results from the additional steps of Gs activation and diffusion to the cyclase. On the other hand, the slope of both responses were similar, an indication that



both stimuli had the same efficacy in recruiting the pool of PKA involved in potassium channel modulation.

**Cytosol.** The responses were different in the cytosol where AKAR2 reported responses to 5-CT of smaller amplitude than to forskolin ( $6.8 \pm 0.5$  % ratio change,  $n=30$ , 7 slices *vs*  $13.4 \pm 0.7$  %,  $n=27$ , 9 slices; fig. 5D). Activation of 5-HT<sub>7</sub> membrane receptors thus led to a partial effect in the cytosol whereas it was maximal on target membrane currents.

In order to analyze the kinetics of the PKA response in the cytosol we first measured the speed of cAMP-triggered AKAR2 phosphorylation in these neurons. The ratio response upon whole-cell dialysis with 500  $\mu$ M cAMP increases exponentially with a time-constant of 20 sec (fig. 5C, upright triangles), consistent with the diffusion of a small molecules from the patch pipette into the cytosol (12, 23). Uniform and rapid release of caged cAMP by UV light triggered a yet faster ratio increase with negligible delay or rising phase (fig. 5C, inverted triangles), showing that indeed the speed of AKAR2 phosphorylation by PKA is not the limiting factor in our kinetic measurements.

As observed at the membrane, in the cytosol we measured a delay in the ratio signal of AKAR2 between the forskolin and 5-CT responses ( $9.9 \pm 2.7$  s  $n=27$  *vs*  $25.4 \pm 4.6$  s  $n=30$ ). The initial slope of both responses were similar but since the maximal response was bigger for forskolin than 5-CT, the rise-time also differed: the 10-90 % rise time was  $267 \pm 18$  s  $n=27$  for forskolin *vs*  $141 \pm 12$  s  $n=29$  for 5-CT. When comparing the membrane with the cytosol, for both stimulations, the cytosolic signal of AKAR2 is always much slower than the PKA effect on the sAHP.

**Nucleus.** We wanted to see whether forskolin and 5-CT can affect phosphorylation in the nucleus measured as the ratio changes in this compartment using AKAR2-NLS. As in the cytosol, the PKA signal was smaller in response to 5-CT than to forskolin (fig. 5F,  $3.6 \pm 0.6$  % ratio change,  $n=22$ , 4 slices *vs*  $6.3 \pm 0.75$  %  $n=13$ , 4 slices), showing that the relative

amplitude of the PKA signal is transferred into the nucleus. The time-course and the delay were similar for both stimuli, but much slower than in the cytosol (fig. 5E): the 10-90 % rise time was  $16.6 \pm 1$  min  $n=13$  for forskolin and  $18.3 \pm 1$  min  $n=15$  for 5-CT. No delay between forskolin and 5-CT responses could be detected on such slow responses. The nucleus thus receives a PKA signal that has been temporally filtered on a time-scale of tens of minutes, which is consistent with the model of passive diffusion of the catalytic subunit of PKA into the nucleus.

## Discussion

**AKAR2 in brain slices.** We used a genetically-encoded FRET probe to study the dynamics of a second messenger cascade in morphologically intact neurons. This approach is of general interest to neurobiologists since it can be used to study other brain regions with any of the diverse genetically-encoded fluorescent probes. In our experiments, we studied the dynamics of PKA effects at different locations inside the cell and we chose to use AKAR2, an indicator of PKA-mediated phosphorylation. We first verified that activation of PKA by forskolin led to strong emission ratio increases whereas the control inactive probe showed no change. Inhibition of all phosphodiesterases by IBMX did not increase the forskolin response showing that forskolin fully activates PKA and gives the maximal AKAR2 response. After agonist washout, the ratio returned to baseline, showing that after PKA deactivation, AKAR2 can be dephosphorylated by endogenous phosphatases. This ratio recovery took about an hour, ie 10 times longer than the onset in the cytosol, and the effect of phosphatases on the onset of the PKA response in the cytosol can therefore be neglected. Photorelease of caged cAMP showed that the phosphorylation of AKAR2 by PKA occurs within few seconds and this step is not limiting the temporal resolution of our measurements. Based on the fluorescence intensity and comparison with fluorescein, the cytosolic concentration of AKAR2 is around a few

micromolar, in the range of many other PKA substrates in the cytosol, and it is unlikely that the addition of AKAR2 will exert any significant buffering effect on the available pool of active PKA. In addition, our experiments show that even in neurons expressing AKAR2, activation of PKA still leads to the expected suppression of  $I_{sAHP}$ , showing that the PKA activity is not significantly hampered by the presence of AKAR2. AKAR2 is thus particularly suitable for physiological studies since it reports the phosphorylation level of soluble PKA substrates in the cell, reporting at steady state the equilibrium between phosphorylation by PKA and dephosphorylation, and displaying the activation kinetics of PKA at the onset of the response.

**Amplitude.** Our results show that the PKA effect on its targets is more pronounced at the membrane than in the cytosol. At the membrane, pharmacological stimulation of adenylyl cyclase or activation through G-protein coupled receptors both suppress  $I_{sAHP}$  to similar extents, indicating a full effect of PKA on the channels. In contrast, in the cytosol, the PKA response to serotonergic stimulation is only about half of that obtained after direct pharmacological stimulation of adenylyl cyclase. In other words, a neuromodulatory stimulus that produces a maximal effect on membrane channels is only able to trigger a partial response in the cytosol, showing that membrane and cytosol respond differently to the same extracellular signal. A reduced efficacy of GPCR-mediated stimulation in the cytosol has also been reported for soluble proteins like spinophilin (24). The nucleus responds in a similar gradual way and one would expect that the effect exerted by PKA on gene expression will depend on the PKA activity level in the nucleus, as has been reported in NIH3T3 or PC12 cells (25).

Several hypotheses may explain the highly efficient coupling between adenylyl cyclases and the sAHP potassium channel. A spatially restricted cAMP signal has been described in cardiocytes (4, 26, 27) and HEK293 cells (28) where phosphodiesterases seem to play an

important role. In neurons, a high surface/volume ratio in neurites may help keep the cyclases and potassium channels in close proximity while containing cAMP and free catalytic PKA subunit in a small cylindrical volume. In addition, at the molecular level, protein-protein interactions may form highly organized "signaling microdomains" (29, 30), maintaining a pool of activatable PKA in close vicinity to the target channels. Further validation of these hypotheses awaits the molecular identification of the channel mediating  $I_{sAHP}$ .

**Time-course.** The kinetics of the PKA effect on membrane channels are consistent with data obtained from other preparations, including cardiocytes (31) and chromaffin cells (32). We observed that the PKA-mediated response to 5-HT<sub>7</sub> receptor stimulation starts with a delay of about 5 s compared to the forskolin response. This delay likely results from the recruitment and activation of Gs proteins and is comparable to the 3 s reported for the  $\beta$ -adrenergic receptors in heart (33). Such a delay is much longer than for responses mediated by Gi/Go-proteins, as GIRK potassium currents can be activated in hundreds of ms in neurons. This is consistent with results in chromaffin cells which exhibit adrenergic responses with dual kinetics, a fast component mediated by Gi/Go and a slow one mediated by Gs (32).

The kinetics of the PKA effects in the cytosol are much slower than at the membrane. While the PKA-mediated suppression of sAHP current is complete in 45 s, maximal phosphorylation of cytosolic targets takes more than 2 min. Experiments performed on epithelial cell lines reported similar differences in the kinetics of the cAMP signal at the membrane and in the cytosol (28). After the cytosol, the PKA signal propagates towards the nucleus on an even slower time-course, reaching a maximum only after 17 min. The 5-CT response still remains smaller than the forskolin response by about the same factor as in the cytosol, indicating that the PKA signal is linearly transferred to the nucleus. The nuclear envelope thus seems to behave as a passive integrator of the cytosolic signal, "low-pass filtering" the cytosolic events without affecting their relative amplitude. This slow nuclear signal has also been reported on

cultured cell lines (14, 34) where the time-constant of the nuclear response is similar to the time-constant of nuclear translocation of the catalytic subunits of PKA (25, 35).

**Integration.** Our experiments describe for the first time the time-course of PKA-mediated signals in a morphologically intact preparation of mammalian neurons. Our results are in good agreement with earlier experiments performed on invertebrate neurons where PKA is first activated in small dendrites and then, depending on the stimulus, PKA activity propagates towards the cell body (3). We show here in morphologically intact mammalian brain neurons that PKA is activated sequentially at the membrane, in the cytosol and finally in the nucleus. This result suggests that the physiological effects of a neuromodulator will depend on the temporal profile of its release. Phasic release would affect membrane excitability within tens of seconds. Continuous release of a neuromodulator during tonic firing of neuromodulatory inputs would trigger signals in the cytosol leading to the phosphorylation of intracellular proteins on a slower time-scale. Ultimately, the PKA signal may reach the nucleus to affect gene expression after very long stimulations.

We also observed that the amplitude of the PKA response to a GPCR-mediated stimulation, although maximal at the membrane, is only partial in the cytosol and in the nucleus, confirming the physiological importance of feedback mechanisms to prevent the full activation of PKA in the cytosol. The coincidence of this PKA signal with other cellular events or the metabolic history of the cell may contribute to the fine tuning of the resulting PKA signal in the cytosol and in the nucleus and thus control the final physiological output.

## **Experimental procedures**

**Subcloning and Virus production.** Sindbis virus has been used in previous reports for gene transfer in organotypic cultured hippocampal slices (36-38). The coding sequences of AKAR2 and AKAR2-NLS were subcloned into the viral vector pSinRep5 (Invitrogen). The AKAR2 Thr<sub>391</sub> to Ala mutant (AKAR2mut) was generated using the Quickchange

mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The plasmids pSin-AKAR2, pSin-AKAR2-NLS and pSin-AKAR2Thr<sub>391</sub>Ala and the helper plasmid pDH26S (Invitrogen) were transcribed in vitro using the Megascript SP6 kit (Ambion). BHK cells were co-transfected with one specific RNA and the helper RNA by electroporation ( $2 \cdot 10^7$  cells  $950 \mu\text{F}$ ,  $230\text{V}$ ) and grown for 24 hours at  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum in absence of antibiotics before collecting cell supernatant containing the viruses (titer:  $10^6$  to  $10^8$  ip/ml).

**Brain slices and infection.** The preparation of acute brain slices was optimized to ensure survival of neurons up to 24h after cutting, which is sufficient for the expression of the AKAR2 gene. C57BL6 mice (12-16 days old; Janvier, France) were decapitated, in accordance with the guidelines of EC and of our institutions. The brain quickly removed and immersed in ice-cold solution containing (in mM): 210 sucrose, 20 PIPES, 2.4 KCl, 10  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\text{CaCl}_2$ , 10 glucose,  $45 \mu\text{M}$  indomethacin, pH 7.3 (39). Coronal thalamic and cortical slices of  $220 \mu\text{M}$  thickness were obtained using a HM650V vibratome (Microm, Germany) and kept at  $32^\circ\text{C}$  for 1h in (in mM): 125 NaCl, 0.4  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$  and 25 Glucose, bubbled with  $5\%\text{CO}_2/95\%\text{O}_2$ . Slices were then transferred for 1h to a similar solution at room temperature where the calcium was raised to 2mM (standard extracellular solution). Thereafter, brain slices were placed onto a millicell-CM membrane (Millipore), pre-equilibrated with culture medium (50% MEM, 50% HBSS, glucose 6.5 g/l, penicillin-streptomycin). Infection with pseudoviruses was performed by adding the viral solution ( $5 \cdot 10^5$  particules/slice) dropwise to the slice. We used low numbers of viral particles so that only a small number of neurons were infected, allowing non-confocal imaging of individual neurons on a dark background. Cells were incubated overnight at  $32^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ . During recordings, brain slices were continuously perfused with standard extracellular

solution with 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>. All recordings were performed at 32°C. Slices were discarded after every experiment, *ie* only naive slices were used.

Some brain slices were processed for immunohistochemistry as described (40) with mouse anti-NeuN (MAB377 Chemicon: 1:200 dilution) and Cy3 coupled goat anti-mouse IgG (Jackson: 1:2000 dilution), and observed with a Leica TCS NT confocal laser scanning microscope. Excitation was 488 nm for AKAR2 and 568 nm for Cy3. Detection used a 525±25 nm bandpass filter for AKAR and 590 nm longpass for Cy3. 93 % of AKAR2-expressing cells in our preparations also expressed NeuN, showing that the vast majority of cells expressing the probe were neurons. The remaining non-neuronal cells were easily distinguished based on morphological criteria.

**Single cell spectral analysis.** BHK cells were grown on glass coverslips and transfected with the AKAR2 or AKAR2mut construct in pCDNA3 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). The coverslip was mounted in a sealed chamber, perfused with the standard extracellular solution gassed with 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>. Forskolin was diluted in the same buffer and perfused in the chamber. The emission spectrum was recorded using a custom-built microspectrofluorometer (41), with excitation set at 454.5 nm focused on a 20 µm diameter spot. Measurements were performed on the same individual cell in control solution and after bath application of forskolin.

**Optical recordings on brain slices.** Images were obtained with an Olympus BX50WI upright microscope with a 60x 0.9 NA water-immersion objective and a Micromax digital camera (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA) with a 1300 x 1030 interline CCD sensor composed of 6.7 x 6.7 mm pixels, cooled to -20 °C. A 100 W halogen lamp was used for epifluorescence illumination with 0.5 s exposure duration. Images were corrected for background and flat-field uniformity. For each pixel, the ratio was calculated as the emission at 535 nm divided by the emission at 480 nm (F535/F480), and weighted by the intensity

when calculating an average on a region. Excitation and dichroic filters were D436/20 and 505dclp for CFP (FRET) and HQ500/20 and Q515lp for YFP. Signals were acquired by alternating the emission filters (480/40 and HQ535/30) or using an emission splitter (Optosplit II with standard CFP/YFP filter set, Cairn Research Ltd, Faversham, UK). All filters are from Chroma Technology (Brattleboro, VT, USA).

For uncaging experiments, brain slices were loaded overnight with 500  $\mu$ M DMNB-cAMP (Molecular Probes) in the culture dish. A 100W Hg arc lamp was used for uncaging experiments with 3-5 s exposure duration.

**Patch-clamp recording.** Patch pipette solution contained (mM) : 130 potassium methane sulphonate, 10 Hepes, 1 EGTA, 5 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 4 ATP-Na, 5 creatine phosphate, pH 7.35, liquid junction potential of + 7.0 mV. Neurons in brain slices were recorded under visual control. Pipettes were pulled with a vertical puller (Narishige, Japan) from borosilicate glass (Hilgenberg, Malsfeld, Germany) and had a resistance of 2-3 M $\Omega$ . Voltage clamp recordings were obtained using an Axopatch 200B (Axon Instrument, USA), digitized with an ITC16 interface (Instrutech, USA) and analysed using Axograph software (Axon Instruments, USA).  $I_{sAHP}$  was activated by a train of 20 to 40 steps of 3 ms duration at a frequency of 80 Hz from a holding potential of -60 mV to +20 mV.

**Drug application.** For all experiments performed on intralaminar thalamic neurons, drugs in standard extracellular solution were applied focally onto the field using a glass pipette of 180  $\mu$ m tip diameter placed 600  $\mu$ m away and 300  $\mu$ m above the recorded neuron, ensuring rapid delivery of the drugs (see fig 5A).

Drugs were from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

Differences were considered statistically different when  $p < 0.05$  using t-test. Statistics given in the text are mean  $\pm$  SEM.



## Acknowledgements

This work was supported by CNRS and Université Paris 6.

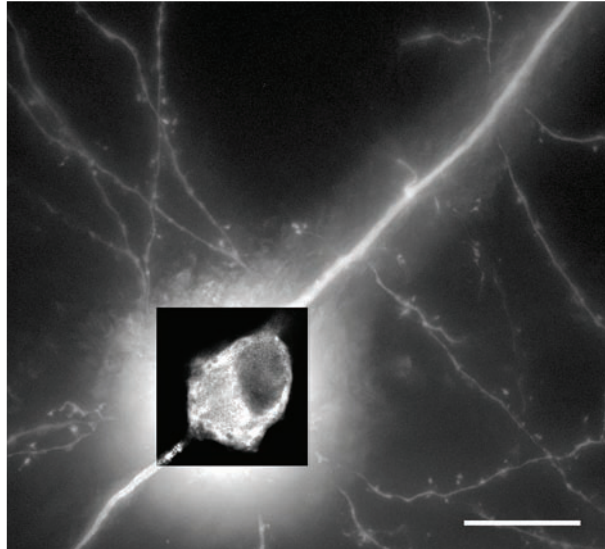
## References

1. Nairn, A. C., Hemmings, H. C. J. & Greengard, P. (1985) *Annu Rev Biochem* **54**, 931-976.
2. Bacsikai, B. J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S. R., Kaang, B. K., Kandel, E. R. & Tsien, R. Y. (1993) *Science* **260**, 222-226.
3. Hempel, C. M., Vincent, P., Adams, S. R., Tsien, R. Y. & Selverston, A. I. (1996) *Nature* **384**, 166-169.
4. Steinberg, S. F. & Brunton, L. L. (2001) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 751-773.
5. Carnegie, G. K. & Scott, J. D. (2003) *Genes Dev* **17**, 1557-1568.
6. Hoogland, T. M. & Saggau, P. (2004) *J Neurosci* **24**, 8416-8427.
7. Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y. & Tsien, R. Y. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 906-918.
8. Miyawaki, A. (2003) *Dev Cell* **4**, 295-305.
9. Sato, M. & Umezawa, Y. (2004) *Methods* **32**, 451-455.
10. Zhang, J., Hupfeld, C. J., Taylor, S. S., Olefsky, J. M. & Tsien, R. Y. (2005) *Nature* **437**, 569-573.
11. Nagai, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inouye, S., Hirose, K., Iino, M. & Hagiwara, M. (2000) *Nat Biotechnol* **18**, 313-316.
12. Rich, T. C., Tse, T. E., Rohan, J. G., Schaack, J. & Karpen, J. W. (2001) *J Gen Physiol* **118**, 63-78.
13. Nikolaev, V. O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. & Lohse, M. J. (2004) *J Biol Chem* **279**, 37215-37218.
14. DiPilato, L. M., Cheng, X. & Zhang, J. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16513-

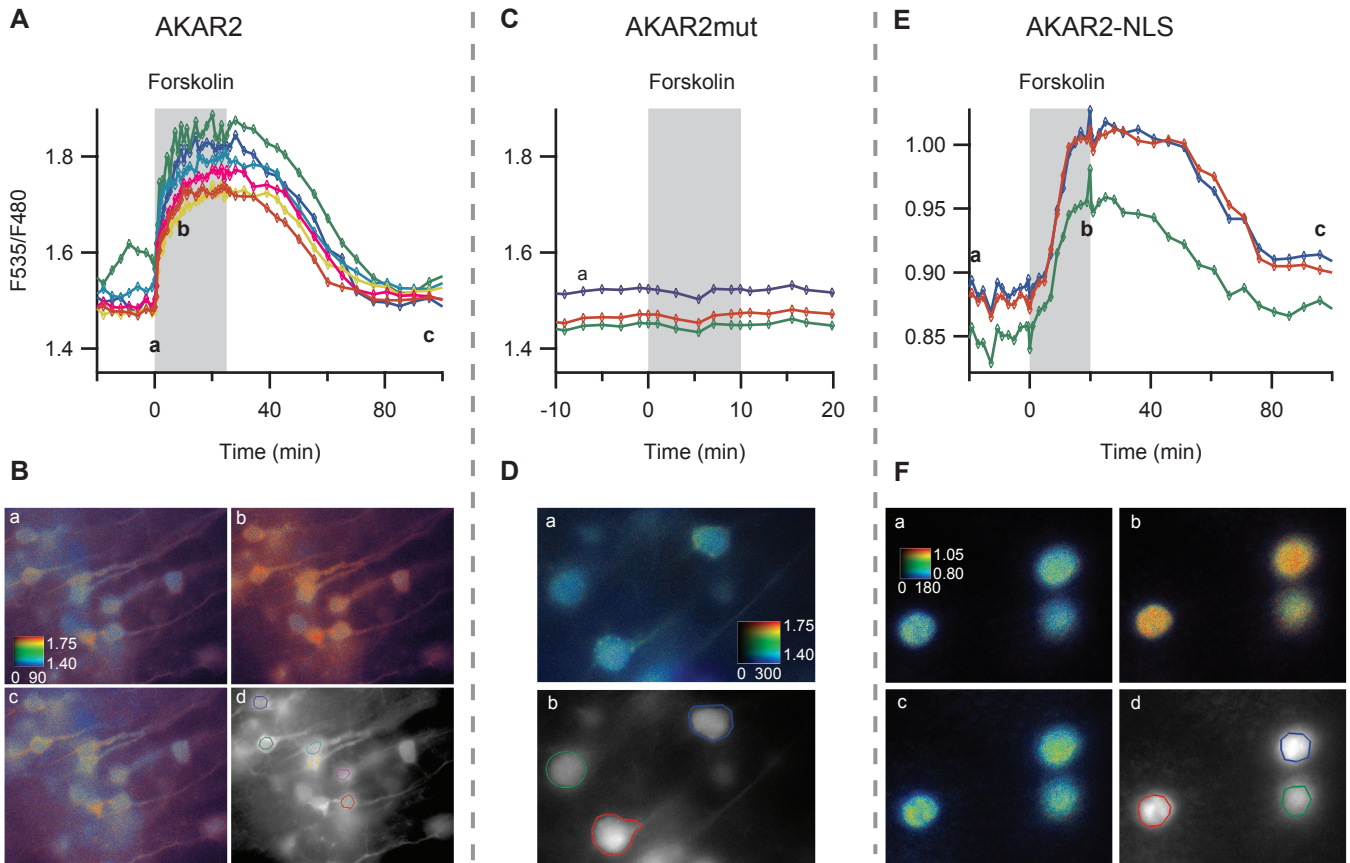
16518.

15. Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zacco, M., Moolenaar, W. H., Bos, J. L. & Jalink, K. (2004) *EMBO Rep* **5**, 1176-1180.
16. Zacco, M., De Giorgi, F., Cho, C. Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P. A., Taylor, S. S., Tsien, R. Y. & Pozzan, T. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, 25-29.
17. Nicoll, R. A. (1988) *Science* **241**, 545-551.
18. Sah, P. (1996) *Trends Neurosci* **19**, 150-154.
19. Pedarzani, P. & Storm, J. F. (1993) *Neuron* **11**, 1023-1035.
20. Goillard, J.-M. & Vincent, P. (2002) *Journal of Physiology* **541**, 453-465.
21. Lancaster, B. & Batchelor, A. M. (2000) *J Physiol (Lond)* **522**, 231-246.
22. Lancaster, B., Hu, H., Ramakers, G. M. & Storm, J. F. (2001) *J Physiol* **536**, 809-823.
23. Marty, A. & Neher, E. (1995) in *Single-channel recording 2d ed*, eds. Sakmann, B. & Neher, E. (Plenum Press, New-York), pp. 31-52.
24. Hsieh-Wilson, L. C., Benfenati, F., Snyder, G. L., Allen, P. B., Nairn, A. C. & Greengard, P. (2003) *J Biol Chem* **278**, 1186-1194.
25. Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R. & Montminy, M. R. (1993) *Mol Cell Biol* **13**, 4852-4859.
26. Jurevicius, J. & Fischmeister, R. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 295-299.
27. Rochais, F., Vandecasteele, G., Lefebvre, F., Lugnier, C., Lum, H., Mazet, J. L., Cooper, D. M. & Fischmeister, R. (2004) *J Biol Chem* **279**, 52095-52105.
28. Rich, T. C., Fagan, K. A., Tse, T. E., Schaack, J., Cooper, D. M. F. & Karpen, J. W. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13049-13054.
29. Fraser, I. D. & Scott, J. D. (1999) *Neuron* **23**, 423-426.
30. Davare, M. A., Avdonin, V., Hall, D. D., Peden, E. M., Burette, A., Weinberg, R. J., Horne, M. C., Hoshi, T. & Hell, J. W. (2001) *Science* **293**, 98-101.

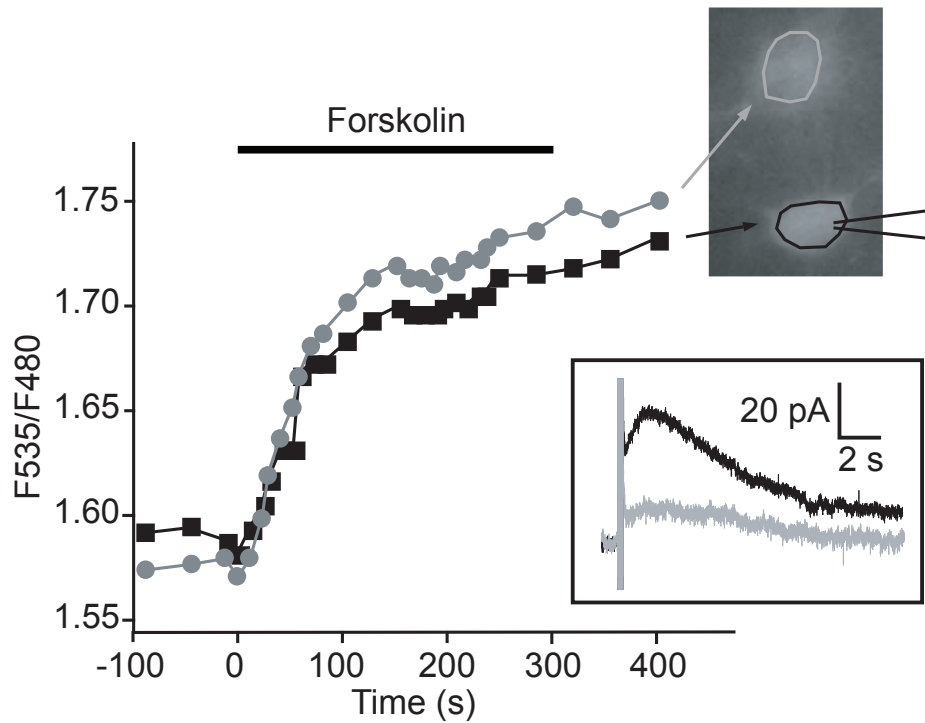
31. Goaillard, J.-M., Vincent, P. & Fischmeister, R. (2001) *J Physiol* **530**, 79-91.
32. Cesetti, T., Hernandez-Guijo, J. M., Baldelli, P., Carabelli, V. & Carbone, E. (2003) *J Neurosci* **23**, 73-83.
33. Frace, A. M., Méry, P. F., Fischmeister, R. & Hartzell, H. C. (1993) *J Gen Physiol* **101**, 337-353.
34. Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S. S. & Tsien, R. Y. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14997-15002.
35. Harootunian, A. T., Adams, S. R., Wen, W., Meinkoth, J. L., Taylor, S. S. & Tsien, R. Y. (1993) *Mol Biol Cell* **4**, 993-1002.
36. Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K. & Malinow, R. (1999) *Science* **284**, 1811-1816.
37. Maletic-Savatic, M., Malinow, R. & Svoboda, K. (1999) *Science* **283**, 1923-1927.
38. Ehrengruber, M. U., Lundstrom, K., Schweitzer, C., Heuss, C., Schlesinger, S. & Gahwiler, B. H. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7041-7046.
39. Meuth, S., Pape, H. C. & Budde, T. (2002) *Eur J Neurosci* **15**, 1603-1614.
40. Ferezou, I., Cauli, B., Hill, E. L., Rossier, J., Hamel, E. & Lambolez, B. (2002) *J Neurosci* **22**, 7389-7397.
41. Sureau, F., Moreau, F., Millot, J. M., Manfait, M., Allard, B., Aubard, J. & Schwaller, M. A. (1993) *Biophys J* **65**, 1767-1774.



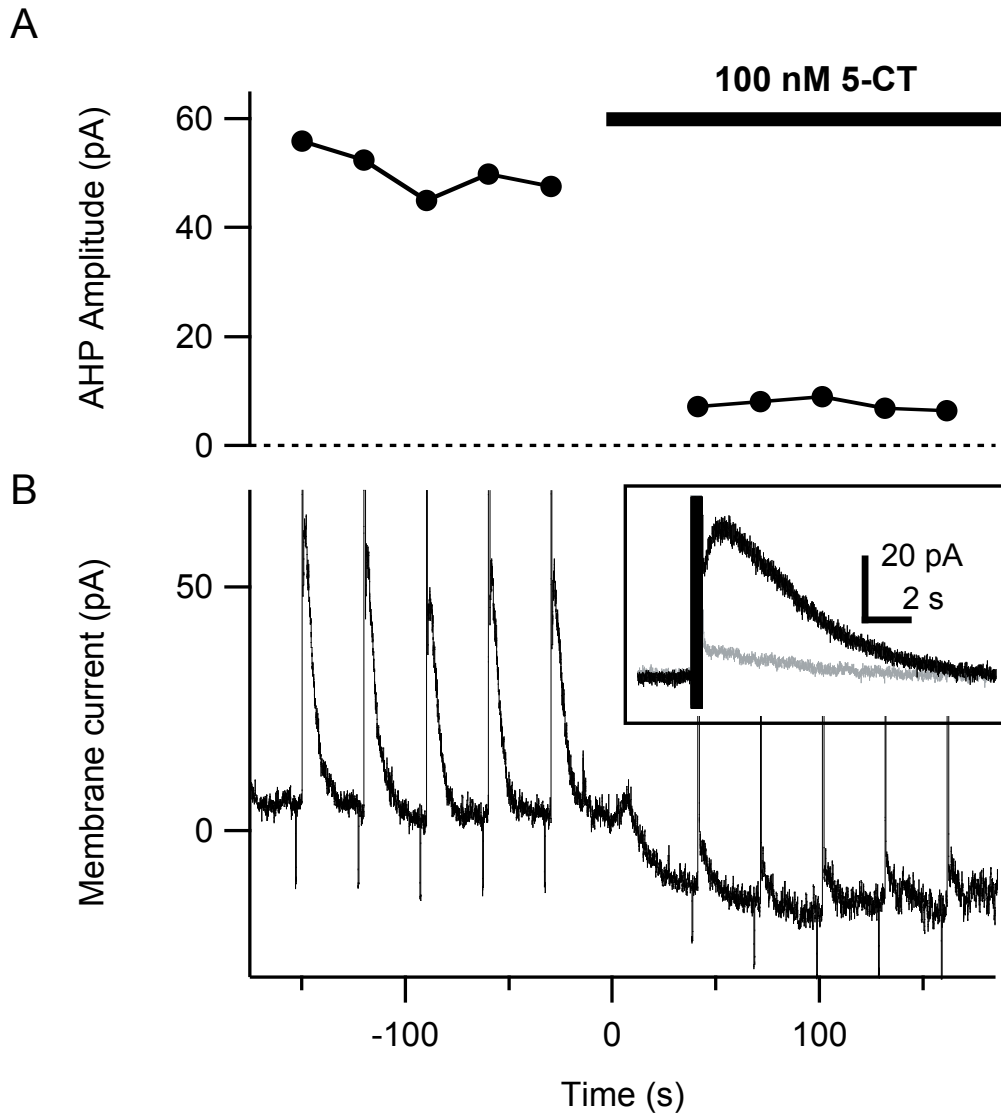
**Fig. 1.** Pyramidal neuron expressing AKAR2 in layer V-VI of a brain slice of somatosensory cortex, with YFP excitation and emission. A stack of wide field fluorescence images was collected over 50  $\mu\text{m}$  depth with 1.5  $\mu\text{m}$  intervals and projected in the Z direction to show the neuritic processes of this neuron. The image of the cell body showing the nucleus (overlaid) corresponds to one focal plane and was obtained by digital deconvolution of the stack. Gamma correction of intensity is 0.57. Scale bar is 20  $\mu\text{m}$ .



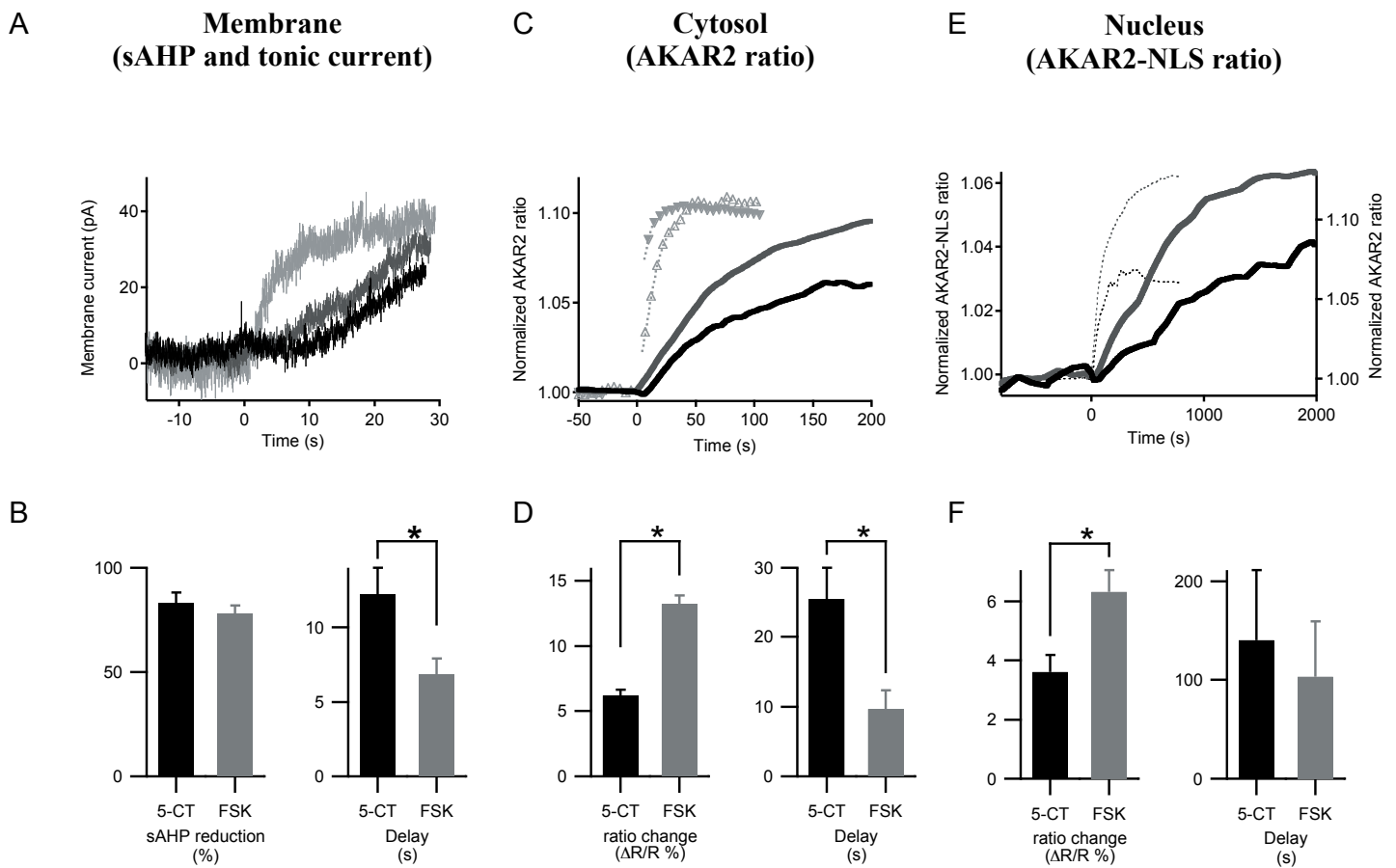
**Fig. 2.** Somatosensory cortical brain slices expressing AKAR2 (**A, B**), AKAR2mut (**C, D**) and AKAR2-NLS (**E, F**), and their responses to forskolin application. Each trace in A, C and E indicates the F535/F480 emission ratio measured on one individual neurone: the ratio was averaged on the regions indicated by the colored contour on Bd, Db and Fd which show the YFP fluorescence image. The pseudocolor images in B, D and F were calculated to display the F535/F480 ratio value coded in hue and the fluorescence coded by intensity. Images were calculated for the data points indicated by the corresponding letters on the graphs in A, C and E. Forskolin (13  $\mu$ M) was applied in the bath for the duration indicated by the shaded area on the graph. The calibration square represents horizontally the intensity in counts/pixel/sec and vertically the F535/F480 emission ratio. The calibration square is 20  $\mu$ m wide (B, D) and 10  $\mu$ m (F).



**Fig. 3.** Whole-cell recording does not perturb the AKAR2 ratio signal: in the same field, two neurons were monitored for AKAR2 ratio changes while one neuron was recorded in whole-cell configuration. For this neuron, the inset shows IsAHP before (black trace) and after (gray) bath application of 13  $\mu$ M forskolin.

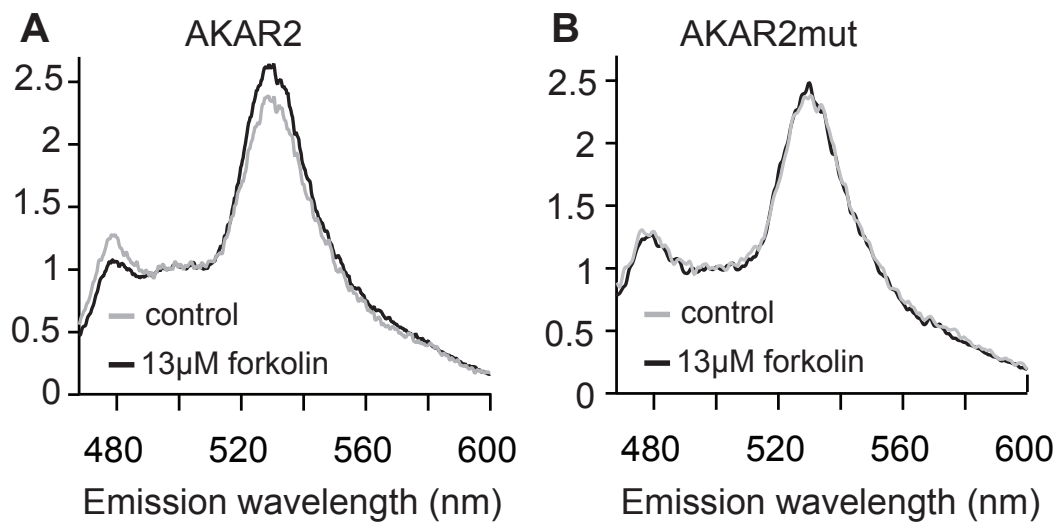


**Fig. 4.** The tonic current reports the onset of PKA activation at the membrane: IsAHP and the tonic current are suppressed simultaneously upon application of 100 nM 5-CT. A: amplitude of IsAHP; B: whole-cell current. The inset shows the average IsAHP before (black) and after (gray) 5-CT application.



**Fig. 5.** Kinetics of PKA activation at the membrane (**A, B**), in the cytosol (**C, D**) and in the nucleus (**E, F**). Black represents 5-CT, dark gray forskolin and light gray normalized controls. Traces in A, C, E are averages of all traces in the same condition. A: reduction of the tonic potassium current (traces presented inverted for legibility) in response to 100 nM 5-CT (n=7, black) and 13  $\mu$ M forskolin (n=9, dark gray). Control with 10 mM TEA (n=4, light gray) shows that drug application is faster than the tonic potassium current response. B left: Effect of 5-CT and forskolin on IsAHP amplitude; right: delay of the tonic current response onset, measured as the intersection of the linear fit of the beginning of the response and the baseline. C: onset of AKAR2 ratio response upon application of 5-CT and forskolin. Controls (normalized) are whole-cell dialysis with 500  $\mu$ M cAMP in the patch pipette (n=4, triangles) and photolysis of caged cAMP (n=3, inverted triangles). D: Effect of 5-CT and forskolin on steady-state AKAR2 ratio response (left) and onset delay (right). E, F: same as (C, D) for AKAR2-NLS. AKAR2 responses to 5-CT and forskolin are overlaid in dotted lines (E, right axis) for comparison with the nuclear response. All drug applications were performed using the same fast focal perfusion system. Comparisons indicated by \* are statistically significant.





**Supporting data fig. 1.** Emission spectrum of AKAR2 (A) and AKAR2mut (B) recorded in individual BHK cells, in control condition (gray) and 20 min after adding 13  $\mu$ M forskolin to the standard extracellular solution (black).

## ***Principaux résultats de l'étude qui viennent d'être présentés sont :***

- L'utilisation de la technique de survie de tranches associée à l'utilisation de virus Sindbis recombinants permet une expression rapide et spécifique d'un gène d'intérêt dans les neurones. Dans notre étude, la mise en culture sur la nuit et l'expression de la sonde AKAR2 n'ont produit aucun changement détectable de l'activité de la PKA sur ces effecteurs endogènes. Cette technique est facilement généralisable et permet d'exprimer n'importe quel transgène dans préparations de neurones en tranche.

- Nous montrons que les cinétiques d'activation de la PKA sont différentes selon les compartiments cellulaires observés. A la membrane, l'activation maximale de la PKA se fait en une centaine de secondes. Au niveau cytosolique, il faut d'environ 5 minutes pour obtenir une phosphorylation maximale de la sonde AKAR2. Au niveau nucléaire, la phosphorylation de la sonde AKAR2-NLS prend plus de 20 minutes. Il apparaît donc que la durée de l'activation de la PKA est très importante dans l'intégration spatiale des signaux extracellulaires.

- L'activation de la PKA produit par une stimulation du récepteur 5-HT7 n'est pas homogène dans les différents compartiments neuronaux. En effet, la 5-CT produit une inhibition totale du courant de l'AHP lente au niveau membranaire mais ne produit pas une phosphorylation maximale de la sonde AKAR2 et AKAR2-NLS. Cela démontre une spécificité dans l'activation de la PKA selon la localisation subcellulaire des effecteurs.

- Nous montrons également que l'activation de l'AC soit par un RCPG soit par la FSK est à l'origine d'activation spatiale et temporelle différente de la PKA. En effet, la FSK produit une phosphorylation maximale des effecteurs de la PKA quelque soit leur localisation cellulaire contrairement à la 5-CT. De plus, l'activation de l'AC par un RCPG se fait avec un délai incompressible de 10s alors que la FSK active la PKA sans délai apparent mais atteint une phosphorylation maximale des cibles plus lentement que la 5-CT.

**Article 2 (en préparation) : Les PDE4 régulent l'activation de la PKA en réponse à la stimulation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques.**

## Contexte de l'étude

Dans l'article précédent, nous avons observé que l'intégration des signaux PKA dépendait du mode de stimulation de l'AC. Une stimulation chimique de l'AC par la FSK produit une phosphorylation maximale de l'ensemble des effecteurs étudiés, alors qu'une stimulation de l'AC suite à l'activation du récepteur 5-HT7 produit une inhibition totale du courant membranaire de l'AHP lente et une phosphorylation partielle des sondes AKAR2 et AKAR2-NLS. Ainsi, l'activation des RCPG produit des phosphorylations différentielles des cibles de la PKA selon leur localisation subcellulaire.

Les PDEs, en dégradant l'AMPC, participent à la propagation et à la compartimentation des signaux PKA (*voir introduction compartimentation fonctionnelle*). En effet, dans les cardiocytes, la stimulation locale des récepteurs  $\beta$  adrénergiques produit uniquement une activation locale des canaux calciques de type L (Jurevicius & Fischmeister, 1996). Par contre, une inhibition localisée des PDEs associée à une stimulation locale des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques provoquent une potentialisation des courants calciques à l'intérieur et à l'extérieur de la zone d'application (Jurevicius *et al.*, 2003). Ainsi, les PDEs en participant à la spécificité spatiale et temporelle des signaux AMPC et PKA pourraient être à l'origine de la différence d'intégration subcellulaire observée dans les neurones.

Dans le SNC, l'activation de la voie AMPC/PKA est une des cibles thérapeutiques majeures dans le traitement des troubles mnésiques et de la dépression. Ces dernières années, les PDEs et plus particulièrement les PDE4 ont été étudiées pour leur effets sur ces troubles cognitifs. L'inhibition des PDE4 augmente les performances mnésiques d'animaux modèles du syndrome de Rubinstein-Taybi ou de la maladie d'Alzheimer (Bourtchouladze *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2004). Les inhibiteurs des PDE4 participent de plus à l'amélioration des déficits de mémoire de souris âgées (Bach *et al.*, 1999). Ces inhibiteurs tel le Rolipram ou le Ro 20-1724, possèdent également des effets antidépresseurs testés sur des animaux modèles ou lors d'essais cliniques (Fleischhacker *et al.*, 1992; O'Donnell & Zhang, 2004). La dépression et les traitements antidépresseurs sont connus pour influencer les effets cellulaires de la noradrénaline. De plus, il a été montré que la répétition d'état stressant chez le rat provoque une diminution de la production d'AMPC en réponse à la noradrénaline (Stone *et al.*, 1984) et une augmentation de l'activité des PDE4 (Itoh *et al.*, 2003) qui dégrade l'AMPC produit par la noradrénaline (Ye & O'Donnell, 1996). Bien que l'ensemble des effets comportementaux des inhibiteurs de PDE4 font intervenir le métabolisme de l'AMPC, et que ces PDEs sont

impliquées dans l'intégration des réponses noradrénergiques, les mécanismes cellulaires d'action de ces inhibiteurs sont mal définis.

Dans ce contexte, nous avons décidé d'étudier le rôle des PDEs dans l'intégration des signaux PKA produit par l'activation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques. Afin de déterminer si ces enzymes participent à la régulation spatiale et temporelle de ces réponses, nous avons d'abord caractérisé les effets des inhibiteurs de différentes familles de PDEs sur le niveau basal de l'activité PKA. Puis, nous avons testé le rôle des PDE4 dans la régulation de l'activité PKA produite par les agonistes  $\beta$  adrénergiques.

Les principaux résultats obtenus ont montré que :

- L'application d'IBMX produit une augmentation du rapport de fluorescence dans les neurones corticaux et thalamiques.

- Les inhibiteurs des PDE4 produisent, dans les neurones, des activations de la PKA dépendantes de leur concentration.

- L'inhibition de l'activité des PDE4 produit une potentialisation des faibles concentrations d'isoprotérénol mais n'a aucun effet sur l'activation de la PKA par les concentrations saturantes d'isoprotérénol, un agoniste  $\beta$  adrénergiques.

## **Résultats**

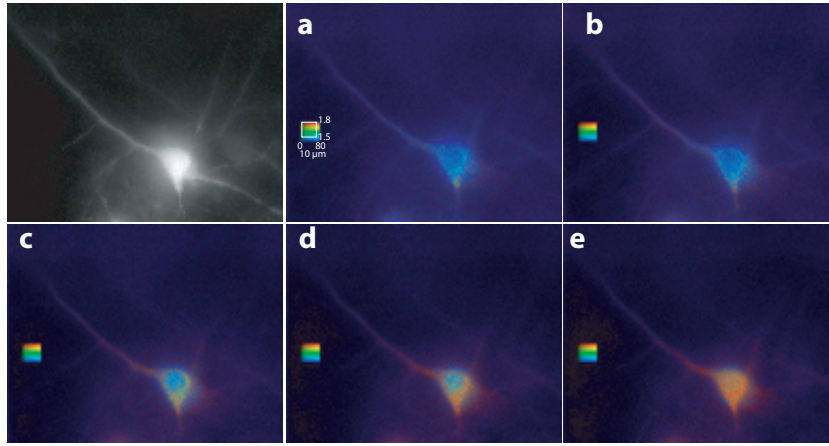
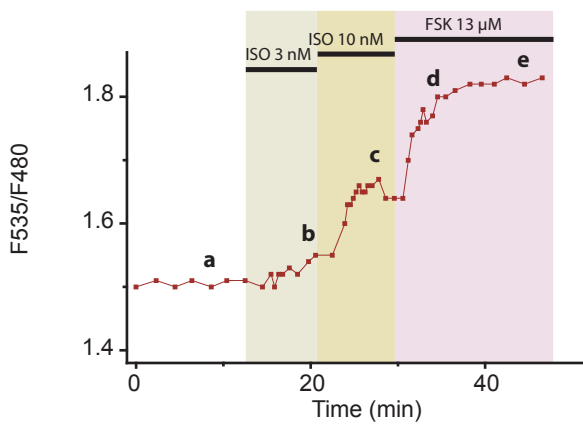
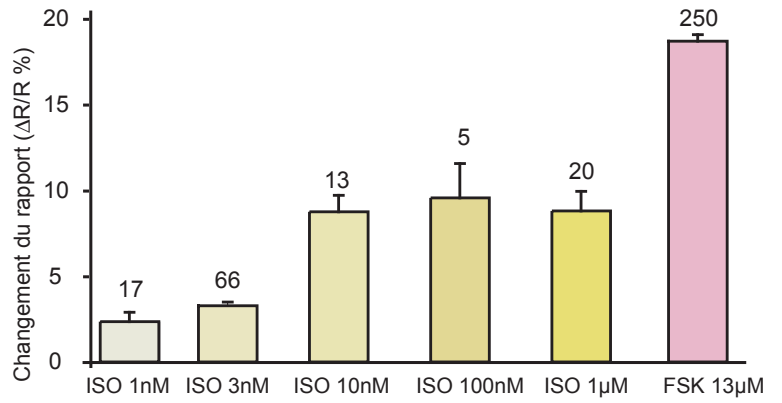
Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux neurones pyramidaux des couches profondes du cortex pariétal. Nous avons utilisé des coupes coronales de cortex de souris infectées par le virus codant pour la sonde AKAR2. L'identification des neurones pyramidaux a été effectuée sur des critères morphologiques. L'ensemble des drogues utilisées ont été appliquées dans le bain.

### **Réponses $\beta$ -adrénergique dans les neurones corticaux et comparaison avec les réponses FSK.**

L'application de FSK induit une augmentation du rapport de fluorescence de  $15 \pm 5\%$  ( $n=123$ ) qui est attribuable à une phosphorylation de la sonde AKAR2 (voir Figure 2 article 1). L'application d'Isoprotérénol produit une augmentation croissante du rapport de fluorescence en fonction de la concentration d'agoniste (Isoprotérénol 1nM, 3nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M :  $1,2 \pm 0,4$  ;  $2,2 \pm 0,3$  ;  $5,3 \pm 0,6$  ;  $6,9 \pm 2,2$  ;  $9,6 \pm 0,9\%$  respectivement, Figure1). La variation de fluorescence maximale est beaucoup plus faible que celle obtenue avec des concentrations saturantes de FSK. Il est à remarquer que cette différence dans la phosphorylation de la sonde AKAR2 entre l'Isoprotérénol et la FSK est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec la 5-CT et la FSK dans le noyau Centro-Médian du thalamus (voir Figure 5 article 1).

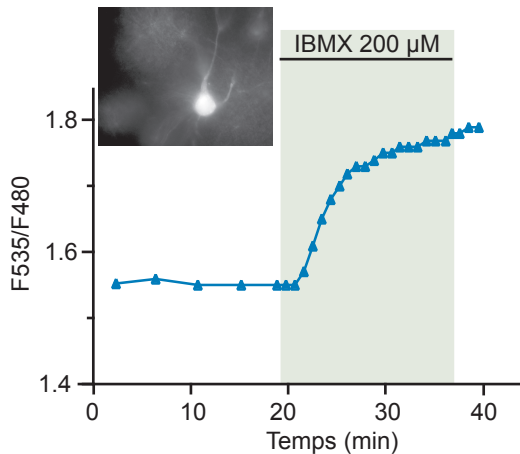
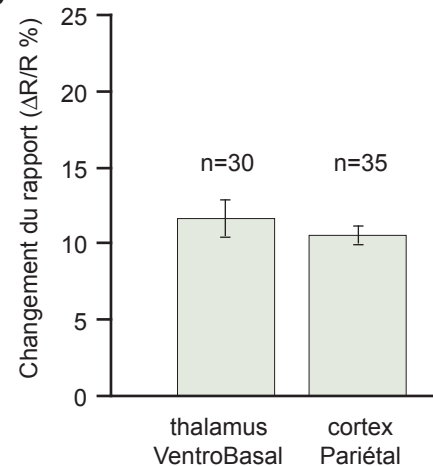
### **Le blocage des PDEs produit une activation de la PKA.**

Afin de tester si les PDEs interviennent dans la régulation des signaux PKA enregistrés dans les neurones, nous avons appliqué de l'IBMX, un bloquant non-spécifique des PDEs, sur des tranches coronales n'ayant reçues aucune autre stimulation antérieure. L'IBMX produit une augmentation du rapport de fluorescence sur l'ensemble des neurones corticaux et thalamiques testés ( $10,6 \pm 0,6\%$   $n=35$ ,  $11,6 \pm 1,2\%$   $n=30$  Figure 2). Le blocage

**A****B****C**

**Figure 1** : Caractérisation de la réponse  $\beta$ -adrénergique dans les neurones corticaux.

**A**, Image du neurone pyramidal du cortex pariétal de souris enregistré et images en fausses couleurs acquises à chaqu'un des temps indiqués en **(B)**. **B**, Variation du rapport de fluorescence au cours du temps suite à l'application d'agoniste  $\beta$ -adrénergique. **C**, Histogramme présentant le changement du rapport de fluorescence obtenu avec différentes concentrations d'isoprotérénol et de FSK.

**A****B**

**Figure 2** : Effet du blocage non spécifique des PDEs sur l'activité PKA dans les neurones.

**A**, Variation du rapport de fluorescence au cours du temps suite à l'application d'IBMX sur un neurone du thalamus VB. **B**, Histogramme présentant le changement du rapport de fluorescence observés dans le thalamus VB et dans le cortex pariétal de souris.

des PDEs induit donc une activation de la PKA et permet de mettre en évidence une activité tonique des AC dans ces neurones.

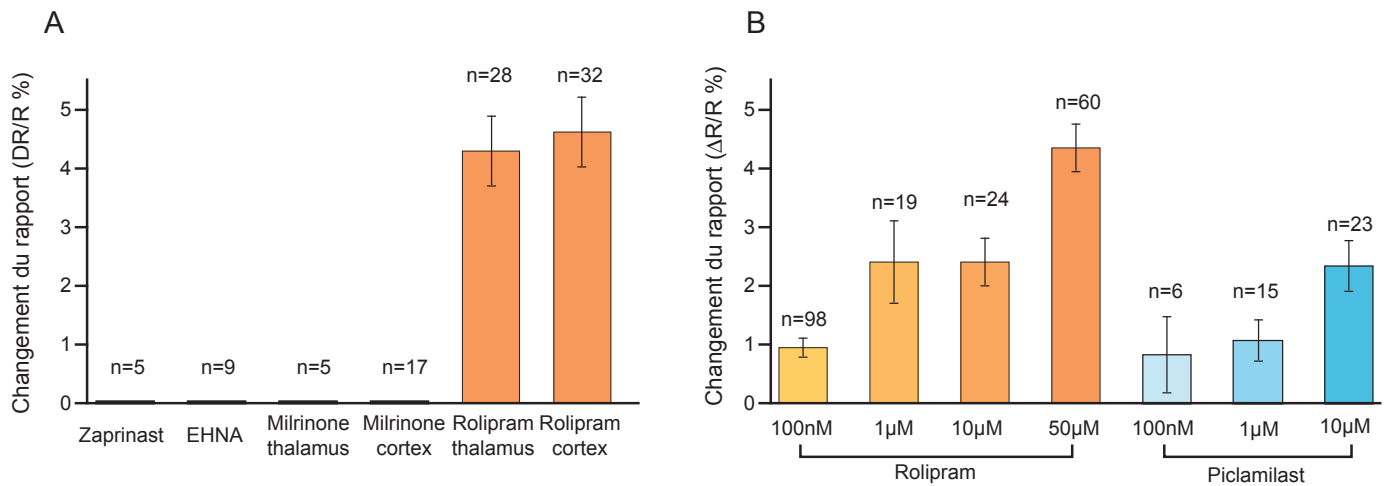
### **Les PDE4 sont actives et dégradent l'AMPC dans les neurones corticaux et thalamiques.**

Afin d'identifier la famille de PDEs responsable de l'activité de dégradation de l'AMPC, l'application d'inhibiteurs spécifiques a été testée. Le Zaprinast (100 $\mu$ M), inhibiteur des PDEs 1, 5 et 6, ne produit aucune variation du rapport de fluorescence dans les neurones. L'EHNA (10-50 $\mu$ M) inhibiteur des PDEs de type 2 et le Milrinone (1-50 $\mu$ M) inhibiteur des PDEs de type 3, ne provoquent pas de phosphorylation de la sonde AKAR2 (figure 3A). Le Dipyridamole, inhibiteur des PDE 5, 6, 7, 9, 10 et 11 est fluorescent et rend toute mesure de FRET impossible. Par contre un inhibiteur spécifique des PDE4, le rolipram, provoque une phosphorylation de la sonde dépendante de sa concentration (rolipram 100nM, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M :  $0,9 \pm 0,15$  ;  $2,3 \pm 0,65$  ;  $1,6 \pm 0,36$  ;  $4,6 \pm 0,6\%$  respectivement). L'application de Piclamilast, autre inhibiteur des PDE4, produit également une activation de la voie AMPc/PKA (Piclamilast 100nM, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M :  $0,8 \pm 1,5$  ;  $1 \pm 1,3$  ;  $2,45 \pm 2\%$  respectivement, figure 3B). Ces données montrent que l'activité des PDE4 est essentielle dans le maintien de la concentration basale d'AMPC. Cependant la phosphorylation de la sonde AKAR2 en présence d'inhibiteur des PDE4 est beaucoup moins importante qu'en présence d'IBMX (voir figure 2), cela suggère soit l'existence d'autres familles de PDEs impliquées dans la régulation du niveau de base de l'AMPC soit un effet de l'IBMX non spécifique des PDEs.

### **Les PDE4 régulent les réponses $\beta$ -adrénergiques dans les neurones corticaux.**

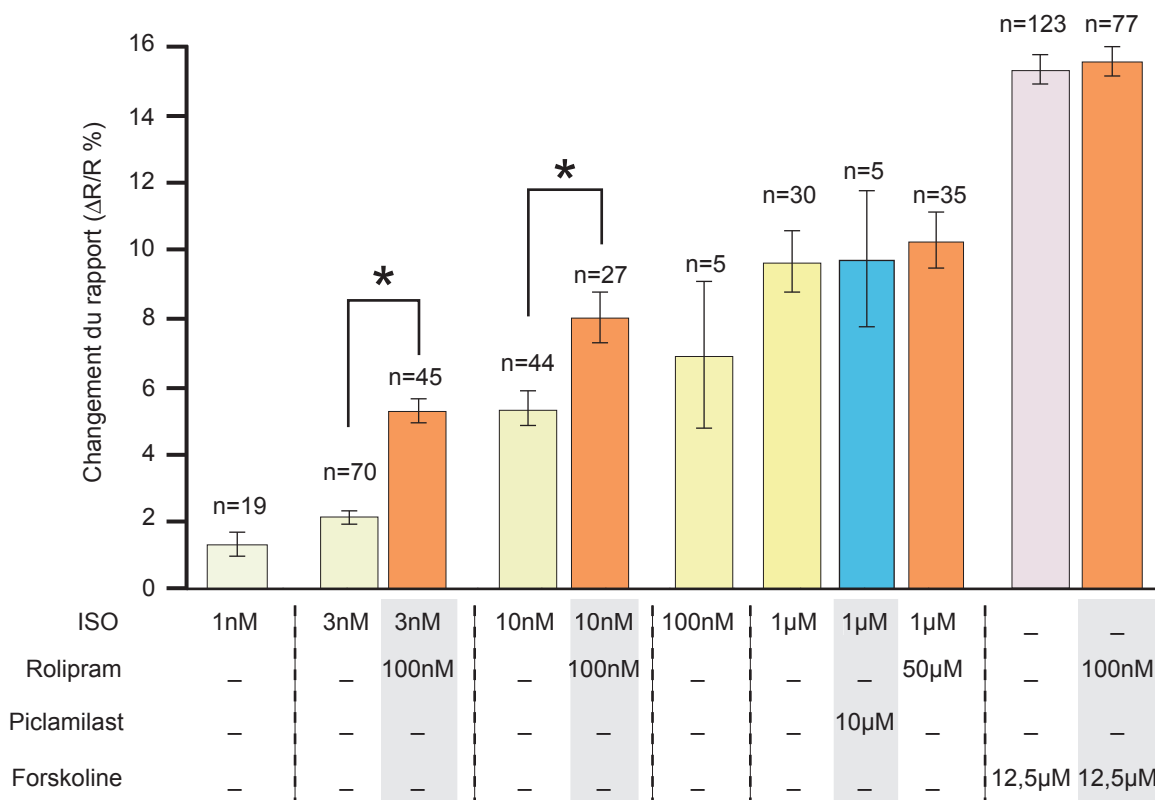
Dans un deuxième temps, nous avons étudié le rôle des PDE4 dans la régulation des signaux PKA. Les réponses maximales de la FSK ou de l'isoprotérénol ne sont pas modifiées par le rolipram. Par contre, en présence de 100nM de rolipram, le changement du rapport de fluorescence, résultant de l'application dans le bain d'Isoprotérénol à des concentrations de





**Figure 3** : La PDE de type 4 est impliqué dans le maintient d'une concentration basale d'AMPc.

**A**, Identification des PDE activent en condition basale. Histogramme présentant le changement du rapport de fluorescence lors du blocage des PDE de type 1 par le zaprinast, de type 2 par l'EHNA, de type 3 par le Milrinone et de type 4 par le rolipram dans le thalamus et le cortex. **B**, L'activation de la PKA par les bloqueurs des PDE4 est sensible aux concentrations utilisées.



**Figure 4** : Les PDE4 modulent les réponses β-adrénergiques des neurones corticaux de souris.

Changement du rapport de fluorescence obtenu en réponse à différentes concentration d'isoprotérénol et FSK en présence ou non de bloqueur des PDE4 dans les neurones du cortex pariétal.

3nM et de 10nM, est potentialisé ( $5,2 \pm 0,4\%$  contre  $2,2 \pm 0,3\%$  et  $7,9 \pm 0,8\%$  contre  $5,3 \pm 0,6\%$ ).

### **En conclusion :**

- L'application d'IBMX produit une augmentation du rapport de fluorescence dans les neurones corticaux et thalamiques. Cette augmentation traduit une phosphorylation de la sonde AKAR2 et donc une activation de la PKA. L'inhibition des PDEs démasque donc une activité basale forte des AC.

- Les inhibiteurs des PDE4 produisent de faibles activations de la PKA dans les neurones. Cette famille de PDEs participe à la régulation de la concentration basale d'AMPc mais ces PDEs ne semblent pas être les seules actives et nous ne pouvons toutefois pas écarter un rôle éventuel des PDE1, 2 et 3.

- L'inhibition de l'activité des PDE4 produit une potentialisation des faibles concentrations d'isoprotérénol. En présence de rolipram, pour une même concentration d'agoniste  $\beta$  adrénergique, l'activation de la PKA est plus importante. Les PDE4 interviennent donc directement dans la régulation réponses  $\beta$ -adrénergiques. Par contre le blocage des PDE4 ne produit aucun effet sur l'activation maximale de la PKA par l'isoprotérénol. Cela suggère que l'activité des PDE4 n'est pas à l'origine des différences de réponses maximales observées entre la FSK et les agonistes des RCPG.

## ***Discussion***

### **1. Les AC sont toniquement actives dans les neurones corticaux**

Nous avons montré que le blocage non spécifique des PDEs provoque une activation de la PKA dans les neurones corticaux. Dans ces cellules, une activation de la PKA peut donc résulter soit d'une augmentation de la production d'AMPC soit d'une diminution de sa dégradation. D'après Miles Houslay, les cellules peuvent être classées selon le métabolisme de l'AMPC (Houslay, 1998). Ainsi, il existerait des cellules où le niveau d'AMPC basal est essentiellement fixé par le niveau d'activité basale de l'AC (cellules de classe I) et des cellules où, au contraire, le niveau d'activité de la AC étant élevé la concentration d'AMPC ne peut être maintenue en dessous du seuil d'activation de la PKA que par l'intervention des PDEs (cellules de classe II). Au vu de nos résultats, les neurones corticaux et thalamiques appartiendraient donc aux cellules de classe II.

### **2. L'inhibition des sites de haute et de basse affinités des PDE4 est-elle à l'origine de l'activation de la PKA dans les neurones corticaux ?**

Le rolipram et le piclamilast (inhibiteurs spécifiques des PDE4) produisent une phosphorylation de la sonde AKAR2. Cet effet révèle que les PDE4 participent à la dégradation de l'AMPC produit par l'activité tonique des AC.

L'effet de ces inhibiteurs est dépendant de la concentration utilisée, plus la concentration est élevée, plus la sonde AKAR2 est phosphorylée. Même si nous n'avons pas réalisé, pour le moment, une courbe concentration-réponse très détaillée, nous pouvons observer deux composantes distinctes sur la figure 3. Le premier plateau semble être atteint

avec des concentrations de 1 à 10 $\mu$ M de rolipram mais à des concentrations supérieures, la phosphorylation de la sonde AKAR2 est plus importante.

Une hypothèse compatible avec ces résultats repose sur l'existence d'une différence d'affinité des PDE4 pour leurs inhibiteurs. En effet, le rolipram est capable de se lier sur des sites de hautes affinités (high affinity rolipram binding site ou HARBS) ou de basses affinités (low affinity rolipram binding site ou LARBS) (Souness & Rao, 1997). Les PDE4 peuvent adopter plusieurs conformations structurelles différentes et ainsi modifier la liaison du rolipram (Laliberte *et al.*, 2000; Conti *et al.*, 2003).

Les HARBS et les LARBS ont été identifiées dans le cerveau et il est proposé que l'inhibition des HARBS ou des LARBS produirait des effets physiologiques différents (Conti *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003). L'application de rolipram à des concentrations inférieures à 10 $\mu$ M pourrait inhiber spécifiquement les HARBS et conduire à l'activation modérée de la PKA. A des concentrations supérieures le rolipram pourrait inhiber les HARBS et les LARBS ce qui se traduirait par une activation plus importante de la PKA. Une des façons de valider cette hypothèse serait de compléter la courbe concentration réponse du piclamilast car cet inhibiteur lie de façon identique les HARBS et les LARBS (Souness *et al.*, 1995).

Nous pouvons tout de même penser que la conformation des PDE4 n'est pas le seul paramètre expliquant les effets complexes du rolipram. La diversité des PDE4 ainsi que leurs régulations et leurs localisations sont aussi à prendre en compte.

### 3. Le rolipram à faible concentration augmente la discrimination des réponses $\beta$ adrénergiques dans les neurones pyramidaux.

Les antidépresseurs agissent le plus souvent par une augmentation de la neurotransmission noradrénergique et/ou sérotoninergique (O'Donnell & Zhang, 2004). Les inhibiteurs des PDE4 semblent intervenir en aval des RCPG mais les mécanismes cellulaires d'action précis de ces antidépresseurs sont largement ignorés.

Nous montrons que le rolipram, à une concentration de 100nM, potentialise l'activation de la PKA en réponse à de faibles concentrations d'agonistes  $\beta$  adrénergiques. Le groupe de O'Donnell a montré que le rolipram augmente également la production d'AMPC en

réponse à l'isoprotérénol ou à l'activation spécifique des récepteurs  $\beta 1$  et  $\beta 2$  dans des cultures de neurones corticaux de rat (Ye & O'Donnell, 1996; Zhang *et al.*, 2005).

Il est envisageable que le rolipram en potentialisant l'activation de la voie AMPc/PKA en réponse à des faibles concentrations d'agonistes  $\beta$  adrénergiques participe à l'augmentation de la sensibilité des neurones cibles à la noradrénaline. Cette action permet une activation de la PKA en réponse à des libérations de noradrénaline qui autrement resterait sous le seuil d'induction de l'effet physiologique. Cette potentialisation des réponses  $\beta$  adrénergiques par le rolipram dans les neurones corticaux pourrait expliquer une partie des effets antidépresseurs de ces molécules.

En perspective de ces résultats, il serait intéressant :

- de regarder si le rolipram est capable de potentialiser la phosphorylation de la sonde AKAR2 pour de faibles concentrations de noradrénaline.

- de suivre l'activation de la phosphorylation de la sonde AKAR2-NLS en réponse aux agonistes  $\beta$  adrénergiques avec ou sans inhibiteurs de PDE4 et voir ainsi l'activation de la PKA dans le noyau.

- déterminer quelles sont les PDE4 impliquées dans la dégradation de l'AMPc produit par l'activation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques. L'utilisation des souris invalidées pour les gènes des PDE4A, B ou D pourrait permettre de comprendre le rôle de chaque isoforme.

#### 4. L'activation généralisée de la voie AMPc/PKA dans le cerveau peut-il produire un déficit d'apprentissage ?

Nos données montrant une activation de la PKA dans les neurones en présence de rolipram sont en accord avec des expériences antérieures qui avaient montré une augmentation de la concentration basale d'AMPc dans les cultures primaires de neurones corticaux et dans les tranches d'hippocampe lors de l'inhibition des PDE4 (Barad *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005).

*In vivo*, à faibles doses, le rolipram améliore les performances mnésiques de souris âgées (Bach *et al.*, 1999), de modèles de souris du syndrome Rubinstein-Taybi (Bourtchouladze *et al.*, 2003) et de souris invalidées pour les gènes du précurseur de la protéine amyloïde et de la préséniline 1 (Gong *et al.*, 2004). Par contre, à fortes doses, le

rolipram produit des déficits d'apprentissage chez les rongeurs (Barad *et al.*, 1998; Bourchouladze *et al.*, 2003). Ces déficits ont été observés chez la drosophile mutante DUNCE (gène orthologue de la PDE4 des mammifères) (Byers *et al.*, 1981).

Nous avons montré que plus, le rolipram est administré à des concentrations élevées, plus il active la voie AMPc/PKA dans les neurones. L'activation généralisée de cette voie dans tous les neurones pourrait être à l'origine des effets délétères observés. Cette hypothèse est renforcée par une étude menée sur des rats et des singes âgés. Ces animaux présentent au cours du vieillissement des déficits d'apprentissage et une activation de la voie AMPc/PKA. Ces déficits sont renforcés par l'utilisation de rolipram ou d'activateur de la PKA alors que des améliorations des performances mnésiques sont obtenues lors de l'utilisation d'antagonistes de la PKA (Ramos *et al.*, 2003).

L'ensemble de nos résultats avec ceux de la littérature montrent que la relation entre l'activation de la voie AMPc/PKA et les processus cognitifs est complexe. Il ne suffit pas d'augmenter l'activité de la PKA dans les neurones pour obtenir une amélioration des processus cognitifs. Cette amélioration a lieu lors de l'utilisation de faibles concentrations d'inhibiteurs de PDE4, ce qui indiquerait que ces effets puissent être médié par les HARBS. A l'inverse, les effets délétères des inhibiteurs des PDE4 pourraient impliquer l'inhibition conjointe des HARBS et des LARBS. La compréhension des effets cellulaires de ces inhibiteurs est donc très importante aussi bien d'un point de vue fondamental pour mieux appréhender la régulation de la voie AMPc/PKA dans les neurones que d'un point de vue appliqué pour la synthèse d'inhibiteurs plus spécifiques des différentes isoformes des PDE4 (Berton & Nestler, 2006).

# Discussion générale

## ***A. Absence d'effet des RCPG liés aux protéines de type Gi/Go sur la phosphorylation de la sonde AKAR2.***

### 1. Résultats complémentaires

Au cours de nos expériences sur les réponses  $\beta$  adrénergiques dans le cortex, lorsque nous avons appliqué de la noradrénaline sur des neurones corticaux, nous avons constaté que la variation du rapport de fluorescence est identique à celle obtenue en présence d'isoprotérénol. L'amplitude des réponses ainsi que les cinétiques ne sont pas significativement différentes (noradrénaline  $10\mu\text{M}$  :  $11\% \pm 7$   $n=31$ , iso  $1\mu\text{M}$  :  $10\% \pm 5$   $n=30$ ). Or la noradrénaline active des récepteurs couplés à Gs mais aussi des récepteurs couplés à Gi/Go.

Nous avons testé les effets d'autres neuromodulateurs ayant des récepteurs couplés aux protéines Gs et Gi/Go comme la dopamine ou la sérotonine. Lors de ces applications, nous avons toujours observé une augmentation de la phosphorylation de la sonde AKAR2.

Nous avons également testé la co-application d'isoprotérénol ( $1\mu\text{M}$ ) et baclofen ( $10\mu\text{M}$ , agonistes des récepteurs  $\text{GABA}_B$  couplés négativement à l'AC) ce qui produit une augmentation de rapport de fluorescence identique à celui obtenu en présence d'isoprotérénol seul.

Enfin, l'application de baclofen ( $10\mu\text{M}$ ) seul ne produit aucun effet sur la phosphorylation de la sonde AKAR2.

Au cours de nos expériences avec la sonde AKAR2, nous n'avons jamais observé de diminution du rapport de fluorescence.

## 2. Les effets électrophysiologiques des récepteurs couplés aux protéines Gi/Go

Ces résultats sont très intéressants car ils montrent qu'une application de noradrénaline produit une activation de la sonde PKA identique aux réponses  $\beta$  adrénergiques. Ceci est très surprenant car les neurones corticaux expriment les récepteurs  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$  adrénergiques. Il est possible, par exemple, d'enregistrer en électrophysiologie des réponses spécifiques à l'application d'agonistes de ces différents récepteurs. L'activation des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\beta$  produisent des dépolarisations des neurones pyramidaux (Foehring *et al.*, 1989; McCormick *et al.*, 1991; Wang & McCormick, 1993) et les agonistes  $\alpha_2$  produisent des diminutions des courants calciques haut seuil (Timmons *et al.*, 2004).

Il en est de même pour toutes les autres stimulations des récepteurs couplés aux protéines Gi/Go que nous avons utilisées. Les récepteurs GABA<sub>B</sub> par exemple produisent des hyperpolarisations soutenues des neurones.

## 3. Spécificité des protéines Gi/Go impliquées dans le couplage des récepteurs

Une hypothèse expliquant ces résultats serait que les récepteurs couplés aux protéines Gi/Go que nous avons stimulés ne régulent pas l'activité des AC activées par les récepteurs  $\beta$  adrénergiques dans les neurones corticaux. En effet, une étude électrophysiologique réalisée dans le thalamus montre que l'application de baclofen augmente la potentialisation du courant  $I_h$  produite par l'isoprotérénol. Cette potentialisation est spécifique des récepteurs GABA<sub>B</sub> car l'activation d'autres récepteurs couplés négativement à l'AC comme les récepteurs A<sub>1</sub> à l'adénosine et  $\mu$ -opioïdes ne potentialisent pas ce courant (Frere & Luthi, 2004). A l'inverse dans les neurones CA3 de l'hippocampe, l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> et des récepteurs



A<sub>1</sub> à l'adénosine diminue les effets des réponses isoprotérénol sur le courant de l'AHP. Cette réduction du courant AHP démasque un effet antagoniste de protéines Gi/Go sur les réponses Gs (Gerber & Gahwiler, 1994). Enfin, des études biochimiques dans les neurones CA1 de l'hippocampe montre que l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> n'a aucun effet sur la production d'AMPC en réponse à la stimulation des récepteurs β adrénergiques. Par contre, l'activation des récepteurs dopaminergiques D<sub>2</sub> et sérotoninergiques 5HT<sub>1A</sub> couplés négativement à l'AC réduit la production d'AMPC des réponses β adrénergiques (Vanhoose *et al.*, 2004).

Il apparaît donc que selon le type neuronal étudié une même famille de RCPG de type Gi/Go puisse avoir des effets différents sur la régulation des réponses β adrénergiques. Il serait intéressant de comprendre les mécanismes à l'origine de ces modulations différentes de la voie AMPc/PKA dans les neurones. Pour cela il faudrait tester l'activation d'autres RCPG de type Gi/Go sur les neurones pyramidaux et savoir si l'absence d'effet des protéines Gi, que nous avons observée, est liée à une spécificité dans la régulation des réponses β adrénergiques par certains types de récepteurs couplés négativement à l'AC. Cette spécificité pouvant être apportée par une compartimentation particulière des récepteurs β adrénergiques.

#### 4. Rôle des protéines βγ

Les sous unités βγ des protéines G<sub>oi</sub> stabilisent le complexe AC-G<sub>αs</sub> (Federman *et al.*, 1992; Robichon *et al.*, 2004) ce qui permet une production d'AMPC plus soutenue. Il se pourrait que ce mécanisme soit à l'origine de l'absence d'effet observé dans nos conditions expérimentales. L'effet principal de l'activation des récepteurs couplés aux protéines Gi/Go serait médié par les sous-unités βγ lors d'une stimulation simultanée des récepteurs β adrénergiques.

L'utilisation de faibles doses de FSK pourrait nous permettre de nous affranchir de l'interaction des protéines G<sub>αs</sub>-βγ-AC. En effet, la FSK active directement l'AC et cette activation n'est pas potentialisée par les sous-unités βγ. L'application de faibles concentrations de FSK et d'agonistes des récepteurs couplés négativement à l'AC pourrait nous permettre de favoriser l'action des protéines Gi.

## 5. Activité tonique de l'AC implique-t-elle une activation tonique de la PKA ?

Nous avons montré grâce à l'utilisation d'inhibiteurs des PDEs que les AC sont toniquement actives dans les neurones. Pourtant, lors de l'application d'agonistes GABA<sub>B</sub>, nous n'avons pas observé de modification de la phosphorylation de la sonde AKAR2. Ceci pourrait démontrer que la production basale d'AMPc n'est pas suffisante pour dépasser le seuil d'activation des PKA responsables de la phosphorylation de la sonde AKAR2. Dans ces conditions, il est normal que l'inhibition de l'AC par les agonistes GABA<sub>B</sub> ne soit pas détectée par la sonde AKAR2.

Au vue de l'ensemble de ces données, il apparaît donc comme fondamental de poursuivre des études sur l'activation de ces récepteurs couplés aux protéines Gi/Go. Il serait judicieux d'utiliser en parallèle les sondes AMPc codées génétiquement (du type Epacs) et la sonde AKAR2 afin de déterminer l'effet de ces agonistes sur la concentration d'AMPc et sur l'activation de la PKA.

## ***B. La détection des microdomaines d'AMPc est-elle compatible avec l'imagerie de fluorescence ?***

De nombreuses données de la littérature proposent l'existence de microdomaines (Wong & Scott, 2004) dont la taille varie selon la technique utilisée pour les mettre en évidence. En électrophysiologie avec la technique de patch clamp en configuration cellule attachée, la taille du microdomaine correspond à la surface du patch présent à la pointe de la pipette soit environ  $1\mu\text{m}^2$  (Chen-Izu *et al.*, 2000). En biochimie, la taille correspond à un assemblage protéique de l'ordre de centaines de nanomètres (Dodge-Kafka *et al.*, 2005) et en imagerie, le microdomaine d'AMPc a une dimension d'environ  $1\mu\text{m}$  (Zaccolo & Pozzan, 2002).

L'utilisation des sondes fluorescentes AMPc et PKA n'ont jamais, à part l'étude de Zaccolo et Pozzan, mis en évidence de microdomaines d'AMPc (Bacskai *et al.*, 1993; Hempel *et al.*, 1996; Goillard *et al.*, 2001; Vincent & Bruscianno, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Dipilato *et al.*, 2004; Nikolaev *et al.*, 2004). Au cours de notre étude, nous n'avons

d'ailleurs pas observé de signaux PKA compatibles avec l'existence de microdomaines d'AMPc. Plusieurs facteurs pourraient contribuer à expliquer cette absence de détection des microdomaines.

## 1. Les limites des systèmes d'imagerie traditionnels

Les systèmes d'imagerie peuvent être éventuellement responsables de l'absence apparente de microdomaines. La plupart de ces études n'ont pas utilisé une imagerie de type confocale. L'excitation des fluorophores, a donc lieu sur un très grand volume et la diffusion de cette fluorescence est un facteur limitant. Si dans une région discrète se produit une modification du rapport de fluorescence, ce signal sera fortement perturbé par les régions alentours.

Une des façons de résoudre ce problème de diffusion de la fluorescence serait de refaire des expériences soit avec un système d'imagerie confocale soit d'utiliser un adressage spécifique des sondes utilisées. L'adressage le plus judicieux serait d'utiliser des sondes capables de se rendre à la membrane mais sans les adresser dans les domaines membranaires particuliers, ce qui risquerait de créer artificiellement des microdomaines.

## 2. La diffusion des protéines

Les mesures de la concentration de l'AMPc ou de l'activité de la PKA se font par une utilisation de sondes protéiques de type FRET. En ce qui nous concerne, nous avons mesuré les variations du rapport de fluorescence produit par la sonde AKAR2 en réponse à sa phosphorylation. Or les mouvements de la sonde AKAR2 et de la PKA pourraient expliquer le fait qu'une augmentation localisée de l'AMPc produit une phosphorylation beaucoup plus globale des effecteurs. En effet, une fois la PKA activée, la sous-unité catalytique peut diffuser et phosphoryler l'ensemble des cibles rencontrées sur son passage produisant alors un élargissement du microdomaine.

La diffusion de la sonde AKAR2 peut également être impliquée dans l'absence de compartimentation. Une phosphorylation de la sonde dans un endroit localisé et sa diffusion rapide dans le cytosol entraînerait une disparition dans la localisation du signal.

L'utilisation de la technique de retour de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) permettrait de suivre les mouvements de protéines fluorescentes dans les neurones. Son principe repose sur la destruction localisée du fluorophore associé à une protéine d'intérêt et de regarder la cinétique de retour de cette fluorescence celle-ci étant directement corrélée à la vitesse de diffusion de la protéine. Des études réalisées sur des sondes codées génétiquement montrent que ces sondes diffusent librement dans le cytosol des neurones (Pologruto *et al.*, 2004). Afin de déterminer les vitesses de diffusion de la PKA et de la sonde AKAR2 dans les neurones, il faudrait faire une étude de FRAP avant et après activation de la voie AMPc/PKA. Ces résultats permettraient de savoir si le déplacement de ces protéines est compatible avec la résolution temporelle apportée par les systèmes classiques d'imagerie.

### 3. Les modes de stimulation de la voie AMPc/PKA

Enfin l'utilisation d'applications globales d'agonistes de la voie AMPc/PKA peut aussi être invoquées. En effet, la quasi-totalité des études d'imagerie de la voie AMPc se sont intéressées à des stimulations globales des cellules enregistrées. Comme nous l'avons vu lors de l'introduction les études démontrant l'existence de microdomaines d'AMPc fonctionnels ont utilisé des applications locales d'agonistes.

Il faudrait donc tester cette hypothèse afin de voir si une application locale d'agoniste de la voie AMPc peut permettre de démasquer des augmentations locales de la concentration d'AMPc ou des phosphorylations localisées de la sonde AKAR2 dans les neurones.

## **C. La compartimentation fonctionnelle de la voie AMPc/PKA dans les neurones**

Nous avons montré qu'il existait une compartimentation fonctionnelle des réponses aux agonistes de la voie AMPc. C'est une compartimentation au sens large qui différencie la membrane plasmique, le cytosol et le noyau par des différences d'amplitude et de cinétique de l'activation de la PKA. L'utilisation des sondes fluorescentes basées sur la protéine Epacs a montré que l'AMPc diffuse librement dans le cytosol et le noyau des neurones ou des cellules HEK (Dipilato *et al.*, 2004; Nikolaev *et al.*, 2004). Nous montrons, grâce à la mesure de la phosphorylation de la sonde AKAR2, AKAR2-NLS et des canaux de l'AHP lente, un ralentissement de la diffusion de l'activation de la PKA de la membrane vers le cytosol (de l'ordre de quelques dizaines de secondes) et du cytosol vers le noyau (de l'ordre de quelques minutes). Si une diffusion libre s'effectuait entre ces compartiments nous n'aurions pas de différence de cinétique de phosphorylation. Le ralentissement des signaux PKA du cytosol vers le noyau peut être expliqué par la diffusion passive de la sous-unité catalytique de la PKA (Hagiwara *et al.*, 1993; Harootunian *et al.*, 1993). Le ralentissement observé entre la membrane plasmique et le cytosol peut-être expliqué par l'existence d'une barrière de diffusion entre la membrane plasmique et le cytosol, cet effet ayant déjà été observé dans les cardiocytes ou les cellules HEK (Jurevicius & Fischmeister, 1996; Rich *et al.*, 2001a; Dipilato *et al.*, 2004).

### **2.1. Le modèle de barrière de diffusion physique**

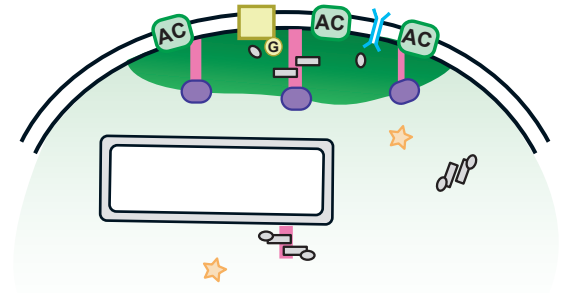
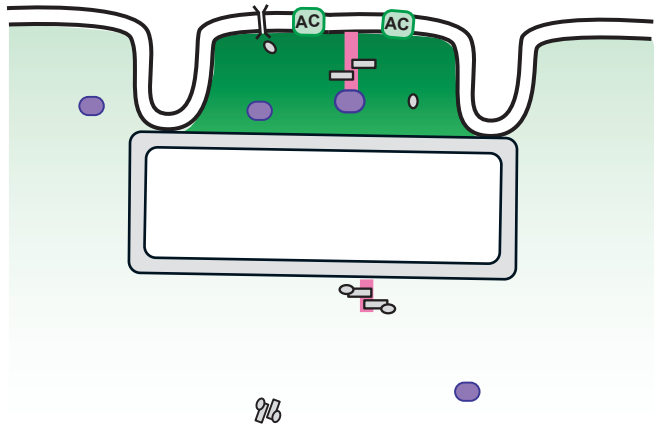
Il existe deux hypothèses principales sur la nature de cette barrière de diffusion. La première repose sur les travaux de Rich et collaborateurs qui prédit l'existence d'une barrière physique composée par les membranes du réticulum endoplasmique et les invaginations de la membrane plasmique (Rich *et al.*, 2000). Les PKA et les autres effecteurs de la voie (dans cette étude les canaux CNG) présents dans ce domaine sont activés rapidement par la production d'AMPc. Les PKA et les effecteurs présents en dehors de ce domaine sont activés lentement car l'AMPc diffuse difficilement (voir figure 5A). Il faut souligner que les auteurs n'attribuent aucun rôle aux PDEs dans la mise en place de cette barrière.

Modèle de Rich et Karpen  
Barrière de diffusion physique

Modèle de la Barrière de diffusion biochimique  
Adaptée à nos résultats

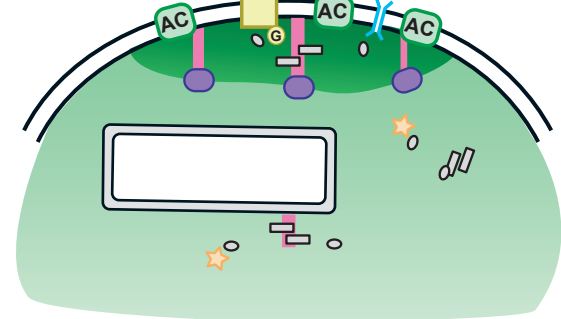
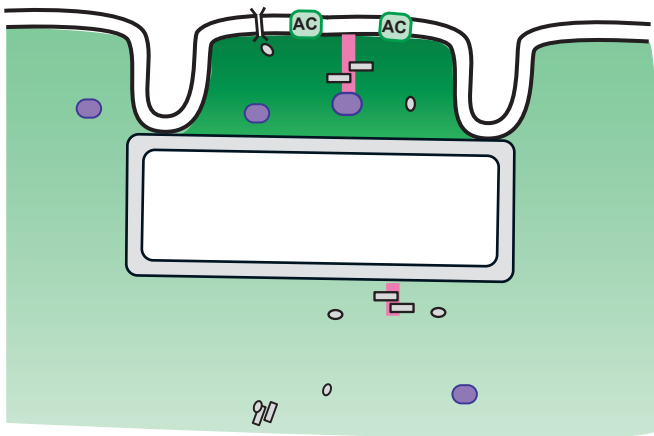
t=10s

t=30s



t=120s

t=100s



- PDEs
- AKAPs
- ⌋ Canaux CNG
- ⓐ Adénylyl-cylase
- ⌋ PKA

- Récepteur β adrénergique
- PDEs
- AKAPs
- ⌋ Canaux AHP lente
- ⓐ Adénylyl-cylase
- ⌋ PKA
- ★ AKAR2

**Figure 5:** représentation schématique des différents modèle de barrière de diffusion des signaux AMPc/PKA.

**A,** L'AMPc est produit par l'AC et accumulé près de la membrane à cause de la présence d'une barrière de diffusion physique composée par la membrane du réticulum endoplasmique et des invaginations de la membrane plasmique. Sans cette restriction de la diffusion, l'AMPc traverserait la cellule en 160ms. Les PKA endogènes sont soit diffusent dans le cytosol ou localisées dans des compartiments spécifiques grâce aux AKAPs. Les PKA présentes à proximité des AC sont rapidement activées après stimulation de l'AC. Les PKA réparties dans le cytosol elles le sont plus tardivement. Dans ce modèle, les PDEs ne participent pas à la restriction des signaux (*d'après Rich et coll 2000*).

**B,** L'AMPc est produit à la membrane en réponse à la stimulation des récepteurs β adrénergiques. L'AMPc est accumulé et restreint près de l'AC grâce à la présence d'une activité des PDEs. Les PKA présentes dans ce compartiment sont rapidement activées et phosphorylent les canaux de l'AHP lente. Les PKA présentes dans le cytosol sont activées plus tardivement et phosphorylent alors la sonde AKAR2.

Ce modèle n'est pas en accord avec nos résultats. En effet, les auteurs prédisent qu'en configuration cellule entière l'augmentation de la concentration d'AMPc est quasiment inexistante dans le cytosol, alors que nos mesures montrent que l'amplitude et la cinétique de la phosphorylation de la sonde AKAR2 ne sont pas perturbées par l'enregistrement en patch-clamp. De plus, nos expériences menées sur les inhibiteurs des PDEs montrent clairement une implication des PDE4 dans la régulation des signaux PKA.

De plus, ce modèle repose sur l'utilisation de cellules HEK exprimant l'AC8 et les canaux CNG. Les cellules HEK sauvages expriment les AC 2,3,6 et 7 (Hellevuo *et al.*, 1993). L'expression d'une AC exogène dans ces cellules va entraîner des productions d'AMPc aberrantes d'un point de vue qualitatif et quantitatif, ce qui rend le modèle peu réaliste. Ces auteurs montrent d'ailleurs que l'activation des AC par la FSK produit des concentrations d'AMPc proche de 50µM à proximité des canaux CNG (Rich *et al.*, 2000). Le même groupe, en utilisant des cellules HEK sauvages, obtient une concentration d'AMPc de l'ordre du micromolaire à proximité des canaux CNG (Rich *et al.*, 2001a; Rich *et al.*, 2001b). De plus, les canaux CNG produisent de forte entrée de calcium dans la cellule HEK et les AC3 et 8 sont activées par la calmoduline ayant lié le calcium. Cette activation supplémentaire participe encore un peu plus à une production d'AMPc non physiologique.

Il est aussi intéressant de noter que les canaux CNG utilisés ont une très faible sensibilité pour l'AMPc et leur gamme dynamique (entre 10 et 500µM) n'est pas appropriée à des variations physiologiques de la concentration d'AMPc. Pour comparaison, l'affinité pour l'AMPc de la sous-unité RII de PKA est comprise entre 100 et 300nM. L'ouverture de ces canaux ne peut donc pas être utilisée pour faire une corrélation avec l'activation des autres effecteurs de la voie AMPc.

## **2.2. Implication des PDEs dans la barrière de diffusion**

La deuxième hypothèse repose également sur une localisation de l'ensemble des protagonistes de la voie de signalisation mais la restriction spatiale et temporelle de la diffusion de l'AMPc est attribuable à l'activité des PDEs (figure B). Dans ce modèle, la production d'AMPc va très rapidement activer les PKA localisées près de l'AC, et la dégradation de l'AMPc par les PDEs empêche une large diffusion. Si l'augmentation de la

concentration d'AMPC est suffisante pour saturer l'activité des PDEs, l'AMPC va pouvoir diffuser en dehors du compartiment et activer les PKA cytosoliques.

Notre étude sur la régulation des réponses  $\beta$  adrénergique par les PDE4 corrobore cette hypothèse. D'autres études sont en accord avec ce modèle car elles montrent que l'inhibition de certaines PDEs permet une propagation des signaux AMPC et PKA (Rich *et al.*, 2001b; Zaccolo & Pozzan, 2002; Jurevicius *et al.*, 2003; Mongillo *et al.*, 2004; Barnes *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré que l'adressage d'une PDEs à proximité du complexe PKA-AKAR2 permet de réguler l'amplitude et la durée de phosphorylation de la sonde (Dodge-Kafka *et al.*, 2005). Ceci souligne encore un peu plus l'importance d'une colocalisation de l'ensemble des protagonistes dans la régulation de la voie AMPC/PKA.

Il apparaît donc que la formation de microdomaines de la voie AMPC/PKA apporte une spécificité dans le codage de certains stimulus extracellulaires. Pourtant ces microdomaines n'expliquent pas tout, il a d'ailleurs été démontré qu'une expression homogène des canaux CNG à la membrane plasmique des cardiocytes permet de mettre en évidence des disparités d'activation de ces canaux en réponse à différents stimulus (Dipilato *et al.*, 2004; Rochais *et al.*, 2004), démontrant que les microdomaines d'AMPC peuvent être remplacés ou renforcés par d'autres mécanismes. Par exemple, les neurones qui sont des cellules hautement spécialisées morphologiquement. La présence dans les dendrites des RCPG et des AC permet à elle seule de produire une augmentation plus importante et plus rapide de la concentration d'AMPC dans ce compartiment que dans le soma. De plus, le rapport surface sur volume des dendrites est très favorable à une accumulation des seconds messagers et permet donc une activation spécifique de la PKA dans les dendrites fins (Bacskai *et al.*, 1993).

Enfin une série d'études sur la sonde AKAR montrent que l'adressage d'un substrat à proximité de la PKA représente un moyen efficace d'augmenter la vitesse de la réponse physiologique (Zhang *et al.*, 2001). Cet effet a également été observé lors de l'adressage de la sonde ECUE à la membrane plasmique de cellules HEK (Dipilato *et al.*, 2004).



## Conclusion et perspectives

Au cours de mon travail de thèse, j'ai approché, aussi bien par l'expérience pratique que par l'étude bibliographique, l'activation et la régulation de la voie AMPc/PKA en réponse à des stimulus extracellulaires. J'ai observé que les voies de signalisation, et en particulier la voie de l'AMPc, qui pouvait paraître simple, il y a encore quelques années apparaissent maintenant comme des systèmes étonnamment riches et complexes. C'est d'ailleurs cette complexité qui semble être à l'origine de la spécificité de l'action de ces voies.

Le premier concept important ayant modifié la perception des voies de transduction a été la découverte que la régulation, la synthèse et la dégradation des seconds messagers pouvaient être effectuées par différentes isoformes d'une même enzyme. En fonction de son équipement enzymatique, une cellule pourra donc réguler l'amplitude et la durée des réponses. Ces deux facteurs, la cinétique et l'amplitude des réponses aux stimulus extracellulaires, ont d'ailleurs été souvent négligés à la fois dans les études réalisées sur les voies de transduction et dans les représentations des cascades de voies de signalisation.

Le deuxième bouleversement dans la représentation des voies de signalisation réside dans la localisation des effecteurs. Grâce à un adressage précis des protéines, la cellule va pouvoir activer et réguler certains effecteurs dans des compartiments subcellulaires spécifiques. Cette localisation a apporté une nouvelle dimension dans l'étude des voies de transduction et c'est grâce à sa grande facilité de représentation que cette vision des microdomaines de seconds messagers se trouve être aujourd'hui la principale explication physiologique de la spécificité d'action des stimulus extracellulaires.

Cependant il ne faut pas oublier que la spécificité des voies de signalisation peut également reposer sur les mécanismes de rétroactions. Les PDEs en dégradant l'AMPc vont participer directement à la cinétique, l'amplitude et la localisation des réponses. Mais les autres mécanismes de rétrocontrôle comme la désensibilisation des RCPG et l'activation de protéines phosphatases spécifiques vont également intervenir dans la modulation des signaux.

Enfin, au cours de ce manuscrit, je n'ai parlé que de la voie de l'AMPc et des mécanismes capables d'en assurer une certaine spécificité et je n'ai pas envisagé l'implication

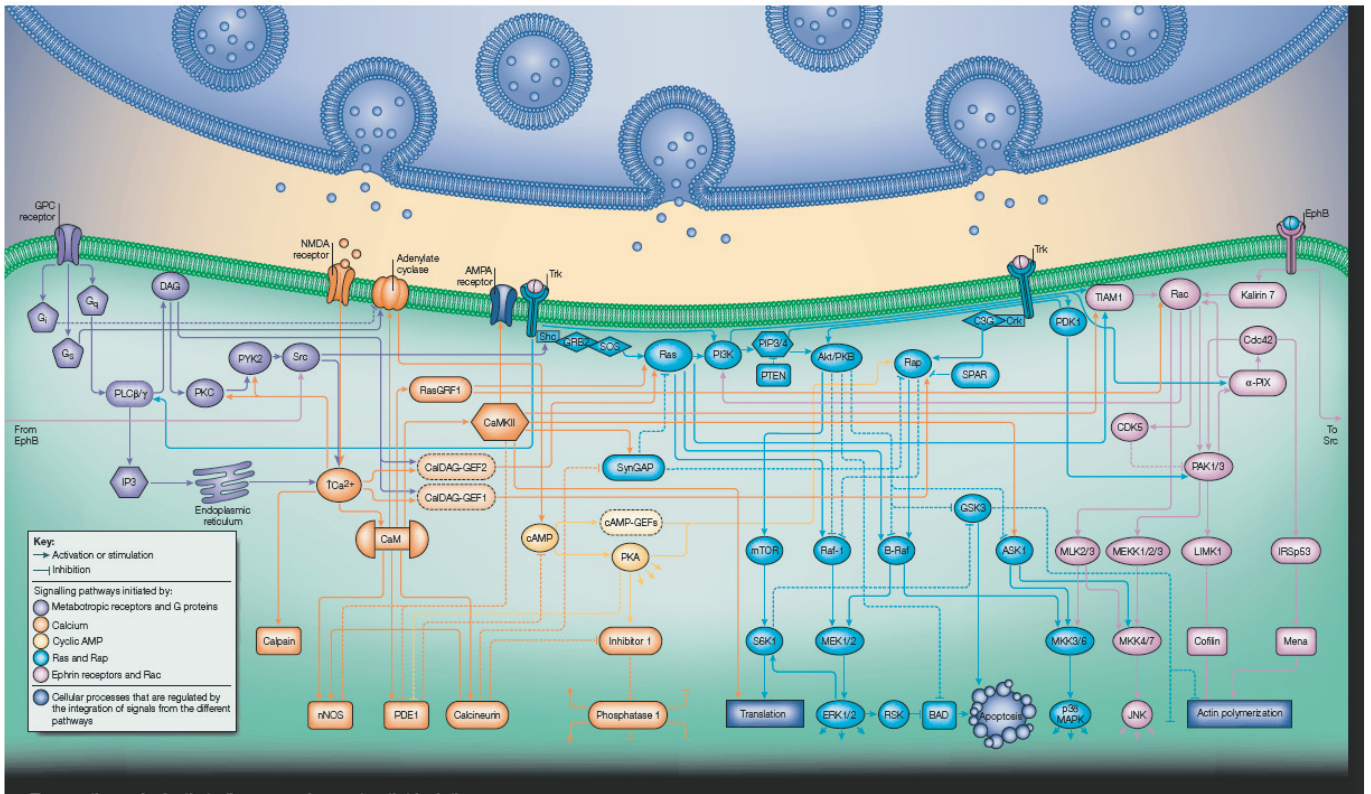
des autres voies de signalisation. De nombreuses régulations croisées entre les différentes voies de transduction sont décrites dans la littérature. Nous avons vu par exemple, qu'un même récepteur est capable d'activer différentes voies de signalisation. Les AC et les PDEs sont régulées par des protéines kinases ou des seconds messagers appartenant aux autres voies de transduction. Certaines cibles de la PKA sont aussi phosphorylées par des protéines kinases activées par d'autres signaux intracellulaires.

La liaison d'un agoniste sur son récepteur va donc être à l'origine de l'activation d'une voie de signalisation mais par l'intervention de mécanisme de rétrocontrôle soit positif ou négatif, cet agoniste pourra moduler les autres voies de signalisation. Ces régulations croisées sont favorisées par la mise en place d'une architecture commune de ces voies qui consiste généralement à des interactions protéines-protéines, des cascades de phosphorylation et la formation de seconds messagers diffusibles.

Parmi l'ensemble de ces interactions, les liens très étroits entre les voies de signalisation du calcium et de l'AMPc ont été l'objet de nombreuses études en neurobiologie. En effet, comme nous l'avons vu lors de l'introduction, ces deux voies modulent de nombreux effecteurs commun allant de l'AC, aux canaux ioniques, en passant par les PDEs ou les facteurs de transcription. Ces deux voies sont interconnectées et de nombreux auteurs ont suggéré qu'elles étaient le substrat moléculaire permettant la détection de coïncidence. L'activation simultanée de ces deux voies de signalisation permettrait de produire des modifications à court ou à long terme en réponse les stimulus importants physiologiquement. Cette hypothèse est séduisante mais il reste encore beaucoup de choses à déterminer notamment quels sont les cinétiques, les localisations ou les amplitudes des signaux calciques et AMPc capables d'entraîner ces régulations spécifiques.

L'ensemble des données de la littérature sur ces régulations croisées permet donc d'imaginer l'existence d'un réseau de voie de signalisation. Ce réseau fait intervenir différentes voies de signalisation interconnectées entre elles par des points de convergence. L'existence de ce réseau rend l'analyse de l'activation des voies de transduction beaucoup moins intuitive et apporte une spécificité supplémentaire à la signalisation. En effet, l'existence des points de convergence permet l'émergence de nouvelles propriétés, de nouveaux seuils d'activation des effecteurs, de cinétiques et de localisations subcellulaires différentes selon la cellule observée. Il faut tout de même prendre quelques précautions avec l'existence de ces régulations croisées qui ont été montrées le plus souvent dans des systèmes *in vitro* ou recombinants et qui ne tiennent donc pas compte de la stoechiométrie, de la localisation et des cinétiques d'activations des différents protagonistes.

Il apparaît au vue de ce travail bibliographique que nous devons modifier notre vision des voies de transduction et plus particulièrement les modes de représentation de ces voies. Pour cela, il est indispensable de connaître et de représenter les cinétiques d'activation, les localisations et les seuils d'activation des effecteurs. Au niveau de la cellule, il faudrait également étudier les interactions entre les différentes voies de signalisation dans des contextes physiologiques. Ces études permettraient à terme d'arrêter de voir les voies de signalisation comme des voies linéaires n'interagissant jamais entre elles où de les imaginer comme des générateurs de confusion ou les effecteurs d'une voie activent au final toutes les autres voies (comme pourrait le laisser penser le poster édité dans Nature Neurosciences Review, il y a quelques mois, voir figure 6) (Kennedy *et al.*, 2005). L'intégration de ces différents facteurs de complexité et de spécificité semble donc nécessaire à une meilleure compréhension des voies de signalisation mais la diversité des interactions et des facteurs impliqués représentent des problèmes très complexe à aborder et des études de modélisation sont indispensables (Bhalla & Iyengar, 1999; Weng *et al.*, 1999).



**Figure 6** : Le réseau intracellulaire des voies de signalisation des épines dendritiques (d'après Kennedy et coll 2005).

**Partie 2 : Les mécanismes cellulaires d'action  
du GHB dans le thalamus à l'origine de  
l'apparition des crises d'épilepsie de type  
absence et de la diminution des états de  
vigilance**

# Introduction

Au début des années 50, suite à la découverte de la présence de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) dans le cerveau des mammifères, de nombreuses études ont tenté de comprendre les effets pharmacologiques de ce composé sur le fonctionnement du système nerveux central (SNC). Toutefois, le GABA ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et c'est dans ce contexte que Laborit synthétisa l'acide  $\gamma$ -hydroxybutyrique (GHB), un acide gras à chaîne courte très proche structuralement du GABA qui passe la barrière hémato-encéphalique (figure 1A). Les premières études pharmacologiques ont révélé que l'injection intrapéritonéale de GHB chez le rat provoque des effets sédatifs et induit un sommeil proche du sommeil physiologique (Laborit, 1964).

Les effets produits par l'administration exogène de GHB sont fortement dépendants de la dose administrée ou ingérée. Chez l'homme, des prises de faibles doses de GHB (environ 10mg/Kg) sont à l'origine d'effets sédatifs, anxiolytiques et myorelaxants. Les doses plus fortes (20-40mg/Kg) sont utilisées pour améliorer la qualité du sommeil des patients narcoleptiques. Avec des doses supérieures à 60mg/Kg, le GHB produit des crises d'épilepsie tonico-cloniques et peut induire des comas profonds.

Ces dernières années, il s'est développé une utilisation détournée du GHB à des fins récréatives et illicites. Au début des années 90, les culturistes l'utilisaient comme complément alimentaire dans l'espoir de stimuler la production d'hormone de croissance. En parallèle, le GHB est devenu, grâce à ses effets désinhibiteur et euphorisant, une drogue très populaire dans les boîtes de nuit et dans les « rave party ». Dans ce cas, son utilisation se fait le plus souvent, en association avec de l'alcool et/ou de l'ecstasy mais de nombreuses autres substances toxicomanogènes sont également utilisées. Cette consommation provoque de très nombreuses overdoses et il n'existe actuellement aucun traitement capable de traiter ces intoxications. Au Etats-Unis, la FDA (Federal Drug Administration) a ordonné de sévères restrictions quant à la vente de GHB et l'a classé comme produit stupéfiant en 2000 (Smith *et al.*, 2002; Snead & Gibson, 2005). Le GHB est le plus souvent vendu sous forme liquide : il n'a aucune couleur, aucune odeur et présente seulement un léger goût salé. L'ensemble de ces propriétés l'ont rendu célèbre sous le nom de « drogue du viol » car il peut facilement être

ajouté dans le verre de la future victime qui ne pourra pas détecter sa présence (Snead & Gibson, 2005).

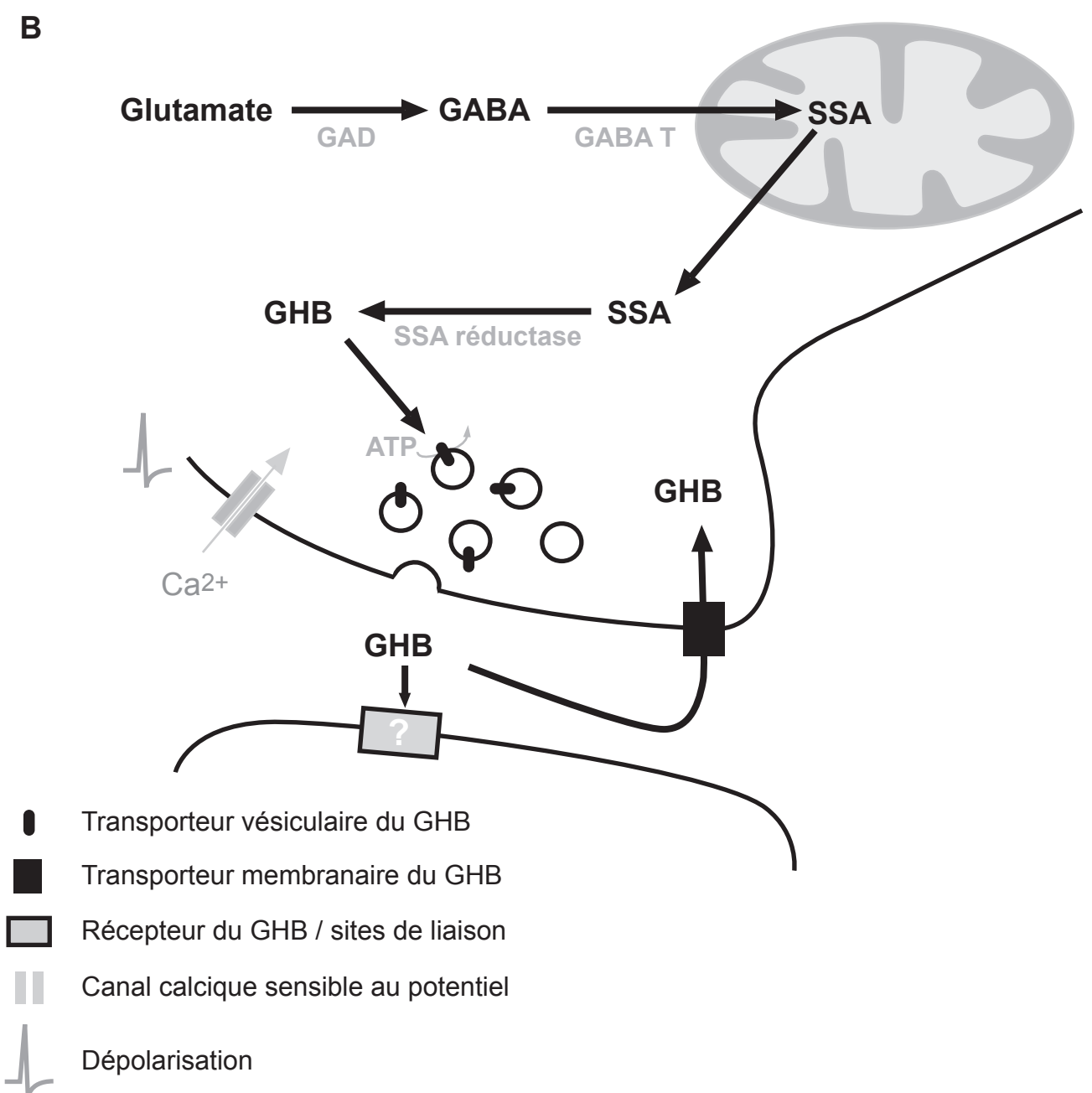
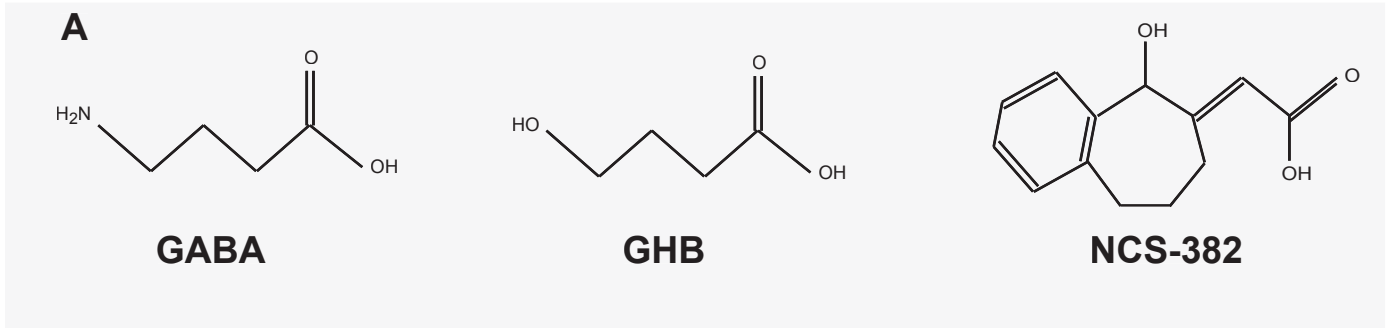
Les effets pharmacologiques et comportementaux de l'ingestion de GHB sont donc bien connus mais de nombreuses interrogations se posent sur ses mécanismes cellulaires d'action. De plus, le GHB est présent de façon endogène dans le cerveau des mammifères et à l'heure actuelle personne ne connaît la fonction de ce pool endogène.

## **I. Le GHB est-il un neurotransmetteur du système nerveux central ?**

De plus, le GHB possède de nombreuses propriétés caractéristiques des neurotransmetteurs classiques et certains auteurs proposent qu'il joue un rôle de neurotransmetteur ou neuromodulateur du SNC (Maitre, 1997).

### ***1. Voie de biosynthèse du GHB et libération dans la fente synaptique***

Tout d'abord, le GHB est présent à des concentrations de l'ordre du micromolaire dans le cerveau des mammifères. Les plus fortes concentrations de GHB étant retrouvées dans la substance noire compacte, le striatum et l'hippocampe. La voie de synthèse du GHB fait intervenir la transamination du GABA en acide succinique (SSA) par la GABA transaminase, puis une réduction de l'acide succinique est nécessaire à l'obtention du GHB par l'action de l'acide succinique semi-aldéhyde réductase (figure 1B). L'ensemble de ces transformations s'effectue dans les neurones exprimant la glutamate décarboxylase (GAD), qui transforme l'acide glutamique en GABA, un marqueurs communément utilisé pour identifier les neurones GABAergiques (Maitre, 1997; Hedou *et al.*, 2000). On retrouve le GHB dans le cytosol et dans la fraction synaptosomale (Snead, 1987) où il est concentré dans les vésicules



- Transporteur vésiculaire du GHB
- Transporteur membranaire du GHB
- Récepteur du GHB / sites de liaison
- Canal calcique sensible au potentiel
- Dépolarisation

**GAD** : Glutamate décarboxylase  
**GABA T** : GABA transaminase  
**SSA réductase** : Acide succinique semi-aldéhyde réductase

**Figure 1** : Présentation des principaux composés de la voie de biosynthèse du GHB et schéma d'une synapse GHBERgique.  
**A**, Structure chimique du GABA, du GHB et du NCS-382 l'antagoniste des récepteurs du GHB. **B**, Certains neurones exprimant l'enzyme de synthèse du GABA (GAD) possèdent également l'équipement enzymatique de synthèse du GHB. Une fois synthétisé, le GHB peut entrer dans les vésicules d'exocytose grâce à un transporteur spécifique. L'augmentation intracellulaire de calcium en réponse à une dépolarisation membranaire entraînerait sa libération dans la fente synaptique. Une fois dans le milieu extracellulaire il serait soit recapturé par le neurone présynaptique soit exercerait son action au niveau postsynaptique par activation d'un récepteur.



synaptiques par un transporteur utilisant l'énergie de l'ATP (Muller et al., 2002). La libération du GHB dans le milieu extracellulaire est dépendante de la dépolarisation membranaire et de l'entrée d'ion calcium (Maitre & Mandel, 1982; Maitre *et al.*, 1983). Une fois dans la fente synaptique le GHB a deux possibilités : soit il est recapturé par les neurones pré-synaptiques grâce à un transporteur utilisant le gradient électrochimique des ions sodium et des ions chlorure (Benavides et al., 1982b), soit il se fixe sur un récepteur (voir figure 1B).

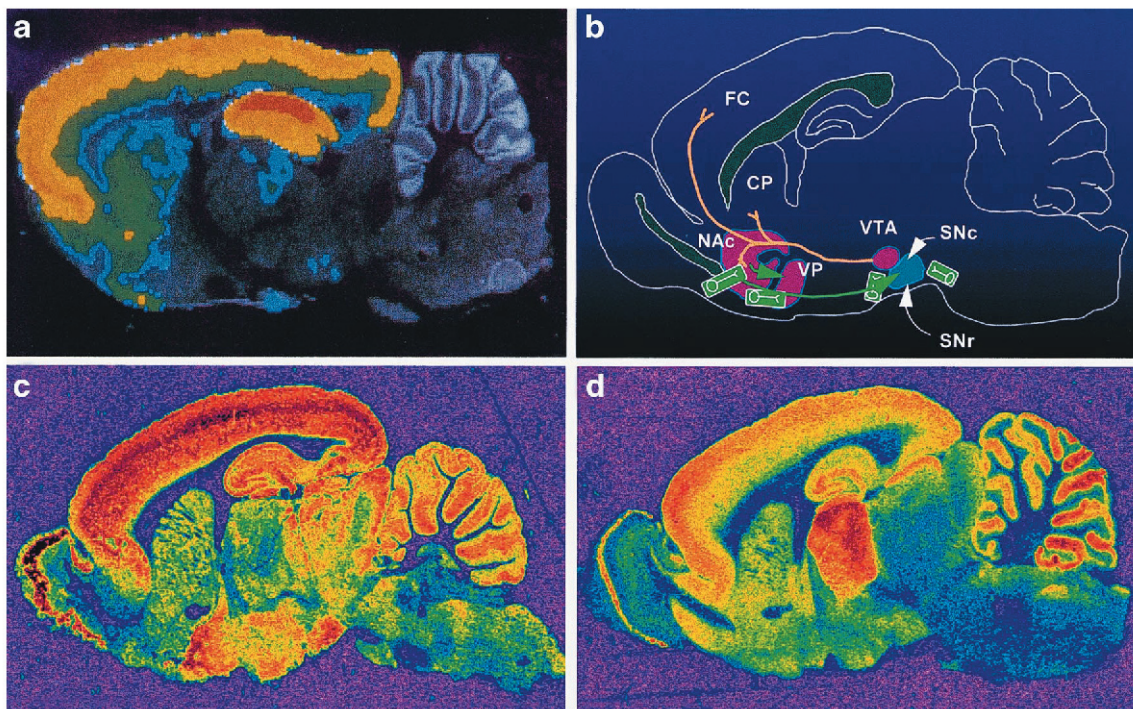
## **2. Les sites de liaison du GHB, leur distribution et leur couplage**

L'hypothèse d'un récepteur spécifique a été émise lors de la découverte de sites de liaison du GHB. Ces sites ont été identifiés la première fois sur des membranes de cerveau entier de rat et ils ont été classés en site de haute affinité ayant une constante de dissociation (Kd) de l'ordre de 30 à 500 nM et en site de basse affinité ayant un Kd compris entre 1,5 et 16  $\mu$ M (Benavides et al., 1982a).

Des marquages autoradiographiques réalisés sur des tranches de cerveau de rat ont permis de réaliser une cartographie de la distribution de ces sites. Le marquage présente une distribution hétérogène, avec une densité maximale dans l'hippocampe, le cortex et le bulbe olfactif. Le striatum, l'amygdale et le thalamus présentent une densité intermédiaire et aucun site de liaison n'a été trouvé dans l'hypothalamus, le cervelet et le reste des régions caudales du cerveau (Figure 2A) (Snead & Liu, 1984).

Ces sites sont spécifiques du GHB et leurs ontogénies ainsi que leurs distributions tissulaires dans le SNC sont différentes de celles des sites du GABA (figure 2) (Snead, 1994; Bernasconi *et al.*, 1999). De plus, seul le NCS-382, l'antagoniste du récepteur au GHB (figure 1), est capable de modifier la liaison du GHB sur ces sites spécifiques.

Ces sites de liaison semblent être associés à des récepteurs couplés à des protéines G et plus particulièrement aux protéines Gi/Go. En effet, la toxine pertussique ou des analogues non métabolisables du GTP entraînent une très nette diminution de la fixation du GHB sur les membranes neuronales (Ratomponirina et al., 1995; Snead, 2000).



**Figure 2** : Distribution des sites de hautes affinités du GHB, du GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. **A**, Autoradiographie réalisée en présence de 30nM de GHB tritié qui montre une présence des sites de liaison essentiellement au niveau des aires cortico-limbiques et du thalamus. **B**, Représentation schématique de la voie méso-cortico-limbique (ou circuit de la récompense). **C et D**, Marquage des récepteurs GABA<sub>A</sub> (C) et GABA<sub>B</sub> (D) par utilisation d'antagonistes spécifiques radiomarqués. Le marquage des sites de hautes affinités du GHB ne recouvre pas totalement ceux des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> ce qui indiquera une entité moléculaire différente. (d'après Bernasconi et coll 1999).

### **3. Le clonage du récepteur du GHB.**

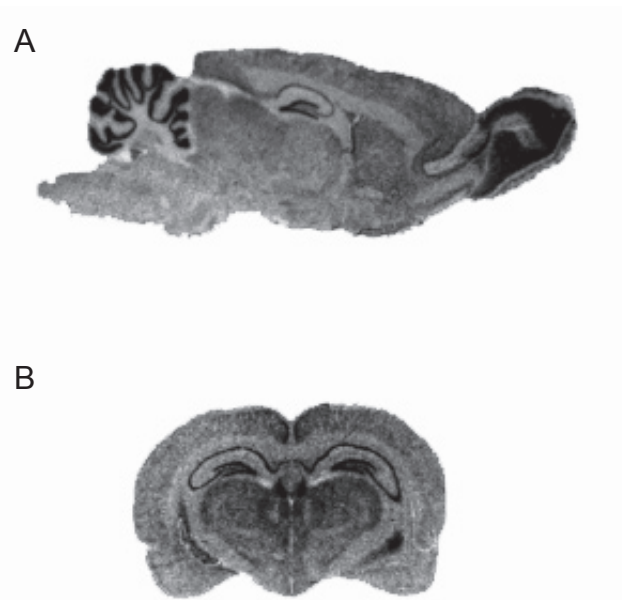
#### **3.1 Le récepteur spécifique du GHB**

Au cours de l'année 2003, l'équipe de Maitre a cloné à partir d'une banque d'ADNc d'hippocampe de rat un récepteur à 7 domaine transmembranaire liant spécifiquement le GHB et ses analogues structuraux (Andriamampandry et al., 2003). L'utilisation du NCS-400, agoniste des sites de hautes affinités du GHB, a permis d'isoler une protéine de 512 acides aminés (57 KDa) n'ayant aucune homologie de séquence avec les récepteurs GABA<sub>B</sub> et les autres familles de récepteurs couplés aux protéines G. L'hybridation *in situ* des messagers de cette protéine montre une distribution équivalente à celle des sites de hautes affinités du GHB (figure 3). L'application de GHB sur des cellules CHO exprimant la protéine clonée provoque l'apparition d'un courant cationique (figure 4B) dont l'activation devient non réversible en présence de GTP- $\gamma$ -S (figure 4C), analogue non hydrolysable du GTP.

L'ensemble de ces données semblent prouver que la protéine clonée correspond bien aux sites de hautes affinités du GHB déjà décrit dans la littérature, et que cette protéine est un RCPG liant spécifiquement le GHB et ses analogues.

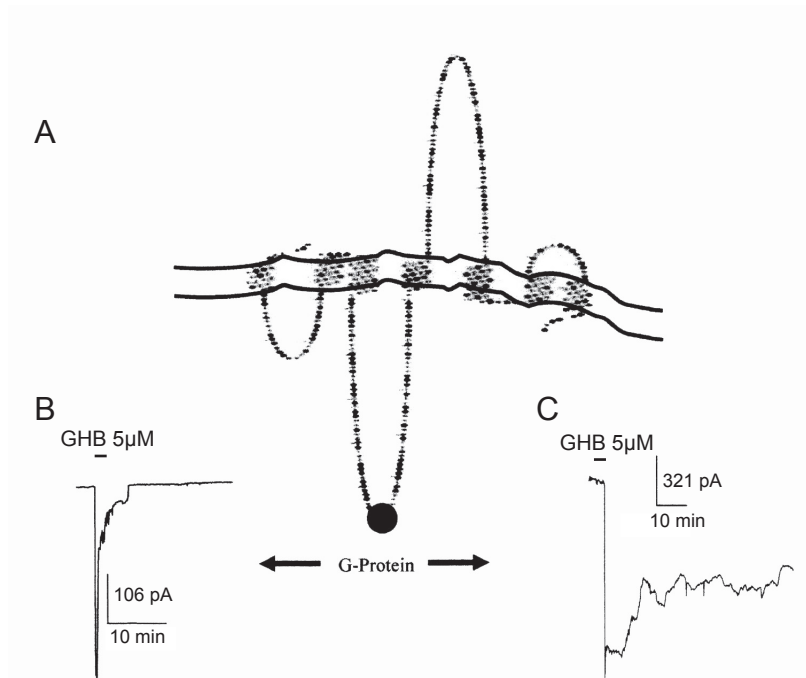
#### **3.2 Homologie de séquence avec les récepteurs tétraspanines.**

Cependant, le récepteur cloné est très atypique car il ne possède aucune homologie avec les autres RCPG (seulement 2,5% de résidus identiques avec les récepteurs GABA<sub>B</sub>). Ce point est intrigant car les auteurs ont utilisé des amorces très conservées des RCPG pour isoler la protéine d'intérêt à partir d'une banque d'ADNc d'hippocampe de rat. De plus, les 175 premiers acides aminés de la séquence de cette protéine possèdent 65% d'homologie avec les protéines de la superfamille des tétraspanines. Les tétraspanines forment une famille très importante de protéines transmembranaires exprimées dans de très nombreux organismes. Ces



**Figure 3 :** Distribution des ARNm du récepteur au GHB cloné.

**A**, coupe sagittale **B**, et coronale de cerveau de souris montrant l'hybridation *in situ* des ARNm de la protéine clonée, grâce à l'utilisation d'oligonucléotides spécifiques radiomarqués. Le bulbe olfactif, le cortex, l'hippocampe et le thalamus présentent une densité très fortes de messagers. Cette distribution est équivalente à celle obtenue lors des expériences de liaison révélant les sites de hautes affinités du GHB. Il faut tout de même noter une densité très fortes d'ARNm dans le cervelet, structure dépourvue de sites de liaison au GHB (d'après Andriamampandry et coll 2003).



**Figure 4 :** Structure et caractérisation fonctionnelle du récepteur cloné.

**A**, Structure probable de la protéine clonée. **B**, Courant entrant obtenu lors de l'application de GHB sur des cellules HEK 293 exprimant la protéine clonée. **C**, Courant enregistré en présence de  $GTP\gamma S$  dans la pipette de patch et de GHB dans le milieu extracellulaire (d'après Andriamampandry et coll 2003).

protéines ont une structure à quatre domaines transmembranaires (figure 5) et sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Elles interagissent physiquement avec des protéines membranaires, du cytosquelette et extracellulaires (figure 6) et forment un réseau qui serait à l'origine des leurs effets (Levy & Shoham, 2005). Certaines tétraspanines interagissent avec les RCPG et sont capable lors de la liaison d'un ligand d'induire la dissociation du complexe récepteur-protéine G (Little et al., 2004). Il reste donc aujourd'hui à savoir en quoi le récepteur cloné est proche structuralement et fonctionnellement de cette famille de protéine.

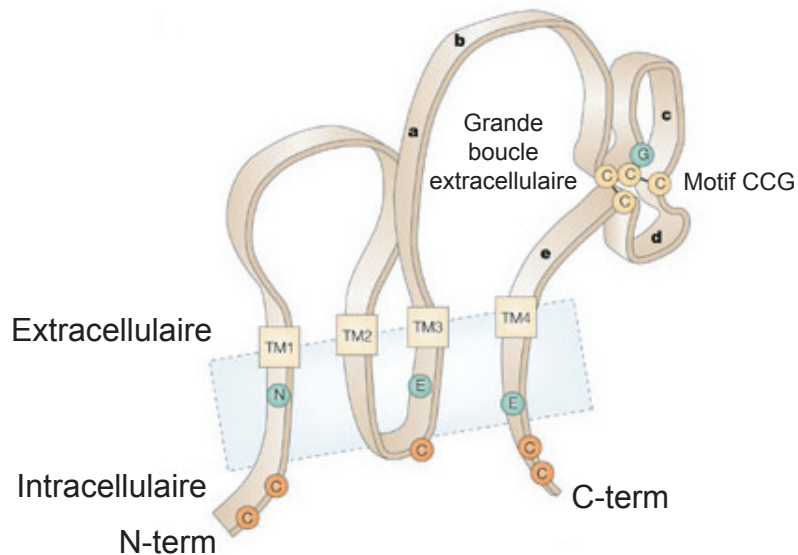
En plus des interrogations concernant l'appartenance de ce récepteur cloné à telle ou telle famille de RCPG, de nombreuses contradictions avec l'ensemble des données précédentes de la littérature existent.

### 3.3 Distribution tissulaire du récepteur cloné

La distribution des ARNm de la protéine clonée est presque similaire à celle des sites de hautes affinités pour le GHB sauf au niveau du cervelet. En effet, alors qu'aucun marquage de sites de hautes affinités pour le GHB dans le cervelet n'a été montré cette structure possède la plus importante quantité d'ARNm de la protéine clonée (Maitre, 1997).

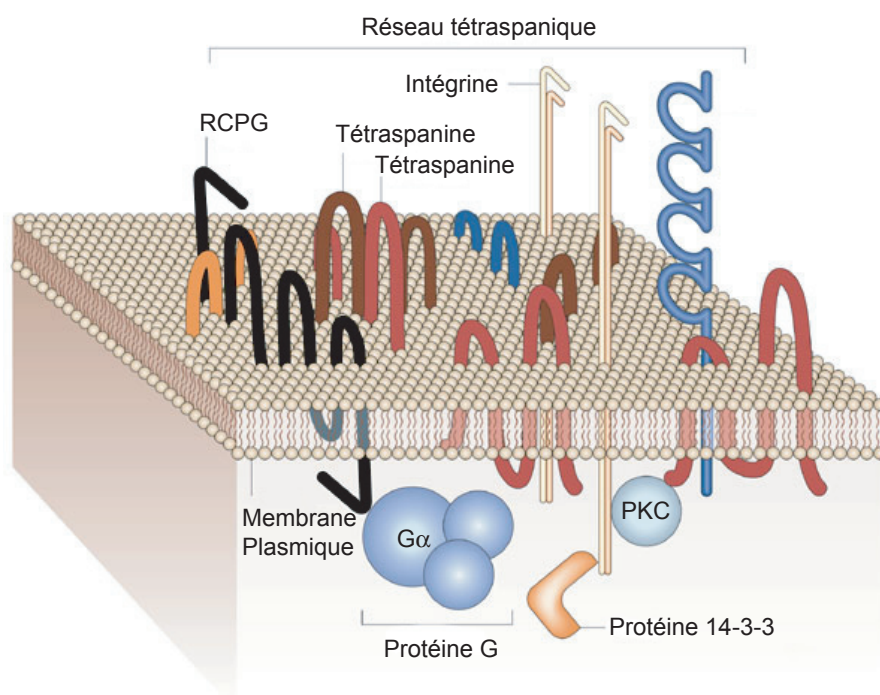
### 3.4 Différences dans les effecteurs activés

Les données biochimiques obtenues sur les sites de liaison du GHB dans le cortex et l'hippocampe montrent une diminution de la formation d'AMPc induite par la FSK en présence de GHB et cette réduction de la concentration d'AMPc implique la libération de protéines Gi/Go (Ratomponirina *et al.*, 1995; Snead, 2000). De plus, dans les cellules NCB-20, les applications de GHB produisent une inhibition des courants calciques (Kemmel *et al.*, 1998) et une activation de courants potassiques (Kemmel *et al.*, 2003). L'ensemble de ces effets sont bloqués par le NCS-382 ce qui suggère que les sites de liaison spécifique du GHB seraient couplés négativement à l'AC.



**Figure 5 :** Structure schématique des tétraspanines.

La structure tridimensionnelle de CD81 est utilisée ici comme un modèle général des tétraspanines. Les quatre domaines transmembranaires (TM) contiennent des résidus polaires (cercle vert) conservés dans l'ensemble de la famille. Le motif CCG formé par des résidus cystéines délimite la région variable de la grande boucle extracellulaire (c et d). Les cercles oranges représentent des résidus cystéines pouvant être palmitoylés (D'après Levy et Shoham 2005).



**Figure 6:** Interactions moléculaires à l'intérieur du réseau formé par les tétraspanines.

Représentation schématique d'un réseau constitué par les tétraspanines. Ce réseau permet grâce à des interactions des tétraspanines avec des protéines intracellulaires, membranaires et extracellulaires de créer des microdomaines intervenant dans la transduction de signaux extracellulaires. Les tétraspanines peuvent se lier entre elles, lié des RCPG, des protéines G, la PKC... Elles pourraient intervenir dans la régulation des voies de transduction (D'après Levy et Shoham 2005).

Le groupe de Maitre montre que l'application de GHB sur les cellules CHO transfectées avec le récepteur cloné produit l'activation d'un courant cationique ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) qui n'avait jamais été décrit auparavant et aucune expérience avec de la toxine pertussique, par exemple, n'a été réalisée pour connaître la nature de ce son couplage.

### 3.5 Pertes d'effets des antagonistes spécifiques.

Enfin la caractéristique la plus surprenante de ce récepteur au GHB concerne l'absence d'effet du NCS-382, décrit par ce même groupe comme l'antagoniste spécifique du récepteur au GHB (Maitre, 1997). L'ensemble des études, pharmacologiques et électrophysiologiques, en accord avec l'existence d'un récepteur au GHB repose sur l'action de cet antagoniste et les expériences de liaison réalisées avec le NCS-382 montrent que la distribution de ces sites de liaison recouvre celle des sites de hautes affinités du GHB (Maitre *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1991; Snead, 1996). Il est donc très paradoxal, après avoir basé toute l'argumentation de l'existence d'un récepteur au GHB sur ce composé, que le récepteur du GHB cloné ne le lie pas.

## II. Le GHB active les récepteurs GABA de type B.

Comme nous venons de le voir, les études biochimiques dans leur grande majorité suggèrent l'existence d'un récepteur spécifique du GHB. Cette supposition étant renforcée par le clonage de ce récepteur. Pourtant, les principales données électrophysiologiques montrent que les effets du GHB passent par une activation des récepteurs GABA de type B (GABA<sub>B</sub>).

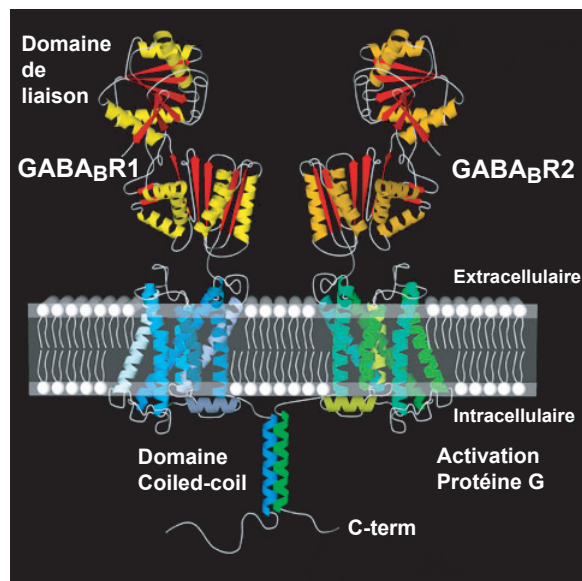
### 1. Les récepteurs GABA<sub>B</sub> et leurs fonctions dans le SNC

Le récepteur GABA<sub>B</sub> est un récepteur métabotrope couplé aux protéines Gi/Go. Il est composé de deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires : GABA<sub>B</sub>R1 et GABA<sub>B</sub>R2 (figure 7A) (Marshall et al., 1999). Ces monomères ne sont pas fonctionnels lorsqu'ils sont exprimés séparément, seul l'hétérodimère l'est. La « sous-unité » GABA<sub>B</sub>R1 porte le site de liaison du GABA et la « sous-unité » GABA<sub>B</sub>R2 permet l'adressage de l'hétérodimère à la membrane (figure 7B)(Bouvier, 2001). L'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> conduit à la libération des protéines Gi/Go qui vont moduler certaines conductances membranaires et inhiber l'adénylyl-cyclase (Bowery et al., 2002). Les canaux calciques de type N, P et Q se trouvent inhibés par la sous-unité βγ des protéines Gi/Go (Dolphin & Scott, 1986; Bettler *et al.*, 2004; Nicoll, 2004) et les canaux potassiques à rectification entrante activés par les protéines G (GIRK) sont eux activés (Gahwiler & Brown, 1985; Bettler *et al.*, 2004; Nicoll, 2004).

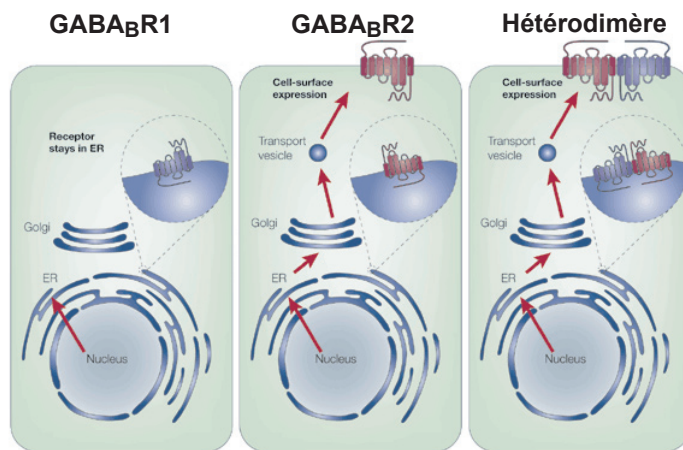
Ces récepteurs sont exprimés à la surface des neurones de nombreux noyaux du SNC (figure 2D) et sont présents aux niveaux pré et post-synaptique (Thompson & Gahwiler, 1992). La libération synaptique de GABA produit à certaines synapses une réponse fonctionnelle (potentiel post-synaptique inhibiteur ou PPSI) biphasique au niveau du neurone post-synaptique. L'hyperpolarisation précoce et rapide est due à l'ouverture des canaux GABA<sub>A</sub> alors que l'hyperpolarisation tardive et lente est due par l'activation des récepteurs



A



B



**Figure 7** : Le récepteur GABA<sub>B</sub> fonctionnel est un hétérodimère.

**A**, Structure hypothétique du récepteur GABA<sub>B</sub>. Ce récepteur est formé de deux RCPG (GABA<sub>B</sub>R1 et GABA<sub>B</sub>R2) associés l'un à l'autre par un domaine coiled-coil en C-terminal. **B**, Seul l'hétérodimère GABA<sub>B</sub>R1 et GABA<sub>B</sub>R2 est fonctionnel. Lorsque GABA<sub>B</sub>R1 est exprimé sans GABA<sub>B</sub>R2, il est retenu dans le réticulum endoplasmique sous une forme immature. Quand GABA<sub>B</sub>R2 est exprimé seul, il est adressé à la membrane mais n'ayant pas de site de liaison du GABA il n'est pas activable. Seul l'expression des deux "sous-unités" permet la formation d'un dimère dans le réticulum endoplasmique, adressé ensuite à la membrane (*d'après Bernasconi et coll 2002 et Bouvier 2001*).

GABA<sub>B</sub> (Dutar & Nicoll, 1988). Cette hyperpolarisation lente et soutenue joue un rôle important dans le comportement électrophysiologique des neurones (Crunelli & Leresche, 1991). Au niveau pré-synaptique, l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> est à l'origine d'une réduction de la libération des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs (Bowery, 1993; Nicoll, 2004).

## **2. Le GHB se lie et active les récepteurs GABA<sub>B</sub>**

L'ensemble des effets pré et post-synaptiques obtenus lors de l'application d'agoniste du récepteur GABA<sub>B</sub> ont été également observés lors de l'utilisation de GHB. En effet, l'application de GHB produit une hyperpolarisation des neurones thalamocorticaux (Williams et al., 1995), des cellules pyramidales de l'hippocampe (Xie & Smart, 1992b), des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (Harris et al., 1989) et des neurones de l'aire tegmentale ventrale (Madden & Johnson, 1998). Le GHB provoque également une diminution de l'amplitude des courants et des potentiels synaptiques excitateurs et inhibiteurs enregistrés dans les neurones thalamocorticaux (Emri et al., 1996), les cellules pyramidales de l'hippocampe et du cortex (Xie & Smart, 1992a; Jensen & Mody, 2001). Il diminue la libération de GABA et de glutamate (Banerjee & Snead, 1995). De plus, les antagonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> abolissent complètement l'ensemble des effets électrophysiologiques observées en présence de GHB.

Lingenhoehl et collaborateurs ont étudié les effets d'application de GHB sur des ovocytes de xénope exprimant un canal potassique à rectification entrante de type GIRK et un récepteur GABA<sub>B</sub>. Ils ont démontré que l'application de GHB sur ces ovocytes active les récepteurs GABA<sub>B</sub> et les courants GIRK. Cet effet n'est pas bloqué par le NCS-382 mais il est bloqué par les antagonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Lingenhoehl et al., 1999).

### **3. L'activation des récepteurs $GABA_B$ est à l'origine des effets exogènes du GHB : étude des souris invalidées pour le récepteur $GABA_B R1$ .**

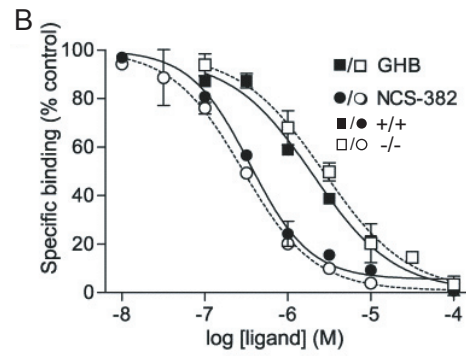
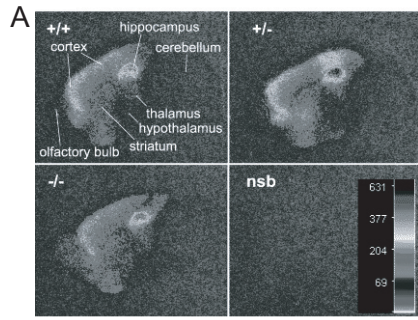
La démonstration qui a permis de prouver que les effets de l'application exogène du GHB sont médiés par une activation des récepteurs  $GABA_B$  est venue de l'étude des souris invalidées pour le récepteur  $GABA_B R1$  (Prosser *et al.*, 2001; Schuler *et al.*, 2001).

Les résultats des expériences de compétitions et de liaisons réalisées sur les souris sauvages et les souris  $GABA_B R1$ -/- ne montre aucune différence dans la liaison des sites de hautes affinités pour le GHB et le NCS-382 (figure 8.1) (Kaupmann *et al.*, 2003). Le fait que la distribution des ces sites et les caractéristiques pharmacologiques de la liaison du GHB restent similaires chez les souris sauvages et les souris invalidées pour le récepteur  $GABA_B$  montre bien que les sites de liaison du GHB et du baclofen sont des entités différentes.

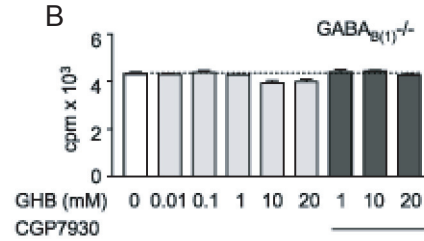
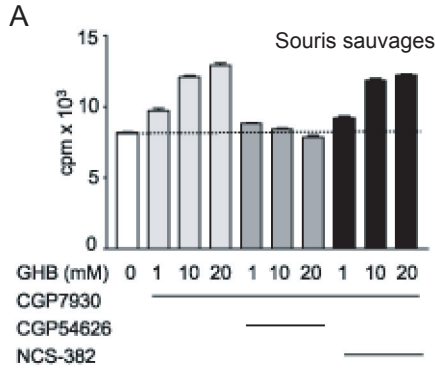
Les auteurs observent une augmentation de la liaison du GTP- $\gamma$ -S en présence de GHB traduisant un couplage des sites de liaison du GHB avec les protéines Gi/Go (Figure 8.2). Cette augmentation de la liaison du GTP- $\gamma$ -S est inhibée par les antagonistes des récepteurs  $GABA_B$  chez les souris sauvages et aucun effet du GHB n'a été détecté chez les souris  $GABA_B R1$ -/. Il semble donc que les modifications de la liaison du GTP- $\gamma$ -S par le GHB impliquent une activation des récepteurs  $GABA_B$ .

L'administration de GHB ne produit pas d'effets sédatifs (Figure 8.3), d'hypothermie (Figure 8.4), d'augmentation de synthèse de dopamine et d'apparition d'onde delta sur l'électroencéphalogramme des souris  $GABA_B R1$ -/-. (Figure 8.5). Ces résultats montrent que les effets exogènes du GHB passent par une activation des récepteurs  $GABA_B$ .

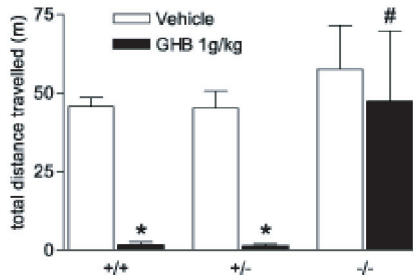
# 1 : Liaison



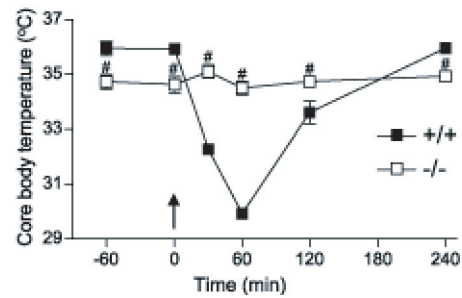
# 2 : GTP- $\gamma$ -S



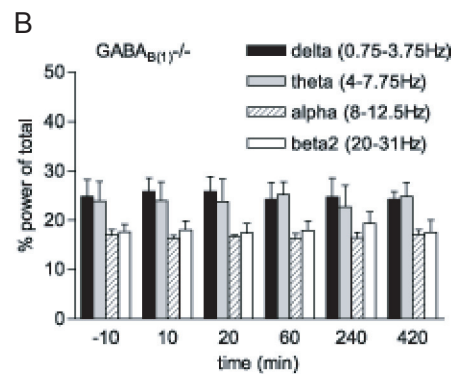
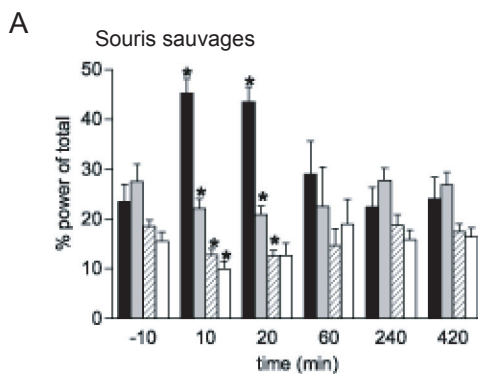
# 3 : Effet sédatif



# 4 : Hypothermie



# 5 : Onde delta



**Figure 8** : Existence de sites de hautes affinités spécifiques du GHB et perte des effets pharmacologiques chez la souris  $GABA_B1^{-/-}$ .

**1A**, Autoradiogramme de la liaison du GHB tritié (30nM) sur des coupes sagittales de souris sauvages, hétérozygotes et  $GABA_B1^{-/-}$ . La liaison non spécifique (nsb) a été obtenue en présence de GHB froid (10mM). **B**, Déliaison du NCS-382 tritié par le GHB et le NCS-382 obtenu sur des membranes de cellules corticales de souris sauvages et  $GABA_B1^{-/-}$ . **2**, Effet du GHB sur la liaison du GTP- $\gamma$ -35S sur des membranes de cellules corticales de souris sauvages (**A**) et  $GABA_B1^{-/-}$  (**B**). **3**, Analyse de l'effet sédatif du GHB sur l'activité locomotrice des souris sauvages, hétérozygotes et  $GABA_B1^{-/-}$ . **4**, Température du corps après l'injection de GHB (1g/Kg) dans des souris sauvages et  $GABA_B1^{-/-}$ . **5**, Le GBL produit l'apparition d'onde delta sur l'EEG sur les souris sauvages (**A**) mais pas sur les souris  $GABA_B1^{-/-}$  (**B**) (d'après Kaupmann et coll 2003).

### **III. Les effets du GHB sur l'excitabilité thalamique.**

#### **1. La boucle thalamocorticale**

La boucle thalamocorticale joue un rôle important dans l'établissement des cycles veille/sommeil et est également impliquée dans la genèse des crises d'épilepsie de type absence. C'est l'activité intrinsèque des neurones de cette boucle ainsi que leurs connexions synaptiques qui génère les rythmes physiologiques corrélés aux différents états de vigilance (Steriade, 2000, 2001).

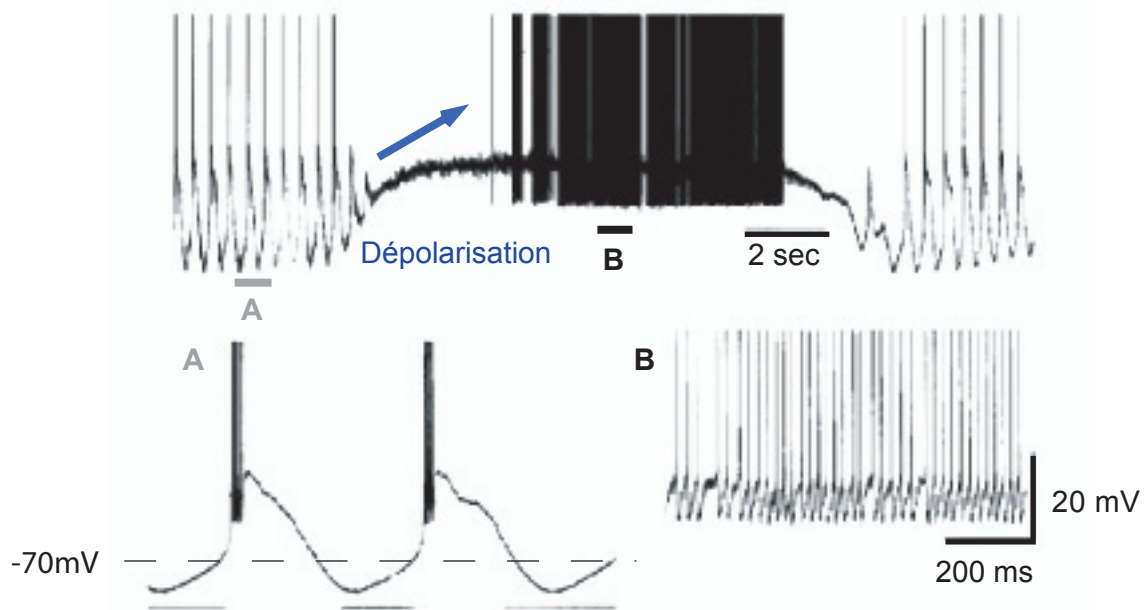
Les neurones du thalamus sensoriel (neurones thalamocorticaux ou TC) font partie intégrante de cette boucle. En effet, les neurones TC reçoivent des afférences excitatrices en provenance du cortex, des afférences excitatrices sensorielles et des afférences inhibitrices venant du noyau réticulé thalamique (principal noyau inhibiteur du thalamus, nRT) (figure 9). Ces neurones présentent deux modes d'activités électriques :

- Un mode caractérisé de « tonique » avec des fréquences de décharge des potentiels d'action de 10 à 50Hz. Ce mode de décharge est observable lorsque le potentiel membranaire est supérieur à -65mV.

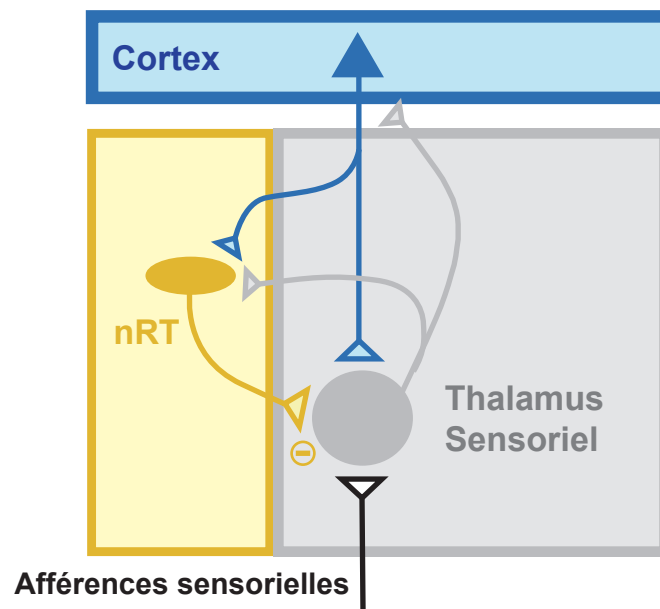
- Un mode de décharge « phasique » pendant lequel les neurones TC génèrent des oscillations du potentiel membranaire associées à des décharges de potentiels d'action en bouffés. Ce mode phasique apparaît lorsque le potentiel membranaire est compris entre -65mV et -75mV (figure 10) (McCormick & Bal, 1997).

Les modes de décharge des neurones TC sont associés aux différents états de vigilance. Le mode de décharge tonique est associé aux périodes d'éveil et permet de relayer les informations sensorielles vers le cortex. Le mode de décharge phasique qui produit des oscillations du potentiel membranaire des neurones TC est associé à une diminution des états de vigilance et aux périodes de sommeil de stade 3 et 4. Enfin, une hyperpolarisation encore

Mode phasique      Mode tonique      Mode phasique



**Figure 9 :** Les deux modes de décharges de PA des neurones TC. Enregistrement intracellulaire d'un neurone TC. **A**, Agrandissement du mode de décharge phasique des neurones TC. L'activité rythmique de décharge des PA est le résultat de l'activation complexe de deux courants membranaires (Courant calcique de type T et courant de type H). **B**, Agrandissement de l'activité tonique des neurones TC. Le passage d'un mode d'activité à l'autre est réalisé par une injection de courant dépolarisant schématisé par la flèche bleue (d'après McCormick et Bal 1997).



**Figure 10 :** schéma simplifié représentant les principales connexions des neurones TC. Les afférences sensorielles excitatrices (noir) établissent des synapses sur les neurones TC (gris). Les axones des neurones TC envoient des projections sur les cellules corticales (bleu) qui en retour projettent de façon topique sur les neurones des noyaux relais. De plus, avant de quitter les limites des noyaux relais, les axones des neurones TC émettent une collatérale qui établit des contacts avec les neurones GABAergique du nRT (jaune). Les neurones du nRT reçoivent également des projections en provenance du cortex et les axones de ces neurones contactent les neurones TC.

plus importante rend les neurones TC insensibles aux entrées synaptiques ce qui est caractéristique de l'état du réseau thalamique lors du coma (Steriade, 2000; Hughes *et al.*, 2002).

## **2. Les effets du GHB exogène dans le thalamus**

Les premières études réalisées sur le GHB ont montré qu'il avait un effet sédatif, qu'il augmentait les périodes de sommeil à onde lente (correspondant aux stades 3 et 4 du sommeil) et qu'à forte dose, il peut provoquer des comas (Crunelli *et al.*, 2006). De plus, le GHB a été utilisé pendant de nombreuses années lors des anesthésies générales.

Un autre effet observé lors d'application intrathalamique du GHB a été très étudié. Il s'agit de la capacité du GHB ou de son précurseur le GBL ( $\gamma$ -butyrolactone) à induire des crises d'épilepsie absence (Godschalk *et al.*, 1977; Snead, 1991, 1992; Crunelli & Leresche, 2002b)

L'épilepsie de type absence est une épilepsie généralisée non convulsive qui se caractérise par de brèves pertes de conscience durant lesquelles l'électroencéphalogramme (EEG) révèle des décharges pointes-ondes généralisées et synchrones d'une fréquence de 2,5 à 4 Hz chez l'homme. Ces crises débutent entre 3 et 8 ans et peuvent se produire jusqu'à 200 fois par jour sans que l'on observe aucun autre déficit neurologique, neuropsychologique ou métabolique (Crunelli & Leresche, 2002b).

## **3. L'action thalamique du GHB**

Au moment où nous avons débuté notre travail, certains effets du GHB sur l'excitabilité thalamique avaient déjà été décrits.

L'enregistrement des neurones TC par la technique de microélectrode avait permis de montrer que l'application de GHB est à l'origine d'une hyperpolarisation de ces neurones. L'amplitude de cette hyperpolarisation est dépendante de la concentration d'agoniste utilisée. Lors de l'utilisation de faibles concentrations de GHB (100-200 $\mu$ M), l'hyperpolarisation

amène les neurones TC dans la gamme de potentiel où apparaissent des oscillations lentes du potentiel de membrane (Williams et al., 1995).

Au niveau pré-synaptique, l'application de GHB produit une diminution de l'amplitude dépendante de la concentration des potentiels post-synaptiques excitateurs évoqués par une stimulation des afférences sensorielles dans le thalamus ventrobasal et dans le corps génouillé latéral de rat (Emri et al., 1996).

Ces différents effets pré et post-synaptiques du GHB observés dans le thalamus sont bloqués par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Crunelli & Leresche, 2002a).

C'est dans ce contexte que nous avons décidé de poursuivre les études des effets du GHB sur l'excitabilité des neurones des noyaux sensoriels du thalamus afin de mieux comprendre les bases cellulaires à l'origine des effets du GHB sur l'augmentation des phases de sommeil à onde lente et sur l'apparition de crises d'épilepsie de type absence. Pour cela, nous avons caractérisé les effets du GHB sur l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs en provenance du cortex (CPSE) et des courants post-synaptiques inhibiteurs en provenance du nRT (CPSI). Nous avons également enregistré la modulation des courants GIRK des neurones TC par le GHB. Au moment où nous avons débuté ce projet, l'existence d'un récepteur au GHB responsable de certains effets du GHB exogène était très controversés. Nous avons donc testé les antagonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> et GHB sur l'ensemble des effets électrophysiologiques observés pour tenter de déterminer quels étaient les récepteurs à l'origine de ces effets.



**Article 3 : Pathway-specific action of  $\gamma$ -hydroxybutiric acid in sensory thalamus and its revelance to absence seizures**

# Pathway-Specific Action of $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid in Sensory Thalamus and Its Relevance to Absence Seizures

Nicolas Gervasi,<sup>1\*</sup> Zohreh Monnier,<sup>1\*</sup> Pierre Vincent,<sup>1</sup> Danièle Paupardin-Tritsch,<sup>1</sup> Stuart W. Hughes,<sup>2</sup> Vincenzo Crunelli,<sup>2</sup> and Nathalie Leresche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique 7102–Université Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris, France, and <sup>2</sup>School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff CF10 3US, United Kingdom

The systemic injection of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) elicits spike and wave discharges (SWDs), the EEG hallmark of absence seizures, and represents a well established, widely used pharmacological model of this nonconvulsive epilepsy. Despite this experimental use of GHB, as well as its therapeutic use in narcolepsy and its increasing abuse, however, the precise cellular mechanisms underlying the different pharmacological actions of this drug are still unclear.

Because sensory thalamic nuclei play a key role in the generation of SWDs and sleep rhythms, and because direct injection of GHB in the ventrobasal (VB) thalamus elicits SWDs, we investigated GHB effects on corticothalamic EPSCs and GABAergic IPSCs in VB thalamo-cortical (TC) neurons. GHB (250  $\mu$ M–10 mM) reversibly decreased the amplitude of electrically evoked EPSCs and GABA<sub>A</sub> IPSCs via activation of GABA<sub>B</sub> receptors; however, ~60% of the IPSCs were insensitive to low (250  $\mu$ M–1.0 mM) GHB concentrations. The putative GHB receptor antagonist NSC 382 applied alone had a number of unspecific effects, whereas it either had no action on, or further increased, the GHB-elicited effects on synaptic currents. Low GHB concentrations (250  $\mu$ M) were also effective in increasing absence-like intrathalamic oscillations evoked by cortical afferent stimulation.

These results indicate that low concentrations of GHB, similar to the brain concentrations that evoke SWDs *in vivo*, differentially affect excitatory and inhibitory synaptic currents in TC neurons and promote absence-like intrathalamic oscillations. Furthermore, the present data strengthen previous suggestions on the GHB mechanism of sleep promotion and will help focus future studies on the cellular mechanisms underlying its abuse.

**Key words:** GABA<sub>B</sub> receptors; inhibition; excitation; sleep; intrathalamic oscillations; abuse

## Introduction

Administration of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) elicits euphoric sensations, sedation, normalization of sleep parameters, and spike and wave discharges (SWDs), the EEG hallmark of absence seizures (Tunnicliff and Cash, 2002). Some GHB effects are clinically exploited (i.e., in anesthesia, alcohol withdrawal, and narcolepsy) (Lammers et al., 1993; Kleinschmidt et al., 1998; Pol-drugo and Addolorato, 1999), whereas others underlie its illicit use as a recreational and so-called “rape” drug (Boyce et al., 2000; Nicholson and Balster, 2001). Experimentally, GHB-elicited SWDs are a well established model of absence seizures (Snead, 1995) that are used to assess the effect of pharmacological–transgenic manipulations of neuronal channels and receptors on the

expression of this paroxysmal activity (Snead et al., 2000; Kim et al., 2001).

The mechanisms of GHB actions, however, are unclear. The existence of (1) binding sites with a specific brain distribution [different from those of GABA<sub>A</sub> receptors (GABA<sub>A</sub>Rs) and GABA<sub>B</sub>Rs] (Bernasconi et al., 1999), (2) high-affinity ligands (that do not displace GABA or baclofen from GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> sites) (Maitre et al., 1990), and (3) biochemical and behavioral responses that are blocked by NCS 382 (the only available GHB antagonist) (Maitre et al., 1990; Schmidt et al., 1991; Hechler et al., 1993; Snead, 1996; Ferraro et al., 2001; Mehta et al., 2001) has led to the proposition that there are physiologically relevant brain GHB receptors (Maitre, 1997). In contrast, other biochemical and behavioral data indicate that GHB only acts as a weak GABA<sub>B</sub> receptor agonist (Bernasconi et al., 1999), and isolation of GHB receptor(s) has been elusive (Cash and Tunnicliff, 2002).

Electrophysiological results are also contradictory (Crunelli and Leresche, 2002b), because *in vivo* studies show GHB responses that are mediated by putative GHB receptors, whereas most of the *in vitro* investigations highlight GABA<sub>B</sub> receptor-mediated responses, a result confirmed by data from recombinant GABA<sub>B</sub> receptors (Lingenhoehl et al., 1999). The only exception to this scenario is the GHB-mediated modulation of Ca<sup>2+</sup> currents in NCB20 cells, which is NCS 382 sensitive (Kemmel et al., 2003).

Received July 10, 2003; revised Oct. 14, 2003; accepted Oct. 28, 2003.

The work was supported by the Wellcome Trust (Grant 71436) and partly by the National Institute on Drug Abuse (DA14830-01). We thank Dr. H. R. Parri for critical reading of this manuscript.

\*N.G. and Z.M. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to N. Leresche, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique 7102–Université Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint-Bernard, F-75005 Paris, France. E-mail: nathalie.leresche@snv.jussieu.fr.

Z. Monnier's present address: Laboratoire de Neurosciences EA 481, Université de Franche-Comté, 25000 Besançon, France.

Copyright © 2003 Society for Neuroscience 0270-6474/03/2311469-10\$15.00/0

Sensory thalamic nuclei play a key role in SWDs (Crunelli and Leresche, 2002a) and sleep rhythms (Steriade et al., 1997). Taking advantage of current knowledge of thalamic GABA<sub>B</sub> (Emri et al., 1996a; Ulrich and Huguenard, 1996; Kim et al., 1997; Le Feuvre et al., 1997) and putative GHB receptors (Hechler et al., 1992), and because GHB injection in the ventrobasal (VB) thalamus elicits SWDs (Snead, 1991), we investigated in VB thalamocortical (TC) neurons whether, and via which receptors, GHB affects corticothalamic EPSCs and GABA<sub>A</sub>ergic IPSCs originating from the nucleus reticularis thalami (NRT). We report that GHB elicits a GABA<sub>B</sub>-mediated reduction of EPSCs and IPSCs, but only 41% of the IPSCs are sensitive to concentrations  $\leq 1$  mM. Low GHB concentrations also increase slow intrathalamic oscillations evoked by cortical stimulation. These results indicate that low GHB concentrations differentially affect excitatory and inhibitory synaptic currents in TC neurons and are discussed in the context of the ability of similar brain GHB concentrations to generate SWDs *in vivo*.

Preliminary data have been published in abstract form (Monnier et al., 2000).

## Materials and Methods

**Whole-cell recordings.** A block containing the thalamus was dissected from the brain of male 10- to 22-d-old Wistar rats (mean  $14 \pm 2$ ), and corticothalamic (400  $\mu$ m thick) or horizontal (220  $\mu$ m thick) slices containing the NRT and ventral posterolateral and ventral posteromedial nuclei were prepared in ice-cold saline, as described by Agmon and Connors (1991) and Le Feuvre et al. (1997), respectively, using a Vibroslice (Leica VT1000S). Slices were kept at 35°C in oxygenated saline (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), before being transferred, one at the time, to the experimental setup, where they were maintained at room temperature and perfused at a rate of 1–2 ml/min with an oxygenated medium of composition (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, and 25 glucose, pH 7.3.

Membrane currents were recorded from the soma of TC neurons visualized under Nomarski optics. Recording pipettes were pulled from borosilicate glass using a Narishige (Tokyo, Japan) micropipette puller and coated with wax. For recording synaptic currents, electrodes were filled with the following solution (in mM): 115 CsCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, 4 Na-ATP, 0.4 Na-GTP, 15 phosphocreatine, and 50 U/ml creatine phosphokinase, pH 7.3 (osmolarity, 305 mOsm) (electrode resistance, 1.5–2 M $\Omega$ ). Once a high-resistance seal had been established, the holding potential was set to  $-60$  mV, and the whole-cell, voltage-clamp configuration was obtained. Values of access resistance ranged from 4 to 6 M $\Omega$  at the beginning of the recording to 4–8 M $\Omega$  at the end. At least 70% of these values were compensated. Patch-clamp electrodes were connected to an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Voltage protocols and acquisition were controlled by Axograph 4.8. The membrane currents were filtered by a four-pole Bessel filter set at a corner frequency of 5 kHz, digitalized on-line at a sampling rate of 10 or 20 kHz, and later analyzed using Axograph 4.8 (Axon Instruments). Data were not collected until  $\geq 10$  min after patch rupture to allow the internal and external solutions to equilibrate.

Isolation of glutamatergic EPSCs was obtained by adding the GABAergic antagonist, gabazine (1–10  $\mu$ M), to the perfusion medium. Isolation of GABA<sub>A</sub> IPSCs was obtained by adding to the perfusion medium the glutamate antagonists, DL-APV (50  $\mu$ M) and CNQX (10  $\mu$ M) (Eaton and Salt, 1996; Salt, 2002). Evoked postsynaptic currents were recorded from a holding potential of  $-60$  mV. Evoked IPSCs were elicited by extracellular electrical stimulation, using an electrode consisting of a glass pipette (6–8  $\mu$ m tip diameter) filled with the extracellular medium, and a remote 100- $\mu$ m-thick platinum wire. The stimulating electrode was positioned 25–60  $\mu$ m from the recorded neuron. Evoked corticothalamic EPSCs were elicited using a bipolar metallic electrode located in the internal capsule, close to the NRT. Square pulses of 20  $\mu$ sec duration and 10–40 V amplitude were applied at a frequency of 0.05 Hz to evoke EPSCs or IPSCs.

The perforated-patch technique was used to record outward K<sup>+</sup> currents, because it provided more stable recordings. The patch electrodes were filled with 1  $\mu$ l of the following solution (in mM): 130 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.3 (osmolarity, 305 mOsm). A quartz capillary was loaded with 0.5  $\mu$ l of pipette solution in which 100  $\mu$ M amphotericin B from a fresh stock solution in DMSO and 10  $\mu$ M fluorescein were added. The 10- $\mu$ m-diameter tip of the capillary was placed close to the tip of the recording pipette, and the solution was ejected once the cell-attached configuration had been obtained, leading to a rapid decrease in the series resistance. The integrity of the membrane patch was monitored with the fluorescein fluorescence.

**Extracellular recordings.** Extracellular recordings were performed in adult rat horizontal slices (prepared as described previously) maintained at 35°C, using an interface recording chamber and glass pipettes filled with 0.5 M NaCl (resistance, 1–5 M $\Omega$ ) connected to a Neurolog 104 amplifier (Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, UK). The extracellular medium contained (in mM): 134 NaCl, 3.75 KCl, 1.25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 16 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose. Multiunit activity was evoked by delivering a brief electrical stimulus (100–200  $\mu$ sec; 50–100  $\mu$ V) to the internal capsule using a bipolar tungsten electrode. The oscillatory index was calculated as the ratio of the first satellite peak to the central peak of the autocorrelogram, expressed as a percentage (Huntsman et al., 1999).

Quantitative data obtained with both extracellular and patch electrode recordings are given as mean  $\pm$  SD, and the statistical significance was tested using Student's *t* test.

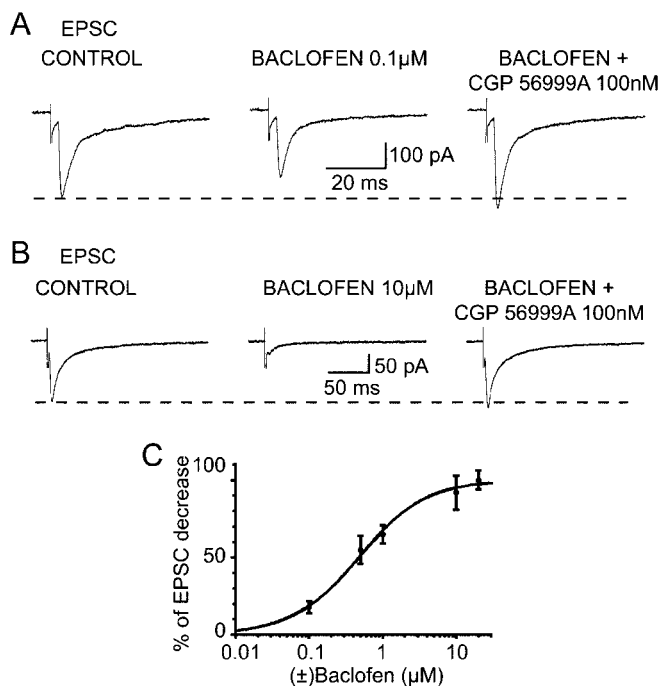
**Drugs.** Solutions containing ( $\pm$ )baclofen, GHB, NCS 382, NCS 356, *trans*-4-hydroxycrotonic acid (4-HCN), CGP 56999A, and CGP 35348 were prepared immediately before the experiment. All drugs were bath applied. We thank Novartis (Basel, Switzerland) for their gift of CGP 56999A and CGP 35348, and Dr. J. J. Bourguignon (Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7081, Strasbourg, France) for NCS 356. All other chemicals were purchased from Sigma and Tocris.

## Results

### GABA<sub>B</sub> receptors on corticothalamic afferents

Before assessing the action of GHB on corticothalamic EPSCs, we investigated the effects of the GABA<sub>B</sub> receptor agonist baclofen at this synapse, because no study has so far addressed this issue. As shown in Figures 1 and 2, electrical stimulation of the corticothalamic afferents evoked in VB TC neurons two types of EPSCs that differ in their kinetics, with the longer-lasting type of EPSCs being recorded more frequently, as reported previously by Kao and Coulter (1997).

Application of ( $\pm$ )baclofen dose-dependently and reversibly decreased the amplitude of corticothalamic EPSCs in all neurons tested (Fig. 1A,B). The effect of baclofen reached steady-state between 2 and 3 min from the beginning of the application, and the recovery was obtained between 10 and 12 min after the start of the washout. The reduction observed with 0.1, 0.5, 1, 10, and 20  $\mu$ M baclofen was  $15 \pm 4\%$  ( $n = 7$ ),  $47 \pm 9\%$  ( $n = 8$ ),  $55 \pm 6\%$  ( $n = 9$ ),  $78 \pm 11\%$  ( $n = 14$ ), and  $85 \pm 6\%$  ( $n = 4$ ), respectively (IC<sub>50</sub>, 0.48  $\mu$ M) (Fig. 1C). The decreases obtained with 10 and 20  $\mu$ M baclofen were not statistically different ( $p = 0.05$ ), suggesting that 10  $\mu$ M baclofen already provides a maximal activation of the GABA<sub>B</sub> receptors present at this synapse. The GABA<sub>B</sub> receptor antagonists CGP 35348 (1 mM) ( $n = 3$ ) or CGP 56999A (100 nM) ( $n = 15$ ) not only fully antagonized the 10  $\mu$ M baclofen-induced reduction of the EPSC, but also increased the amplitude of the EPSC above the control level (Fig. 1A,B), as has already been shown for both the sensory EPSP (Emri et al., 1996a) and the NRT-derived IPSPs in TC neurons (Le Feuvre et al., 1997). No difference in baclofen potency and the effect of GABA<sub>B</sub> antagonists was observed between EPSCs with different kinetics.



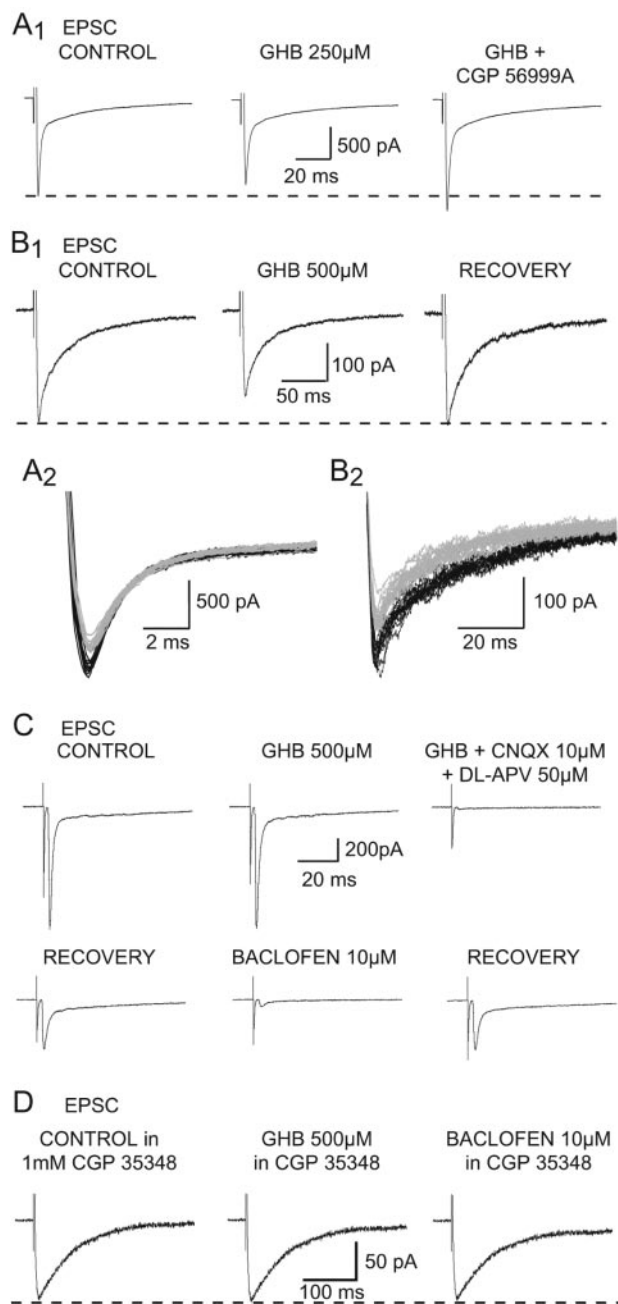
**Figure 1.** Effect of (±)baclofen on the corticothalamic EPSC. Baclofen (0.1 and 10  $\mu\text{M}$ ) reversibly decreases the amplitude of the EPSC by 23% (*A*) and 76% (*B*), respectively. The GABA<sub>B</sub> antagonist CGP56999A (100 nM) antagonizes the effect of baclofen at both concentrations and increases the EPSCs by 12% compared with the control amplitude. Each trace in *A* and *B* is the average of 10–20 EPSCs. *C*, Dose–response curve of the effect of baclofen on the corticothalamic EPSCs.

### Effect of GHB on the corticothalamic EPSC

Having established the action of baclofen, we then investigated the effect of GHB on electrically evoked corticothalamic EPSCs. Application of GHB reversibly decreased the amplitude of these EPSCs in 96% of TC neurons. The effect of GHB reached steady-state between 2 and 3 min from the beginning of the application, and the recovery was obtained between 10 and 12 min after the start of the washout. No effect was observed with 100  $\mu\text{M}$  GHB ( $n = 3$ ), whereas 250  $\mu\text{M}$  evoked a reduction ( $17 \pm 3\%$ ) in seven of eight neurons (Fig. 2*A*). Increasing the GHB concentration to 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 10 mM, and 20 mM elicited a decrease of  $27 \pm 10\%$  ( $n = 34$  of 36),  $25 \pm 10\%$  ( $n = 6$  of 6),  $56 \pm 11\%$  ( $n = 5$  of 5), and  $61 \pm 13\%$  ( $n = 5$  of 5), respectively (Figs. 2*B*, 4*A*,*B*). In the two neurons in which 500  $\mu\text{M}$  GHB was ineffective, subsequent application of baclofen markedly decreased the amplitude of the EPSC (Fig. 2*C*).

The GHB-elicited reduction of the corticothalamic EPSC was antagonized by CGP 56999A (100 nM) in 3 of 3, 10 of 12, and 4 of 4 neurons tested with 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , and 1 mM GHB, respectively (Fig. 2*A*). Similar to what had been observed with baclofen, CGP 56999A produced an increase over the control amplitude in the presence of GHB (Fig. 2*A*), and no differences in the effect of GHB were observed between EPSCs with different kinetics.

These results indicate that the totality of GHB effects on the corticothalamic EPSCs recorded in TC neurons occurs through activation of GABA<sub>B</sub> receptors. In the hippocampus, however, an effect of GHB on the EPSPs and IPSPs evoked in CA1 neurons after stimulation of Schaeffer collateral–commissural fibers could still be observed when GHB was applied in the continuous presence of the GABA<sub>B</sub> receptor antagonists CGP 35348 (500  $\mu\text{M}$ ) (Berton et al., 1999) or CGP 55845 (1  $\mu\text{M}$ ) (Cammalleri et al., 2002). To match this experimental paradigm, we applied GHB in



**Figure 2.** Effect of GHB on the corticothalamic EPSC. *A1*, GHB (250  $\mu\text{M}$ ) decreases the amplitude of the EPSC by 11%. This effect is antagonized by CGP56999A (100 nM), which also increases the EPSC size by 16% compared with control. *A2*, Superimposition of the individual synaptic currents used to build up the averages presented in *A1* (control in black; GHB in gray). *B1*, GHB (500  $\mu\text{M}$ ) produces a reversible 22% decrease of the EPSC. *B2*, Superimposition of the individual synaptic currents used to build up the averages presented in *B1* (control in black; GHB in gray). *C*, Recordings from one of the few TC neurons in which GHB fails to decrease the EPSC amplitude show that 10  $\mu\text{M}$  baclofen decreases this synaptic current by 90%. Perfusion with the excitatory amino acid antagonists (CNQX and APV) blocks the electrically evoked corticothalamic EPSC. *D*, In the continuous presence of the GABA<sub>B</sub> antagonist CGP35348 (1 mM), GHB (500  $\mu\text{M}$ ) has no effect on the EPSC. The lack of effect of 10  $\mu\text{M}$  baclofen on the EPSC after washout of GHB demonstrates that this concentration of CGP 35348 fully blocks presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors. Each trace in *A1*, *B1*, *C*, and *D* is the average of 10–20 EPSCs.

the continuous presence of 1 mM CGP 35348, a concentration that fully antagonizes the response to a maximal concentration of baclofen (Fig. 2*D*). Also in this condition, however, GHB was never capable of inducing a reduction of the corticothalamic EPSC ( $n = 8$ ) (Fig. 2*D*).

### Effect of GHB on NRT-mediated IPSCs

GHB also decreased the amplitude of NRT-derived GABA<sub>A</sub> IPSCs with a similar potency as against the EPSCs (see below), but at low concentrations (250  $\mu$ M–1 mM) it was effective on only 41% of the IPSCs. In particular, 250  $\mu$ M GHB did not produce any effect on 13 of 14 neurons (Fig. 3A), whereas a 14% reduction was observed in 1 neuron (Fig. 4A,B). Increasing the GHB concentration to 500  $\mu$ M induced a  $25 \pm 8\%$  reduction of the IPSCs in 21 of 42 neurons (Fig. 3B), whereas 1 mM GHB produced a  $29 \pm 10\%$  reduction in 9 of 19 neurons (Fig. 4A,B); however, application of 10 mM GHB induced a  $54 \pm 10\%$  decrease in every TC neuron tested ( $n = 7$ ) (Figs. 3C, 4A,B).

The GHB-induced reduction of the NRT-derived IPSCs was always fully antagonized by CGP 56999A (100 nM) ( $n = 1$  and 4, for 250 and 500  $\mu$ M GHB, respectively) (Fig. 3B). In addition, in the continuous presence of CGP 56999A (100 nM), application of GHB (500  $\mu$ M) never decreased the IPSC amplitude ( $n = 10$ ) (Fig. 3D).

In 10 of the 31 neurons that were insensitive to either 500  $\mu$ M or 1 mM GHB, we were able to apply baclofen (5–10  $\mu$ M) after washout of GHB. In each of these 10 neurons, baclofen decreased the IPSC amplitude by the same amount as in those neurons in which GHB was active (Fig. 3E).

It has been claimed that some of the actions of GHB observed *in vitro* when using high micromolar to low millimolar concentrations could be caused by its conversion to GABA via the GHB dehydrogenase (Hechler et al., 1997). If this were the case under the experimental conditions used to record IPSCs, one would have expected to see a change in holding current caused by the continuous activation of GABA<sub>A</sub> receptors. No change in holding current, however, was observed in any experiments on the IPSCs, nor has any change been reported during similar experiments in cortex and hippocampus (Jensen and Mody, 2001).

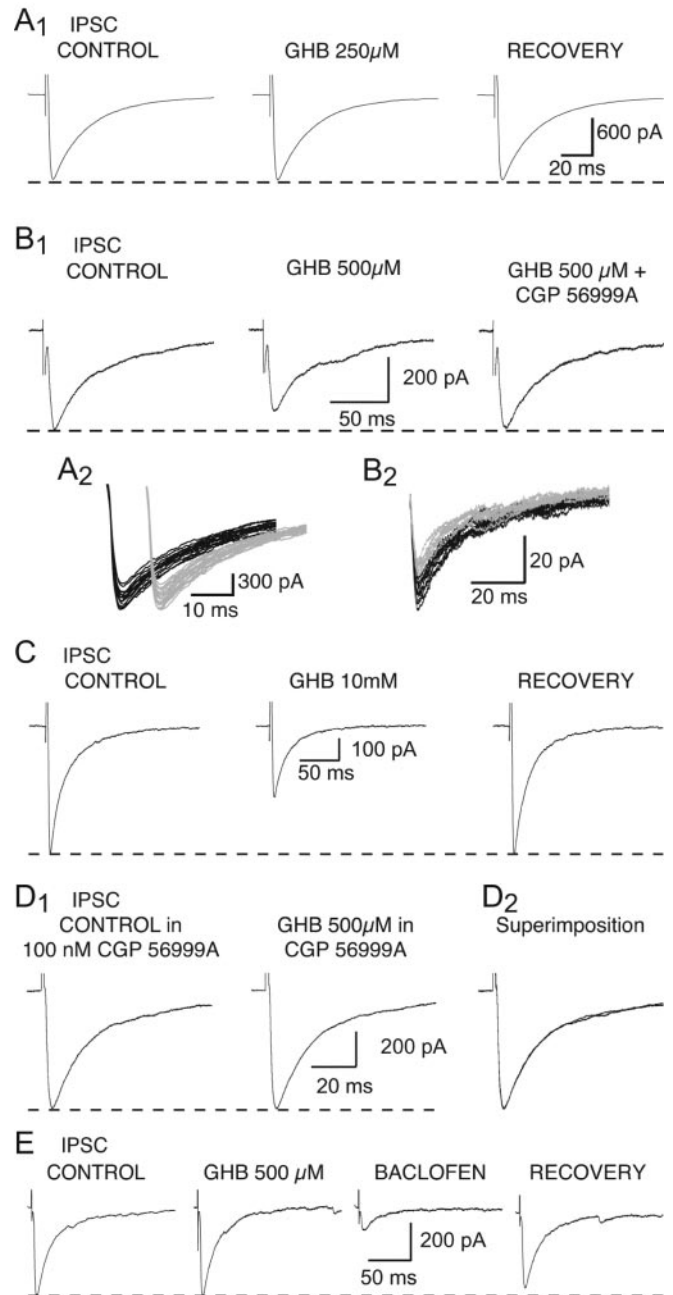
### Effects of NCS 382

To completely exclude the involvement of putative GHB receptors in the action of GHB on thalamic synaptic currents, we then looked at the effect of the putative GHB receptor antagonist NCS 382. We started by investigating the action of this compound applied alone, because no study has thoroughly addressed this issue so far.

NCS 382 at a concentration of 50–100  $\mu$ M, which has been shown to be effective against GHB action in NCB20 cells (Kemmel et al., 1998), had no effect on the EPSC amplitude ( $n = 5$ ) (Fig. 5A). At concentrations  $\geq 300$   $\mu$ M, however, NCS 382 produced a reversible increase in the EPSC amplitude. In particular, at 300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, and 1 mM, NCS 382 increased the EPSC by 10 and 20% ( $n = 2$ ), 10 and 12% ( $n = 2$ ), and  $24 \pm 4\%$  ( $n = 6$ ), respectively (Fig. 5B). Conversely, application of 1 mM NCS 382 decreased the amplitude of IPSCs by  $21 \pm 5\%$  ( $n = 4$ ) (Fig. 5C).

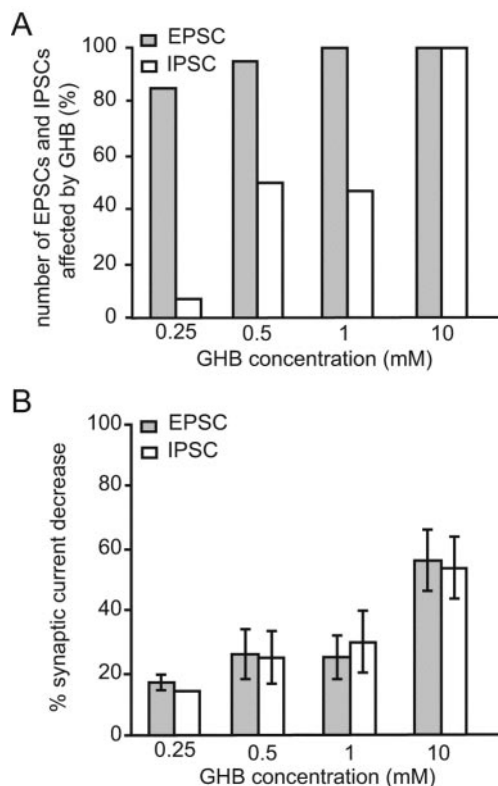
Despite the narrow range within which NCS 382 alone had no action on synaptic currents, we then tested the ability of NCS 382 to antagonize the effect of GHB. Application of NCS 382 at 100  $\mu$ M–1 mM had no effect on the GHB-elicited reduction of the EPSC (Fig. 6A), or it prevented the full block of the GHB response by a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist. In addition, at concentration  $\geq 500$   $\mu$ M, NCS 382 could elicit an additional decrease to that produced by GHB (Fig. 6B) (i.e., 20% reduction in one of three neurons tested with 500  $\mu$ M GHB and 18% in two of seven neurons tested with 1 mM GHB), as reported previously for the sensory EPSP in the same thalamic nucleus (Emri et al., 1996b).

Similarly, application of 500  $\mu$ M or 1 mM NCS 382 did not antagonize the effect of GHB (250  $\mu$ M,  $n = 1$ ; 500  $\mu$ M,  $n = 4$ ) on

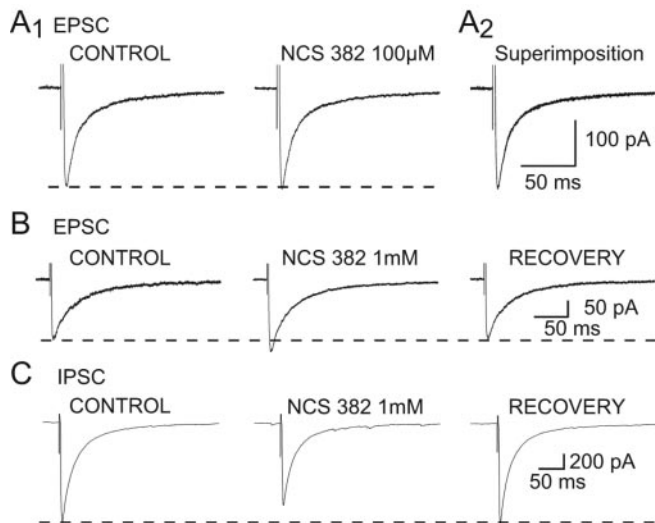


**Figure 3.** Effect of GHB on the NRT-derived IPSC. *A1*, GHB (250  $\mu$ M) has no effect on the amplitude of the GABA<sub>A</sub> IPSC. *A2*, Superimposition of the individual synaptic currents used to build up the averages presented in *A1* (control in black; GHB in gray). The IPSCs recorded in control condition and during GHB application have been offset for clarity. *B1*, GHB (500  $\mu$ M) decreases the amplitude of the IPSC by 20%. This effect is antagonized by CGP 56999A (100 nM). *B2*, Superimposition of the individual synaptic currents used to build up the averages presented in *B1* (control in black; GHB in gray). *C*, GHB at 10 mM reversibly decreases the IPSC amplitude by 48%. *D1*, In the continuous presence of CGP 56999A (100 nM), GHB (500  $\mu$ M) has no effect on the IPSC. *D2*, Superimposition of the traces shown in *D1*. *E*, Recordings from one of the VB TC neurons in which 500  $\mu$ M GHB fails to decrease the IPSC amplitude show that 10  $\mu$ M baclofen reduces this synaptic current by 72%. Each trace in *A1*, *B1*, and *C–E* is the average of 10–20 IPSCs.

the IPSC amplitude (Fig. 6C); however, in three of five neurons tested with 1 mM NCS 382, it produced an additional  $18 \pm 7\%$  decrease in the IPSC amplitude. Overall, therefore, NCS 382 shows a number of nonspecific actions on synaptic currents that drastically limit its use.

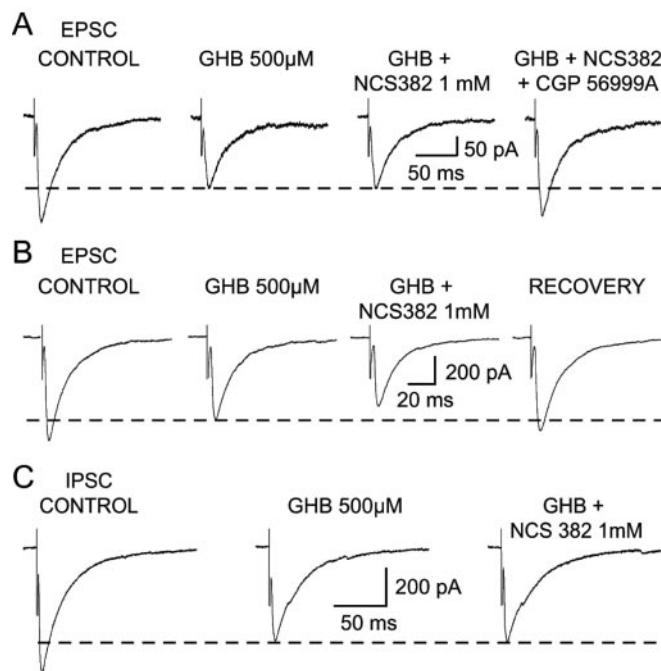


**Figure 4.** Summary of the effects of GHB on the corticothalamic EPSC and the NRT-derived GABA<sub>A</sub> IPSC. *A*, Percentage of EPSCs and IPSCs affected by different GHB concentrations. Note that although almost all EPSCs are affected by GHB (0.25–1.0 mM), a much smaller proportion of IPSCs is sensitive to these concentrations. At 10 mM, all EPSCs and IPSCs are decreased by GHB. *B*, Effect of different GHB concentrations on the amplitude of EPSCs and IPSCs. No difference in the decrease elicited by GHB is observed between EPSCs and those IPSCs that are sensitive to GHB.



**Figure 5.** Effects of NCS 382 applied alone. *A1*, NCS 382 (100 μM) has no effect on the corticothalamic EPSCs amplitude. *A2*, Superimposition of the traces shown in *A1*. *B*, NCS 382 (1 mM) produces a reversible 18% increase in the corticothalamic EPSC. *C*, NCS 382 (1 mM) produces a reversible 18% decrease in the NRT-derived IPSC. Each trace in *A–C* is the average of 10–20 EPSCs or IPSCs.

**Lack of effect of NCS 356 and *trans*-4-hydroxycrotonic acid**  
 Although GHB actions on synaptic currents were fully blocked by GABA<sub>B</sub> receptor antagonists, it might be that GHB receptor may be disclosed using more potent agonists. We therefore tested the



**Figure 6.** Effect of NCS 382 on the GHB-induced decrease of EPSCs and IPSCs. *A*, NCS 382 (1 mM) does not antagonize the GHB-induced decrease of the corticothalamic EPSC, whereas CGP 56999A (100 nM) does. *B*, Recordings from one of the neurons in which NCS 382 (1 mM) produces a decrease of the EPSC additional to that evoked by GHB on the EPSC. *C*, Lack of effect of NCS 382 (1 mM) on the GHB-induced decrease of the IPSC. Each trace in *A–C* is the average of 10–20 EPSCs or IPSCs.

effect of NCS 356 and 4-HCN, two high-affinity ligands of putative GHB receptors that have been suggested to possess agonist-like actions (Hechler et al., 1990, 1993). Application of NCS 356 (500 μM) failed to produce any change in the amplitude of the corticothalamic EPSC ( $n = 18$ ) (Fig. 7*A*) or the NRT-derived GABA<sub>A</sub> IPSC ( $n = 8$ ) (Fig. 7*B*). In the same neurons, however, subsequent application of either 500 μM GHB or 1–10 μM baclofen produced the usual reduction in the synaptic current amplitude (Fig. 7*A, B*). 4-HCN (500 μM) was also unable to affect the IPSC ( $n = 3$ ) (Fig. 7*C*).

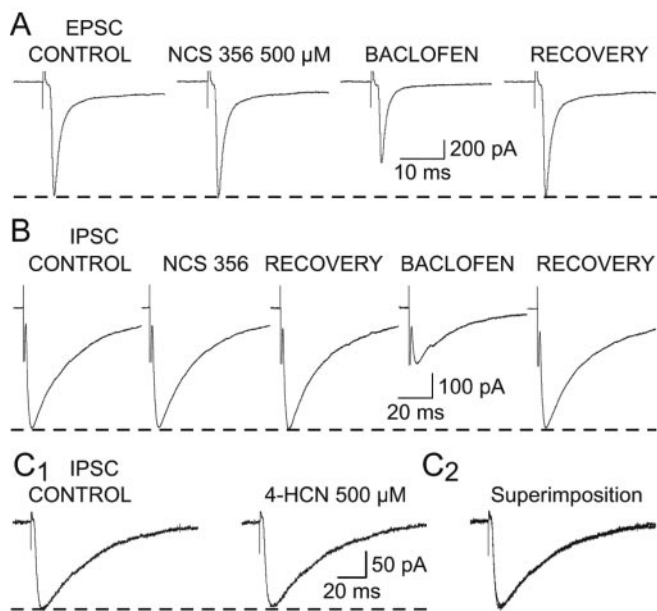
**Postsynaptic action of GHB**

GHB has already been shown to hyperpolarize TC neurons, an effect that is mediated by activation of postsynaptic GABA<sub>B</sub> receptors and insensitive to NCS 382 (Williams et al., 1995). Because in the continuous presence of GABA<sub>B</sub> antagonists the unmasking of a GHB receptor-mediated response on hippocampal synaptic currents has been reported recently (Berton et al., 1999; Cammalleri et al., 2002), we wonder whether under similar conditions a postsynaptic effect of GHB on TC neurons could also be highlighted.

From a holding potential of –60 mV, GHB (500 μM–10 mM;  $n = 32$ ) produced an outward current (Fig. 8*A, B*), with an ED<sub>50</sub> of 1.2 mM. In the continuous presence of CGP 56999A, however, at a concentration (300 nM) that fully blocked the maximal response to baclofen (10 μM) ( $n = 4$ ) (Fig. 8*C*), GHB was unable to elicit any outward current ( $n = 12$ ) (Fig. 8*B*).

**Action of GHB on intrathalamic oscillations**

Having established the action of GHB on corticothalamic EPSCs, NRT-evoked IPSCs, and TC neurons, we examined the ability of this drug to affect intrathalamic oscillations using extracellular



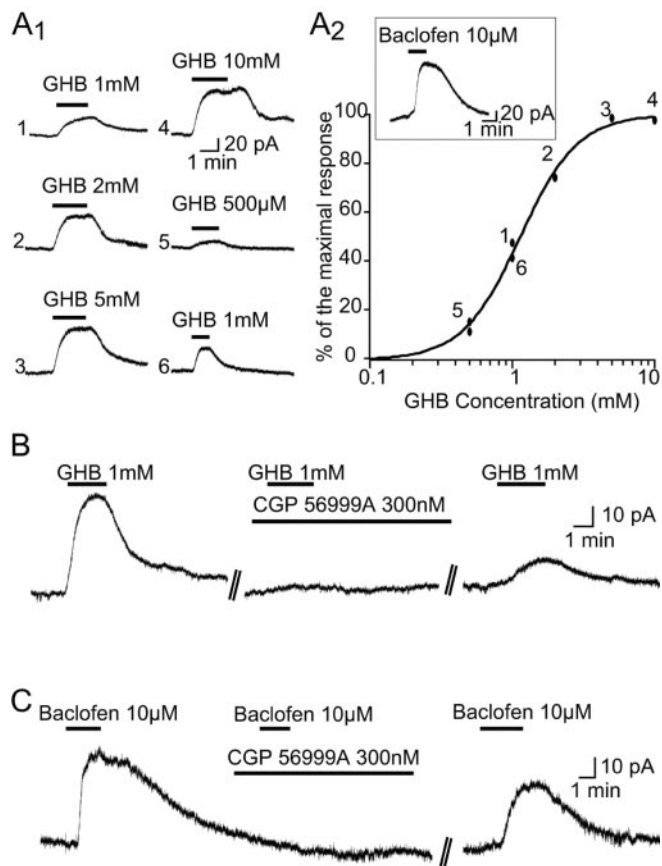
**Figure 7.** Lack of effect of NCS356 and 4-HCN on EPSCs and IPSCs. *A*, NCS356 (500  $\mu$ M) has no effect on the EPSC, whereas the decrease induced by baclofen (1  $\mu$ M) indicates that the synaptic current in this neuron is sensitive to GABA<sub>B</sub> receptor activation. *B*, NCS356 (500  $\mu$ M) fails to affect the NRT-derived IPSC, whereas the decrease induced by baclofen (10  $\mu$ M) indicates that the synaptic current in this neuron is sensitive to GABA<sub>B</sub> receptor activation. *C1*, 4-HCN (500  $\mu$ M) has no effect on the GABA<sub>A</sub> IPSC amplitude. *C2*, Superimposition of the traces shown in *C1*. Each trace in *A–C* is the average of 10–20 EPSCs or IPSCs.

recordings of multiunit activity in the VB. Stimulation of the cortical afferents, achieved by delivering a brief stimulus to the internal capsule, elicited slow intrathalamic oscillations of firing activity (frequency,  $1.5 \pm 0.4$  Hz;  $n = 9$  recordings in nine different slices) consisting of action potential bursts in few TC neurons ( $1.8 \pm 0.4$  U) with an oscillatory index of  $51 \pm 7\%$  (Fig. 9*A*). After application of 250  $\mu$ M GHB, the oscillatory response to internal capsule stimulation comprised a larger number of neurons ( $4.7 \pm 0.5$  U;  $p < 0.001$ ) and occurred at a higher frequency ( $3.1 \pm 1.0$  Hz;  $p < 0.01$ ), with an increased oscillatory index ( $72 \pm 8\%$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 9*B–D*). Interestingly, in some experiments ( $n = 3$ ), the oscillatory activity recorded in the presence of GHB became self-sustained, i.e., it no longer required electrical stimulation of the cortical afferents (data not shown). All of these effects of GHB were reversed after removal of the drug from the perfusion medium (frequency,  $1.3 \pm 0.4$  Hz; number of units,  $2.2 \pm 0.3$ ; oscillatory index,  $62 \pm 6\%$ ) (Fig. 9*A–D*). Application of 500  $\mu$ M GHB, on the other hand, abolished evoked intrathalamic oscillations in four of five cases (Fig. 9*E*).

## Discussion

The main conclusion of this investigation is that in the concentration range (250–500  $\mu$ M) that elicits SWDs, GHB instates an imbalance between the excitatory and inhibitory drives to TC neurons because it decreases 96% of corticothalamic glutamatergic EPSCs but only 43% of the NRT GABA<sub>A</sub>ergic IPSCs. Low GHB concentrations (250  $\mu$ M) also increase intrathalamic oscillations evoked by cortical stimulation.

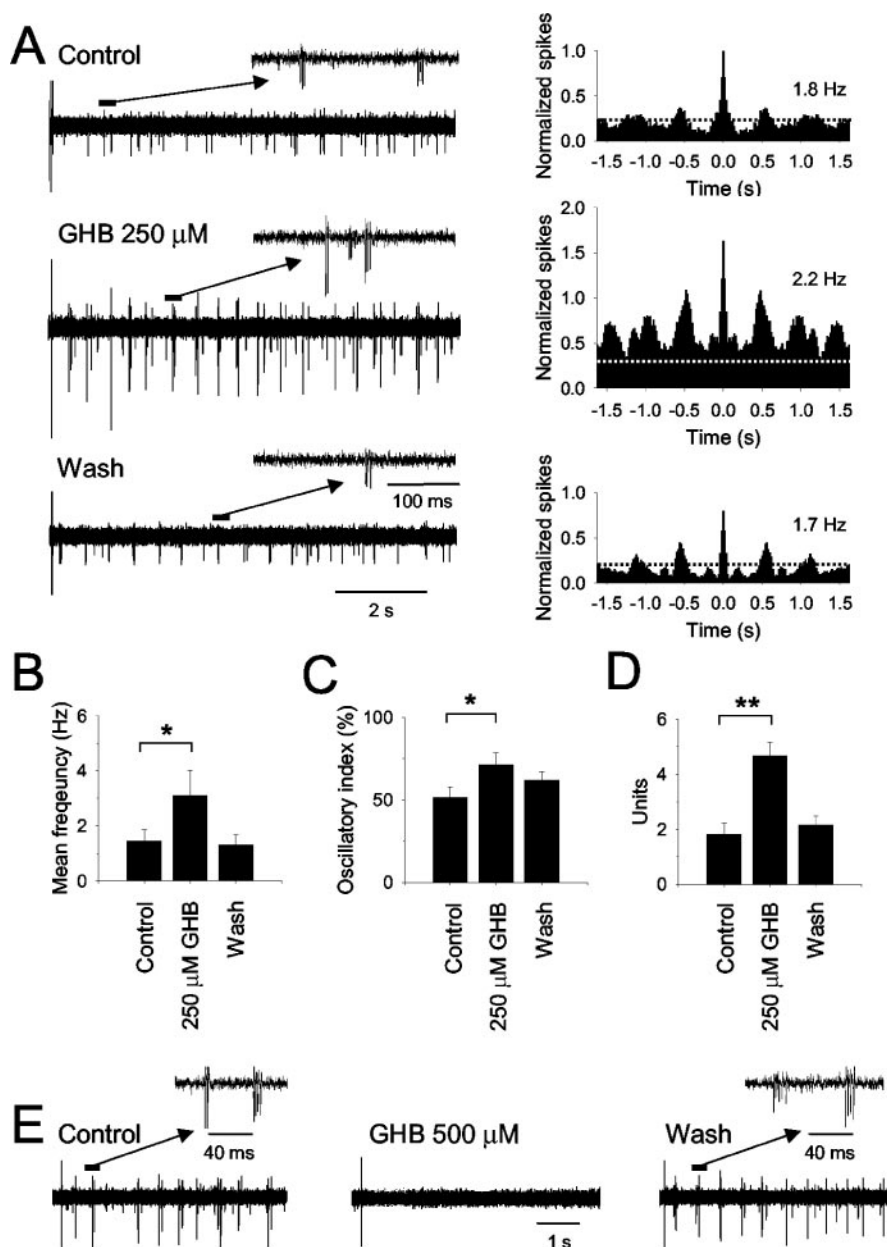
In addition, our results demonstrate that these thalamic GHB effects are mediated by GABA<sub>B</sub> receptors and strongly question the use of NCS 382 and NCS 356 and 4-HCN as putative GHB receptor antagonist and agonists, respectively.



**Figure 8.** GHB-elicited outward current. *A*, Application of GHB dose-dependently activates an outward current in a VB TC neuron (*A1*). *A2* shows the dose–response curve of the effect of GHB in one neuron. Numbers in the plot refer to the order of application, as indicated in *A1*. For comparison, the inset shows the outward current activated in the same neuron by 10  $\mu$ M baclofen. *B*, The outward current elicited by 1 mM GHB is fully antagonized by CGP 56999A (300 nM). *C*, The outward current elicited by 10  $\mu$ M baclofen is fully antagonized by CGP 56999A (300 nM).

## GABA<sub>B</sub> versus GHB receptors

That all GHB actions in VB are mediated by GABA<sub>B</sub> receptors is in agreement with previous *in vitro* electrophysiological experiments in another thalamic nucleus (Williams et al., 1995; Emri et al., 1996b) and any brain areas examined so far, i.e., substantia nigra (Harris et al., 1989), hippocampus (Xie and Smart, 1992b; King et al., 1997), ventral tegmental area (VTA) (Madden and Johnson, 1998), and cortex (Jensen and Mody, 2001). Berton et al. (1999) and Cammalleri et al. (2002), however, reported that in the presence of CGP 35348 (500  $\mu$ M) or CGP 55845 (1  $\mu$ M), application of GHB (600  $\mu$ M) decreases EPSPs or GABA<sub>A</sub> IPSPs, respectively, in CA1 neurons *in vitro*, an effect abolished by NCS 382. Using a similar protocol, we did not detect any GHB receptor-mediated action on thalamic EPSCs and IPSCs. Although this discrepancy may reflect a real difference between thalamus and hippocampus, it is likely that GHB was still acting on presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors in these two hippocampal studies, because 1 mM is necessary to fully block presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors in this area (Davies et al., 1991). Indeed, Berton et al. (1999) and Cammalleri et al. (2002) did not test whether presynaptic GABA<sub>B</sub> receptors were fully blocked. Furthermore, although these studies reported no effect of 500  $\mu$ M NCS 382 alone, an increase (11 and 65% at 100  $\mu$ M and 2 mM, respectively) has been observed in hippocampal field potentials (King et al., 1997),



**Figure 9.** Effect of GHB on population activity in the VB. *A*, In control conditions, the response to stimulation of the cortical afferents recorded in the VB shows a period of transient multiunit bursting with a dominant frequency of 1.8 Hz (see autocorrelogram on the right; bin width 20 msec). After application of 250  $\mu\text{M}$  GHB, the response comprises activity from an increased number of neurons, leading to an increase in the total spike count, and occurs at a higher frequency (2.2 Hz) (see autocorrelogram on the right). After washout of GHB, the response is again characterized by fewer bursting neurons and occurs at a lower frequency (1.7 Hz). All autocorrelograms were normalized to the peak value obtained in control conditions. The dotted lines in the autocorrelogram indicate the 99% confidence limit. *B–D*, Summary (from 9 multiunit recordings in 9 different slices) of the effect of 250  $\mu\text{M}$  GHB on the oscillation frequency (*B*), the oscillatory index (see Materials and Methods) (*C*), and the number of units comprising the oscillatory response (*D*) (\* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ ). *E*, After a brief stimulus delivered to the internal capsule, an extracellular recording in the VB displays transient neuronal activity consisting of action potential bursts in a small number of TC neurons (see enlarged section). This response is reversibly abolished by application of 500  $\mu\text{M}$  GHB.

and our analysis has highlighted nonspecific NCS 382 effects in thalamus.

#### Physiologically relevant GHB receptors?

Two critical issues still confound our understanding of brain GHB effects. It has been suggested that submicromolar to low micromolar GHB concentrations are needed to evoke GHB responses mediated by putative GHB receptors; however, the only

*in vitro* studies that reported electrophysiological effects of GHB concentrations  $< 100 \mu\text{M}$  (Crunelli and Leresche, 2002b) are in cell lines (Kemmel et al., 1998; Kemmel et al., 2003). In all other *in vitro* studies, including those in areas with high GHB binding sites (e.g., VTA, cortex, hippocampus, thalamus), a threshold GHB concentration of 100–300  $\mu\text{M}$  was required to observe GHB effects (Harris et al., 1989; Xie and Smart, 1992a; Williams et al., 1995; Emri et al., 1996b; Madden and Johnson, 1998), and these responses were then invariably abolished by GABA<sub>B</sub> antagonists. With regard to *in vivo* investigations, most of the studies using systemic or iontophoretic applications of GHB (Diana et al., 1991; Engberg and Nissbrandt, 1993; Godbout et al., 1995; Aizawa et al., 1997) cannot help to clarify this issue because the brain GHB concentration was not measured. On the other hand, the expression of SWDs (i.e., the only behavioral effect of systemically injected GHB for which the brain GHB concentration–response curve is available) requires a threshold brain GHB concentration of 240  $\mu\text{M}$  (Snead, 1991), and here we have indeed shown that 250  $\mu\text{M}$  GHB fully acts on GABA<sub>B</sub> receptors (Williams et al., 1995; Emri et al., 1996b).

Furthermore, it has been claimed that the block by systemic NCS 382 of the behavioral and *in vivo* electrophysiological effects of GHB supports the existence of GHB receptors (Maitre, 1997). We would argue, however, that because the brain NCS 382 concentration after systemic administration has never been measured, any apparent block of GHB effects by NCS 382 *in vivo* should be treated with caution, because it may result from any of its non-specific actions in thalamus (Emri et al., 1996b; this study) and hippocampus (King et al., 1997), as well as in the cerebellum, which has no GHB binding sites (Bernasconi et al., 2002). This negative view of the existence of physiologically relevant brain GHB receptors is also supported by the lack of action on thalamic EPSCs and IPSCs of NCS 356 and 4-HCN (this study), two high-affinity GHB receptor ligands—antagonists in cell lines (Kemmel et al., 2003) and in biochemical tests (Hechler et al., 1990, 1993), and by the inability of 4-HCN

to elicit SWDs *in vivo* (Depaulis et al., 1988).

#### Thalamic GABA<sub>B</sub> receptor subtypes

The existence of GABA<sub>B</sub> receptor subtypes (Bonanno and Raiteri, 1993; Guyon and Leresche, 1995) and of a presynaptic GHB–GABA<sub>B</sub> receptor complex (Banerjee and Snead, 1995) has been proposed, although no support from cloning studies is available yet. Interestingly, GABA<sub>B</sub>R1a/b and GABA<sub>B</sub>R2 immunoreactiv-



ity was detected only on postsynaptic elements in the VB (i.e., on TC neurons) (Kulik et al., 2002). The lack of GABA<sub>B</sub> immunoreactivity in VB presynaptic elements is surprising when compared with this and previous electrophysiological studies and has been explained by the existence of yet unidentified GABA<sub>B</sub> clones (Kulik et al., 2002). In this respect, our findings that ~60% of GABA<sub>A</sub> IPSCs in VB are unaffected by low GHB concentrations but show a normal sensitivity to baclofen would suggest the existence of thalamic GABA<sub>B</sub> autoreceptor subtype(s) with a low sensitivity to GHB. Interestingly, the threshold concentration for GABA<sub>B</sub>-mediated effects of GHB in cortex and hippocampus (Jensen and Mody, 2001) is 10-fold higher than in thalamus.

### Mechanism of GHB-elicited SWDs and decreased states of vigilance

A preferential effect of GHB on basal glutamate versus GABA release *in vivo* was shown in VB (Banerjee and Snead, 1995) but not in cortex (Hu et al., 2000), although the significance of changes in basal thalamic release for the EEG expression of a paroxysmal activity is unclear. Electrophysiologically, low (250  $\mu$ M–1 mM) GHB concentrations hyperpolarize TC neurons (Williams et al., 1995) and decrease with a similar potency sensory EPSPs (Emri et al., 1996b), corticothalamic EPSCs, and 40% of GABA<sub>A</sub> IPSCs in VB, whereas the remaining IPSCs are unaffected (this study). On the basis of these results, and because SWDs can be elicited by direct injection of GHB into the VB (Snead, 1991), we suggest that a substantial component of the mechanism underlying the generation of SWDs by systemic GHB is caused by an imbalance of the physiological excitatory and inhibitory drives to TC neurons in favor of an increased inhibition. This would not only tend to slightly hyperpolarize TC neurons and decrease their afferent corticothalamic and sensory excitatory volleys, but would also leave the TC neuron population with a substantial proportion of unaltered NRT phasic inhibition, thus helping to impose that periodic inhibition that sculpts the electrical behavior of TC neuron during this paroxysmal activity (Steriade and Contreras, 1995; Pinault et al., 1998; Huntsman et al., 1999; Blumenfeld and McCormick, 2000; Tancredi et al., 2000; D'Arcangelo et al., 2002; Slight et al., 2002). The ability of low (250  $\mu$ M) GHB concentrations to increase absence-like intrathalamic oscillations clearly supports this view. It should be pointed out, however, that in addition to directly activating corticothalamic excitatory synapses, internal capsule stimulation will also strongly excite NRT neurons by activating both corticothalamic and thalamocortical fibers. Furthermore, because the NRT plays a key role in the maintenance and initiation of intrathalamic oscillations, the involvement of specific GHB-mediated effects in this nucleus should not be discounted when attempting to understand the pro-rhythmic actions of this drug. Whether an imbalance of excitatory and inhibitory drives might account for other GHB actions also remains to be elucidated, although it is worth noting that in VTA a differential control of EPSCs and IPSCs was recently suggested to underlie the rewarding properties of nicotine (Mansvelder et al., 2002).

Another critical feature of the GHB model of absence seizures that can also be explained by our results is the finding that SWDs are evoked within a narrow range of GHB concentrations (240–500  $\mu$ M in the rat), because higher concentrations lead to a progressive slowing of the EEG associated with increasingly strong sedation and sleep promotion (Snead et al., 1976; Snead, 1991). Our results show that at a GHB concentration of 250  $\mu$ M, the imbalance between the excitatory and inhibitory drives to TC neurons is already present and that slow intrathalamic oscillations

are increased. At 500  $\mu$ M, although the preferential effect on EPSCs versus IPSCs remains, the oscillations are partly abolished, probably because the (postsynaptic) activation of G-protein gated inward rectifying K<sup>+</sup> current (GIRK) is stronger. At even higher concentrations, the dampening of both excitatory and inhibitory inputs, together with the increasing GIRK activation, would result in a stronger hyperpolarization of TC neurons, necessary to express those intrinsic–network activities associated with states of progressively decreasing vigilance (Steriade, 2000; Hughes et al., 2002). This thalamic action, together with similar effects on cortical neurons (Godbout et al., 1995; Jensen and Mody, 2001), might well account for the sedation and normalization of sleep patterns, which are exploited in the illicit use of GHB and its clinical use in narcolepsy, respectively.

### References

- Agmon A, Connors BW (1991) Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex *in vitro*. *Neuroscience* 41:365–379.
- Aizawa M, Ito Y, Fukuda H (1997) Roles of gamma-aminobutyric acid (GABA<sub>B</sub>) and gamma-hydroxybutyric acid receptors in hippocampal long-term potentiation and pathogenesis of absence seizures. *Biol Pharmacol Bull* 20:1066–1070.
- Banerjee PK, Snead III OC (1995) Presynaptic gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-aminobutyric acid (GABA<sub>B</sub>) receptor-mediated release of GABA and glutamate (GLU) in rat thalamic ventrobasal nucleus (VB): a possible mechanism for the generation of absence-like seizures induced by GHB. *J Pharmacol Exp Ther* 273:1534–1543.
- Bernasconi R, Mathivet P, Bischoff S, Marescaux C (1999) Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential? *Trends Pharmacol Sci* 20:135–141.
- Bernasconi R, Mathivet P, Otten U, Bettler B, Bischoff S, Marescaux C (2002) Part of the pharmacological actions of  $\gamma$ -hydroxybutyrate are mediated by GABA<sub>B</sub> receptors. In: *Gamma-hydroxybutyrate: molecular, functional and clinical aspects* (Tunnicliff G, Cash CD, eds), pp 29–63. New York: Taylor and Francis.
- Berton F, Brancucci A, Beghe F, Cammalleri M, Demuro A, Francesconi W, Gessa GL (1999) Gamma-hydroxybutyrate inhibits excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 380:109–116.
- Blumenfeld H, McCormick DA (2000) Corticothalamic inputs control the pattern of activity generated in thalamocortical networks. *J Neurosci* 20:5153–5162.
- Bonanno G, Raiteri M (1993) Multiple GABA<sub>B</sub> receptors. *Trends Pharmacol Sci* 14:259–261.
- Boyce SH, Padgham K, Miller LD, Stevenson J (2000) Gamma hydroxybutyric acid (GHB): an increasing trend in drug abuse. *Eur J Emerg Med* 7:177–181.
- Cammalleri M, Brancucci A, Berton F, Loche A, Gessa GL, Francesconi W (2002) Gamma-hydroxybutyrate reduces GABA(A)-mediated inhibitory postsynaptic potentials in the CA1 region of hippocampus. *Neuropharmacology* 27:960–969.
- Cash C, Tunnicliff G (2002) The  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptor in the brain. In: *Gamma-hydroxybutyrate: molecular, functional and clinical aspects* (Tunnicliff G, Cash D, eds), pp 17–27. New York: Taylor and Francis.
- Crunelli V, Leresche N (2002a) Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* 3:371–382.
- Crunelli V, Leresche N (2002b) Action of  $\gamma$ -hydroxybutyrate on neuronal excitability and underlying membrane conductances. In: *Gamma-hydroxybutyrate: molecular, functional and clinical aspects* (Tunnicliff G, Cash CD, eds), pp 75–110. New York: Taylor and Francis.
- D'Arcangelo G, D'Antuono M, Biagini G, Warren R, Tancredi V, Avoli M (2002) Thalamocortical oscillations in a genetic model of absence seizures. *Eur J Neurosci* 16:2383–2393.
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL (1991) GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349:609–611.
- Depaulis A, Bourguignon JJ, Marescaux C, Vergnes M, Schmitt M, Micheletti G, Warter JM (1988) Effects of gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone derivatives on spontaneous generalized non-convulsive seizures in the rat. *Neuropharmacology* 27:683–689.
- Diana M, Mereu G, Mura A, Fadda F, Passino N, Gessa G (1991) Low doses

- of gamma-hydroxybutyric acid stimulate the firing rate of dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Res* 566:208–211.
- Eaton SA, Salt TE (1996) Role of *N*-methyl-*D*-aspartate and metabotropic glutamate receptors in corticothalamic excitatory postsynaptic potentials in vivo. *Neuroscience* 73:1–5.
- Emri Z, Turner JP, Crunelli V (1996a) Tonic activation of presynaptic GABA(B) receptors on thalamic sensory afferents. *Neuroscience* 72:689–698.
- Emri Z, Antal K, Crunelli V (1996b) Gamma-hydroxybutyric acid decreases thalamic sensory excitatory postsynaptic potentials by an action on presynaptic GABA(B) receptors. *Neurosci Lett* 216:121–124.
- Engberg G, Nissbrandt H (1993) Gamma-hydroxybutyric acid (GHB) induces pacemaker activity and inhibition of substantia nigra dopamine neurons by activating GABA(B)-receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 348:491–497.
- Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT, Francesconi W, Loche A, Gessa GL, Antonelli T (2001) Gamma-hydroxybutyrate modulation of glutamate levels in the hippocampus: an in vivo and in vitro study. *J Neurochem* 78:929–939.
- Godbout R, Jelenic P, Labrie C, Schmitt M, Bourguignon JJ (1995) Effect of gamma-hydroxybutyrate and its antagonist NCS-382 on spontaneous cell firing in the prefrontal cortex of the rat. *Brain Res* 673:157–160.
- Guyon A, Leresche N (1995) Modulation by different GABA(B) receptor types of voltage-activated calcium currents in rat thalamocortical neurones. *J Physiol (Lond)* 485:29–42.
- Harris NC, Webb C, Greenfield SA (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, Schmitt M, Bourguignon JJ, 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, Gobaille S, 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.
- Hechler V, Peter P, Gobaille S, Bourguignon JJ, Schmitt M, Ehrhardt JD, Mark J, Maitre M (1993) Gamma-hydroxybutyrate ligands possess antidopaminergic and neuroleptic-like activities. *J Pharmacol Exp Ther* 264:1406–1414.
- Hechler V, Ratomponirina C, Maitre M (1997) Gamma-hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacement of GABA(B) binding that is blocked by valproate and ethosuximide. *J Pharmacol Exp Ther* 281:753–760.
- Hu RQ, Banerjee PK, Snead III OC (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.
- Hughes SW, Cope DW, Bleythyn KL, Crunelli V (2002) Cellular mechanisms of the slow (1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons in vitro. *Neuron* 33:947–958.
- Huntsman MM, Porcello DM, Homanics GE, DeLorey TM, Huguenard JR (1999) Reciprocal inhibitory connections and network synchrony in the mammalian thalamus. *Science* 283:541–543.
- Jensen K, Mody I (2001) GHB depresses fast excitatory and inhibitory synaptic transmission via GABA(B) receptors in mouse neocortical neurons. *Cereb Cortex* 11:424–429.
- Kao CQ, Coulter DA (1997) Physiology and pharmacology of corticothalamic stimulation-evoked responses in rat somatosensory thalamic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 77:2661–2676.
- Kemmel V, Taleb O, Perard A, Andriamampandry C, Siffert JC, Mark J, Maitre M (1998) Neurochemical and electrophysiological evidence for the existence of a functional gamma-hydroxybutyrate system in NCB-20 neurons. *Neuroscience* 86:989–1000.
- 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 D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW, Shin HS (2001) Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* 31:35–45.
- Kim U, Sanchez-Vives MV, McCormick DA (1997) Functional dynamics of GABAergic inhibition in the thalamus. *Science* 278:130–134.
- King MA, Thinschmidt JS, Walker DW (1997) Gammahydroxybutyrate (GHB) receptor ligand effects on evoked synaptic field potentials in CA1 of the rat hippocampal slice. *J Neural Transm* 104:1177–1193.
- Kleinschmidt S, Grundmann U, Knocke T, Silomon M, Bach F, Larsen R (1998) Total intravenous anaesthesia with gamma-hydroxybutyrate (GHB) and sufentanil in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a comparison in patients with unimpaired and impaired left ventricular function. *Eur J Anaesthesiol* 15:559–564.
- Kulik A, Nakadate K, Nyiri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R (2002) Distinct localization of GABA(B) receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus. *Eur J Neurosci* 15:291–307.
- Lammers GJ, Arends J, Declerck AC, Ferrari MD, Schouwink G, Troost J (1993) Gammahydroxybutyrate and narcolepsy: a double-blind placebo-controlled study. *Sleep* 16:216–220.
- Le Feuvre Y, Fricker D, Leresche N (1997) GABAA receptor-mediated IPSCs in rat thalamic sensory nuclei: patterns of discharge and tonic modulation by GABA(B) autoreceptors. *J Physiol (Lond)* 502:91–104.
- 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.
- Madden TE, Johnson SW (1998) Gamma-hydroxybutyrate is a GABA(B) 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, Hechler V, Vayer P, Gobaille S, Cash CD, Schmitt M, Bourguignon JJ (1990) A specific gamma-hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties. *J Pharmacol Exp Ther* 255:657–663.
- Mansvelter HD, Keath JR, McGehee DS (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33:905–919.
- Mehta AK, Muschawek NM, Maeda DY, Coop A, Ticku MK (2001) Binding characteristics of the gamma-hydroxybutyric acid receptor antagonist [(3H)](2E)-(5-hydroxy-5, 7, 8, 9-tetrahydro-6H-benzo[a][7]annulen-6-ylidene) ethanoic acid in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 299:1148–1153.
- Monnier Z, Paupardin-Tritsch D, Leresche N (2000) Effect of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid on cortical EPSCs and NRT-mediated IPSCs in the rat sensory thalamus. *Soc Neurosci Abstr* 26:274.3.
- Nicholson KL, Balster RL (2001) GHB: a new and novel drug of abuse. *Drug Alcohol Depend* 63:1–22.
- Pinault D, Leresche N, Charpier S, Deniau JM, Marescaux C, Vergnes M, Crunelli V (1998) Intracellular recordings in thalamic neurones during spontaneous spike and wave discharges in rats with absence epilepsy. *J Physiol (Lond)* 509:449–456.
- Poldrugo F, Addolorato G (1999) The role of gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcoholism: from animal to clinical studies. *Alcohol* 34:15–24.
- Salt TE (2002) Glutamate receptor functions in sensory relay in the thalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1759–1766.
- Schmidt C, Gobaille S, Hechler V, Schmitt M, Bourguignon JJ, Maitre M (1991) Anti-sedative and anti-cataleptic properties of NCS-382, a gamma-hydroxybutyrate receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 203:393–397.
- Slaght SJ, Leresche N, Deniau JM, Crunelli V, Charpier S (2002) Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges. *J Neurosci* 22:2323–2334.
- Snead III OC (1991) The gamma-hydroxybutyrate model of absence seizures: correlation of regional brain levels of gamma-hydroxybutyric acid and gamma-butyrolactone with spike wave discharges. *Neuropharmacology* 30:161–167.
- Snead III OC (1995) Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann Neurol* 37:146–157.
- Snead III OC (1996) Presynaptic GABA(B)- and gamma-hydroxybutyric acid-mediated mechanisms in generalized absence seizures. *Neuropharmacology* 35:359–367.
- Snead III OC, Yu RK, Huttenlocher PR (1976) Gamma hydroxybutyrate. Correlation of serum and cerebrospinal fluid levels with electroencephalographic and behavioral effects. *Neurology* 26:51–56.

- Snead III OC, Banerjee PK, Burnham M, Hampson D (2000) Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci* 20:6218–6224.
- Steriade M (2000) Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* 101:243–276.
- Steriade M, Contreras D (1995) Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity. *J Neurosci* 15:623–642.
- Steriade M, Jones EG, McCormick DA (1997) *Thalamus*. Oxford: Elsevier Science.
- Tancredi V, Biagini G, D'Antuono M, Louvel J, Pumain R, Avoli M (2000) Spindle-like thalamocortical synchronization in a rat brain slice preparation. *J Neurophysiol* 84:1093–1097.
- Tunncliffe G, Cash C (2002) *Gamma-hydroxybutyrate: molecular, functional and clinical aspects*. New York: Taylor and Francis.
- Ulrich D, Huguenard JR (1996) GABAB receptor-mediated responses in GABAergic projection neurones of rat nucleus reticularis thalami in vitro. *J Physiol (Lond)* 493:845–854.
- Williams SR, Turner JP, Crunelli V (1995) Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABAB, receptor-mediated hyperpolarization. *Neuroscience* 66:133–141.
- Xie X, Smart TG (1992a) Gamma-hydroxybutyrate hyperpolarizes hippocampal neurones by activating GABAB receptors. *Eur J Pharmacol* 212:291–294.
- Xie X, Smart TG (1992b) Gamma-hydroxybutyrate depresses monosynaptic excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 223:193–196.

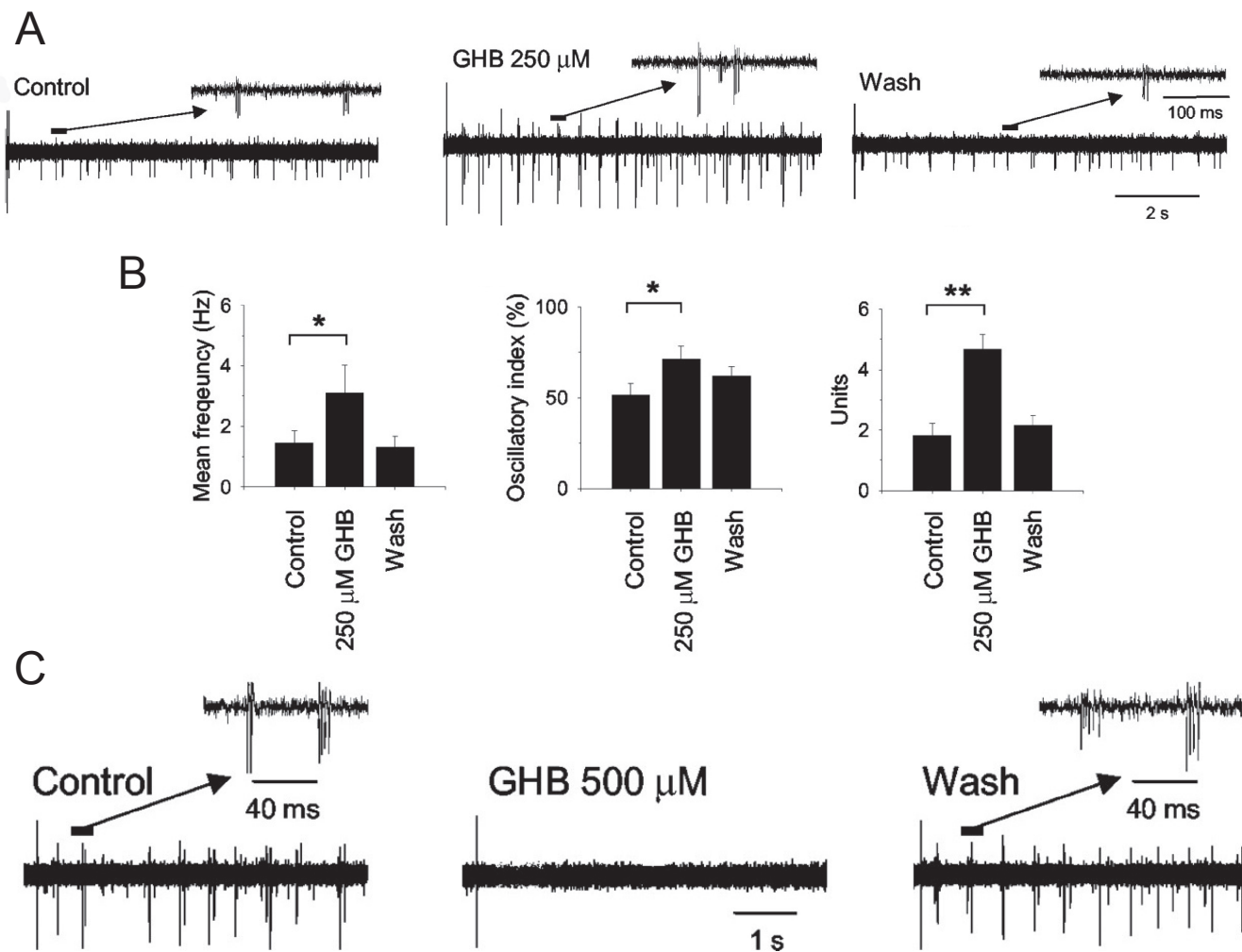
# Discussion

## ***Mécanismes cellulaires d'action du GHB.***

### 1. Crise d'épilepsie absence

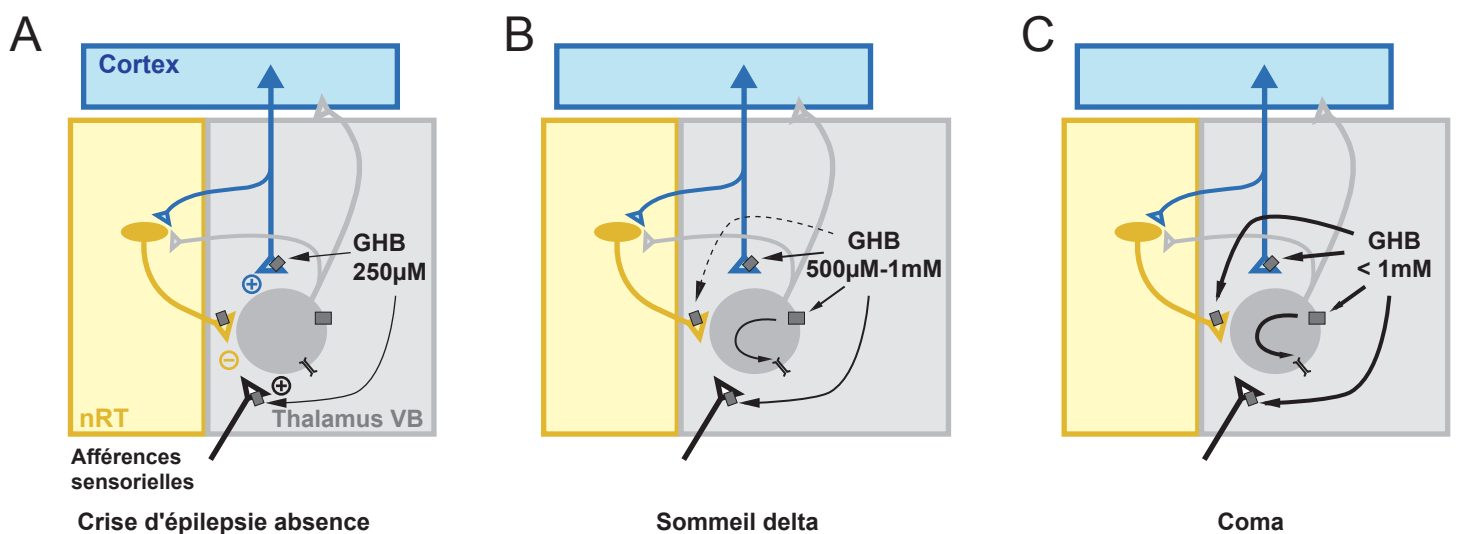
Au cours de notre étude (Gervasi *et al.*, 2003), nous avons montré qu'à faible concentration (250 $\mu$ M), le GHB diminue d'environ 20% l'amplitude des CPSE en provenance du cortex et n'a pas d'effet sur les CPSI venant du nRT. A ces concentrations, le GHB diminue également l'amplitude des potentiels post synaptiques excitateurs des afférences sensorielles (Emri *et al.*, 1996). De plus, cette diminution des entrées excitatrices est associée à une activation modérée des canaux GIRK qui vont hyperpolariser les neurones TC (Williams *et al.*, 1995). Sur des oscillations intrathalamiques, mettant en jeu un ensemble de neurones TC enregistrés après une stimulation des fibres corticales, nous avons montré une augmentation de la récurrence d'activités rythmiques (figure 11A).

Cette concentration de 250 $\mu$ M est particulièrement pertinente puisqu'elle correspond à la concentration seuil d'induction des crises d'épilepsie chez les rongeurs (Snead, 1991). Il faut noter que chez le rat une injection de GHB dans le thalamus VB est suffisante pour produire l'apparition de décharges pointes-ondes (Liu *et al.*, 1991; Snead, 1991). Nos résultats indiquent que le GHB, à cette concentration, produit un déséquilibre de la balance excitation / inhibition et en favorisant l'inhibition, en provenance du nRT, conduit à une augmentation du taux de décharge et de synchronisation des neurones TC (figure 11B). Nous supposons que l'ensemble des modifications de l'excitabilité du réseau thalamique, en présence de faibles concentrations de GHB, soit à l'origine de l'induction des activités pathologiques observées lors des crises d'épilepsies absence (figure 12A).



**Figure 11** : Effet du GHB sur l'activité des neurones thalamocorticaux du thalamus VB.

**A**, Oscillations intrathalamiques enregistrées en réponse à une stimulation des afférences corticales avant et après application de GHB (250 $\mu\text{M}$ ). **B**, Moyenne des effets de 250 $\mu\text{M}$  GHB sur la fréquence d'oscillation, index d'oscillation et le nombre d'unité par oscillation. **C**, Oscillations intrathalamiques enregistrées en réponse à une stimulation des afférences corticales avant et après application de 500 $\mu\text{M}$  de GHB (D'après Gervasi et coll 2003).



**Figure 12** : Schéma récapitulatif des effets du GHB dans le thalamus VB et corrélation avec l'apparition de rythmes physiologiques et pathologiques.

**A**, A des concentrations de l'ordre de 250 $\mu\text{M}$ , le GHB déprime les afférences glutamatergiques ce qui produit l'apparition de décharges pointes-ondes. **B**, A des concentrations comprises entre 500 $\mu\text{M}$  et 1mM, le GHB agit sur les afférences excitatrices et hyperpolarise les neurones TC, ce qui arrête les oscillations intrathalamiques et abolit les décharges pointes-ondes. **C**, Pour des concentrations supérieures à 1mM, le GHB déprime tous les neurones de la boucle thalamocorticale et déconnecte l'ensemble du réseau.

## 2. Augmentation des périodes de sommeil de stade 3 et 4

A des concentrations comprises entre 500 $\mu$ M et 1mM, le GHB réduit l'amplitude de l'ensemble des CPSE et d'environ 50% des CPSI. Il faut ajouter à cette diminution des courants synaptiques une activation des canaux GIRK des neurones TC.

L'administration de GHB produit une apparition d'ondes delta sur l'EEG signature électrophysiologique des stades 3 et 4 du sommeil. Le GHB en réduisant l'amplitude des entrées synaptiques et en hyperpolarisant les neurones TC va produire une hyperpolarisation progressive des neurones de la boucle thalamocorticale. L'ensemble de ces effets pouvant conduire au développement d'activité électrique de type delta corrélée physiologiquement à une diminution des états de vigilance (figure 12B) (Steriade, 2000; Hughes *et al.*, 2002).

Enfin à plus forte concentration, le GHB produit une très forte hyperpolarisation des neurones TC et réduit fortement le poids des afférences sensorielles, corticales et intrathalamiques ce qui conduit à une déconnection fonctionnelle de l'ensemble des partenaires de la boucle thalamocorticale et conduit au coma (figure 12C) (Hughes *et al.*, 2002).

Au cours de cette étude nous avons également démontré que l'ensemble des effets du GHB sur l'excitabilité thalamique était attribuable à une activation des récepteurs GABA<sub>B</sub>. Nous montrons également que les autorécepteurs GABA<sub>B</sub> présents sur les afférences en provenance du nRT ont une sensibilité plus faible au GHB que les hétérorécepteurs présents sur les afférences excitatrices et les neurones TC. Ces différences de sensibilité entre les récepteurs GABA<sub>B</sub> ont également été retrouvées dans d'autres régions du SNC et permettent de rendre compte d'autres effets fonctionnels du GHB.

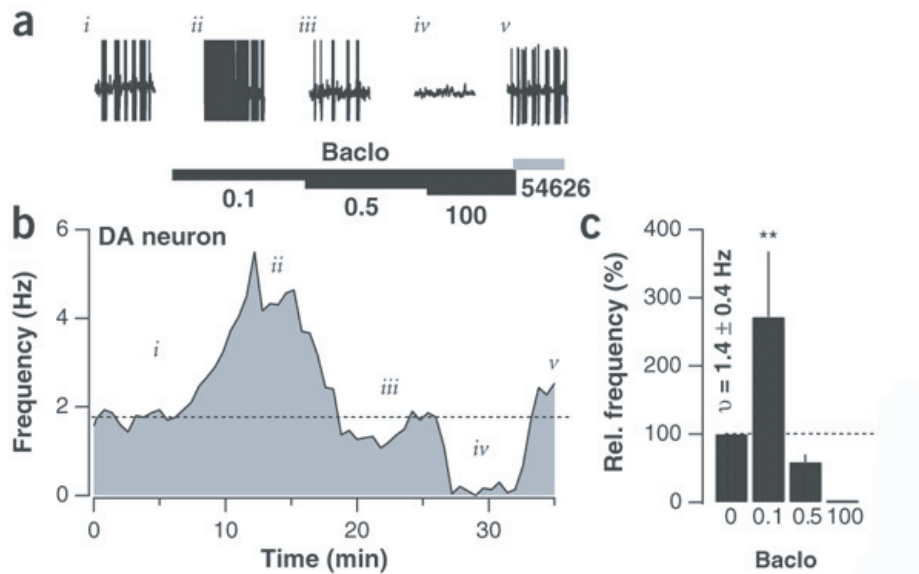
### 3. Action bi-directionnelle des agonistes GABA<sub>B</sub> dans l'aire tegmentale ventrale.

Chez le rongeur, le baclofen réduit l'auto-administration de psychostimulants (Brebner *et al.*, 2002). Le GHB possède un comportement beaucoup plus complexe puisqu'il peut produire des bénéfices lors du sevrage de certaines drogues ou des comportements de fortes dépendances (Martellotta *et al.*, 1998; Dyer *et al.*, 2001). Ces effets des agonistes GABA<sub>B</sub> impliquent les circuits de la récompense (ou système hédonique) et plus particulièrement le système dopaminergique mésolimbique (figure 3B). Les substances psychostimulantes modifient l'activité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) et augmentent de la libération de dopamine. Cette modification de la concentration de dopamine est impliquée dans la mise en place des comportements dépendants (Everitt & Robbins, 2005).

Une étude récente menée par le groupe de Luscher s'est intéressée aux effets du GHB sur les neurones de l'aire tegmentale ventrale (ATV). Cette étude démontre que les interneurones GABAergiques ont une sensibilité plus grande au GHB et au baclofen que les neurones dopaminergiques (Cruz *et al.*, 2004). Cette différence de sensibilité est à l'origine d'une modulation bi-directionnelle de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de l'ATV. A faibles concentrations, les agonistes GABA<sub>B</sub> augmente la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques et à des concentrations plus fortes, ces agonistes diminuent le nombre de potentiel d'action émis par les neurones dopaminergiques (figure 13).

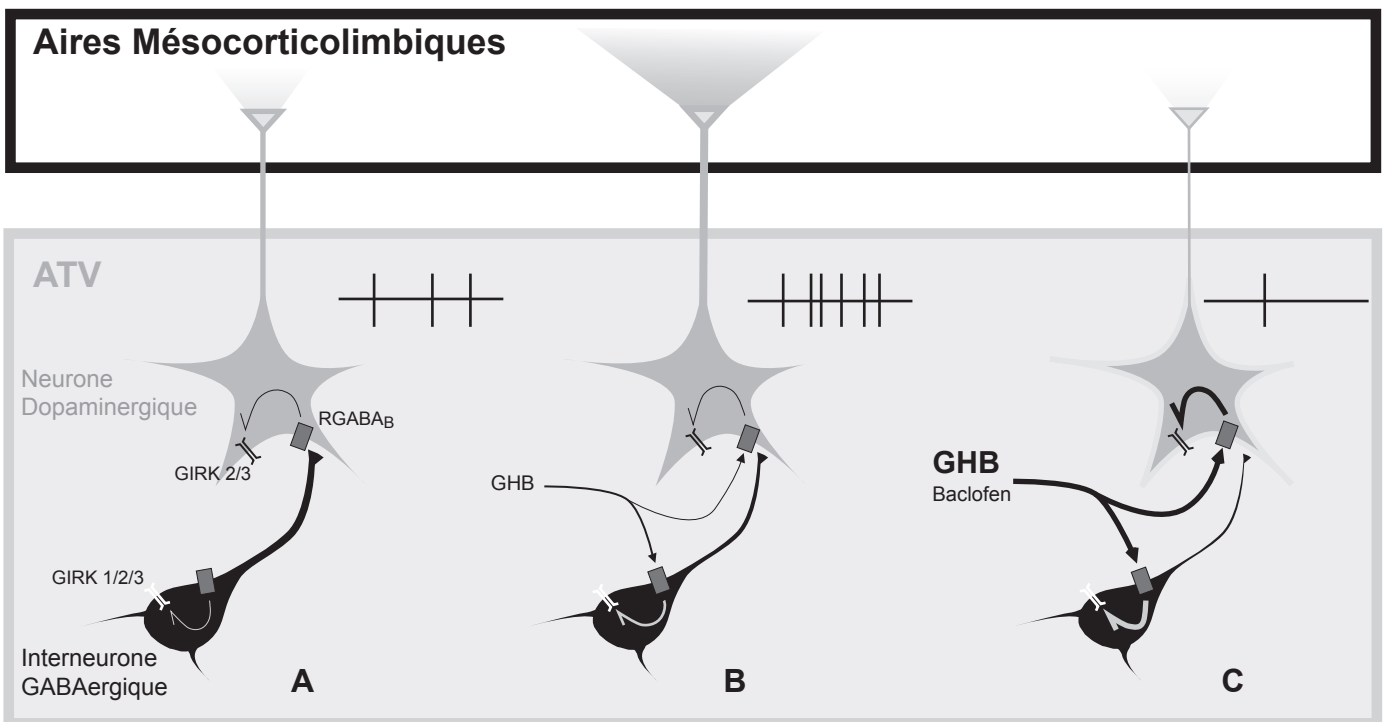
Lorsque le baclofen est utilisé pour diminuer l'administration de psychostimulants, il l'est toujours à des concentrations qui compatible avec une diminution de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques. Cette réduction de la libération de dopamine pourrait expliquer les effets bénéfiques du baclofen sur l'administration de psychostimulants (figure 14C).

Le GHB lui peut-être administré à des doses compatibles avec une augmentation du taux de décharge des neurones dopaminergiques. Ces doses inférieures à 1mM vont augmenter la libération de dopamine sur les cellules cibles ce qui participerait à la mise en place de comportements dépendants (Figure 13B). A des concentrations plus importantes, le GHB va hyperpolariser les neurones dopaminergiques, diminuer la libération de dopamine sur les neurones cibles et avoir un effet bénéfique lors du traitement des dépendances (Figure 14C).



**Figure 13** : Régulation bi-directionnelle des agonsites GABA<sub>B</sub> sur la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de l'ATV.

**A**, Variation du potentiel membranaire enregistrée sur un neurone dopaminergique en configuration cellule attachée. **B**, Fréquence de décharge des potentiels d'action des neurones en fonction de la concentration de Baclofen (en  $\mu\text{M}$ ). Les effets du Baclofen sont bloqués par le CGP 54626 ( $2\mu\text{M}$ ). **C**, Moyenne des changements de fréquence d'émission des potentiels d'action par les neurones dopaminergiques en fonction de la concentration de Baclofen ( $\mu\text{M}$ ). (D'après Cruz et coll 2004)



**Figure 14** : schéma récapitulatif de la modulation bi-directionnelle du GHB dans l'ATV et sa possible implication dans ses effets comportementaux complexes.

**A**, En condition contrôle, les interneurons GABAergiques exercent une inhibition tonique des neurones dopaminergiques. Cette inhibition implique les récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>. **B**, Lorsque le GHB est ingéré ou administré à de faibles concentrations ( $<1\text{mM}$ ), il hyperpolarise les interneurons et lève ainsi l'inhibition tonique exercée sur les neurones dopaminergiques. Ceci se traduit par une augmentation de la libération de dopamine. **C**, Lors de l'utilisation de Baclofen ou à fortes concentrations de GHB, tous les neurones de l'ATV se trouvent hyperpolarisés et la libération de dopamine est fortement déprimée.



## Perspectives

Au cours de ces dernières années, la compréhension des modes d'action du GHB a beaucoup évolué. L'utilisation de souris invalidés pour le récepteur GABA<sub>B</sub> et de nombreuses études électrophysiologiques ont montré que les effets obtenus par administration exogène de GHB impliquaient l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub>. Pourtant la démonstration que le GHB active le récepteur GABA<sub>B</sub> ne permet pas, en soit, de comprendre ces effets comportementaux si variés. Les résultats de notre étude sur les effets du GHB dans le thalamus VB et celle de Cruz et collaborateurs sur les effets des agonistes GABA<sub>B</sub> dans l'ATV présentent un mécanisme similaire d'action du GHB. Dans les deux études, la différence de sensibilité des neurones aux agonistes GABA<sub>B</sub> est un mécanisme qui permet d'expliquer certains des effets comportementaux complexes de ces agonistes. L'existence de ces régulations ouvre toute une nouvelle voie dans le développement de stratégies permettant le traitement de certaines pathologies comme la narcolepsie ou dans le sevrage aux drogues.

La compréhension du rôle du GHB endogène va être relancée par le clonage du récepteur spécifique au GHB et permettra peut-être de savoir si les récepteurs au GHB correspondent à des récepteurs fonctionnels. La synthèse très récente de nouveaux agonistes spécifiques des récepteurs au GHB devrait permettre de résoudre cette question en apportant une meilleure différenciation des effets du GHB passant par les récepteurs GABA<sub>B</sub> et GHB (Wu *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2005).

# Bibliographie

- Adams SR, Harootunian AT, Buechler YJ, Taylor SS & Tsien RY. (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349**, 694-697.
- Andriamampandry C, Taleb O, Viry S, Muller C, Humbert JP, 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.
- Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD & Kandel ER. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5280-5285.
- Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER & Tsien RY. (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. *Science* **260**, 222-226.
- Banerjee PK & Snead OC, 3rd. (1995). Presynaptic gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-aminobutyric acidB (GABAB) receptor-mediated release of GABA and glutamate (GLU) in rat thalamic ventrobasal nucleus (VB): a possible mechanism for the generation of absence-like seizures induced by GHB. *J Pharmacol Exp Ther* **273**, 1534-1543.
- Barad M, Bourtchouladze R, Winder DG, Golan H & Kandel E. (1998). Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15020-15025.
- Barnes AP, Livera G, Huang P, Sun C, O'Neal WK, Conti M, Stutts MJ & Milgram SL. (2005). Phosphodiesterase 4D forms a cAMP diffusion barrier at the apical membrane of the airway epithelium. *J Biol Chem* **280**, 7997-8003.
- Beavo JA & Brunton LL. (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 710-718.
- Benavides J, Rumigny JF, Bourguignon JJ, Cash C, Wermuth CG, Mandel P, Vincendon G & Maitre M. (1982a). High affinity binding sites for gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci* **30**, 953-961.

- Benavides J, Rumigny JF, Bourguignon JJ, Wermuth CG, Mandel P & Maitre M. (1982b). A high-affinity, Na<sup>+</sup>-dependent uptake system for gamma-hydroxybutyrate in membrane vesicles prepared from rat brain. *J Neurochem* **38**, 1570-1575.
- Bernasconi R, Mathivet P, Bischoff S & Marescaux C. (1999). Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential? *Trends Pharmacol Sci* **20**, 135-141.
- Berridge CW & Waterhouse BD. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* **42**, 33-84.
- Berton O & Nestler EJ. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* **7**, 137-151.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J & Gassmann M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84**, 835-867.
- Bhalla US & Iyengar R. (1999). Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* **283**, 381-387.
- Birnbaumer L & Rodbell M. (1969). Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J Biol Chem* **244**, 3477-3482.
- Bockaert J & Pin JP. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**, 1723-1729.
- Bourtchouladze R, Lidge R, Catapano R, Stanley J, Gossweiler S, Romashko D, Scott R & Tully T. (2003). A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10518-10522.
- Bouvier M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 274-286.
- Bowery NG. (1993). GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**, 109-147.
- Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI & Enna SJ. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* **54**, 247-264.
- Brebner K, Childress AR & Roberts DC. (2002). A potential role for GABA(B) agonists in the treatment of psychostimulant addiction. *Alcohol Alcohol* **37**, 478-484.
- Brunton LL, Hayes JS & Mayer SE. (1981). Functional compartmentation of cyclic AMP and protein kinase in heart. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **14**, 391-397.
- Byers D, Davis RL & Kiger JA, Jr. (1981). Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **289**, 79-81.

- Carr DW, Hausken ZE, Fraser ID, Stofko-Hahn RE & Scott JD. (1992). Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J Biol Chem* **267**, 13376-13382.
- Carter LP, Wu H, Chen W, Matthews MM, Mehta AK, Hernandez RJ, Thomson JA, Ticku MK, Coop A, Koek W & France CP. (2005). Novel gamma-hydroxybutyric acid (GHB) analogs share some, but not all, of the behavioral effects of GHB and GABAB receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 1314-1323.
- Chen-Izu Y, Xiao RP, Izu LT, Cheng H, Kuschel M, Spurgeon H & Lakatta EG. (2000). G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca(2+) channels. *Biophys J* **79**, 2547-2556.
- Colledge M, Dean RA, Scott GK, Langeberg LK, Huganir RL & Scott JD. (2000). Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK-AKAP complex. *Neuron* **27**, 107-119.
- Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY & Jin C. (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem* **278**, 5493-5496.
- Cooper DM. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* **375**, 517-529.
- Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM & Keely SL. (1977). Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem* **252**, 3854-3861.
- Crunelli V, Emri Z & Leresche N. (2006). Unravelling the brain targets of gamma-hydroxybutyric acid. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 44-52.
- Crunelli V & Leresche N. (1991). A role for GABAB receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. *Trends Neurosci* **14**, 16-21.
- Crunelli V & Leresche N. (2002a). Action of gamma-hydroxybutyrate on neuronal excitability and underlying membrane conductances. *Gamma-hydroxybutyrate: Molecular, fonctionnal and clinical aspect*, 75-110.
- Crunelli V & Leresche N. (2002b). Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* **3**, 371-382.
- Cruz HG, Ivanova T, Lunn ML, Stoffel M, Slesinger PA & Luscher C. (2004). Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. *Nat Neurosci* **7**, 153-159.
- Daaka Y, Luttrell LM & Lefkowitz RJ. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**, 88-91.

- Daniel PB, Walker WH & Habener JF. (1998). Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr* **18**, 353-383.
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T & Hell JW. (2001). A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2. *Science* **293**, 98-101.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A & Bos JL. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**, 474-477.
- Dessauer CW, Tesmer JJ, Sprang SR & Gilman AG. (1999). The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 205-210.
- Dipilato LM, Cheng X & Zhang J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16513-16518.
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE & et al. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**, 75-79.
- Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS & Scott JD. (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**, 574-578.
- Dolphin AC & Scott RH. (1986). Inhibition of calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones by (-)-baclofen. *Br J Pharmacol* **88**, 213-220.
- Dutar P & Nicoll RA. (1988). A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature* **332**, 156-158.
- Dyer JE, Roth B & Hyma BA. (2001). Gamma-hydroxybutyrate withdrawal syndrome. *Ann Emerg Med* **37**, 147-153.
- Emri Z, Antal K & Crunelli V. (1996). Gamma-hydroxybutyric acid decreases thalamic sensory excitatory postsynaptic potentials by an action on presynaptic GABAB receptors. *Neurosci Lett* **216**, 121-124.
- Everitt BJ & Robbins TW. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* **8**, 1481-1489.
- Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR & Bourne HR. (1992). Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits. *Nature* **356**, 159-161.
- Fleischhacker WW, Hinterhuber H, Bauer H, Pflug B, Berner P, Simhandl C, Wolf R, Gerlach W, Jaklitsch H, Sastre-y-Hernandez M & et al. (1992). A multicenter double-

- blind study of three different doses of the new cAMP-phosphodiesterase inhibitor rolipram in patients with major depressive disorder. *Neuropsychobiology* **26**, 59-64.
- Foehring RC, Schwindt PC & Crill WE. (1989). Norepinephrine selectively reduces slow Ca<sup>2+</sup>- and Na<sup>+</sup>-mediated K<sup>+</sup> currents in cat neocortical neurons. *J Neurophysiol* **61**, 245-256.
- Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M & Harmar AJ. (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* **57**, 279-288.
- Fraser ID & Scott JD. (1999). Modulation of ion channels: a "current" view of AKAPs. *Neuron* **23**, 423-426.
- Frere SG & Luthi A. (2004). Pacemaker channels in mouse thalamocortical neurones are regulated by distinct pathways of cAMP synthesis. *J Physiol* **554**, 111-125.
- Gahwiler BH & Brown DA. (1985). GABAB-receptor-activated K<sup>+</sup> current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 1558-1562.
- Gao T, Yatani A, Dell'Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD & Hosey MM. (1997). cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* **19**, 185-196.
- Gerber U & Gahwiler BH. (1994). GABAB and adenosine receptors mediate enhancement of the K<sup>+</sup> current, IAHP, by reducing adenylyl cyclase activity in rat CA3 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **72**, 2360-2367.
- Gervasi N, Monnier Z, Vincent P, Paupardin-Tritsch D, Hughes SW, Crunelli V & Leresche N. (2003). Pathway-specific action of gamma-hydroxybutyric acid in sensory thalamus and its relevance to absence seizures. *J Neurosci* **23**, 11469-11478.
- Gilman AG. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**, 615-649.
- Goaillard JM & Vincent P. (2002). Serotonin suppresses the slow afterhyperpolarization in rat intralaminar and midline thalamic neurones by activating 5-HT(7) receptors. *J Physiol* **541**, 453-465.
- Goaillard JM, Vincent PV & Fischmeister R. (2001). Simultaneous measurements of intracellular cAMP and L-type Ca<sup>2+</sup> current in single frog ventricular myocytes. *J Physiol* **530**, 79-91.
- Godschalk M, Dzoljic MR & Bonta IL. (1977). Slow wave sleep and a state resembling absence epilepsy induced in the rat by gamma-hydroxybutyrate. *Eur J Pharmacol* **44**, 105-111.

- Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M & Arancio O. (2004). Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J Clin Invest* **114**, 1624-1634.
- Haas HL & Konnerth A. (1983). Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. *Nature* **302**, 432-434.
- Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R & Montminy MR. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol* **13**, 4852-4859.
- Hanoune J & Defer N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-174.
- Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS & Tsien RY. (1993). Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol Biol Cell* **4**, 993-1002.
- Harris NC, Webb C & Greenfield SA. (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.
- Hebb AL, Robertson HA & Denovan-Wright EM. (2004). Striatal phosphodiesterase mRNA and protein levels are reduced in Huntington's disease transgenic mice prior to the onset of motor symptoms. *Neuroscience* **123**, 967-981.
- Hedou G, Chasserot-Golaz S, Kemmel V, Gobaille S, Roussel G, Artault JC, Andriamampandry C, Aunis D & 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.
- Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R & Hamblin MW. (1997). Four 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* **68**, 1372-1381.
- Heidmann DE, Szot P, Kohen R & Hamblin MW. (1998). Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* **37**, 1621-1632.
- Hellevo K, Yoshimura M, Kao M, Hoffman PL, Cooper DM & Tabakoff B. (1993). A novel adenylyl cyclase sequence cloned from the human erythroleukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 311-318.
- Hempel CM, Vincent P, Adams SR, Tsien RY & Selverston AI. (1996). Spatio-temporal dynamics of cyclic AMP signals in an intact neural circuit. *Nature* **384**, 166-169.
- Houslay MD. (1998). Adaptation in cyclic AMP signalling processes: a central role for cyclic AMP phosphodiesterases. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 161-167.

- Huang P, Lazarowski ER, Tarran R, Milgram SL, Boucher RC & Stutts MJ. (2001). Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14120-14125.
- Hughes SW, Cope DW, Blethyn KL & Crunelli V. (2002). Cellular mechanisms of the slow (<1 Hz) oscillation in thalamocortical neurons in vitro. *Neuron* **33**, 947-958.
- Ishikawa Y & Homcy CJ. (1997). The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. *Circ Res* **80**, 297-304.
- Itoh T, Abe K, Tokumura M, Horiuchi M, Inoue O & Ibi N. (2003). Different regulation of adenylyl cyclase and rolipram-sensitive phosphodiesterase activity on the frontal cortex and hippocampus in learned helplessness rats. *Brain Res* **991**, 142-149.
- Jensen K & Mody I. (2001). GHB depresses fast excitatory and inhibitory synaptic transmission via GABA(B) receptors in mouse neocortical neurons. *Cereb Cortex* **11**, 424-429.
- Jurevicius J & Fischmeister R. (1996). cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by beta-adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 295-299.
- Jurevicius J, Skeberdis VA & Fischmeister R. (2003). Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following beta<sub>2</sub>-adrenergic stimulation of I<sub>Ca,L</sub> in frog ventricular myocytes. *J Physiol* **551**, 239-252.
- 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 & 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.
- Kaupp UB & Seifert R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* **63**, 235-257.
- Kaupp UB & Seifert R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* **82**, 769-824.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE & Graybiel AM. (1998). A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**, 2275-2279.
- 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.



- Kemmel V, Taleb O, Perard A, Andriamampandry C, Siffert JC, Mark J & Maitre M. (1998). Neurochemical and electrophysiological evidence for the existence of a functional gamma-hydroxybutyrate system in NCB-20 neurons. *Neuroscience* **86**, 989-1000.
- Kennedy MB, Beale HC, Carlisle HJ & Washburn LR. (2005). Integration of biochemical signalling in spines. *Nat Rev Neurosci* **6**, 423-434.
- Klauck TM, Faux MC, Labudda K, Langeberg LK, Jaken S & Scott JD. (1996). Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* **271**, 1589-1592.
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR & Gilman AG. (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**, 1558-1564.
- Laborit H. (1964). Sodium 4-Hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol* **32**, 433-451.
- Laliberte F, Han Y, Govindarajan A, Giroux A, Liu S, Bobechko B, Lario P, Bartlett A, Gorseth E, Gresser M & Huang Z. (2000). Conformational difference between PDE4 apoenzyme and holoenzyme. *Biochemistry* **39**, 6449-6458.
- Langan TA. (1968). Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **162**, 579-580.
- Langan TA. (1969). Action of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent histone kinase in vivo. *J Biol Chem* **244**, 5763-5765.
- Levy S & Shoham T. (2005). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **5**, 136-148.
- Lichtman JW & Conchello JA. (2005). Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**, 910-919.
- 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.
- Little KD, Hemler ME & Stipp CS. (2004). Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell* **15**, 2375-2387.
- Liu Z, Snead OC, III, Vergnes M, Depaulis A & Marescaux C. (1991). Intrathalamic injections of gamma-hydroxybutyric acid increase genetic absence seizures in rats. *Neurosci Lett* **125**, 19-21.
- Lucas JJ & Hen R. (1995). New players in the 5-HT receptor field: genes and knockouts. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 246-252.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F & Biel M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-591.

- Madden TE & Johnson SW. (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.
- Madison DV & Nicoll RA. (1982). Noradrenaline blocks accommodation of pyramidal cell discharge in the hippocampus. *Nature* **299**, 636-638.
- 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 & Mandel P. (1983). Depolarization-evoked release of gamma-hydroxybutyrate from rat brain slices. *J Neurochem* **41**, 287-290.
- Maitre M, Hechler V, Vayer P, Gobaille S, Cash CD, Schmitt M & Bourguignon JJ. (1990). A specific gamma-hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties. *J Pharmacol Exp Ther* **255**, 657-663.
- Maitre M & Mandel P. (1982). [Calcium-dependent liberation of gamma-hydroxybutyrate after depolarization of rat brain slices]. *C R Seances Acad Sci III* **295**, 741-743.
- Marshall FH, White J, Main M, Green A & Wise A. (1999). GABA(B) receptors function as heterodimers. *Biochem Soc Trans* **27**, 530-535.
- Martellotta MC, Balducci C, Fattore L, Cossu G, Gessa GL, Pulvirenti L & Fratta W. (1998). Gamma-hydroxybutyric acid decreases intravenous cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **59**, 697-702.
- Mayr B & Montminy M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 599-609.
- McCormick DA & Bal T. (1997). Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* **20**, 185-215.
- McCormick DA, Pape HC & Williamson A. (1991). Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system. *Prog Brain Res* **88**, 293-305.
- Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL & Conti M. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 29-35.
- Mongillo M, McSorley T, Evellin S, Sood A, Lissandron V, Terrin A, Huston E, Hannawacker A, Lohse MJ, Pozzan T, Houslay MD & Zaccolo M. (2004). Fluorescence resonance energy transfer-based analysis of cAMP dynamics in live neonatal rat cardiac myocytes reveals distinct functions of compartmentalized phosphodiesterases. *Circ Res* **95**, 67-75.
- Mons N & Cooper DM. (1995). Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling. *Trends Neurosci* **18**, 536-542.

- Montminy M. (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* **66**, 807-822.
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G & Goodman RH. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6682-6686.
- Muller C, Viry S, Miehe 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.
- Newlon MG, Roy M, Morikis D, Hausken ZE, Coghlan V, Scott JD & Jennings PA. (1999). The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat Struct Biol* **6**, 222-227.
- Nicholas AP, Hokfelt T & Pieribone VA. (1996). The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 245-255.
- Nicoll RA. (1988). The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science* **241**, 545-551.
- Nicoll RA. (2004). My close encounter with GABA(B) receptors. *Biochem Pharmacol* **68**, 1667-1674.
- Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A & Lohse MJ. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215-37218.
- O'Donnell JM & Zhang HT. (2004). Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol Sci* **25**, 158-163.
- Pape HC. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* **58**, 299-327.
- Pawson T & Scott JD. (2005). Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* **30**, 286-290.
- Pedarzani P, Krause M, Haug T, Storm JF & Stuhmer W. (1998). Modulation of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current sIAHP by a phosphatase-kinase balance under basal conditions in rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **79**, 3252-3256.
- Pedarzani P & Storm JF. (1993). PKA mediates the effects of monoamine transmitters on the K<sup>+</sup> current underlying the slow spike frequency adaptation in hippocampal neurons. *Neuron* **11**, 1023-1035.
- Perez-Torres S, Cortes R, Tolnay M, Probst A, Palacios JM & Mengod G. (2003). Alterations on phosphodiesterase type 7 and 8 isozyme mRNA expression in Alzheimer's disease brains examined by in situ hybridization. *Exp Neurol* **182**, 322-334.

- Perez-Torres S, Miro X, Palacios JM, Cortes R, Puigdomenech P & Mengod G. (2000). Phosphodiesterase type 4 isozymes expression in human brain examined by in situ hybridization histochemistry and [<sup>3</sup>H]rolipram binding autoradiography. Comparison with monkey and rat brain. *J Chem Neuroanat* **20**, 349-374.
- Pohjanoksa K, Jansson CC, Luomala K, Marjamaki A, Savola JM & Scheinin M. (1997). Alpha2-adrenoceptor regulation of adenylyl cyclase in CHO cells: dependence on receptor density, receptor subtype and current activity of adenylyl cyclase. *Eur J Pharmacol* **335**, 53-63.
- Pologruto TA, Yasuda R & Svoboda K. (2004). Monitoring neural activity and [Ca<sup>2+</sup>] with genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *J Neurosci* **24**, 9572-9579.
- Prosser HM, Gill CH, Hirst WD, Grau E, Robbins M, Calver A, Soffin EM, Farmer CE, Lanneau C, Gray J, Schenck E, Warmerdam BS, Clapham C, Reavill C, Rogers DC, Stean T, Upton N, Humphreys K, Randall A, Geppert M, Davies CH & Pangalos MN. (2001). Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* **17**, 1059-1070.
- Ramos BP, Birnbaum SG, Lindenmayer I, Newton SS, Duman RS & Arnsten AF. (2003). Dysregulation of protein kinase a signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. *Neuron* **40**, 835-845.
- Ratomponirina C, Hode Y, Hechler V & Maitre M. (1995). gamma-Hydroxybutyrate receptor binding in rat brain is inhibited by guanyl nucleotides and pertussis toxin. *Neurosci Lett* **189**, 51-53.
- Reinhardt RR & Bondy CA. (1996). Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature rat brain. *Neuroscience* **72**, 567-578.
- Reyes-Irisarri E, Perez-Torres S & Mengod G. (2005). Neuronal expression of cAMP-specific phosphodiesterase 7B mRNA in the rat brain. *Neuroscience* **132**, 1173-1185.
- Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM & Karpen JW. (2000). Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol* **116**, 147-161.
- Rich TC, Fagan KA, Tse TE, Schaack J, Cooper DM & Karpen JW. (2001a). A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13049-13054.
- Rich TC, Tse TE, Rohan JG, Schaack J & Karpen JW. (2001b). In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol* **118**, 63-78.
- Robichon A, Tinette S, Courtial C & Pelletier F. (2004). Simultaneous stimulation of GABA and beta adrenergic receptors stabilizes isotypes of activated adenylyl cyclase heterocomplex. *BMC Cell Biol* **5**, 25.

- Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet JL, Cooper DM & Fischmeister R. (2004). Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* **279**, 52095-52105.
- Ross EM, Maguire ME, Sturgill TW, Biltonen RL & Gilman AG. (1977). Relationship between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *J Biol Chem* **252**, 5761-5775.
- Sah P. (1996). Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* **19**, 150-154.
- Sah P & Faber ES. (2002). Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* **66**, 345-353.
- Schmidt C, Gobaille S, Hechler V, Schmitt M, Bourguignon JJ & Maitre M. (1991). Anti-sedative and anti-cataleptic properties of NCS-382, a gamma-hydroxybutyrate receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* **203**, 393-397.
- Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Spooren W, Jatou AL, Vigouret J, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Kaslin E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H & Bettler B. (2001). Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* **31**, 47-58.
- Seino S & Shibasaki T. (2005). PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* **85**, 1303-1342.
- Smith KM, Larive LL & Romanelli F. (2002). Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. *Am J Health Syst Pharm* **59**, 1067-1076.
- Snead OC, 3rd. (1987). gamma-Hydroxybutyric acid in subcellular fractions of rat brain. *J Neurochem* **48**, 196-201.
- Snead OC, 3rd. (1991). The gamma-hydroxybutyrate model of absence seizures: correlation of regional brain levels of gamma-hydroxybutyric acid and gamma-butyrolactone with spike wave discharges. *Neuropharmacology* **30**, 161-167.
- Snead OC, 3rd. (1992). Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents. *J Neural Transm Suppl* **35**, 7-19.
- Snead OC, 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 OC, 3rd. (1996). Relation of the [3H] gamma-hydroxybutyric acid (GHB) binding site to the gamma-aminobutyric acidB (GABAB) receptor in rat brain. *Biochem Pharmacol* **52**, 1235-1243.

- Snead OC, 3rd. (2000). Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor. *J Neurochem* **75**, 1986-1996.
- Snead OC, 3rd & Gibson KM. (2005). Gamma-hydroxybutyric acid. *N Engl J Med* **352**, 2721-2732.
- Snead OC, 3rd & Liu CC. (1984). Gamma-hydroxybutyric acid binding sites in rat and human brain synaptosomal membranes. *Biochem Pharmacol* **33**, 2587-2590.
- Soderling SH & Beavo JA. (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 174-179.
- Souness JE, Maslen C, Webber S, Foster M, Raeburn D, Palfreyman MN, Ashton MJ & Karlsson JA. (1995). Suppression of eosinophil function by RP 73401, a potent and selective inhibitor of cyclic AMP-specific phosphodiesterase: comparison with rolipram. *Br J Pharmacol* **115**, 39-46.
- Souness JE & Rao S. (1997). Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases. *Cell Signal* **9**, 227-236.
- Steinberg SF & Brunton LL. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 751-773.
- Steriade M. (2000). Corticothalamic resonance, states of vigilance and mentation. *Neuroscience* **101**, 243-276.
- Steriade M. (2001). Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J Neurophysiol* **86**, 1-39.
- Stone EA, Platt JE, Trullas R & Slucky AV. (1984). Reduction of the cAMP response to norepinephrine in rat cerebral cortex following repeated restraint stress. *Psychopharmacology (Berl)* **82**, 403-405.
- Sutherland EW & Rall TW. (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**, 1077-1091.
- Tasken K & Aandahl EM. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* **84**, 137-167.
- Taylor SS, Buechler JA & Yonemoto W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**, 971-1005.
- Taylor SS, Yang J, Wu J, Haste NM, Radzio-Andzelm E & Anand G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1697**, 259-269.
- Thompson SM & Gahwiler BH. (1992). Comparison of the actions of baclofen at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* **451**, 329-345.

- Timmons SD, Geisert E, Stewart AE, Lorenzon NM & Foehring RC. (2004). alpha2-Adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidal neurons. *Brain Res* **1014**, 184-196.
- Van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-Van Ittersum M, Repaske DR, Goy MF, Kotera J, Omori K, Beavo JA & De Vente J. (2003). mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol* **467**, 566-580.
- Vanhoose AM, Ritchie MD & Winder DG. (2004). Regulation of cAMP levels in area CA1 of hippocampus by Gi/o-coupled receptors is stimulus dependent in mice. *Neurosci Lett* **370**, 80-83.
- Vincent P & Bruscianno D. (2001). Cyclic AMP imaging in neurones in brain slice preparations. *J Neurosci Methods* **108**, 189-198.
- Vizuete ML, Venero JL, Traiffort E, Vargas C, Machado A & Cano J. (1997). Expression of 5-HT7 receptor mRNA in rat brain during postnatal development. *Neurosci Lett* **227**, 53-56.
- Walsh DA, Perkins JP & Krebs EG. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **243**, 3763-3765.
- Wang Z & McCormick DA. (1993). Control of firing mode of corticotectal and corticopontine layer V burst-generating neurons by norepinephrine, acetylcholine, and 1S,3R-ACPD. *J Neurosci* **13**, 2199-2216.
- Wei JY, Roy DS, Leconte L & Barnstable CJ. (1998). Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol* **56**, 37-64.
- Wen W, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL & Taylor SS. (1994). Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem* **269**, 32214-32220.
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY & Taylor SS. (1995a). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463-473.
- Wen W, Taylor SS & Meinkoth JL. (1995b). The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J Biol Chem* **270**, 2041-2046.
- Weng G, Bhalla US & Iyengar R. (1999). Complexity in biological signaling systems. *Science* **284**, 92-96.
- Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, Sheng M & Scott JD. (1999). Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* **285**, 93-96.

- Williams SR, Turner JP & Crunelli V. (1995). Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABAB, receptor-mediated hyperpolarization. *Neuroscience* **66**, 133-141.
- Wong W & Scott JD. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 959-970.
- Wu H, Zink N, Carter LP, Mehta AK, Hernandez RJ, Ticku MK, Lamb R, France CP & Coop A. (2003). A tertiary alcohol analog of gamma-hydroxybutyric acid as a specific gamma-hydroxybutyric acid receptor ligand. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 675-679.
- Xie X & Smart TG. (1992a). gamma-Hydroxybutyrate depresses monosynaptic excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* **223**, 193-196.
- Xie X & Smart TG. (1992b). Gamma-hydroxybutyrate hyperpolarizes hippocampal neurones by activating GABAB receptors. *Eur J Pharmacol* **212**, 291-294.
- Ye Y & O'Donnell JM. (1996). Diminished noradrenergic stimulation reduces the activity of rolipram-sensitive, high-affinity cyclic AMP phosphodiesterase in rat cerebral cortex. *J Neurochem* **66**, 1894-1902.
- Zaccolo M & Pozzan T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711-1715.
- Zhang HT, Huang Y, Mishler K, Roerig SC & O'Donnell JM. (2005). Interaction between the antidepressant-like behavioral effects of beta adrenergic agonists and the cyclic AMP PDE inhibitor rolipram in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **182**, 104-115.
- Zhang J, Campbell RE, Ting AY & Tsien RY. (2002). Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 906-918.
- Zhang J, Ma Y, Taylor SS & Tsien RY. (2001). Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14997-15002.
- Zhao Y, Zhang HT & O'Donnell JM. (2003). Inhibitor binding to type 4 phosphodiesterase (PDE4) assessed using [3H]piclamilast and [3H]rolipram. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 565-572.