
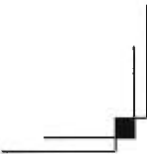


UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL



**EFFETS DU GAMMA-HYDROXYBUTYRATE SUR LE  
CYCLE VEILLE-SOMMEIL CHEZ LE RAT**



par

**Véronique Girodias**

Département de psychologie  
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophæ Doctor (Ph.D.)  
en psychologie option neuropsychologie expérimentale

Août, 1999

© Véronique Girodias, 1999



BF  
22  
US4  
2000  
v. 011

---

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**EFFETS DU GAMMA-HYDROXYBUTYRATE  
SUR LE CYCLE VEILLE-SOMMEIL CHEZ LE RAT**

présentée par Véronique Girodias,  
a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Thèse acceptée le \_\_\_\_\_

*«Il est encore plus facile de juger de l'esprit d'un homme par ses questions que par ses réponses.»*

Duc de François Gaston Lévis

*«Chercher n'est pas une chose et trouver une autre, mais le gain de la recherche, c'est la recherche même.»*

Saint Grégoire de Nysse

*«Se réveiller, c'est se mettre à la recherche du monde.»*

Alain dit Émile Chartier

## *Sommaire*

Différents neurotransmetteurs sont impliqués dans les mécanismes d'induction et de maintien du sommeil. Trois neurotransmetteurs ont surtout été étudiés jusqu'à maintenant: la noradrénaline, la sérotonine et l'acétylcholine. Le but de la présente étude est d'évaluer le rôle hypnotique du gamma-hydroxybutyrate (GHB), un neurotransmetteur identifié dans le SNC des mammifères (Maitre et Mandel, 1984). À cette fin, nous avons procédé à des enregistrements électrophysiologiques du cycle veille-sommeil chez le rat pendant les quatre heures qui suivent l'administration d'une faible (10 mg/kg) ou forte (160 mg/kg) dose de GHB, avec ou sans l'administration concomitante d'un antagoniste sélectif des récepteurs de GHB, le sel de sodium de l'acide 6-carboxyméthylidène 5-ol-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocycloleptène, (NCS-382). De plus nous avons traité les rats à trois différents moments du cycle nyctéméral, soit au début et en fin de période de lumière, et encore en début de période d'obscurité.

Puisque le GHB semble avoir des effets hypnotiques et électrophysiologiques différents selon la dose utilisée et selon le moment circadien de l'administration, nous supposons que le GHB induira plus rapidement l'endormissement, qu'il raccourcira la latence au sommeil paradoxal (SP) et qu'il augmentera la durée du SP au détriment de la durée de l'éveil et du sommeil lent léger. Tous ces effets devraient être plus prononcés en période de lumière qu'en période d'obscurité notamment parce que le rat est un animal à activité nocturne. De plus, nous prévoyons que seuls les effets obtenus avec une faible dose de GHB seront annihilés par l'administration du NCS-382.

Nos résultats montrent que seule une faible dose de GHB et non une forte dose peut raccourcir la latence du SP sans en modifier la durée. Par conséquent le GHB agirait uniquement sur le mécanisme de déclenchement du SP et non sur le mécanisme de maintien. L'administration de NCS-382 permet de relier cet effet aux récepteurs à GHB. Cet effet ne s'obtient qu'en période de lumière, phase du cycle circadien où la propension au sommeil paradoxal est forte. La cause exacte de cet effet demeure indéterminée. Une étiologie dopaminergique semble pouvoir être retenue. En effet, le GHB modifie sélectivement l'activité cérébrale des neurones du cortex préfrontal qui reçoit des afférences dopaminergiques de l'aire tegmentaire ventrale.

---

L'étude future des effets du GHB sur le sommeil à un niveau micro-architectural et la compréhension de ses propriétés nootropes et thermiques, nous permettra de mieux juger de son utilité fonctionnelle.

## *Table des matières*

<i>Sommaire</i> .....	<i>iv</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>ix</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>x</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>xi</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>xii</i>
<b>Chapitre 1</b> .....	<b>1</b>
Introduction.....	2
1. L'organisation du sommeil chez le rat.....	2
2. Fonctions du sommeil lent et du sommeil paradoxal.....	5
2.1 Fonctions du sommeil lent.....	5
2.2 Fonctions du sommeil paradoxal.....	6
3. Modèles du contrôle de sommeil.....	8
3.1 Le contrôle neurochimique du cycle veille-sommeil.....	8
3.2 Le modèle neurochimique de l'alternance sommeil lent/sommeil paradoxal.....	9
4. Le gamma-hydroxybutyrate.....	12
4.1. Le gamma hydroxybutyrate comme neurotransmetteur ....	12
4.2. Récepteurs spécifiques au gamma-hydroxybutyrate.....	15
4.3 Effets physiologiques du gamma-hydroxybutyrate.....	15
4.4 Effets biochimiques du gamma-hydroxybutyrate.....	17
4.4.1 Effets du gamma-hydroxybutyrate sur le système dopaminergique.....	17
4.4.2 Effets du gamma-hydroxybutyrate sur les autres systèmes de neurotransmission.....	17
4.5 Effets électrophysiologiques du GHB.....	18
4.6 Effets du gamma-hydroxybutyrate sur le cycle veille-sommeil.....	19
4.7 Autres effets du gamma-hydroxybutyrate.....	20
4.8 Effets thérapeutiques du gamma-hydroxybutyrate.....	21
5. Retour sur les concepts importants.....	22

6.	Hypothèses .....	23
<b>Chapitre 2 .....</b>		<b>25</b>
Méthodologie .....		26
7.	Déroulement de la recherche, matériel et conditions générales... 26	
7.1	Enregistrement des stades de vigilance.....	26
7.2	Administration des traitements pharmacologiques .....	26
7.3	Aspects déontologiques .....	27
<b>Chapitre 3 .....</b>		<b>28</b>
Facilitation of REM sleep in the rat with gamma-hydroxybutyrate .....		29
<b>Chapitre 4 .....</b>		<b>38</b>
The triggering of rapid eye movement sleep in the rat with gamma-hydroxybutyrate (GHB) is reversed by the GHB receptor antagonist NCS-382 .....		39
<b>Chapitre 5 .....</b>		<b>55</b>
The effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB) on sleep in the rat at different circadian times .....		56
<b>Chapitre 6 .....</b>		<b>68</b>
Discussion.....		69
8.	Récapitulation des résultats .....	69
8.1	Sélectivité des effets du gamma-hydroxybutyrate sur les paramètres du sommeil .....	69
8.2	Spécificité des effets du gamma-hydroxybutyrate .....	70
8.3	Stabilité des effets du gamma-hydroxybutyrate au cours du nycthémère.....	70
8.4	L'origine des effets du gamma-hydroxybutyrate .....	72
9.	Le GHB dans le futur... ..	73
9.1	Le GHB et la micro-architecture du sommeil .....	74
9.2	Le GHB et la température.....	75
9.3	Le GHB et l'hypothalamus .....	76
9.4	Le GHB et la cognition .....	77



---

10. Mot de la fin.....	78
<b>Références .....</b>	<b>81</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>98</b>
Effects of Gamma-hydroxybutyrate on Ventral Tegmental Unit Activity in the rat: Considerations on REM Sleep Control.....	99

---

## *Liste des tableaux*

Tableau 1 Sites de la présence endogène du GHB et distribution des sites de synthèse, de liaison et de recapture du GHB dans le cerveau des mammifères.....	27
---	----

---

## *Liste des figures*

- Figure 1 – Hypnogramme de 4 heures de sommeil chez le rat en début de période de lumière..... 17
- Figure 2 – Représentation schématique du modèle neurochimique de l'alternance sommeil lent/sommeil paradoxal..... 24

## *Liste des abréviations*

ACh:	Acétylcholine
APUD:	Amine, précurseur, <i>uptake</i> , décarboxylase
ATV:	Aire tegmentaire ventrale
C:	Oscillateur circadien
CLIP:	<i>Corticotropin-like intermediate lobe peptide</i>
DA:	Dopamine
EEG:	Électroencéphalogramme
EMG:	Électromyogramme
EOG:	Électro-oculogramme
GABA:	Acide gamma-amino-butérique
GBL:	Gamma-butyrolactone
GHB:	Gamma-hydroxybutyrate
H:	Processus homéostatique
i.p.:	Intrapéritonéale
i.v.:	Intraveineux
M:	Mole
NA:	Noradrénaline
NaCL:	Chlorure de sodium
NCS-382:	Sel de sodium de l'acide 6-carboxyméthylidène 5-ol-6,7,8, 9-tetrahydro-5H-benzocycloleptène
p.o.:	<i>Per os</i>
POMC:	Pro-opiomelanocortin
SL:	Sommeil lent
Sn:	Substance noire
SNC:	Système nerveux central
SP:	Sommeil paradoxal
SSR-2:	Semi-aldéhyde succinique réductase spécifique
5-HT:	5-hydroxytryptamine: Sérotonine
$\mu$ M:	Micro mole

## *Remerciements*

*J'*aimerais tout d'abord exprimer une sincère et chaleureuse reconnaissance à mes parents qui m'ont depuis toujours permis d'évoluer dans un milieu stimulant et réconfortant; j'y ai acquis la confiance et l'ouverture d'esprit nécessaires pour jeter un regard plus large sur le monde.

*M*es remerciements vont également au Dr Roger Godbout, mon directeur de thèse; son dynamisme indéfectible, sa vivacité d'esprit, sa disponibilité remarquable et son souci constant pour autrui ne sont que quelques-unes des nombreuses qualités qu'il possède et qui m'ont marquée.

*J*e tiens à adresser ma gratitude à Jean et à Gaétan; ils m'ont prouvé à maintes reprises par la brillance de leur intelligence que le cerveau de l'homme peut non seulement égaler mais aussi éclipser les prouesses de l'ordinateur.

*J*e remercie aussi tous mes amis; ils m'ont apporté un soutien quotidien, particulièrement Isabelle qui fut constamment à l'écoute et pleine de sollicitude. Je suis profondément reconnaissante à Claude qui m'a offert la chance d'évoluer dans le monde clinique qui m'est devenu si cher; sa perspicacité et la douceur qu'elle témoigne à ses patients m'ont inspirée.

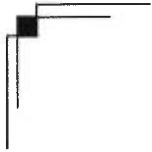
*M*es remerciements les plus tendres vont à Christian, mon mari, sans cesse à mes côtés; son éternel optimisme, son enthousiasme et son imperturbable sérénité me furent indispensables.

*M*erci à Terri, à Pierre et à Geneviève, ma belle-famille, qui m'ont aidée à apporter les retouches finales à cette thèse; leurs merveilleuses personnalités teintées d'humour et d'humanité me furent d'agréables compagnons de route.

*E*nfin, je remercie le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et le Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la recherche du Québec (FCAR) pour leurs contributions financières à ces études de doctorat.

À ma fille Ophélie et les nuits d'insomnie  
qui m'ont fait apprécier le sommeil.

# *Chapitre 1*



## *Introduction*



# Introduction

## 1. L'organisation du sommeil chez le rat

Le sommeil occupe une place prépondérante dans le rythme circadien du cycle activité-repos de tous les mammifères. Il existe une forte corrélation entre le cycle veille-sommeil et l'alternance lumière-obscurité. Chez le rat, rongeur à activité nocturne, la période principale de sommeil coïncide avec la période de lumière; son sommeil occupe environ 80% du temps en période de lumière et 20% des heures d'obscurité (Alföldi *et al.*, 1990; Borbély et Neuhaus, 1978a, 1978b; Trachsel *et al.*, 1988). Et comme le sommeil de cet animal est polyphasique, plusieurs périodes de sommeil et périodes d'éveil se succèdent au cours d'un même nycthémère (Timo-laria *et al.*, 1970).

Trois procédés électrophysiologiques sont utilisés pour étudier les états de vigilance: l'électroencéphalogramme (EEG), l'électromyogramme (EMG) et l'électro-oculogramme (EOG). Ils enregistrent respectivement l'activité cérébro-corticale, l'activité des muscles posturaux et celle des mouvements oculaires. Les caractéristiques de ces enregistrements (Timo-laria *et al.*, 1970; Rechtschaffen et Kales, 1968) permettent de mesurer les temps d'éveil et de sommeil et de différencier deux types de sommeil, le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP). Le SL se subdivise en SL léger et en SL profond selon la présence plus ou moins riche des ondes delta sur le tracé de l'EEG.

Dans les paragraphes ci-dessous, nous allons revoir brièvement la séquence normale du déroulement des stades de sommeil chez le rat. À souligner la difficulté à déterminer chez le rat, comme chez tout animal présentant un cycle veille-sommeil polyphasique, le délai d'endormissement. Cette difficulté peut être surmontée dans le cas des études pharmacologiques par l'administration-contrôle de solution saline. Ce procédé retarde le délai d'endormissement permettant alors d'être comparé au délai obtenu suite à l'administration d'une solution active. Le critère le plus souvent retenu pour déterminer le délai d'endormissement chez le rat est celui de l'apparition du premier fuseau de sommeil (Timo-laria *et al.*, 1970).

À l'éveil, les ondes bêta (>14Hz) et les ondes alpha (8 à 13Hz) prédominent sur le tracé de l'EEG. Le SL léger se reconnaît par la disparition de ces mêmes ondes et par

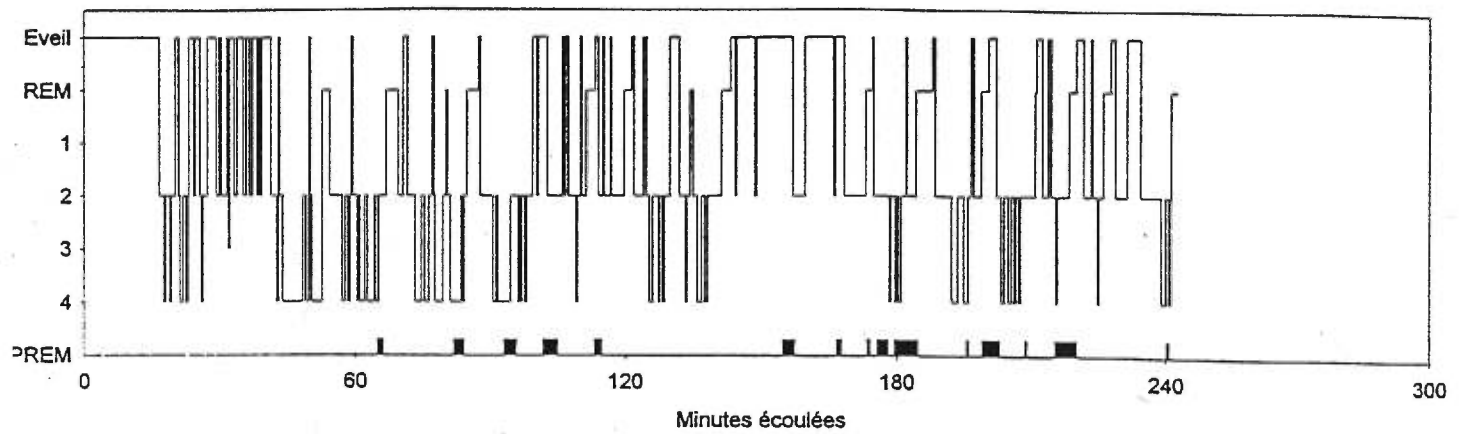


l'apparition d'ondes plus lentes de type thêta (5-8Hz) et d'une activité fusiforme de 8 à 12Hz (Alföldi *et al.*, 1990; Borbély et Neuhaus, 1978a, 1978b; Traschel *et al.*, 1988). Le passage au stade SL profond se caractérise par un tracé comprenant plus de 50% d'activité delta (1-4Hz). Pendant le SL, le rat se tient immobile, la tête parfois en partie redressée malgré une réactivité comportementale très réduite par rapport à l'éveil; les paupières peuvent être entrouvertes; les pupilles sont en myosis; le pouls et la respiration sont ralentis et réguliers. L'EOG est généralement stable et l'EMG montre une faible activité. Le SL est un état physiologique où le métabolisme est réduit.

Le SP survient après 10 à 15 minutes de SL. L'émergence du SP s'annonce par une bouffée intense de fuseaux de sommeil entrecoupée par des d'ondes thêta de basse fréquence (Gottesman, 1992). Ce type de tracé de sommeil, parfois qualifié de sommeil intermédiaire, est toutefois considéré comme faisant encore partie du SL (Pilliat et Gottesmann, 1995) et ne dépasse guère 1% du temps de l'ensemble du sommeil. Le SP qui suit se caractérise par l'apparition d'une activité thêta de fréquence plus rapide (7-8Hz) et de moindre amplitude que l'activité thêta enregistrée au stade du SL léger. Ce stade du sommeil s'accompagne d'une atonie musculaire complète hormis quelques secousses très brèves de type clonique. L'EOG montre des bouffées de mouvements oculaires rapides. Sur le plan comportemental, l'animal adopte pendant le SP une posture particulière: il se recroqueville complètement et replie sa tête en ventroflexion contre l'abdomen pour, possiblement, limiter la déperdition de chaleur ce qui suggère une modification de la thermorégulation au cours des différents stades de vigilance.

La fin d'un épisode de SP est souvent marquée d'un bref réveil suivi d'un nouveau cycle SL-SP. Le SP occupe environ 20% de la durée de chaque cycle. Le SL occupe près de 50% de la durée de chaque cycle (Vivaldi *et al.*, 1994b). La durée moyenne de ces cycles est de 10 à 15 minutes. Chez le rat, le temps d'éveil représente donc moins de 30% de la période de lumière. En période d'obscurité, le sommeil du rat est beaucoup plus fragmenté. Chez le rat comme chez l'humain, le SL et le SP se succèdent de façon prévisible mais inégale au cours de la période principale de sommeil: le SL et une prédominance des ondes delta s'observent en début de période alors que le SP est plus abondant en fin de période (Vivaldi *et al.*, 1994b). Voir figure 1.

Figure 1 – Hypnogramme de 4 heures de sommeil chez le rat en début de période de lumière



#### Légende

REM: *Rapid eye movement*: Sommeil paradoxal  
PREM: *REM period*: Période de sommeil paradoxal: séquence d'époques de SP non interrompue par plus d'une minute d'un autre stade de sommeil

## 2. Fonctions du sommeil lent et du sommeil paradoxal

L'importante activation des systèmes nerveux central (SNC) et périphérique pendant le SP fait de ce stade de sommeil un état de vigilance plus proche de l'éveil que le SL. En dépit de multiples recherches, les fonctions du sommeil restent encore énigmatiques. Cependant, les hypothèses ne manquent pas. Elles tendent généralement à prêter des fonctions surtout d'ordre somatique au SL et des fonctions plutôt neurocognitives au SP.

### 2.1 Fonctions du sommeil lent

Bien que l'on ne connaisse pas de fonctions propres au SL léger, diverses hypothèses ont été avancées sur les fonctions du SL profond. Une première hypothèse accorde au SL profond une fonction de conservation d'énergie (Berger, 1984; Heller *et al.*, 1988). En effet, au cours du SL profond, le métabolisme est réduit et la température corporelle chute. À noter que l'hibernation s'enclenche au cours d'une période de SL profonde (Krilowicz *et al.*, 1988).

Selon une autre hypothèse, le SL profond aurait une fonction neuroendocrinienne. Et de fait, le SL profond s'accompagne d'une libération d'hormone de croissance (Born *et al.*, 1988). D'ailleurs le sommeil de l'enfant, être en croissance, compte plus de SL profond que le sommeil de l'adulte et du vieillard (Roffwarg *et al.*, 1966).

Le SL profond semble aussi avoir un rôle de récupération physiologique (Adam et Oswald, 1983, Berger et Philips, 1988; Berger et Philips, 1990). La quantité de SL profond augmente en proportion du manque de sommeil global. On observe également une intensification du SL quand le sommeil suit une période d'exercices physiques (Shapiro *et al.*, 1981). Les avis diffèrent sur la signification du fait observé. L'intensification du SL profond pourrait résulter de l'augmentation de la température corporelle que produit l'activité physique (Horne, 1988; Taylor et Driver, 1995; Youngstedt *et al.*, 1997). Si l'on privilégie cette explication, la production de chaleur serait donc plus importante que le refroidissement dans la genèse du SL profond. En effet, on remarque que l'application de chaleur sur les neurones de l'hypothalamus provoque plus souvent un endormissement qu'un réveil. De plus, on sait que la production de chaleur et l'apparition du SL se font simultanément au cours du

développement d'un organisme dit altriacal (*i.e.* né avec un SNC encore immature). Enfin, il a été constaté qu'une période de profonde hypothermie précédait la mort des rats que l'on prive de sommeil.

Horne (1992a), estime que le rôle du SL est primordial et prioritaire sur celui du SP. Son jugement s'appuie sur le fait que, dans l'ordre d'apparition des stades du sommeil, le SL survient avant le SP, qu'il y a plus de SL dans la première moitié de la période de sommeil et plus de SP dans la deuxième moitié, et qu'après une privation de sommeil, le rebond de SL précède toujours celui du SP. Lors du sommeil réparateur qui suit la privation, le déficit en SL sera corrigé alors que celui du SP ne le sera qu'à 50%. De plus, on remarque que le sommeil des petits dormeurs (< 6 heures) contient le même nombre de minutes de SL profond que celui des grands dormeurs (>9 heures). Des deux types de sommeil, le premier semble pouvoir être qualifié d'essentiel et le second d'optionnel (Horne, 1992b).

## 2.2 Fonctions du sommeil paradoxal

Des diverses hypothèses sur le rôle du SP, on retient surtout celle lui attribuant une fonction de stimulation du développement cérébral. Il existe une corrélation positive entre la quantité de SP et le degré de maturité du SNC (Roffwarg *et al.*, 1966). Cette stimulation endogène est nécessaire à la maturation de la synaptogénèse et à la différenciation du cerveau. Pour appuyer cette hypothèse, on observe que le sommeil du nouveau-né compte plus de SP que celui du jeune adulte (Roffwarg *et al.*, 1966). De plus, au niveau phylogénétique, les organismes dont le SNC est le plus immature à la naissance montrent davantage de SP durant le sommeil que les organismes dont le SNC arrive près de la pleine maturité (Zepelin, 1980).

Selon Snyder (1966), le SP agirait comme «sentinelle». Le SP veillerait à maintenir une certaine activation corticale périodique propice à un éventuel éveil. Cet état d'activation corticale est nécessaire à l'organisme pour assurer sa sécurité et optimiser sa survie. Il a été effectivement observé que chaque période de SP était suivie d'un bref éveil. En outre, une interruption volontaire de sommeil après une période de SP donne un état de plus grande vigilance qu'une interruption provoquée pendant une période de SL (Fiss *et al.*, 1966). La vitesse de réaction de l'organisme dépend du degré de vigilance et une meilleure vigilance entraîne une réaction plus rapide au danger.

Ephron et Carrington (1966) attribuent au SP une fonction dite «d'homéostasie corticale». Le cerveau doit en tout temps maintenir un niveau minimal de stimulation. Durant le sommeil, et surtout pendant le SL, le cerveau est relativement coupé des stimulations extérieures. Le SP compenserait la perte de stimulations extérieures par la production de stimulations endogènes. Cette fonction faciliterait aussi la transition entre le sommeil et l'état d'éveil.

On reconnaît encore au SP une fonction de mise au point du système oculomoteur binoculaire. Le SP contribuerait à l'établissement du réseau neuromusculaire impliqué dans la coordination des mouvements oculaires volontaires, coordination qui n'est pas acquise dès la naissance. Cette hypothèse se vérifie sur les plans ontogénique et phylogénique. Au cours des premiers mois de vie, il existe une diplopie physiologique. Cette diplopie va spontanément se corriger par un ajustement progressif des mouvements compensatoires binoculaires. Avec le temps, les mouvements deviennent plus coordonnés et permettent l'acquisition d'une vision stéréoscopique. Il existerait une corrélation positive entre la quantité de SP et le degré de décussation du chiasma optique chez les différents organismes. Plus la décussation est avancée, meilleure est la perception stéréoscopique. Les organismes ayant une plus forte proportion de SP, montrent une meilleure aptitude à l'analyse stéréoscopique (Berger, 1969).

Le SP aurait un rôle à jouer dans la genèse des comportements instinctifs (Jouvet, 1991). Par lésions des cellules du locus cœruleus alpha responsable de l'atonie musculaire au cours du SP, on provoque, chez l'animal, des comportements d'attaque, de fuite et d'hyperalimentation. Le trouble du comportement en SP chez l'humain pendant lequel l'individu exprime physiquement ses rêves démontre que cette activation de comportements agressifs se retrouve également au plan phylogénique (Schench *et al.*, 1986).

Le SP servirait de support physiologique aux rêves. Quand le réveil suit une période de SP, dans 85 à 90% des cas (Dement et Kleitman, 1957a, 1957b; Dement et Wolpert, 1958a, 1958b), le souvenir des rêves persiste. Le pourcentage tombe à 50% quand le réveil se produit pendant une période de SL (Foulkes, 1962; Pivik et Foulkes, 1968; Molinari et Foulkes, 1969). Ce souvenir des rêves dépendant du stade de sommeil, semblerait indiquer que le SP est étroitement associé à une intensification de l'activité mentale. Les rêves du SP comportent plus d'éléments émotifs, ont un contenu

plus fantaisiste et font davantage appel à des perceptions d'ordre visuel que les rêves du SL (Foulkes, 1962; Rechtschaffen *et al.*, 1963).

Selon des hypothèses plus récentes, le SP aurait une fonction cognitive plus particulièrement nécessaire à l'acquisition et à la consolidation des apprentissages. Un apprentissage diurne est suivi d'une augmentation du SP. Une privation de SP diminue, au réveil, le rendement de la mémoire des informations enregistrées avant le sommeil (Smith 1985; 1995). Le SP servirait à trier les informations pertinentes des informations anodines (Crick et Mitchison, 1995). Le dicton populaire «la nuit porte conseil» ne serait donc pas sans fondement scientifique.

### 3. Modèles du contrôle de sommeil

#### 3.1 Le contrôle neurochimique du cycle veille-sommeil

Jouvet (1982) propose des mécanismes neurochimiques permissifs qui contrôlent le cycle veille-sommeil. Il y aurait à l'état de veille une accumulation d'une substance produite au niveau des parties ventrale et latérale de l'hypothalamus postérieur à partir de la sérotonine (5-HT) libérée par les terminaisons issues du noyau raphé dorsal. Les cellules sérotoninergiques sont particulièrement actives durant l'éveil et l'injection d'agonistes sérotoninergiques favorise l'apparition du SL. L'observation d'une sécrétion de 5-HT durant l'éveil et la possibilité de faire apparaître le SL laissent supposer l'existence d'un effet permissif attribuable à un agent hypnogène qui s'accumulerait au cours de l'éveil. On observe une corrélation positive entre la durée d'un éveil et l'intensité du SL qui suit l'éveil.

Cespuglio *et al.* (1990) ont mis en évidence par une étude voltamétrique qu'il se produisait, selon le moment du cycle veille-sommeil, deux types de libération de la 5-HT. Au cours de l'état de veille, la libération de la 5-HT se fait au niveau des terminaisons axonales aboutissant dans l'hypothalamus. Cette projection sérotoninergique s'étend jusqu'au noyau suprachiasmatique, région où siège l'horloge biologique. Il semble se trouver dans l'hypothalamus un système capable de transformer la 5-HT en peptides. Il pourrait s'agir d'un système à cellules APUD (*i.e.* amine, précurseur, *uptake*, décarboxylase) apte à produire, entre autres substances, du CLIP (*i.e.* corticotropin-like intermediate lobe peptide) et du POMC (*i.e.* pro-opiomelanocortin), peptides possiblement hypnogènes.

Durant le sommeil, la libération de la 5-HT au niveau des dendrites exerce une influence locale sur les mécanismes permissifs du sommeil, notamment du SL. Cette influence par rétroaction négative sur l'activité du raphé dorsal s'exerce quand la libération de 5-HT atteint un certain seuil. L'endormissement s'expliquerait par l'inhibition progressive du système responsable de l'éveil situé au niveau de la formation réticulée mésencéphalique et par la libération en quantité suffisante de la substance hypnogène au niveau hypothalamique. Celle-ci entraînerait l'apparition des ondes lentes de type delta au moment où la température centrale se trouve en phase descendante. Cette observation s'inscrit très bien dans le modèle de McCarley et Hobson (1975) qui propose une alternance des influx neuronaux excitateurs et inhibiteurs.

### **3.2 Le modèle neurochimique de l'alternance sommeil lent/sommeil paradoxal**

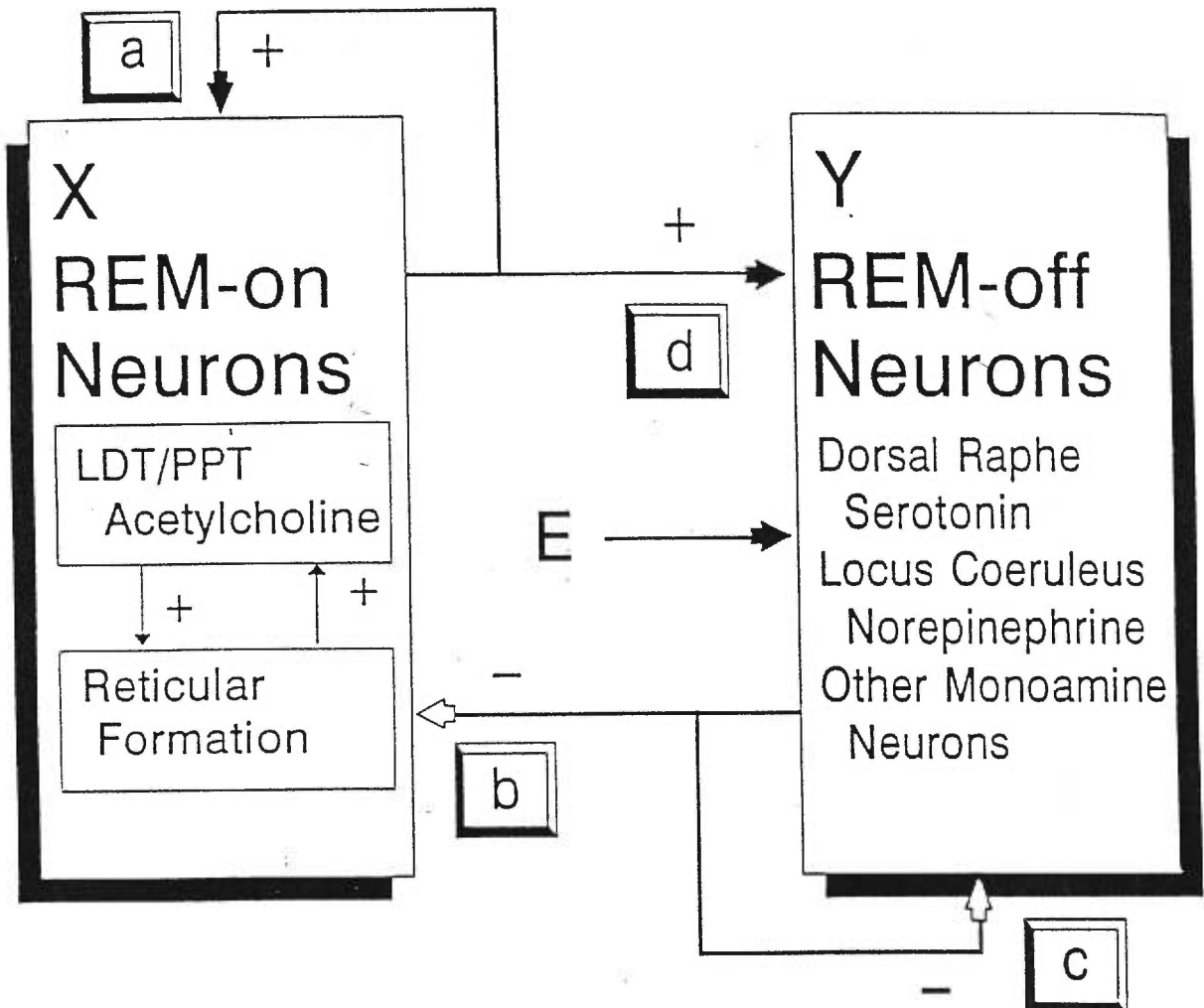
Le modèle de McCarley et Hobson (1975) tente d'expliquer non seulement la modulation du cycle veille-sommeil mais l'alternance périodique du SL et du SP. Ce modèle suppose l'existence de deux systèmes neurochimiques entretenant entre eux une relation cyclique d'inhibition et d'excitation réciproque. Ils différencient deux populations de neurones par l'appellation *SP-off* et *SP-on*. Les neurones *SP-off* sont classiquement situés dans le noyau raphé dorsal (utilisant la 5-HT) et le locus coeruleus (utilisant la noradrénaline [NA]). Plus récemment, ont été inclus dans cette population les neurones utilisant l'histamine (Steinbusch et Mudler, 1984) de même que ceux utilisant l'adénosine (Radulovacki, 1985). Les neurones *SP-on* sont situés au niveau des noyaux tegmentaires dorsolatéraux et pédonculopontiques (utilisant l'acétylcholine [ACh]) et au niveau des neurones cholinostimulés de la formation réticulée qui en reçoit les efférences. L'activité des neurones *SP-off* est très grande pendant l'éveil, réduite pendant le SL et nulle pendant le SP. Cette inactivation progressive des neurones *SP-off* pendant le sommeil s'accompagne d'une levée de l'inhibition tonique qu'ils exerçaient sur les neurones *SP-on*, ce qui permet l'induction du SP. Les neurones *SP-on* sont inactifs en SL et pendant l'éveil. La levée d'inhibition des neurones *SP-on* lors du SP s'accompagne simultanément d'une excitation progressive des neurones *SP-off* par l'ACh maintenant libérée. Quand cette excitation des neurones *SP-off* dépasse un seuil critique, les neurones *SP-on* sont à nouveau inhibés par la 5-HT et la NA ce qui relance un nouveau cycle SL-SP. Voir figure 2.

---

Puisque l'induction et le maintien du SL et du SP sont contrôlés par des mécanismes spécifiques de régulation et que le SL et le SP apparaissent préférentiellement à des moments différents du cycle veille-sommeil, on peut supposer qu'il sera plus facile d'influencer l'un ou l'autre type de sommeil selon le moment circadien où les expériences seront faites.



Figure 2 – Représentation schématique du modèle neurochimique de l'alternance sommeil lent/sommeil paradoxal (McCarley et Massaquoi, 1992)



#### Légende

<i>REM-on Neurons:</i>	SP-on
<i>REM-off Neuron:</i>	SP-off
<i>LDT:</i>	Noyau tegmentaire dorsolatéral
<i>PPT:</i>	Noyau tegmentaire pédonculopontique
<i>Reticular Formation:</i>	Formation réticulée
<i>Dorsal Raphe:</i>	Raphé dorsal
<i>Serotonin:</i>	Sérotonine
<i>Monoamine Neurons:</i>	Neurones monoaminergiques

## 4. Le gamma-hydroxybutyrate

L'implication de la Na, 5-HT, de l'ACh et de nombreux autres neurotransmetteurs dans les mécanismes du cycle veille-sommeil n'est plus à démontrer. Comme le GHB est identifié comme neurotransmetteur (Maitre, 1997), il nous intéresse de savoir s'il joue également un rôle dans le cycle veille-sommeil. Le GHB est un acide gras endogène à chaîne courte qui se retrouve à l'état naturel dans le cerveau des mammifères (Roth et Suhr, 1970; Roth *et al.*, 1980; Walter et Roth, 1977). Les sites anatomiques du cerveau où l'on retrouve du GHB endogène sont nommés dans le tableau 1. Avant de présenter les multiples aspects du GHB, nous apporterons les arguments qui ont permis de classer le GHB comme neurotransmetteur. Différents critères d'admissibilité sont couramment utilisés pour déterminer si une molécule est un neurotransmetteur (Feldman et Quenzer, 1984).

### 4.1. Le gamma hydroxybutyrate comme neurotransmetteur

- *La molécule doit être présente sous une forme séquestrée, préférablement sous forme de vésicule du côté présynaptique.* Par la technique de fractionnement, il a été possible de démontrer que le GHB se retrouve en forte concentration dans le cytosol et en plus faible concentration dans la terminaison axonale (Snead, 1987). La séquestration du GHB en vésicules a été mise en évidence par la technique de microscopie fluorescente (Aghajanian et Roth, 1970).

- *L'application exogène de la molécule dans la région synaptique doit reproduire l'effet d'un phénomène synaptique de neurotransmission.* Plusieurs procédés d'expérimentation, *in vivo* et *in vitro*, permettent de vérifier l'effet recherché. Lorsque l'on met en culture des neurones prélevés dans le cervelet, la moelle épinière et le mésencéphale, on observe une hyperpolarisation de ces neurones suite à l'administration d'une quantité élevée de GHB. Dans une expérience, *in vivo*, l'application par iontophorèse de 0.5M de GHB au voisinage immédiat de cellules nigrales, préalablement identifiées comme dopaminergiques par stimulation ipsilatérale du striatum, provoque une diminution significative du taux de décharge de ces cellules (Olpe et Koella, 1979). Dans une autre expérience, l'addition d'une petite concentration de GHB (300-600  $\mu$ M) dans le bain d'une culture de tissus prélevés au niveau de

l'hippocampe augmente considérablement (jusqu'à 300%) les niveaux *in vitro* de guanine monophosphate cyclique dans le milieu de culture. (Vayer et Maitre, 1989).

- *Il doit y avoir un mécanisme de synthèse pour la molécule; les précurseurs et les enzymes doivent être présents présynaptiquement.* L'enzyme spécifique nécessaire à la formation du GHB, la semi-aldéhyde succinique réductase, a été localisée dans le cytosol et dans les terminaisons nerveuses (Rumigny *et al.* 1981). L'enzyme est présente dans l'hypothalamus, le septum et le cervelet (Tabakoff et Von Wartburg, 1975; Anderson et Salmon, 1977; Vayer *et al.*, 1987, Maitre et Mandel, 1984; Rumigny *et al.*, 1981).

- *Il doit y avoir un mécanisme d'inactivation de la molécule, sous la forme d'une enzyme de dégradation, d'un système de recapture au niveau présynaptique, ou d'une interaction avec des éléments gliaux adjacents.* Un système de recapture à haute affinité spécifique au GHB a été identifié (Hechler *et al.*, 1985; Benavides *et al.*, 1982).

- *La présence de sites de liaisons spécifiques à la molécule doit être observée.* On a identifié des sites de liaisons à haute et faible affinité spécifiques au GHB. Ces sites de liaisons se situent principalement au niveau des terminaisons axonales chez le rat (Maitre *et al.*, 1983a, 1983b; Maitre et Mandel, 1984; Hechler *et al.*, 1991; Vayer *et al.*, 1987) comme chez l'humain (Snead et Liu, 1984).

- *La disponibilité de la molécule doit être régie par un système de libération électrosensible contrôlé par le calcium.* On a identifié un mécanisme de libération du GHB lié à l'activation de canaux calciques par une stimulation électrique (Maitre *et al.*, 1983b; Maitre et Mandel, 1984).

Finalement, le GHB satisfait à tous les critères requis pour être classé comme neurotransmetteur. Le tableau 1 résume la distribution des sites de la présence endogène, de synthèse, de liaisons et de recapture du GHB dans le cerveau.

Tableau 1 Sites de la présence endogène du GHB et distribution des sites de synthèse, de liaison et de recapture du GHB dans le cerveau des mammifères

<u>Présence endogène</u>	<u>Régions par ordre d'importance</u>
Roth (1970)	Hippocampe, cervelet
Roth <i>et al.</i> (1980)	Substance noire, noyau caudé, bulbe olfactif, aire tegmentaire ventrale et cortex cérébral
Maitre <i>et al.</i> (1983a)	Striatum
Vayer <i>et al.</i> (1987)	Cervelet, septum et hypothalamus
<u>Sites de synthèse</u>	
Rumigny <i>et al.</i> (1981)	Cervelet, septum et hypothalamus
Maitre et Mandel (1984)	Hypothalamus
Vayer <i>et al.</i> (1987)	Cervelet, septum et hypothalamus
<u>Sites de liaison</u>	
Maitre et Mandel (1984)	Bulbe olfactif, striatum, hippocampe et cortex préfrontal
Snead et Liu (1984)	Hippocampe et cortex
Vayer <i>et al.</i> (1987)	Hippocampe, cortex fronto-pariétal et septum
Hechler <i>et al.</i> (1991)	Hippocampe, cortex et striatum
<u>Sites de recapture</u>	
Bernavides <i>et al.</i> (1982)	Striatum, hypothalamus, cortex frontal et cervelet
Hechler <i>et al.</i> (1985)	Striatum

## 4.2. Récepteurs spécifiques au gamma-hydroxybutyrate

Selon les principes de base de la pharmacologie, les récepteurs peuvent être classés en fonction de leur sensibilité aux concentrations d'un neurotransmetteur. Si une faible concentration suffit pour que le neurotransmetteur se lie au récepteur, c'est un récepteur de haute affinité. Si une forte concentration est nécessaire, c'est un récepteur à basse affinité. (Feldman et Quenzer, 1984).

Les études ont montré qu'il se trouvait dans le cerveau deux types de liaison aux récepteurs à GHB (Bernavides *et al.*, 1982; Maitre *et al.*, 1983b; Snead et Liu, 1984) et qu'il s'agissait de récepteurs à GHB à haute affinité et basse affinité. Dans le SNC, les sites de liaison à haute affinité semblent présents uniquement dans les neurones, et plus précisément au niveau synaptique terminal (Maitre, 1997).

Les sites de liaison à haute affinité pour le GHB se retrouvent en différents endroits du cerveau (Snead et Liu, 1984; Hechler *et al.*, 1987, 1992). Une grande part se localise dans l'hippocampe, le cortex (préfrontal, frontal, pariétal, temporal, cortex cingulaire et entorhinal), le septum, l'hypothalamus, le cervelet, la protubérance et le bulbe rachidien. Une autre partie relativement importante loge dans le thalamus et l'amygdale. De très nombreux sites correspondant aux régions riches en terminaisons dopaminergiques, notamment le système olfactif, le noyau accumbens, le noyau caudé et le putamen, détiennent également une grande proportion de sites de liaison à haute affinité. Des sites sont enfin présents dans les aires principales dopaminergiques, substance noire (Sn), aire tegmentaire ventrale (ATV) et systèmes tuberoinfundibulaire et tuberohypophysaire.

En bref, les sites de liaison à haute affinité pour le GHB sont en grand nombre, s'étendent largement à l'intérieur du cerveau et se retrouvent souvent sur les parcours d'innervation dopaminergique.

## 4.3 Effets physiologiques du gamma-hydroxybutyrate

Le GHB a été synthétisé pour la première fois par Laborit *et al.* (1960) qui cherchaient à obtenir un dérivé de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) susceptible de traverser la barrière hémato-encéphalique. Comme le GABA, le GHB possède des propriétés dépressives sur le SNC. On a cru à tort qu'il pourrait servir en anesthésie

pour deux raisons essentielles. Il cause, d'une part, une discordance entre l'EEG et le comportement. En effet, bien qu'apparaissent sur le tracé des ondes lentes, normalement associées au SL profond ou au coma, le patient est capable de répondre aux stimulations extérieures (Laborit *et al.*, 1960; Hayashi, 1967; Metcalf *et al.*, 1966). D'autre part, bien que l'effet soit rapide, la durée d'action est très brève. Chez le rat, une modification du comportement survient dans les 4 à 6 minutes qui suivent l'injection (Walters et Roth, 1972). La demi-vie plasmatique est seulement de 60 à 90 minutes chez le rat (Roth et Giarman, 1966) et chez l'humain (Ferrara *et al.*, 1992). En conséquence, l'utilisation du GHB se limite aux chirurgies où les réflexes doivent être présents, accouchements ou interventions ophtalmiques par exemple (Vickers, 1969; Smith *et al.*, 1972).

Dans la chaîne de production du GHB, le gamma-butyrolactone (GBL) se présente comme l'un des précurseurs du GHB. Bien que proches et d'origine commune, ces deux substances possèdent néanmoins des effets physiologiques qui leur sont propres. L'absorption du GBL est plus rapide que celle du GHB (Arena et Fung, 1980). Le GBL augmente la concentration plasmatique du dioxyde de carbone lors de son administration et produit un état d'acidose métabolique persistant durant toute la période d'exposition du sujet au GBL, effets que l'on n'observe pas avec le GHB (MacMillan, 1978). Finalement, l'action épiléptogène de GBL est plus importante que celle du GHB (Snead, 1991).

Les effets du GHB sont différents selon la dose utilisée. Les faibles doses n'agissent que sur les récepteurs de liaison à haute affinité. Les fortes doses agissent sur les récepteurs à haute et basse affinité. Les effets physiologiques obtenus diffèrent donc en fonction du site d'action. D'une étude à l'autre, les doses utilisées varient considérablement. Ce que certaines études désignent par faibles doses peut s'échelonner entre 50 et 100 mg/kg; par fortes doses, entre 500 à 1000mg/kg. Selon la dose utilisée, le GHB produit non seulement des effets différents mais parfois des effets opposés. Kaufman (1990) a montré qu'une dose de 5-10mg/kg n'avait pas les mêmes effets qu'une dose de 300-500mg/kg. La petite dose entraîne une hypothermie tandis que la haute dose induit de l'hypothermie. Godbout *et al.* (1993) sont arrivés aux mêmes résultats thermiques en comparant une dose de 5-10 mg/kg avec une dose de 160-320mg/kg.

## **4.4 Effets biochimiques du gamma-hydroxybutyrate**

### **4.4.1 Effets du gamma-hydroxybutyrate sur le système dopaminergique**

Le GHB possède la propriété d'inhiber sélectivement les neurones dopaminergiques. On l'a souvent utilisé, toujours à fortes doses ( $\geq 500\text{mg/kg}$ ), pour créer des lésions chimiques réversibles dans la neurotransmission dopaminergique du système nigro-strié au cours des études expérimentales sur la maladie de Parkinson (Roth, 1987).

Chez l'animal, les études biochimiques montrent que l'administration périphérique de GHB à forte dose produit d'abord une inhibition générale de la libération de la dopamine (DA) (Murrin et Roth, 1976) qui s'accompagne d'une augmentation de sa synthèse au niveau d'au moins trois champs terminaux dopaminergiques, le striatum, le noyau accumbens et le cortex frontal (Chrapusta *et al.*, 1992; Gessa *et al.*, 1966). La DA emmagasinée après administration de GHB pourrait éventuellement, une fois libérée (Hechler *et al.*, 1991) avoir un impact fonctionnel supplémentaire indirect.

### **4.4.2 Effets du gamma-hydroxybutyrate sur les autres systèmes de neurotransmission**

Les études biochimiques montrent aussi que l'administration aiguë d'une quantité de GHB n'affecte pas ou peu la neurotransmission dans les autres grands systèmes utilisant la 5-HT ou la NA (Gessa *et al.*, 1966).

Certaines études ont toutefois montré une augmentation des niveaux de 5-HT dans le striatum et le système mésolimbique après administration d'une forte dose de GHB (400-500 mg/kg) (Spano et Przegalinski, 1973; Waldmeier et Fehr, 1978; Hedner et Lundborg, 1983; Miguez *et al.*, 1988). Les niveaux absolus de 5-HT ne sont pas significativement augmentés, mais l'accumulation tissulaire du 5-hydroxytryptophan, précurseur de la 5-HT, et les niveaux de l'acide 5-hydroxyindolacétique, le métabolite principal de la 5-HT, sont fortement accrus lors de l'administration de GHB. Ce phénomène résulte possiblement de la modification du taux de renouvellement du 5-HT par le GHB. La stimulation du taux de renouvellement de la 5-HT peut être la conséquence de deux phénomènes. Selon Maitre (1997) cette augmentation s'expliquerait par une plus grande disponibilité du tryptophane, autre précurseur de la

5-HT. Mais il pourrait bien s'agir d'un effet indirect et non spécifique car les doses utilisées sont élevées.

Les résultats des études sur les effets du GHB sur l'ACh sont à première vue contradictoires. Dans une première étude chez le rat, une dose de 750 mg/kg de GHB donne une augmentation de 44% des niveaux d'ACh dans le cortex et le mésencéphale (Giarman et Schmidt, 1963). Dans une autre étude, c'est le GBL et non le GHB qui produit des effets dépressifs sur les niveaux d'ACh dans le striatum, le cortex et l'hippocampe (Ladinsky *et al.*, 1963). Le GHB pourrait ne pas provoquer directement une augmentation des niveaux d'ACh, mais semblerait avoir la capacité de potentialiser l'augmentation résultant de l'administration de neuroleptiques comme la clozapine et la chlorpromazine (Stadler *et al.*, 1974; Laborit *et al.*, 1960).

#### 4.5 Effets électrophysiologiques du GHB

En dépit d'une augmentation de la synthèse de DA, l'administration chez le rat d'une forte dose de GHB (150-400 mg/kg) inhibe l'activité spontanée des neurones dopaminergiques dans la Sn et l'ATV (Walters et Roth, 1972; Roth *et al.*, 1973, 1980; Roth, 1987). Une étude de Diana *et al.* (1991) mentionne un effet contraire. Dans cette étude, les rats utilisés n'étaient pas anesthésiés et c'est conscients, et donc en état de stress, qu'ils étaient mis sous contention. On sait que le stress stimule l'activité des neurones dopaminergiques (Thierry *et al.*, 1968), d'où possiblement les résultats contradictoires obtenus par Diana *et al.* (1991).

Encore une fois, toutes ces études mentionnées plus tôt utilisent des fortes doses. Selon la dose utilisée le GHB agit différemment. Une étude de Godbout *et al.* (1995) a pris soin d'utiliser différentes doses pour différencier les effets du GHB. Les résultats de cette étude ont démontré qu'une forte dose de GHB (160 à 320 mg/kg) induit une inhibition réversible de l'activité de décharge des neurones du cortex préfrontal tandis qu'une faible dose (5-10 mg/kg) induit une excitation. De plus, cette étude a prouvé que l'action du GHB à faibles doses peut être bloquée par l'administration du NCS-382, l'antagoniste sélectif des récepteurs à GHB. Cet effet de blocage n'est pas obtenu pour les fortes doses de GHB. On sait que le NCS-382 n'a pas d'effet propre, ni sur l'activité métabolique de la DA, ni sur son activité neuronale (Godbout *et al.*, 1995; Hechler *et al.*, 1991; Murrin et Roth, 1976; Maitre *et al.*, 1990). On peut donc en déduire que les effets des faibles doses de GHB résultent d'une activation de récepteurs qui lui sont spécifiques. Par contre, les effets des fortes doses



semblent nécessiter la contribution additionnelle d'un système hétérologue. Puisque les récepteurs à GHB se retrouvent surtout sur les terminaisons axonales dans les champs terminaux dopaminergiques, on peut penser que le GHB module la libération de DA en agissant d'abord sur les mécanismes terminaux d'exocytose de la DA. Par ailleurs, d'après Godbout *et al.* (1995), il est possible que le mode d'action impliqué dans la modulation de la libération de DA par des fortes doses de GHB implique des récepteurs GABA<sub>B</sub>, eux aussi situés sur des terminaisons hétérologues (*i.e.*, non-GABA) ou sur des interneurons locaux homologues (Engberg et Nissbrandt, 1993; Banerjee *et al.*, 1995; William *et al.*, 1995).

Les neurones des autres systèmes de neurotransmission sont peu sensibles à l'administration du GHB. Les cellules noradrénergiques du locus coeruleus ne diminuent pas ou très peu leur activité après administration d'une dose aussi élevée que 1200 mg/kg de GHB (Roth *et al.*, 1973).

Le GHB semblerait donc modifier de façon préférentielle l'activité des cellules dopaminergiques quelle que soit la dose utilisée.

#### **4.6 Effets du gamma-hydroxybutyrate sur le cycle veille-sommeil**

Dans l'enchaînement des états de vigilance, le GHB exerce différents effets qui vont de la simple relaxation à la complète sédation.

On attribue au GHB un effet anxiolytique. Une étude où les auteurs utilisent un test de performance sensible aux anxiolytiques (*e. g.* le *critical flicker frequency*), montre que le GHB (10mg/kg) diminue significativement la fréquence à laquelle se détecte un stimulus clignotant. (Grove-White et Kelman, 1971). Dans une autre étude, cependant, l'administration de NCS-382 échoue à renverser l'effet anxiolytique d'une forte dose de GHB (50-250mg/kg) (Schmidt-Mutter *et al.*, 1998), ce qui remet en cause le rôle spécifique des récepteurs à GHB pour l'effet obtenu.

À forte dose (250-1000 mg/kg) le GHB entraîne un état de torpeur chez le rat (Laborit *et al.*, 1960; Marcus *et al.*, 1967; Hayashi, 1967; Metcalf *et al.*, 1966), le chat (Jouvet *et al.*, 1961; Winters et Spooner, 1965), le lapin (Godbout et Pivik, 1982), le singe (Snead, 1978), et l'humain (Laborit, 1964; Hayashi, 1967; Metcalf *et al.*, 1966). Chez le rat, cet état de torpeur se traduit par une diminution de l'activité motrice spontanée, la disparition du réflexe de redressement et par une perte de sensibilité aux

stimuli auditifs et tactiles. Les enregistrements électroencéphalographiques durant cette torpeur montrent une progression allant d'une hypersynchronisation intermittente à la formation de pointes épileptiques et même au silence électrique. Chez l'humain, une dose de GHB excédant 100 mg/kg peut entraîner une perte de conscience (Meltcalf *et al.*, 1966).

On a observé à maintes reprises que le GHB exerçait une influence sur le sommeil (Borenstein *et al.*, 1969; Roth et Suhr, 1970; Yamada *et al.*, 1967; Mamelak *et al.*, 1977; Hoes *et al.*, 1980; Montplaisir et Barbezieux, 1980; Lapierre *et al.*, 1990; Scrima *et al.*, 1990; Matsuzaki, 1967). Chez l'humain, l'administration d'une faible dose de GHB (25 à 50 mg/kg, p.o.) au coucher provoque une diminution du délai d'apparition du SP et une augmentation de la quantité du SL profond au détriment du SL léger.

L'augmentation du SL profond par le GHB est sujet de controverses. Certains scientifiques croient que l'augmentation résulte d'une activation des mécanismes de contrôle du SL profond (Montplaisir et Barbezieux, 1980). Pour d'autres, l'augmentation n'est que le reflet de la stimulation des générateurs d'ondes EEG lentes (Borenstein *et al.*, 1969). L'apparition d'ondes lentes pendant l'état de veille après l'administration de GHB supporte la dernière hypothèse (Metcalf *et al.*, 1966).

L'effet le plus spectaculaire du GHB est de faire apparaître rapidement le SP. À faible dose (30-50 mg/kg), il diminue la latence du SP chez l'humain (Lapierre *et al.*, 1990; Scrima *et al.*, 1990; Mamelak *et al.*, 1977) et chez le chat (Matsuzaki, 1967). Cet effet s'obtiendrait surtout chez les individus présentant des conditions physiologiques ou pathologiques facilitant l'induction du SP: narcolepsie (Broughton et Mamelak, 1979; Mamelak *et al.*, 1977), dépression (Mamelak *et al.*, 1977), personnes âgées, et en fin de nuit chez le sujet sain, moment du cycle nyctéméral le plus favorable à l'émergence du SP (Delorme *et al.*, 1966; Lapierre *et al.*, 1990). À forte dose, le GHB (> 250 mg/kg) entraîne une augmentation de la durée de SL profond au détriment du SP (Mamelak *et al.*, 1977).

#### **4.7 Autres effets du gamma-hydroxybutyrate**

Le GHB exerce une action endocrinienne, notamment en agissant sur l'hormone de croissance (Van Cauter *et al.*, 1997) et sur la prolactine (Takahara *et al.*, 1977). Chez l'humain, l'administration intraveineuse de 2,5 g de GHB (environ 40-50 mg/kg) donne une augmentation de la concentration plasmatique d'hormone de croissance et

de prolactine. Puisque la sécrétion de prolactine est directement inhibée par les neurones dopaminergiques (MacLeod, 1969; Kamberi *et al.*, 1971 et Takahara *et al.*, 1974), le GHB semblerait agir par l'entremise de la DA. Au niveau de l'hormone de croissance, le GHB agirait également par l'entremise de la DA mais de manière indirecte. L'inhibition de la transmission dopaminergique par le GHB entraîne une désinhibition du GABA, ce qui provoque la libération de l'hormone de croissance (Racagni *et al.*, 1982).

Le GHB agit par ailleurs sur le comportement. Redgrave *et al.* (1982) ont observé une augmentation de comportements dopamino-dépendants tel que le comportement alimentaire environ 90 minutes après l'injection de GHB. Ce temps de latence correspond à la demi-vie du GHB (Redgrave *et al.*, 1982) et au délai de libération de la dopamine accumulée.

En raison de son action rapide, le GHB est actuellement une substance très convoitée par les consommateurs de drogues. On lui prête des propriétés euphorisantes et aphrodisiaques. Ses effets sont dangereusement potentialisés par l'absorption d'alcool. Par ailleurs, le GHB utilisé dans ce contexte de consommation est souvent utilisé à forte dose et est de fabrication douteuse en raison de son origine clandestine (Galloway *et al.*, 1997).

La corrélation entre les effets du GHB à fortes doses (>100 mg/kg) et les modifications de DA au niveau central (Gessa *et al.*, 1966) a été assez bien étudiée. Par contre, peu d'études se sont attardées à comparer les effets physiologiques et comportementaux du GHB à faibles et à fortes doses. La température centrale est la seule variable qui a fait l'objet d'une étude dose-réponse (Kaufman *et al.*, 1990; Godbout *et al.*, 1993). Ces deux études ont montré que le GHB injecté à faible dose (5-10 mg/kg, i.p.) augmente la température centrale alors qu'à fortes doses (300-500 mg/kg, i.p.), il l'abaisse.

#### **4.8 Effets thérapeutiques du gamma-hydroxybutyrate**

On a récemment découvert que le GHB était efficace dans le traitement de l'alcoolisme. Chez l'humain et chez le rat il réduit considérablement la consommation volontaire d'alcool (Biggio *et al.*, 1992; Fadda *et al.*, 1989) et contrôle les effets du sevrage (Gallimberti *et al.*, 1992; Fadda *et al.*, 1983, 1989). Il contrôle également le

sevrage des opiacés (Gallimberti *et al.*, 1993), probablement via l'action du GHB sur les systèmes dopaminergiques innervant le noyau accumbens, structure responsable du phénomène de récompense des drogues favorisant la toxicomanie (Di Chiara et Imperato, 1988).

Actuellement, le GHB est surtout utilisé dans le traitement de la narcolepsie. Cette maladie se caractérise par l'invasion d'épisodes de SP durant l'éveil (Broughton et Mamelak, 1980). Selon certains auteurs (Broughton et Mamelak, 1980; Scharf *et al.*, 1985), l'action thérapeutique du GHB est étroitement liée à son effet sur l'organisation du sommeil des personnes narcoleptiques. Une faible dose de GHB (25-50 mg/kg) prise par la bouche au coucher diminue les éveils et les changements de stades qui fragmentent de façon caractéristique le SP nocturne des patients narcoleptiques, ce qui réduirait le besoin de sommeil compensateur des malades pendant le jour.

De façon surprenante, il ne se trouve qu'un nombre réduit d'études sur le mode d'action du GHB dans la narcolepsie. Dans une étude de Delorme *et al.* (1966), l'administration chez le chat de GHB fait apparaître le SP. Dans une autre étude, Godbout et Pivik (1982) ne réussissent pas à obtenir ce même effet chez le lapin. Il se peut que le SP du lapin soit de nature différente et, de ce fait, insensible aux mécanismes de contrôle habituels. Chez le lapin, contrairement à ce qui s'observe dans les autres espèces, l'atonie du SP n'est pas complète (Pivik *et al.*, 1981). Godbout et Pivik (1982) sont les seuls chercheurs à avoir étudié les effets du GHB sur l'EEG et sur le sommeil en utilisant une large gamme de différentes doses (25 à 1250 mg/kg i.v.) et à avoir obtenu un effet hypnotique à faibles et fortes doses chez le lapin.

## **5. Retour sur les concepts importants**

En conclusion, le GHB est un neurotransmetteur encore peu connu dont l'action sur le sommeil mérite d'être explorée de façon plus exhaustive. Il agit différemment selon la dose administrée en sollicitant des récepteurs à GHB de basse ou haute affinité. Ses effets semblent plus marqués dans des situations propices au SP d'où l'intérêt de l'étudier en fonction du rythme circadien des stades du sommeil. Puisque le GHB intervient surtout au niveau du système dopaminergique, certains sites anatomiques semblent mieux se prêter à l'étude de son rôle fonctionnel et de son utilité clinique.

## 6. Hypothèses

Il semble que le GHB ait des effets hypnotiques et électrophysiologiques différents selon la dose utilisée. Il est possible que ces effets soient également modulés par des facteurs chronobiologiques puisque le sommeil est soumis à des variations circadiennes. Notre étude veut éclaircir ces aspects et la recension des écrits nous permet d'émettre les hypothèses suivantes.

### 1. Hypothèses du gamma-hydroxybutyrate sur le sommeil

- Puisque le GHB est un hypnotique chez l'humain, le chat et le lapin, et ceci a été démontré sur une large gamme de doses, **le GHB induirait l'endormissement plus rapidement que le sérum physiologique, toutes doses confondues;**
- Puisque le GHB réduit la latence au SP chez l'humain, **le GHB réduirait la latence au SP chez le rat;**
- Puisque le GHB augmente la durée du SL profond chez l'humain, **le GHB augmenterait la durée du SL profond chez le rat;**
- **Conséquemment la durée de l'éveil et du SL léger devrait être réduite.**
- Puisque le rat est un animal à activité nocturne et que sa période principale de sommeil survient le jour, **tous les effets du GHB sur le sommeil seraient plus prononcés en période de lumière (CT2),** moment nycthéral le plus favorable à l'émergence du SL profond, **qu'en période d'obscurité (CT14),** moment où le sommeil est moins susceptible de survenir; de plus,
- Puisque le GHB agit plus efficacement dans des conditions physiologiques facilitant l'induction du SP, **les effets du GHB sur le SP seront plus prononcés durant la deuxième partie de la période principale de sommeil (CT8),** moment nycthéral le plus favorable à l'émergence du SP.

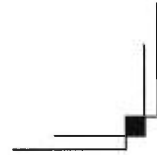
2. Hypothèse sur l'application de l'antagoniste sélectif des récepteurs GHB, le NCS-382, sur les effets du GHB

- Puisque le NCS-382 bloque uniquement les effets neuronaux induits par de faibles doses de GHB, **NCS-382 bloquerait les effets du GHB à faible dose mais n'affecterait pas les changements induits par la forte dose de GHB.**

# *Chapitre 2*



## *Méthodologie*



## Méthodologie

### 7. Déroulement de la recherche, matériel et conditions générales

#### 7.1 Enregistrement des stades de vigilance

Des rats mâles Sprague-Dawley pesant 250-300 mg ont subi une chirurgie pendant laquelle nous avons installé les électrodes EOG, EMG et EEG (fronto-pariétal) nécessaires à la détermination des états de vigilance. Les rats ont été logés dans des pièces illuminées de 06:00 à 18:00 avec un accès *ad libitum* à la nourriture. La température ambiante de la pièce abritant les rats était constamment maintenue entre 22-25 °C.

Deux jours après la chirurgie, on a familiarisé les animaux à l'équipement expérimental en les logeant individuellement dans des cages d'enregistrement et en les connectant aux fils souples destinés à transmettre les signaux électrophysiologiques vers les appareils. Les expériences ont débuté au septième jour suivant la chirurgie. Les signaux électrophysiologiques étaient filtrés par des amplificateurs Grass 8A5 ou 8P511 de la façon suivante: EOG, 0.5-30.0Hz; EEG, 0.01-200Hz; EMG, 5-100Hz, et le résultat final fut transmis à un micro-ordinateur de type PC 486-33 afin d'être échantillonné à une fréquence de 128Hz et entreposé sur disques optiques.

#### 7.2 Administration des traitements pharmacologiques

Des flacons de GHB (Sigma Chem., St.Louis, MO) et de véhicule (sérum physiologique: solution NaCl 0.9%) ont été préparés et codés; les codes n'ont été révélés qu'une fois l'analyse des données terminée. Sur la base des résultats précédemment obtenus concernant l'action électrophysiologique du GHB (Godbout et Pivik, 1982; Godbout *et al.*, 1993), trois niveaux de traitements ont été utilisés, soit: le sérum physiologique, 10 mg/kg de GHB (faible dose) et 160 mg/kg de GHB (forte dose). Pour s'assurer que les effets du GHB observés étaient spécifiques aux récepteurs à GHB, les trois niveaux de traitements ont été injectés seuls ou en même temps que le NCS-382. Les solutions ont été administrées i.p. dans un volume de



1 ml/kg. Compte tenu de la demi-vie du GHB (Snead, 1991; Whitehead et Virtue, 1971) 48 heures s'écoulaient entre chaque traitement.

Puisqu'il était possible que les effets du GHB soient modulés par des facteurs chronobiologiques, les injections ont été données à trois moments prévus: a) à 8:00, c'est-à-dire au moment où la probabilité d'apparition du SL est à son maximum, b) à 14:00, c'est-à-dire au moment où la probabilité d'apparition du SP est à son maximum et c) à 20:00, soit au moment où le sommeil est moins susceptible de survenir chez le rat (Alfödi *et al.*, 1990; Borbély et Neuhaus, 1978a, 1978b; Traschel *et al.*, 1988).

Au départ, il été convenu que les rats recevraient tous les traitements selon une séquence déterminée par une table de hasard et que les résultats pour chacun des traitements seraient comparés à ceux obtenus lors de l'injection du sérum physiologique chez le même rat. Cette procédure a été entièrement appliquée pour la première étude d'où l'utilisation d'un test paramétrique pairé. Cependant, en raison d'une augmentation de traitements dans la deuxième étude et la troisième étude, la période d'expérimentation a été considérablement prolongée, de sorte que plusieurs rats ont été perdus en cours d'expérience. Dès lors, des tests statistiques pour groupes indépendants ont été utilisés.

En se basant sur la durée des effets comportementaux du GHB, y compris l'effet rebond induit par la libération de la DA accumulée (Redgrave *et al.*, 1982), nous avons analysé les états de vigilance pendant les quatre heures qui ont suivi l'injection.

### **7.3 Aspects déontologiques**

Ce projet est conforme aux directives du Conseil Canadien de la Protection des Animaux et a été approuvé par le comité bioéthique animal de l'hôpital du Sacré Cœur.

## Chapitre 3



*«Facilitation of REM sleep in the rat  
with Gamma-hydroxybutyrate»*



---


# Facilitation of REM sleep in the rat with gamma-hydroxybutyrate

Véronique Girodias<sup>1</sup>, Roger Godbout<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur, Montréal (Québec) Canada;

<sup>2</sup> Département de psychiatrie Université de Montréal, Montréal (Québec) Canada;

## Correspondence:

Roger Godbout, Ph.D.  
Centre de recherche  
Hôpital du Sacré-Coeur  
5400 Boul. Gouin ouest  
Montréal (Québec)  
Canada H4J 1C5  
Tel.: (514) 338-2222, ext. 2460  
Fax: (514) 338-2694  
Email: 

SUBMITTED TO NEUROSCIENCE LETTERS

## **Abstract**

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous fatty acid with sedative-hypnotic properties. GHB has been shown to induce REM sleep in humans and cats, but not in rats. We recorded the sleep of rats immediately after a low (10 mg/kg, i.p.) and a high (160 mg/kg, i.p.) dose of GHB. Compared to saline, only the low dose of GHB shortened the delay to the onset of REM sleep. The same dose also increased the duration of light slow-wave sleep (SWS) at the expense of deep SWS. On the other hand the high GHB dose increased sleep latency and shortened deep SWS onset latency. These results show that the acute effects of GHB on REM sleep are dose-specific and that REM sleep is selectively triggered by low doses in the rat.

## **Keywords:**

sleep disorders, paradoxical sleep, narcolepsy, cataplexy, abuse, dopamine.

## Introduction

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous fatty acid thought to act as a neurotransmitter in the central nervous system.[9,11] Its administration produces a cessation of impulse flow in mesencephalic dopaminergic (DA) neurons and is accompanied by a rapid and selective increase in intracellular dopamine at the terminal level.[17] GHB has sedative-hypnotic properties and its nocturnal administration is used to treat cataplexy in patients with narcolepsy. This symptom is related to the inappropriate daytime triggering of rapid eye movement (REM) sleep muscle atonia, particularly when strong emotions are induced. It has been proposed that the therapeutic effect of GHB in narcolepsy is achieved by facilitating nocturnal REM sleep, thus decreasing daytime pressure for this state.[12]

GHB readily crosses the blood-brain barrier and it is short-acting, with a plasmatic half-life ranging between 60 and 90 minutes in the rat using doses of 90 to 600 mg/kg, i.p.[9,16,18] At the present time, peripheral administration of GHB has been shown to facilitate REM sleep without rebounds in humans [1,10,12] and cats [6,8,14], but not in rats.[4,9,13] The lack of evidence for the REM sleep inducing property of GHB in the rat may be attributable to differences in methodology, including dosage and the sleep variables analysed.

The issue of dosage relies on the fact that one of the main characteristics of GHB as a neurotransmitter is the presence of low and high affinity states of the central GHB receptor;[11] therefore, it may be possible that different doses of GHB are bound to have different physiological effects. Indeed, low GHB doses (5-10 mg/kg, i.p.) were shown to increase firing activity in prefrontal cortex output neurons and in presumed DA neurons of the ventral tegmental area whereas higher doses (160-250 mg/kg, i.p.) were shown to decrease it;[2,19] moreover, low GHB doses were also shown to increase core body temperature while high GHB doses were shown to decrease it.[7] Finally, higher doses of GHB can induce generalised absence-like seizures, which has led to its use as an experimental model for petit mal epilepsy. [18]

The lack of evidence for a facilitatory effect of GHB on REM sleep in the rat may also be due to incomplete data description. Indeed, previous reports on the effects of GHB on sleep in the rat did only analyse the total duration of REM sleep, not the

latency to its onset, even though this variable was consistently reported to be the most sensitive to GHB administration in cats and humans. Onset latency and duration are both important as they point out to different neurophysiological mechanisms of REM sleep control, *i.e.*, triggering versus maintenance of REM sleep.[5]

The present research was undertaken to further characterize the effects of GHB on the sleep-wake cycle of the rat by adding methodological controls to previous studies, namely dosage used and dependant variable analysed.

## Methods

Six male Sprague-Dawley rats (300 g) were implanted with chronic electrodes for electroencephalography, electro-oculography and electromyography at least seven days before recordings began. Animals were housed individually with food and water *ad libitum*. Lights were turned on at 06:00 for 12 hours. Based on published results [2,19] each rat was treated on separate occasions with a low (10 mg /kg, i.p.) and a high (160 mg/kg, i.p.) dose of GHB, or with saline; treatments were counterbalanced. Injections were done 2 hours after lights were turned on. Recordings started at the time of injection and lasted 4 hours; at least 48 hours elapsed between treatments. Recordings were visually scored by 2 judges unaware of the experimental condition, using 10 s epochs at a recording paper speed of 15 mm/s. Variables were defined as follows: sleep onset latency: time elapsed between the moment injection and the first occurrence of any sleep stage; latency to light Slow Wave Sleep (SWS): time elapsed between sleep onset and the appearance of the first sleep spindle (8-14 Hz, 0.5-1.5 s); latency to deep SWS: the time elapsed between sleep onset and the first epoch containing more than 50% of delta waves (0.5-4.0 Hz); latency to REM sleep: the time elapsed between sleep onset and the first concomitant occurrence of desynchronized electroencephalogram, atonic electromyogram, and rapid eye movements; REM sleep fragment: a sequence of uninterrupted REM sleep epochs; sleep period: interval between sleep onset and the last epoch of sleep before the end of the recording. Total sleep time: the total time spent in any of the sleep stages. Duration of sleep stages is expressed as a percentage of total sleep time. Waking after sleep onset: time awakened during the sleep period. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Comparisons between saline and each GHB dose were made using paired *t*-tests.

## Results

Results are presented in Table 1. Sleep always started with an epoch of light SWS. At 10 mg/kg, REM sleep latency was significantly and selectively shortened, while REM sleep duration and the number of REM sleep fragments were not affected; GHB 10 mg/kg also increased light SWS duration. On the other hand, GHB 160 mg/kg increased sleep onset latency and reduced the latency to deep SWS. There were no differences between thirds of recording time for any measures of duration neither for REM sleep fragmentation at any dose, showing that no rebound effect took place during the four hours of recording.

**Table 1. Effects of gamma-hydroxybutyrate on sleep in the rat (mean  $\pm$  S.E.M.)**

	Saline	GHB 10 mg/kg	GHB 160 mg/kg
Sleep latency (min)	37.5 $\pm$ 14.8	37.0 $\pm$ 7.8	57.9 $\pm$ 9.9*
SWS-2 latency (min)	27.6 $\pm$ 11.7	21.4 $\pm$ 13.0	8.1 $\pm$ 1.7*
REMS latency (min)	53.5 $\pm$ 10.2	24.0 $\pm$ 4.8*	32.6 $\pm$ 10.5
SWS-1 duration (%)	42.0 $\pm$ 7.5	51.9 $\pm$ 1.9*	46.8 $\pm$ 5.8
SWS-2 duration (%)	41.3 $\pm$ 8.3	31.9 $\pm$ 0.9	39.2 $\pm$ 5.1
REMS duration (%)	16.7 $\pm$ 1.8	16.1 $\pm$ 2.0	14.0 $\pm$ 0.8
REMS fragments/min	0.07 $\pm$ 0.6	0.08 $\pm$ 0.4	0.07 $\pm$ 0.06
WASO (%)	13.0 $\pm$ 4.5	13.7 $\pm$ 2.4	9.4 $\pm$ 3.0
Total sleep time (min)	194.8 $\pm$ 9.6	192.3 $\pm$ 8.9	154.5 $\pm$ 13.2

\*  $p < .05$ , paired  $t$ -tests versus saline. SWS-1: light Slow Wave Sleep; SWS-2: deep Slow Wave Sleep; REMS: REM sleep; WASO: Waking After Sleep Onset.

## Discussion

These results show for the first time that GHB can facilitate the triggering of REM sleep in the rat; no effects were found on REM sleep duration, as previously reported [4,13]. The two other studies that tested the effects of GHB on sleep in the rat may have failed to observe a shortening of REM sleep latency for various methodological issues, including the obvious fact that latencies were not computed [4] or because doses only ranged in the high levels (100-850 mg/kg). [13] Low-dose GHB also facilitated light SWS at the expense of deep SWS. At high doses, GHB significantly increased sleep latency and decreased deep SWS latency. We think that this may reflect a facilitation of EEG desynchrony by low doses of GHB while EEG delta waves would be facilitated by high doses of GHB. This has to be further analysed using quantitative EEG analysis.

It has been shown that only the central effects of low (5-10 mg/kg), not high, doses of GHB on neuronal activity and core body temperature are reversed by the GHB receptor antagonist NCS-382. [2,3,19] Moreover, it has been shown that other mechanisms, possibly involving gamma-aminobutyric acid or glutamate-aspartate neurotransmission, contribute to the effects of higher (160-320 mg/kg) doses. [20] Therefore it is possible that the facilitation of REM sleep by a low dose of GHB as shown by the present results is due to a selective activation of high affinity GHB receptors. Experiments with the GHB receptor antagonist NCS-382 are required to further document this possibility; this equally applies to the dose-dependant effects of GHB on SWS and EEG slow-wave activity .

The present results suggest the possibility that the mechanisms involved in the therapeutic action of GHB in narcolepsy include a selective activation of GHB receptors since comparable low doses (25-50 mg/kg, p.o.) are used. [12] This therapeutic action of GHB would not involve REM sleep maintenance mechanism or consolidation of REM sleep *per se* since REM sleep duration and fragmentation were not affected in the present experiments. Rather, this therapeutic effect could be related to the activation of a pathway common to the triggering REM sleep and the limbic system, the latter being both involved in the pathophysiology of cataplexy [15] and rich in GHB receptors. [11]



## REFERENCES

- [1] Broughton, R. and Mamelak, M., Effects of nocturnal gamma-hydroxybutyrate on sleep/waking patterns in narcolepsy-cataplexy, *Can.J.Neurol.Sci.*, 7 (1980) 23--31.
- [2] Godbout, R., Jelenic, P., Labrie, C., Schmitt, M. and Bourguignon, J.J., Effect of gamma-hydroxybutyrate and its antagonist NCS-382 on prefrontal cortex firing in the rat, *Brain Res.*, 673 (1995) 157--160.
- [3] Godbout, R., Rompré, P.P., Schmitt, M. and Bourguignon, J.J., NCS-382 reverses hyperthermia, not hypothermia, induced by gamma-hydroxybutyrate in the rat. *Soc. Neurosci. Abstracts*, 20 (1994) 1563.
- [4] Godschalk, M., Dzoljic, M.R. and Bonta, I.L., Slow wave sleep and a state resembling absence epilepsy induced in the rat by gamma-hydroxybutyrate, *Eur. J. Pharmacol.*, 44 (1977) 105--111.
- [5] Hobson, J.A., Datta, S., Calvo, J.M. and Quattrochi, J., Acetylcholine as a brain state modulator: triggering and long-term regulation of REM sleep, *Prog. Brain Res.*, 98 (1993) 389--403.
- [6] Jouvet, M., Cier, A., Mounier, D. and Valatx, J.L., Effets du 4-butyrolactone et du 4-hydroxybutyrate de sodium sur l'E.E.G. et le comportement du chat, *C. R. Soc. Biol.*, 155 (1961) 1313--1316.
- [7] Kaufman, E.E., Porrino, L.J. and Nelson, T., Pyretic action of low doses of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in rats, *Biochem.Pharmacol.*, 40 (1990) 40, 2637--2640.
- [8] Knuepfer, M.M., Stumpf, H. and Stock, G., Baroreceptor sensitivity during desynchronized sleep, *Exp. Neurol.*, 92 (1986) 323--334.
- [9] Laborit, H., Sodium 4-hydroxybutyrate, *Int.J. Neuropharmacol.*, 3 (1964) 433--452.
- [10] Lapierre, O., Montplaisir, J., Lamarre, M. and Bédard, M.A., The effect of gamma-hydroxybutyrate on nocturnal and diurnal sleep of normal subjects: further considerations on REM sleep- triggering mechanisms, *Sleep*, 13 (1990) 24--30.
- [11] Maitre, M., The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications, *Prog. Neurobiol.*, 51 (1997) 337--361.

[12] Mamelak, M., Scharf, M.B. and Woods, M., Treatment of narcolepsy with  $\gamma$ -hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings, *Sleep*, 9 (1986) 285--289.

[13] Marcus, R.J, Winters, W.D., Mori, K. and Spooner C.E. EEG and behavioral comparison of the effects of gamma- hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and short chain fatty acids in the rat, *Int. J. Neuropharmacol.*, 6 (1967) 175--185.

[14] Matsuzaki, M., Takagi, H. and Tokizane, T. , Paradoxical phase of sleep: its artificial induction in the cat by sodium butyrate, *Science*, 146 (1964) 1328--1329.

[15] Reid, M.S., Tafti, M., Nishino, S., Sampathkumaran, R., Siegel, J.M. and Mignot, E. Local administration of dopaminergic drugs into the ventral tegmental area modulates cataplexy in the narcoleptic canine, *Brain Res.*, 733 (1996) 83--100.

[16] Roth, R.H. and Giarman, N.J., Gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyric acid. I - Distribution and metabolism, *Biochem. Pharmacol.* 15 (1966) 1333--1348.

[17] Roth, R.H. Biochemical correlates of the electrophysiological activity of dopaminergic neurons. In L.A. Chiodo and A.S. Freeman (Eds.), *Neurophysiology of dopaminergic systems. Current status and clinical perspectives*, Lakeshore Publishing Company, Grosse Pointe (Michigan), 1987, pp. 187--203.

[18] Snead O.C., 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 (1991) 161--167.

[19] Tremblay, H., Godbout, R., Girodias, V., Schmitt, M. and Bourguignon, J.J., Effects of gamma-hydroxybutyrate on ventral tegmental unit activity in the rat: considerations on REM sleep control, *Sleep Res. Online*, 1 (1998) 152--158. (<http://www.sro.org/1998/tremblay/152/>)

[20] Williams, S.R, Turner, J.P. and Crunelli, V., Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABA<sub>B</sub> receptor-mediated hyperpolarization, *Neuroscience*, 66 (1995) 133—141

---

**Acknowledgements**

Supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Conseil de la recherche en sciences naturelles et génie du Canada.

## Chapitre 4



*«The triggering of rapid eye movement  
sleep in the rat with gamma-  
hydroxybutyrate (GHB) is reversed by  
the receptor antagonist NCS-382»*



# The triggering of rapid eye movement sleep in the rat with gamma-hydroxybutyrate (GHB) is reversed by the GHB receptor antagonist NCS-382


Véronique Girodias<sup>1</sup>, Roger Godbout<sup>1,2</sup>  
Martine Schmitt<sup>3</sup> and Jean-Jacques Bourguignon<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur, Montréal (Québec) Canada

<sup>2</sup> Département de psychiatrie Université de Montréal, Montréal (Québec) Canada

<sup>3</sup> Faculté de pharmacie, Université Louis-Pasteur, ERS 655 du CNRS, Illkirch, France

## Correspondence:

Roger Godbout, Ph.D.  
Centre de recherche  
Hôpital du Sacré-Coeur  
5400 Boul. Gouin ouest  
Montréal (Québec)  
Canada H4J 1C5  
Tel.: (514) 338-2222, ext. 2460  
Fax: (514) 338-2694  
Email: 

SUBMITTED TO SLEEP

## Abstract

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous sedative-hypnotic used in the treatment of narcolepsy, a sleep disorder characterized by abnormal nocturnal and diurnal manifestations of Rapid Eye Movement (REM) sleep. The mechanism by which GHB achieves its therapeutic effects is thought to involve a facilitation of nocturnal REM sleep. At the present time, GHB has been shown to induce REM sleep in humans and cats, but not in rats, rabbits and dogs. The present study analysed the effect of different doses of GHB on sleep in the rat by using a co-treatment with a GHB receptor antagonist.

Rats were injected two hours after the onset of the light period with a low (10 mg/kg, *i.p.*; n = 19) and a high (160 mg/kg, *i.p.*; n = 16) dose of GHB with and without the co-administration of the GHB receptor antagonist NCS-382. Polysomnographic recordings lasted four hours.

Compared to a saline treatment, REM sleep latency was decreased by the low GHB dose; other REM sleep parameters including duration (total as well as for the first third of the sleep period), efficiency, and number of REM sleep periods were not affected. Sleep was not affected otherwise. The GHB receptor antagonist NCS-382 blocked the effect of GHB on REM sleep latency. At the high dose, GHB was only associated with a non-significant increase of slow-wave sleep.

These results suggest that the selective activation of high affinity GHB receptors activates REM sleep triggering mechanisms without affecting REM sleep maintenance. The clinical effects of GHB in narcolepsy are discussed.

## Keywords:

gamma-hydroxybutyrate, NCS-382, paradoxical sleep, narcolepsy, dopamine

## Introduction

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous fatty acid thought to act as a neurotransmitter in the central nervous system (Vayer *et al.*, 1987; Maitre, 1997). GHB readily crosses the blood-brain barrier and its administration is reported to produce a cessation of dopamine (DA) release, accompanied by a rapid and selective increase in intracellular dopamine at the terminal level (Roth, 1987). GHB is used as a sedative-hypnotic both in animals and humans; taken at bedtime it is an efficient treatment for cataplexy, a symptom related to the inappropriate daytime triggering of REM sleep muscle atonia in narcoleptic patients (Broughton and Mamelak, 1979); some have also reported the efficacy of GHB against excessive daytime somnolence (Lammers *et al.*, 1993; Scharf *et al.*, 1985). It has been proposed that the therapeutic effect of this compound is achieved by consolidating nocturnal REM sleep, thus decreasing daytime pressure for REM sleep (Broughton and Mamelak, 1979). More recently, GHB has been used to treat alcohol (Biggio *et al.*, 1992) and opiate abuse (Gallimberti *et al.*, 1993). In both animals and humans, GHB has been shown to decrease intake (Biggio *et al.*, 1992; Fadda *et al.*, 1989), craving upon withdrawal (Gallimberti *et al.*, 1992; Fadda *et al.*, 1983, 1989) and anxiety (Schmidt-Muller *et al.*, 1998). Using the animal model, some authors have proposed that GHB itself may have a potential for abuse (Colombo *et al.*, 1995, Galloway *et al.*, 1997).

GHB receptors are found throughout the central nervous system, mainly in the limbic system and the striatum (Maitre, 1997). Binding studies in rats (Maitre *et al.*, 1983a, 1983b; Maitre and Mandel, 1984; Hechler *et al.*, 1987; Vayer *et al.*, 1987) and humans (Snead and Liu, 1984) have shown that GHB receptors reside principally on axon terminals, where they can be found in a high- and a low- affinity state (Maitre *et al.*, 1983). The fact that GHB receptors have a high- and low- affinity state makes it plausible that different doses of GHB will yield different physiological effects. Indeed, recent results have shown that low GHB doses (5-10 mg/kg, i.p.) increase neuronal unit activity in prefrontal cortex output neurons and in dopaminergic ventral tegmental area neurons (Godbout *et al.*, 1995; Tremblay *et al.*, 1998) whereas higher doses (160-250 mg/kg, i.p.) were shown to decrease it; moreover, low GHB doses were also shown to increase core body temperature while high GHB doses were shown to decrease it (Kaufman *et al.*, 1990).

The peripheral administration of GHB has been shown to induce REM sleep in cats (Delorme *et al.*, 1966; Jouvet *et al.*, 1961; Knuepfer *et al.*, 1986; Matsuzaki *et al.*, 1964; Matsuzaki and Tagaki, 1967) and humans (Broughton and Mamelak, 1979; 1980; Lapierre *et al.*, 1990; Mamelak *et al.*, 1973) but not in rabbits (Godbout and Pivik, 1982; Laborit, 1973) nor in dogs (Laborit, 1973). While some have shown a facilitation of REM sleep in the rat (Girodias and Godbout, 1999, submitted) others have not succeeded (Godschalk *et al.*, 1977; Marcus *et al.*, 1967). The present research was undertaken to further elucidate the mechanism by which GHB can induce REM sleep by using different doses as well as pre-treatments with the GHB receptor antagonist NCS-382 (6,7,8,9-tetrahydro-5[H]-benzocycloheptene-5-*o*-4-ylidene acetic acid sodium salt: C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>Na.1H<sub>2</sub>O, molecular weight = 240.25). We now report that low doses of GHB can induce REM sleep in rats and that NCS-382 reverses this effect.

## Methods

Adult male Sprague-Dawley rats (300 g) were implanted with chronic frontal and parietal EEG, EOG, and nuchal EMG electrodes. Recordings were performed at least seven days after surgery and at least five days after they were connected to the recording apparatus. Animals were housed individually with food and water *ad libitum*. Lights were turned on at 06:00 for 12 hours. Based on the literature (see above) rats were treated with either a low (10 mg /kg, i.p.; n = 19) or a high (160 mg/kg, i.p.; n = 16) dose of GHB, with and without a co-administration of the GHB receptor antagonist NCS-382 (Maitre *et al.*, 1990); all rats also received a saline control injection. Treatments were given in random order; at least 48 hours elapsed between experiments and rats were always kept connected to the recording apparatus throughout completion of the protocol. Injections were done two hours after lights were turned on. Recordings started at the time of injection and lasted four hours, using a computer-assisted system (Eclipse™, Stellate Systems, Montreal, Canada).

Recordings were visually scored on-screen by two judges unaware of the experimental condition, using 10 s epochs (50  $\mu$ V = 75 mm; 1 sec = 3.0cm screen width). Discrepancies were resolved by mutual agreement. Variables were defined as follows: Sleep onset latency: time elapsed between the moment of injection and the first occurrence of any sleep stage. Latency to light Slow Wave Sleep (SWS-1): time elapsed between sleep onset and the appearance of the first sleep spindle (8-14 Hz,



0.5-1.5 s). Latency to deep Slow Wave Sleep (SWS-2): the time elapsed between sleep onset and the first epoch containing more than 50% of delta waves (0.5-4.0 Hz). Latency to REM sleep (REMS): the time elapsed between sleep onset and the first concomitant occurrence of desynchronized EEG, atonic EMG, and rapid eye movements. REMS periods: sequence of REMS epochs not interrupted by more than one minute of another state; REMS efficiency: based on REMS periods, it is the ratio of REMS time to time in another state, multiplied by 100. Sleep period: interval between sleep onset and the last epoch of sleep before the end of the recording. Total sleep time: the total time spent in any of the sleep stages. Duration of sleep stages is expressed as a percentage of total sleep time. Waking after sleep onset (WASO): time awakened during the sleep period, *i.e.* following sleep onset. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Each GHB dose was compared to a saline treatment, using independent *t*-tests.

## Results

Results are presented in Table 1. Sleep always started with an epoch of SWS-1. At 10 mg/kg, GHB significantly and selectively shortened REMS latency; no sleep onset REMS (REMS latency < 1 min.) was noted. REMS duration (for the total as well as for the first third of the sleep period), the number of REMS periods, and REMS efficiency were not affected. Other sleep parameters, including SWS-2 and WASO were not affected either. The effect of GHB on REMS latency was no longer observed when rats were pre-treated with NCS-382 ( $45.4 \pm 6.4$  min. vs.  $36.1 \pm 6.5$  min.,  $t = -1.02$ ;  $p < .32$ ).

At the high dose of 160 mg/kg, GHB did not affect REMS whatsoever. There was a 31.2% increase in SWS-2 duration for the first third of the sleep period, but this was non-significant ( $p < .13$ ).

**Table 1. Effects of gamma-hydroxybutyrate on the sleep in the rat (mean  $\pm$  S.E.M)**

	Saline n=13	GHB 10 mg/kg n=19	p	GHB 160 mg/kg n=18	p
Sleep onset latency (min)	27.7 $\pm$ 7.7	22.0 $\pm$ 3.9	.47	34.0 $\pm$ 6.8	.55
SWS-2 latency (min)	23.6 $\pm$ 7.4	16.8 $\pm$ 4.6	.42	13.6 $\pm$ 4.2	.23
REMS latency (min)	45.4 $\pm$ 6.4	27.6 $\pm$ 5.5*	.04*	37.0 $\pm$ 4.5	.28
SWS-1 duration (%)	35.6 $\pm$ 3.9	38.6 $\pm$ 4.0	.61	42.3 $\pm$ 4.5	.28
SWS-2 duration (%)	45.3 $\pm$ 3.4	42.4 $\pm$ 3.8	.61	40.5 $\pm$ 4.1	.40
REMS duration (%)	19.1 $\pm$ 1.3	19.0 $\pm$ 1.1	.91	17.2 $\pm$ 1.1	.25
SWS-1_1T (%)	32.3 $\pm$ 3.4	34.0 $\pm$ 2.5	.67	30.8 $\pm$ 3.4	.77
SWS-2_1T (%)	26.9 $\pm$ 3.6	30.9 $\pm$ 3.0	.42	35.3 $\pm$ 3.8	.13
REMS_1T (%)	15.8 $\pm$ 2.8	21.9 $\pm$ 2.9	.17	18.1 $\pm$ 2.6	.56
REM sleep periods	11.4 $\pm$ 2.0	13.1 $\pm$ 1.8	.54	12.3 $\pm$ 1.8	.73
REM sleep efficiency	71.0 $\pm$ 9.6	77.5 $\pm$ 7.2	.58	79.8 $\pm$ 8.0	.48
Total sleep time (min)	178.7 $\pm$ 6.6	165.8 $\pm$ 7.5	.24	162.3 $\pm$ 9.6	.20
WASO (min)	35.9 $\pm$ 6.8	52.7 $\pm$ 8.0	.15	37.0 $\pm$ 6.7	.92
WASO_1T (%)	51.1 $\pm$ 8.2	40.7 $\pm$ 4.5	.23	44.0 $\pm$ 6.8	.51

\* $p < .05$ ,  $t$ -tests versus saline; n: number of rats.

SWS-1: light Slow Wave Sleep; SWS-2: deep Slow Wave Sleep; REMS: REM sleep;  
\_1T: distribution of the amount of a sleep stage during the first third of the total sleep time; WASO: Waking After Sleep Onset.

## Discussion

This report shows that a low dose, not a high dose of GHB facilitates the triggering of REMS in the rat. This effect had already been shown in our previous research (Girodias and Godbout, submitted). This might help to understand why the therapeutic mechanisms of GHB are still unclear: doses used in fundamental research and clinical practice are usually many folds apart. Most fundamental papers either *in vitro* or *in vivo* used high GHB doses ranging from 100 mg/kg up to 1000 mg/kg, including the petit mal epilepsy model of Snead (1988; 1991). On the other hand, narcoleptic patients (Mamelak *et al.*, 1986), opiates abusers (Gallimberti *et al.*, 1993) and alcohol abusers (Biggio *et al.*, 1992) are treated with doses as low as 25-50 mg/kg, p.o..

Many reasons may explain the fact that the two previous reports failed to show this effect in the rat. In the first of these reports (Marcus *et al.*, 1967) high doses were used (100-850mg/kg), not to mention that EOG and EMG were not recorded, that no information was given as to the time of injection and that only three rats were tested. In the second and more complete report (Godschalk *et al.*, 1977), many discrepancies can be found with the present study the first and most important of which being that no latencies were reported.

More generally, discrepancies in the literature should take into account the issue of age differences. Indeed, according to Snead (1978; 1990) GHB effects on the EEG, at least with high doses (50 mg/kg i.v. and up) are age-related: for comparable EEG effects, smaller doses are needed and effects are more rapid in younger rats. As a matter of fact, Snead (1994) has shown that [3H]GHB binding does not appear until postnatal day 17 and then shows a steady increase until adult levels were reached by postnatal day 40. Moreover, Nelson and Kaufman (1994) have shown that the two enzymes that oxidize GHB, *i.e.*, GHB dehydrogenase (GHB-D) and GHB-oxoacid transhydrogenase (GHB-T) show an age-related activity. At 20 days of age for example, the maximal oxidative capacity of GHB-D in the brain reaches a rate that is approximately 50% greater than adult values. The maximal oxidative capacity of GHB-T in the brain is negligible at 18 days of gestation but increase 40- fold by 20 days and 100-fold by 70 days after birth.

Other methodological reasons may modulate effects of GHB on sleep in the rat. In our study, injections were made exactly two hours after lights on and results obtained with GHB were compared to a full saline session (see methods). Preliminary data published in an abstract form suggest that effects of GHB on REMS in the rat are not present when injections are made 6 hours after lights on (Godbout *et al.* 1995). In some studies such as the one of Godschalk *et al.* (1977), rats were adapted for only 16 hours to the recording environment and they were connected to the recording equipment just one hour before recording; a baseline recording was then performed for one hour (between 10:30 and 11:30), followed by GHB treatment and five hours of recording. This is bound to affect baseline measures.

We propose that the effect of low-dose GHB on REMS latency is achieved by selectively activating high affinity GHB receptors since it was prevented by a pre-treatment with the GHB receptor antagonist NCS-382. Other reports have also shown that NCS-382 selectively blocked the effect of low dose of GHB (5-10 mg/kg) on central temperature (Godbout *et al.*, 1994), firing activity of prefrontal cortex output neurons (Godbout *et al.*, 1995), and firing activity of dopaminergic ventral tegmental area neurons (Tremblay *et al.*, 1998). NCS-382 also reverses GHB-induced DA-dependant release inhibition/tissue accumulation of met-enkephalin (Gobaille *et al.*, 1994), decreased DA-release (Hechler *et al.*, 1991), and sedative and neuroleptic-like behavioral effects of GHB (Schmidt *et al.*, 1991). Conversely, it has been suggested that a different mechanism possibly involving GABA<sub>B</sub> or glutamate-aspartate neurotransmission contributes to the physiological effect of higher (160-320 mg/kg) GHB doses (Banerjee *et al.*, 1995; Engberg and Nissbrandt, 1993; Hechler *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1995). It is noteworthy that in our research a high GHB dose had no significant effect on sleep macro-structure. This dose (160 mg/kg) may not be sufficient to activate GABA<sub>B</sub> receptors (Gauthier *et al.*, 1997; Puigcerver *et al.*, 1996).

The sites through which GHB effects are produced are still unknown. Basically, such sites could be either where GHB receptors are found and/or where they project. Given that the main biochemical effect of GHB is to decrease DA release (Roth, 1987), dopaminergic nuclei or their targets are the most likely candidates to mediate GHB effects on sleep. Recent results have suggested that low doses of GHB can increase DA neurons firing activity, or decrease it through depolarization inactivation of VTA cells

(Tremblay *et al.*, 1998). We propose that a modification of DA input onto cholinergic REM-on cells could desinhibit REM triggering mechanism. First, there is a host of pharmacological evidence showing that postsynaptic DA receptor blockade and presynaptic receptor agonists interfere with REM sleep in the rat (Ongini and Trampus, 1992). Moreover there are more direct evidence to suggest that DA may regulate cholinergic lateral dorsal tegmentum (LDT) neurons, an area which is part of the REM-on system (Jones, 1991), via DA-1 receptors (Robertson and Staines, 1994). Second, there are suggestions that a DA input exists in the LDT. Using DA-specific antibodies, Maeda *et al.* (1994) have observed terminal synapses in "the dendritic area" of the locus coeruleus, on elements with large mitochondria; this could well be cholinergic LDT elements, although it is not specifically mentioned. Moreover, this DA input does not necessarily comes from the VTA but it could also originate from the hypothalamus, particularly the A11 and A13 subgroups (Maeda *et al.*, 1994). Indeed, the possibility that GHB may act on REM sleep and narcolepsy have already been discussed elsewhere (Bédard *et al.*, 1989; Lapierre *et al.*, 1990). *In situ* injections of GHB should bring at least a partial answer to this question.

## REFERENCES

Banerjee PK, Snead OC. Presynaptic *gamma*-hydroxybutyric acid (GHB) and *gamma*-aminobutyric acid<sub>B</sub> (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* 1995; 273:1534.

Bédard MA, Montplaisir J, Godbout R, Lapierre O. Nocturnal  $\gamma$ -hydroxybutyrate. Effects on periodic leg movements and sleep organization of narcoleptic patients. *Clin Neuropharmacol*. 1989;12:29-36.

Biggio G, Cibirin M, Diana M, Fadda F, Ferrara SD, *et al*. Suppression of voluntary alcohol intake in rats and alcoholics by gamma-hydroxybutyric acid: A non-GABAergic mechanism. In: Biggio G, Concas A, Costa H, eds. *GABAergic synaptic transmission*. New-York, Raven Press, 1992;281-288.

Broughton R, Mamelak M. The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci* 1979;6; 1-6.

Broughton R, Mamelak M. Effects of nocturnal gamma-hydroxybutyrate on sleep/waking patterns in narcolepsy cataplexy. *Can. J. Neurol. Sci.* 1980; 7: 23-31.

Colombo G, Agabio R, Lobina C, Loche A, Reali R, Gessa GL. High sensitivity to Gamma-hydroxybutyric acid in ethanol- preferring SP rats. *Alcohol and Alcoholism* 1998; 33:121-125.

Delorme F, Riotte M, Jouvet M. Conditions de déclenchement du sommeil paradoxal par les acides gras à chaîne courte chez le chat pontique chronique. *C. R. Soc. Biol.* 1966;160:1457-1460.

Engberg G, Nissbrandt H. Gamma-Hydroxybutyric acid (GHBA) induces pacemaker activity and inhibition of substantia nigra dopamine neurons by activating GABAB-receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 1993;348:491-497.

Fadda F, Argiolas A, Melis MR, De Montis G, Gessa GL. Suppression of voluntary alcohol consumption in rats by gamma-butyrolactone. *Life Sci.* 1983; 32: 1471-1477.

Fadda F, Colombo G, Mosca E, Gessa GL. Suppression by gamma-hydroxybutyric acid of ethanol withdrawal syndrome in rats. *Alcohol Alcohol*. 1989; 24: 447-451.

Gallimberti L, Ferri M, Ferrara SD, Fadda F, Gessa GL. Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol dependence: a double blind study. *Alcohol Clin Exp Res* 1992;16:673-676.

Gallimberti L, Cibir M, Pagnini P, Sabbion R, Pani PP, Pirastu R, Ferrara SD, Gessa GL. Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome. *Neuropsychopharmacology*. 1993; 9: 77-81.

Galloway GP, Frederick SL, Staggers FE, Gonzales M, Stalcup SA, Smith DE. Gamma-hydroxybutyrate: An emerging drug of abuse that causes physical dependence. *Addiction* 1997; 92: 89-96.

Gauthier P, Arnaud C, Gandolfo G, Gottesmann C. Influence of a GABA(B) receptor antagonist on the sleep-waking cycle in the rat. *Brain Res*. 1997;773:8-14.

Gobaille S, Schmidt C, Cupo A, Herbrecht F, Maitre M. Characterization of methionine-enkephalin release in the rat striatum by *in vivo* dialysis: effects of  $\gamma$ -hydroxybutyrate on cellular and extracellular methionine-enkephalin levels. *Neuroscience* 1994;60:637-648.

Godbout R, Girodias V, Webster, HH. Effects of gamma-hydroxybutyrate on paradoxical sleep in the rat are related to dose and time of administration. *Soc. Neurosci. Abstracts* 1995;21:450.

Godbout, R, Jelenic P, Labrie C, Schmitt M, Bourguignon JJ. Effect of gamma-hydroxybutyrate and its antagonist NCS-382 on prefrontal cortex firing in the rat. *Brain Res* 1995;673:157.

Godbout R, Pivik RT. EEG and behavioral effects of gamma-hydroxybutyrate in the rabbit. *Life Sci* 1982;31:739-748.

Godbout R, Rompré PP, Schmitt M, Bourguignon JJ. NCS-382 reverses hyperthermia, not hypothermia, induced by gamma-hydroxybutyrate in the rat. *Soc. Neurosci Abstr* 1994;20:163.

Godschalk M, Dzoljic MR, Bonta IL. Slow wave sleep and a state resembling absence epilepsy induced in the rat by gamma-hydroxybutyrate. *Eur J Pharmacol* 1977;44:105-111.

Hechler V, Gobaille S, Bourguignon JJ, Maitre M. Extracellular events induced by K-hydroxybutyrate in striatum: A microdialysis study. *J Neurochem* 1991;16:938-944.

Hechler V, Ratomponirina C, Maitre M. gamma-Hydroxybutyrate conversion into GABA induces displacement of GABAB binding that is blocked by valproate and ethosuximide. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997;281:753-760.

Hechler V, Wessmann D, Mach E, Pujol JF, Maitre M. Regional distribution of high-affinity Y-[<sup>3</sup>H]hydroxybutyrate binding sites as determined by radioautography. *J Neurochem* 1987; 49:1025-32.

Jones BE. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 1991;40:637-656.

Jouvet M, Cier A, Mounier D, Valatx JL. Effects du 4-butyrolactone et du 4-hydroxybutyrate de sodium sur l'E.E.G. et le comportement du chat. *C R Soc Biol* 1961;155:1313-1316.

Kaufman EE, Porrino LJ, Nelson T. Pyretic action of low doses of gamma-hydroxybutyrate in rats. *Biochem.Pharmacol.* 1990;40:2637-2640.

Knuepfer MM, Stumpf H, Stock G. Baroreceptor sensitivity during desynchronized sleep. *Exp Neurol* 1986;92:323-334.

Laborit H. Gamma-hydroxybutyrate, succinic semialdehyde and sleep. In: Kerkut GA, Phillis JW, eds. *Progress in neurobiology*, Vol. 1. Oxford: Pergamon Press, 1973:255-274.

Lammers GJ, Arends J, Declerck AC, Ferrari MD, Schouwink G, Troost J. Gamma-hydroxybutyrate and narcolepsy: A double-blind placebo- controlled study. *Sleep* 1993;16:216-220.

Lapierre O, Montplaisir J, Lamarre M, Bédard MA. The effect of gamma-hydroxybutyrate on nocturnal and diurnal sleep of normal subjects: further considerations on REM sleep- triggering mechanisms. *Sleep* 1990;13:24-30.



Maeda T, Kitahama K, Geffard M. Dopaminergic innervation of rat locus coeruleus: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Microscopy Research and Technique* 1994;29:211-218.

Maitre M. The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* 1997; 51:337-361.

Maitre M, Hechler V, Vayer P, Gobaille S, Cash CD, Schmitt M, Bourguignon JJ. A specific  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:657.

Maitre M, Mandel P. Propriétés permettant d'attribuer au gamma-hydroxybutyrate la qualité de neurotransmetteur du système nerveux central. *C.R.Acad.Sci.[III]*. 1984;298:341-345.

Maitre M, Rumigny JF, Cash C, Mandel P. Subcellular distribution of  $\gamma$ -hydroxybutyrate binding sites in rat brain principal localization in the synaptosomal fraction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1983;110:262-265.

Maitre M, Rumigny JF, Cash C, Mandel P. Subcellular distribution of  $\gamma$ -hydroxybutyrate binding sites in rat brain principal localization in the synaptosomal fraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983a; 110: 262.

Maitre M, Rumigny JF, Mandel P. Positive cooperativity in high affinity binding sites for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in rat brain. *Neurochem Res* 1983b;8:113-120.

Mamelak M, Escriu JM, Stokan O. Sleep inducing effects of gamma-hydroxybutyrate. *Lancet* 1973;August 11:328-329.

Mamelak M, Scharf MB, Woods M. Treatment of narcolepsy with  $\gamma$ -hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings. *Sleep* 1986;9:285.

Marcus RJ, Winters WD, Mori K, Spooner CE. EEG and behavioral comparison of the effects of gamma- hydroxybutyrate, gamma-butyrolactone and short chain fatty acids in the rat. *Int J Neuropharmacol* 1967;6:175-185.

Matsuzaki M, Takagi H. Sleep induced by sodium butyrate in the cat. *Brain Res* 1967;4:206-222.

Matsuzaki M, Takagi H, Tokizane T. Paradoxical phase of sleep: its artificial induction in the cat by sodium butyrate. *Science* 1964;146:1328-1329.

Nelson T, Kaufman EE. Developmental time courses in the brain and kidney of two enzymes that oxidise gamma-hydroxybutyrate. *Dev Neurosci*. 1994; 16 (5-6): 352-358.

Ongini E, Trampus M. Modulation of sleep and waking states by D-1 receptors. *J Psychopharmacol* 1992;6:61-67.

Puigcerver A, Vanlujtelaar ELJM, Drinkenburg WHIM, Coenen ALM. Effects of the Gaba(b) antagonist CGP 35348 on sleep-wake states, behaviour, and spike-wave discharges in old rats. *Brain Res. Bull.* 1996;40:157-162.

Robertson GS, Staines WA. D1 dopamine receptor agonist-induced Fos-like immunoreactivity occurs in basal forebrain and mesopontine tegmentum cholinergic neurons and striatal neurons immunoreactive for neuropeptide Y. *Neuroscience* 1994;59:375-387.

Roth RH. Biochemical correlates of the electrophysiological activity of dopaminergic neurons, in: Chiodo LA, Freeman AS, eds. *Neurophysiology of dopaminergic systems. Current status and clinical perspectives*. Grosse Pointe MI: Lakeshore Publishing Company, 1987;187.

Scharf MB, Brown D, Woods M, Brown L, Hirschowitz J. The effects and effectiveness of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in patients with narcolepsy. *J Clin Psychiatry* 1985;46:222-225.

Schmidt C, Gobaille S, Hechler V, Schmitt M, Bourguignon JJ, Maitre M. Anti-sedative and anti-cataleptic properties of NCS-382, a  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 1991;203:393-397.

Schmidt-Muller C, Pain L, Sandner G, Gobaille S, Maitre M. The anxiolytic effect of gamma-hydroxybutyrate in the elevated plus maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil. *Eur J Pharmacol*. 1998; 342; 21-27.

Snead OC, III: Gamma hydroxybutyrate in the monkey. I. Electroencephalographic, behavioral, and pharmacokinetic studies. *Neurology* 1978;28:636-642.

Snead OC.  $\gamma$ -Hydroxybutyrate model of generalized absence seizures: further Characterization and comparison with other absence models. *Epilepsia* 1988;29:361.

Snead OC. Gamma-Hydroxybutyric acid-induced seizures bear no relation to core temperature. *Epilepsia* 1990;31:253-258.

Snead OC. The  $\gamma$ -hydroxybutyrate model of absence seizures: Correlation of regional brain levels of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid and  $\gamma$ -butyrolactone with spike wave discharges. *Neuropharmacology* 1991;30:161.

Snead OC. The ontogeny of [3H] gamma-hydroxybutyrate and [3H]GABAB binding sites: relation to the development of experimental absence seizures. *Brain Res.* 1994;659:147-156.

Snead OC, Liu CC. Gamma-hydroxybutyrate binding sites in rat and human brain synaptosomal membranes. *Biochem Pharmacol* 1984;33:2587-90.

Snead OC, Liu CC. GABA-A receptor function in the gamma-hydroxybutyrate model of generalized absences seizures. *Neuropharmacol* 1993;32:401-409.

Tremblay H, Godbout R, Girodias V, Schmitt M, Bourguignon JJ. Effects of Gamma-Hydroxybutyrate on Ventral Tegmental Unit Activity in the Rat: Considerations on REM Sleep Control. *Sleep Res. Online.* 1998; 4: 152-158.

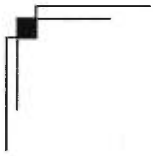
Vayer P, Mandel P, Maitre M, Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci* 1987;41:1547-1557.

Williams SR, Turner JP, Crunelli V. Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABA<sub>B</sub> receptor-mediated hyperpolarization. *Neuroscience* 1995; 66:133-141.

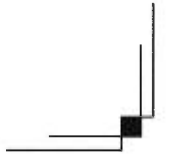
## **Acknowledgements**

Supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, the Conseil de la recherche en sciences naturelles et génie du Canada, and the Conseil national de la recherche scientifique (France).

## Chapitre 5



*«The effects of gamma-  
hydroxybutyrate (GHB) on sleep in the  
rat at  
different circadian times»*



---


# The effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB) on sleep in the rat at different circadian times

Véronique Girodias<sup>1</sup> and Roger Godbout<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur, Montréal (Québec) Canada

<sup>2</sup> Département de psychiatrie Université de Montréal, Montréal (Québec) Canada

## Correspondence:

Roger Godbout, Ph.D.  
Centre de recherche  
Hôpital du Sacré-Coeur  
5400 Boul. Gouin ouest  
Montréal (Québec)  
Canada H4J 1C5  
Tel.: (514) 338-2222, ext. 2460  
Fax: (514) 338-2694  
Email: 

SUBMITTED TO JOURNAL OF SLEEP RESEARCH

## **Abstract**

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous sedative-hypnotic used in the treatment of human narcolepsy, a sleep disorder characterized by abnormal nocturnal and diurnal manifestations of Rapid Eye Movement (REM) sleep. The mechanism by which GHB given at bedtime achieves its therapeutic effects is thought to involve a facilitation of nocturnal REM sleep. It has been shown that GHB facilitates REM sleep in various mammals species, including the rat. The present study investigated whether this effect was stable throughout the circadian period. Rats were injected with GHB (10 mg/kg, i.p.) and saline at three different circadian times: two hours after the light onset (CT2: 19 rats), eight hours after light onset (CT8: 6 rats), or two hours after lights off (CT14: 12 rats). Recordings began at injection time and lasted four hours. It was found that REM sleep latency was shortened by GHB at CT2; other REM sleep parameters, including duration and number of REM sleep cycles, were not affected. GHB had no effects on other sleep variables. GHB had no significant effects on sleep at CT8 and CT14. These results show that the acute effect of GHB on sleep is circadian time-dependant in the rat and that only REM sleep triggering mechanisms are affected.

## **Keywords:**

Sleep, REM sleep, sleep disorders, circadian rhythm, gamma-hydroxybutyrate

## Introduction

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous fatty acid thought to act as a neurotransmitter in the central nervous system (Maitre, 1997). GHB interferes with dopaminergic neurotransmission (Roth, 1987) and it is endowed with sedative-hypnotic properties (Laborit, 1973; Mamelak *et al.*, 1973). Taken at bedtime, GHB is an efficient treatment for cataplexy, a symptom related to the inappropriate daytime triggering of REM sleep muscle atonia in narcoleptics patients (Broughton and Mamelak, 1979; 1980); some have also reported the efficiency of GHB against excessive daytime somnolence (Lammers *et al.*, 1993; Scharf *et al.*, 1985). It has been proposed that the therapeutic effect of this compound is achieved by consolidating nocturnal REM sleep, thus decreasing daytime pressure for REM sleep (Broughton and Mamelak, 1979; Mamelak *et al.*, 1986).

At the present time, GHB has been shown to facilitate REM sleep in humans (Bédard *et al.*, 1989; Broughton and Mamelak, 1980; Lapierre *et al.*, 1990; Mamelak *et al.*, 1986), cats (Jouvet *et al.*, 1961; Matsuzaki *et al.*, 1964), and rats (Girodias *et al.*, 1995; submitted) but not in rabbits (Godbout and Pivik, 1982) nor in dogs (Laborit, 1973). These discrepancies may be attributable to differences in methodology, including: a) the sleep variables analyzed, b) the doses used, and c) the time of GHB administration. The first two issues were recently resolved as it was shown that GHB facilitated REM sleep in the rat by shortening selectively its latency and that only low doses (10 mg/kg, i.p.) were effective (Girodias *et al.*, 1999; submitted). The present paper is concerned by the fact that the facilitatory effect of GHB on sleep may also be dependent upon the spontaneous probability of REM sleep to appear at the moment of recording. Indeed, it has been shown that GHB only induced REM sleep in the cat when it was administered at a time close enough to the onset of the next expected REM sleep period (Delorme *et al.*, 1966). Accordingly, GHB was also shown to potentiate REM sleep in humans more particularly when REM sleep was already facilitated such as in patients with depression or narcolepsy (Mamelak *et al.*, 1977; Bédard *et al.*, 1989) or in older subjects upon morning naps (Lapierre *et al.*, 1990). In the rat, REM sleep has a greater probability to appear in the second half of the main sleep period (Vivaldi *et al.*, 1994). For these reasons, it is possible that the time of administration may also determine the potency of GHB to facilitate REM sleep in rats.



The present research was undertaken to further characterize the effects of GHB on the electrophysiologically recorded sleep-wake cycle of the rat by controlling some of the confounding variables present in previous literature, including the circadian time at which it is administered.

## Methods

Adult male Sprague-Dawley rats (300 g) were implanted with chronic frontal and parietal EEG, EOG, and nuchal EMG electrodes. Recordings were performed at least seven days after surgery and at least five days after they were connected to the recording apparatus. Animals were housed individually with food and water *ad libitum*. Lights were turned on at 06:00 for 12 hours. Separate groups of rats were treated with GHB (10 mg/kg, i.p.) and saline (in random order) at different time of the circadian period: two hours after light onset (CT2: n = 19), eight hours after light onset (CT8: n = 6) and two hours after lights were turned off (CT14: n = 12).

Recordings started at the time of injection and lasted four hours; at least 48 hours elapsed between GHB and saline treatments and rats were always kept connected to the recording apparatus throughout the protocol, using a computer-assisted system (Eclipse™, Stellate Systems, Montreal, Canada).

Recordings were visually scored on-screen by two judges unaware of the experimental condition, using 10 s epochs (50  $\mu$ V = 75 mm; 1 sec = 3.0cm screen width). Discrepancies were resolved by mutual agreement. Variables were defined as follows: Sleep onset latency: time elapsed between the moment of injection and the first occurrence of any sleep stage. Latency to light Slow Wave Sleep (SWS-1): time elapsed between sleep onset and the appearance of the first sleep spindle (8-14 Hz, 0.5-1.5 s). Latency to deep Slow Wave Sleep (SWS-2): the time elapsed between sleep onset and the first epoch containing more than 50% of delta waves (0.5-4.0 Hz). Latency to REM sleep (REMS): the time elapsed between sleep onset and the first concomitant occurrence of desynchronized EEG, atonic EMG, and rapid eye movements. REMS periods: sequence of REMS epochs not interrupted by more than one minute of another state; REMS efficiency: based on REMS periods, it is the ratio of REMS time to time in another state, multiplied by 100. Sleep period: interval between sleep onset and the last epoch of sleep before the end of the recording. Total sleep

time: the total time spent in any of the sleep stages. Duration of sleep stages is expressed as a percentage of total sleep time. Waking after sleep onset (WASO): time awakened during the sleep period, *i.e.* following sleep onset. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Results were analyzed for the total recording time and for the first third of the sleep period. Comparisons were made using independent *t*-tests.

## Results

Results are presented in Table 1. Sleep always started with an epoch of SWS-1. At CT2, GHB selectively shortened REM sleep latency; this was the circadian time at which REM sleep latency was the longest upon the saline injection. Total REM sleep was not affected, although its amount in the first third of the sleep period time was non-significantly increased by 36.8%; the number of REM sleep periods and REM sleep efficiency did not vary between saline and GHB.

GHB given at CT8 and CT14 did not shorten REM sleep latency; if anything, it was rather non-significantly increased by 46.2% and 37.3%, respectively. The number of REM sleep periods and REM sleep efficiency were not affected whatsoever. No other effects of GHB on sleep were found at CT8. At CT14, GHB decreased SWS-2 duration and increased WASO in the first third of the sleep period, close to statistical significance ( $p < .06$  and  $p < .10$ , respectively).

**Table 1: Effects of Gamma-hydroxybutyrate 10 mg/kg, i.p. on sleep at different circadian times (Mean  $\pm$  S.E.M.).**

	Saline at CT2 n=12	GHB at CT2 n=19	p	Saline at CT8 n=6	GHB at CT8 n=6	p	Saline at CT14 n=8	GHB at CT14 n=12	p
Sleep latency (min.)	27.7 $\pm$ 7.7	22 $\pm$ 3.9	.47	28.2 $\pm$ 4.9	22.3 $\pm$ 3	.33	45.2 $\pm$ 6.6	37.7 $\pm$ 5.5	.39
SWS-2 latency (min.)	23.6 $\pm$ 7.4	16.8 $\pm$ 4.6	.42	4.4 $\pm$ 1.7	13.2 $\pm$ 6.3	.21	7.0 $\pm$ 4.3	10.2 $\pm$ 3.7	.58
REMs latency (min.)	45.4 $\pm$ 6.4	27.6 $\pm$ 5.5*	.04*	19.9 $\pm$ 2.7	29.1 $\pm$ 7.2	.26	25.1 $\pm$ 6.3	40.0 $\pm$ 8.5	.19
SWS-1 duration (%)	35.6 $\pm$ 3.9	38.6 $\pm$ 4.0	.61	54.9 $\pm$ 4.2	60.1 $\pm$ 3.6	.38	45.0 $\pm$ 6.0	44.2 $\pm$ 4.5	.91
SWS-2 duration (%)	45.3 $\pm$ 3.4	42.4 $\pm$ 3.8	.61	28.4 $\pm$ 2.9	25.1 $\pm$ 3.1	.47	39.7 $\pm$ 5.4	39.5 $\pm$ 4.3	.97
REMS duration (%)	19.1 $\pm$ 1.3	19.0 $\pm$ 1.1	.91	16.7 $\pm$ 2.2	14.8 $\pm$ 0.8	.44	15.3 $\pm$ 1.5	16.3 $\pm$ 1.1	.56
SWS-1_1T (%)	32.3 $\pm$ 3.4	34.0 $\pm$ 2.5	.67	34.1 $\pm$ 1.5	37.5 $\pm$ 3.6	.43	34.5 $\pm$ 3.0	31.6 $\pm$ 3.6	.57
SWS-2_1T (%)	26.9 $\pm$ 3.6	30.9 $\pm$ 3.0	.42	30.7 $\pm$ 4.3	34.9 $\pm$ 9.6	.71	52.1 $\pm$ 7.7	34.7 $\pm$ 4.8	.06
REMs_1T (%)	15.8 $\pm$ 2.8	21.9 $\pm$ 2.9	.17	25.8 $\pm$ 8.0	33.4 $\pm$ 6.9	.50	32.2 $\pm$ 5.0	24.7 $\pm$ 4.4	.28
Total Sleep Time (min.)	178.7 $\pm$ 6.6	165.8 $\pm$ 7.5	.24	162.3 $\pm$ 12.0	167.3 $\pm$ 6.0	.72	110.8 $\pm$ 4.8	101.8 $\pm$ 3.8	.16
REMs periods	11.4 $\pm$ 2.0	13.1 $\pm$ 1.8	.54	11.4 $\pm$ 2.0	13.1 $\pm$ 1.8	.54	12.9 $\pm$ 1.2	10.6 $\pm$ 1.0	.16
REMs efficiency (%)	71.0 $\pm$ 9.6	77.5 $\pm$ 7.2	.58	71.0 $\pm$ 9.6	77.5 $\pm$ 7.2	.58	93.4 $\pm$ 1.5	94.0 $\pm$ 1.9	.82
WASO (min.)	35.9 $\pm$ 6.8	52.7 $\pm$ 8.0	.15	38.2 $\pm$ 11.8	50.1 $\pm$ 8.5	.44	89.4 $\pm$ 8.7	104.0 $\pm$ 5.9	.16
WASO_1T (%)	51.1 $\pm$ 8.2	40.7 $\pm$ 4.5	.23	34.0 $\pm$ 8.9	21.9 $\pm$ 7.2	.33	24.6 $\pm$ 4.4	34.0 $\pm$ 3.3	.10

\* $p < .05$ ,  $t$ -tests versus saline; n: number of rats.

SWS-1: light Slow Wave Sleep; SWS-2: deep Slow Wave Sleep; REMS: REM sleep;

\_1T: distribution of the amount of a sleep stage during the first third of the total sleep time; WASO: Waking After Sleep Onset.

## Discussion

This report shows that GHB facilitates the triggering of REM sleep in rats only when a low dose is administered at the beginning of the light period (CT2). This circumscribed effect in circadian terms may be explained by the fact that CT2, which is during the main sleep period, bears an increased probability for REM sleep appearance (Vivaldi *et al.*, 1994). Indeed, this correspond to what was found in cats (Delorme *et al.*, 1966). On the other hand, despite the fact that REM sleep time is peaking in the second half of the main period under natural conditions (Vivaldi *et al.*, 1994) GHB had no effects on REM sleep at CT 8. This could be explained by a floor effect, *i.e.*, that GHB could not further reduce REM sleep latency at this time of the circadian period. On the other hand, results in humans are not in agreement with this hypothesis. Indeed Mamelak *et al.* (1977) have found that low doses of GHB induced REM sleep when it was given just prior to going to bed. Lapierre *et al.* (1990) have shown that REM sleep was more easily induced upon early morning naps. However in those two studies, the fact that human population studies were particular on one aspect on the other (depressed subjects and aged subjects) may be relevant and should be elucidated.

Redgrave *et al.* (1982) have shown a rebound of dopamine-dependant behaviors following GHB administration in the rat. Although not significantly, we must report a 46.8% increase of the total WASO at CT2 and a decrease by 20.4% in the first third of the sleep period, suggesting a rebound of waking during later parts of recordings. This effect could be related to a release of the accumulated dopamine following the short-term cessation of impulse flow and stimulation of dopamine that follows GHB administration (Roth, 1987). It is possible that this effect would be facilitated in the early phases of the light cycle.

The present results show that comparable doses of GHB facilitate REM sleep in rats (10 mg/kg, *i.p.*) and humans (25-50 mg/kg, *p.o.*) (Mamelak *et al.*, 1986) and that this effect is only demonstrated when GHB is given in the early part of the main sleep period. Since GHB is known to have dose-dependant central thermal effects, hyperthermia at low doses and hypothermic at high doses (Godbout *et al.*, 1994; Kaufman *et al.*, 1990) and since REM sleep is facilitated during the ascending phase of the central temperature curve (Borbély and Neuhaus, 1978), it would be interesting to

verify whether the effects of GHB on REM sleep and central temperature are dependant phenomena.

Finally, the present results might help to explain why GHB was not successful in treating cataplexy in the animal model (Foutz *et al.*, 1981). In this study, indeed, dogs were treated with high GHB doses (500 mg/kg, *p.o.*), three times a day. We predict that GHB will successfully control cataplexy in the canine model only if it is given at low doses, upon the onset of the main sleep period.

## REFERENCES

Bédard, M.A., Montplaisir, J., Godbout, R. and Lapierre, O. Nocturnal  $\gamma$ -hydroxybutyrate. Effects on periodic leg movements and sleep organization of narcoleptic patients. *Clin. Neuropharmacol.*, 1989, 12: 29-36.

Borbély, A.A., Neuhaus, H.U. Circadian rhythm of sleep and motor activity in the rat during skeleton photoperiod, continuous darkness and continuous light. *J. Comp. Physiol.*, 1978, 128: 37-46.

Broughton, R. and Mamelak, M. The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can.J.Neurol.Sci.*, 1979;6: 1-6.

Broughton, R. and Mamelak, M. Effects of nocturnal gamma-hydroxybutyrate on sleep/waking patterns in narcolepsy-cataplexy. *Can.J.Neurol.Sci.*, 1980, 7: 23-31.

Delorme, F., Riette, M. and Jouvét, M. Conditions de déclenchement du sommeil paradoxal par les acides gras à chaîne courte chez le chat pontique chronique. *C. R. Sol. Bio.*, 1966, 160: 1457-1460.

Foutz, AS. Delashaw, JB. Guilleminault, C. Dement WC. Monoaminergic mechanisms and experimental cataplexy. *Ann.Neurol.* 1981, 10: 369-376.

Godbout, R. and Pivik, R.T. EEG and behavioral effects of gamma-hydroxybutyrate in the rabbit. *Life Sc.* 1982; 31: 739-748.

Godbout, R. Rompré, P.P., Schmitt, M. Bourguignon, J.J. NCS-382 reverses hyperthermia, not hypothermia, induced by gamma- hydroxybutyrate in the rat. *Soc.Neurosci.Abstr.*,1994, 20:1563.

Hechler, V., Gobailier, S., Bourguignon, J.J. and Maitre, M. Extracellular events induced by  $\gamma$ -hydroxybutyrate in striatum: A microdialysis study. *J. Neurochem.*, 1991, 56: 938-944.

Jouvét, M., Cier, A., Mounier, D. and Valatx, J. L. Effets du 4-butyrolactone et du 4-hydroxybutyrate de sodium sur l'E.E.G. et le comportement du chat. *C. R. Soc. Bio.*, 1961, 155: 1313-1316.

Kaufman EE, Porrino LJ, Nelson T. Pyretic action of low doses of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in rats. *Biochem.Pharmacol.*, 1990, 40: 2637-2640.

Knuepfer, M. M., Stumpf, H. and Stock, G. Baroreceptor sensitivity during desynchronized sleep. *Exp. Neurol.*, 1986, 92: 323-334.

Laborit, H. Gamma-hydroxybutyrate, succinic semialdehyde and sleep. In: Kerkut GA, Phillis JW, eds. *Progress in neurobiology*, Vol. 1. Oxford: Pergamon Press, 1973:255-274.

Lammers, GJ, Arends J, Declerck AC, Ferrari MD, Schouwink G, Troost J. Gammahydroxybutyrate and narcolepsy: A double-blind placebo- controlled study. *Sleep* 1993, 16: 216-220.

Lapierre, O., Montplaisir, J., Lamarre, M. and Bédard, M. A. The effect of gamma-hydroxybutyrate on nocturnal and diurnal sleep of normal subjects: further considerations on REM-sleep-triggering mechanisms. *Sleep*, 1990, 13: 24-30.

Maitre, M. The gamma-hydroxybutyrate signaling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol.*, 1997, 51: 337-361.

Mamelak, M., Escriu, J.M., Stokan, O. Sleep inducing effects of gamma-hydroxybutyrate. *Lancet*, 1973 (2, August): 328-329.

Mamelak, M., Escriu, J.M. and Stokan, O. The effects  $\gamma$ -hydroxybutyrate on sleep. *Biol.Psychiatry*, 1977,12: 273-288.

Mamelak, M., Scharf M. B. and Woods, M. Treatment of narcolepsy with  $\gamma$ -hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings, *Sleep*, 1986, 9: 285-289.

Matsuzaki, M., Takagi, H. and Tokizane, T. Paradoxical phase of sleep: its artificial induction in the cat by sodium butyrate. *Science*, 1964, 146: 1328-1329.

Redgrave, P, Taha EB, White L, Dean P. Increased food intake following the manipulation of intracerebral dopamine levels with gamma-hydroxybutyrate. *Psychopharmacology (Berl)*, 1982, 76:273-277.

Roth, R.H. Biochemical correlates of the electrophysiological activity of dopaminergic neurons, in: Chiodo L. A. and Freeman S. A. (Eds) *Neurophysiology of dopaminergic systems. Current status and clinical perspectives*. Lakeshore Publishing Company, Grosse Pointe MI, 1987, 187.

Scharf, MB, Brown D, Woods M, Brown L, Hirschowitz J. The effects and effectiveness of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in patients with narcolepsy. *J Clin Psychiatry* 1985, 46: 222-225.

Vivaldi, EA, Wyneken U, Roncagliolo M, Ocampo A, Zapata AM. Measures of location and dispersion of sleep state distributions within the circular frame of a 12:12 light: dark schedule in the rat. *Sleep* 1994,17: 208-219.

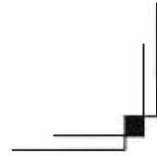


## **Acknowledgements**

Supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Conseil de la recherche en sciences naturelles et génie du Canada.

# *Chapitre 6*

## *Discussion*



## Discussion

### 8. Récapitulation des résultats

Les analyses présentées dans les chapitres précédents visaient à mieux comprendre l'action du gamma-hydroxybutyrate (GHB) sur le sommeil chez le rat. Ce projet est la somme de quatre études dont la dernière étude est présentée en annexe. Vient d'abord l'étude de la sélectivité des effets GHB sur les paramètres du sommeil après administration d'une faible dose (10 mg/kg) ou d'une forte dose (160 mg/kg). Vient ensuite la vérification de la spécificité des effets obtenus en utilisant l'antagoniste spécifique des récepteurs à GHB, le NCS-382. Une troisième étude cherche à connaître les effets obtenus au cours du nyctémère, soit en début et en fin de phase de lumière, soit en début de phase d'obscurité. La dernière étude est celle de l'identification d'un des éléments du réseau neuronal à l'origine des effets du GHB sur le sommeil. Compte tenu que le nombre de sujets ait augmenté en cours de recherche modifiant parfois quelques résultats d'une étude à une autre, la présente discussion sera centrée uniquement sur les effets qui se sont maintenus à travers les études.

#### 8.1 Sélectivité des effets du gamma-hydroxybutyrate sur les paramètres du sommeil

Il existe des récepteurs à haute et basse affinité pour le GHB (Snead et Liu, 1984; Bernavides *et al.*, 1982; Maitre *et al.*, 1983b), ce qui entraîne des effets différents, parfois opposés, selon la dose utilisée (voir introduction). Selon les lois naturelles de la neuropharmacologie, les faibles doses de GHB vont activer exclusivement les récepteurs à haute affinité alors que les hautes doses vont activer les deux types de récepteurs (Feldman et Quenzer, 1984).

Dans la première étude, nous cherchions à connaître les effets d'une faible et d'une forte dose de GHB sur le sommeil. Nous avons pu démontrer que ces effets dépendaient des doses utilisées. À faible dose, le GHB réduisait significativement la latence au SP sans affecter la durée. Ceci indique que le GHB agit sur le mécanisme de déclenchement du SP et non sur son mécanisme de maintien. Aucun effet significatif ne fut observé sur le SP par administration d'une forte dose de GHB. Ces résultats confirment ceux obtenus par d'autres études démontrant que les effets du GHB sur la température (Godbout *et al.*, 1993), sur l'activité neuronale préfrontale (Godbout *et al.*,

1995) et sur l'activité neuronale de l'ATV (Tremblay *et al.*, 1998, voir section 1.4) différent selon les doses administrées.

## **8.2 Spécificité des effets du gamma-hydroxybutyrate**

Pour savoir si les effets d'une faible dose de GHB dépendaient de l'activation des récepteurs du GHB, nous avons administré de façon simultanée le GHB et son antagoniste, le NCS-382. Les résultats obtenus dans la deuxième étude ont montré que le NCS-382 inhibait l'effet d'une faible dose de GHB, prouvant ainsi que cet effet agissait via les récepteurs spécifiques au GHB. Ces résultats sont similaires à ceux déjà publiés par d'autres auteurs et confirment la spécificité des effets du GHB à faible dose aux récepteurs GHB (Godbout *et al.*, 1994; Godbout *et al.*, 1995; Tremblay *et al.*, 1998, voir section 1.4). En revanche, nos résultats n'indiquent aucun effet significatif suite à l'administration d'une forte dose de GHB. Par ailleurs, les études précédentes sur l'activité neuronale et sur la température montraient que le GHB à forte dose provoquaient des effets qui ne pouvaient toutefois être bloqués par l'administration du NCS-382. On déduit donc que les effets obtenus sous forte dose de GHB ne pourraient pas être dus uniquement à l'activation des récepteurs à GHB. De notre côté, suite à l'administration de la forte dose de GHB, nous avons observé des signes EEG suggérant une activité épileptique. Des études plus poussées sur cet aspect devront être menées afin de mieux comprendre l'implication du GHB dans la genèse de l'EEG. Certaines études proposent l'implication d'un système plus complexe pour les effets à forte dose du GHB. Ce système activerait notamment des récepteurs à GABA-B (Endberg et Nissbrandt, 1993; Banerjee *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1995).

## **8.3 Stabilité des effets du gamma-hydroxybutyrate au cours du nyctémère**

La propension au sommeil et la distribution des stades à l'intérieur d'une même période de sommeil évoluent selon un cycle circadien (Borbély et Neuhaus, 1978a, 1978b; Weitzman *et al.*, 1980; Vivaldi *et al.* 1994a, 1994b; Czeisler *et al.* 1990). Il nous importait de savoir si les effets du GHB se manifestaient à des moments précis du nyctémère. Dans notre troisième étude, nous avons constaté qu'une faible dose de GHB ne réduisait la latence du SP qu'en période de lumière. Vivaldi *et al.* (1994a, 1994b) ont analysé la distribution de l'éveil et des différents stades du sommeil au cours du nyctémère chez le rat. Ces chercheurs montrent que l'organisation nyctémérale du sommeil chez les rats et chez les humains comporte trois points communs: une

concentration plus importante du SL au début de la première moitié de la phase principale de sommeil, une concentration plus importante du SP dans la seconde moitié et une augmentation progressive de la quantité de sommeil riche en activité sigma (équivalence à la bande de fréquence des fuseaux de sommeil, soit 12-14 Hz) au cours du sommeil. Un de ces points communs retient particulièrement notre attention, soit celui de la stabilité du rythme circadien du SP d'une nuit à une autre mais également d'une espèce à une autre. Ainsi le GHB à faible dose peut raccourcir la latence du SP chez le rat s'il est administré au début de la période propice au sommeil. Par ailleurs, l'impossibilité de faciliter l'émergence rapide du SP en fin de période de lumière s'explique possiblement par une limite physique. On ne pourrait réduire davantage la latence au SP déjà obtenue en début de période de lumière.

Cette particularité du GHB à mieux agir dans des conditions favorables sur le SP se retrouve aussi chez les individus ayant une latence au SP plus courte (Mamelak *et al.*, 1977; Broughton et Mamelak, 1979; Mamelak *et al.*, 1986): personnes atteintes de narcolepsie, malades dépressifs ou personnes âgées quand elles font des siestes matinales (Lapierre *et al.*, 1990). Chez ces individus, le GHB potentialise également les mécanismes de déclenchement du SP sans toujours favoriser son maintien (*i.e.* sa durée totale).

Le GHB est réputé pour exercer une action hypnotique (Mamelak *et al.*, 1977; Hoes *et al.*, 1980). Il est dès lors surprenant, comme nous l'avons constaté, qu'il ne raccourcisse pas le délai d'endormissement dans notre propre étude après l'administration d'une faible dose de GHB. En fait, l'effet hypnotique serait réservé exclusivement à la population humaine car chez l'animal (Laborit *et al.*, 1961; Jouvet, 1961; Godbout et Pivik, 1982 et Snead, 1978), on parle plutôt d'état de torpeur suite à l'administration de GHB. Cet état de torpeur qui se reconnaît par une diminution de l'activité comportementale n'a pas été documenté suffisamment sur le plan électroencéphalographique pour qu'on puisse penser qu'il correspond à un sommeil véritable. Le GHB n'a pas non plus d'effet hypnotique en période d'obscurité, alors qu'il y aurait davantage de marge pour réduire les latences. Ceci suggère donc fortement que le GHB n'est pas un hypnotique chez le rat. Par contre, on comprend que la réduction du délai d'apparition du SP n'est pas un effet hypnotique non spécifique.

## 8.4 L'origine des effets du gamma-hydroxybutyrate

Plusieurs sites anatomiques du SNC peuvent contribuer aux effets du GHB sur le SP, entre autres les régions qui abritent les récepteurs à GHB et les aires qui reçoivent les projections de ces régions. Tel que présenté dans l'introduction, le modèle de McCarley et Hobson (1975) suggère que les neurones impliqués dans la modulation du SP sont les neurones SP-*off* (utilisant la 5-HT et la Na) et les neurones SP-*on* (utilisant l'ACh).

Selon une première hypothèse, la réduction de la latence au SP par le GHB s'expliquerait par une inhibition du système SP-*off*. Le fait que le GHB ne modifie pas les taux de concentration de 5-HT (Bustos et Roth, 1972a, 1972b; Gessa *et al.*, 1966) et de NA (Gessa *et al.*, 1966) va à l'encontre de cette hypothèse.

Selon une deuxième hypothèse, la réduction de la latence au SP résulterait d'une excitation du système cholinergique SP-*on*. Bien que le GHB ne modifie pas significativement les taux de concentration d'ACh (Ladinsky *et al.*, 1983), il a la capacité d'intensifier l'augmentation provoquée par l'administration préalable de neuroleptiques comme la clozapine et la chlorpromazine (Stadler *et al.*, 1974; Laborit *et al.*, 1960). Nous nous sommes alors demandé si le GHB ne pourrait pas potentialiser la neurotransmission cholinergique, favorable au déclenchement du SP, quand le système cholinergique est déjà excité. A ce sujet, le modèle de McCarley et Hobson (1975) nous rappelle que l'apparition spontanée du SP ne survient que si précédée d'une augmentation (progressive) du taux de décharge des cellules ACh du système SP-*on*. Chez le chat, l'administration du GHB immédiatement après la fin d'une période spontanée de SP ne peut provoquer de SP (Delorme *et al.*, 1966). Par contre, Delorme *et al.* (1966) ont également montré que le GHB ne déclenche le SP que s'il est administré après la mi-temps entre deux périodes normales de SP. La période réfractaire est probablement due à des niveaux endogènes d'ACh insuffisants pour être potentialisés par le GHB, comme il le fait dans le cas d'administration de neuroleptiques, telle que discutée plus tôt.

Nos résultats montrent que le GHB ne déclenche effectivement le SP qu'en début de période de lumière, probablement parce que les niveaux d'ACh commencent à augmenter. Malheureusement, peu de recherches se sont penchées sur les niveaux circadiens de l'ACh dans le système SP-*on*.

Finalement, comme troisième hypothèse, il faut nécessairement que la réduction de la latence au SP implique la contribution d'un site anatomique contenant des récepteurs à GHB. Or, les récepteurs à GHB sont retrouvés principalement dans le système limbique (Maitre et Mandel, 1984; Snead et Liu, 1984; Vayer *et al.*, 1987; Hechler *et al.*, 1991). Comme le GHB agit spécifiquement sur la DA (Gessa *et al.*, 1966; Roth et Surh, 1970; Aghahanian et Roth, 1970; Roth, 1987), l'ATV, composante du système limbique qui synthétise la DA, semblerait impliquée. Par ailleurs, il a été démontré que la stimulation des noyaux dopaminergiques mésencéphaliques a une action inhibitrice sur les cellules du raphé dorsal (Stern *et al.*, 1979). Il se pourrait donc que le déclenchement du SP par une faible dose de GHB laquelle excite les cellules de l'ATV soit lié à une inhibition du raphé dorsal par libération de DA. Les projections de l'ATV jusqu'aux régions cholinergiques du prosencéphale basal et du tronc cérébral (Maeda *et al.*, 1994) expliqueraient également l'activation des cellules SP-*on* et l'apparition plus rapide du SP qui en résulte.

Nous avons déjà procédé à la vérification de la dernière hypothèse, soit celle discutant d'une origine dopaminergique. Cette quatrième étude est présentée en annexe (Tremblay *et al.*, 1998). Elle montre que le GHB agit sur le taux de décharge des cellules dopaminergiques de l'ATV selon un effet dose-réponse. Les faibles doses ont généralement tendance à produire une augmentation de la fréquence de décharge, tandis que les fortes doses produisent un effet inverse. Une étude antérieure de Godbout *et al.* (1995) démontrait que le GHB provoquait un effet similaire sur les cellules du cortex préfrontal. Par ailleurs, les cellules présumément dopaminergiques de l'ATV montrent un phénomène de blocage par dépolarisation suite à une administration d'une faible dose de GHB.

## 9. Le GHB dans le futur...

Les résultats des quatre études que nous avons menées (chapitre 3, 4, 5 et annexe 1) soulèvent plusieurs questions et surtout de nouvelles hypothèses de travail se prêtant à de futurs projets. Elles sont résumées ci-dessous et reprises en détails dans les sections suivantes:

- Il conviendrait, par exemple, d'analyser avec minutie les paramètres du sommeil en explorant non seulement les éléments macro-architecturaux mais également les éléments micro-architecturaux tels que les évènements phasiques et les évènements toniques. La détermination des stades du sommeil passe par l'analyse d'un ensemble de

plusieurs éléments micro-architecturaux. Cette analyse globale tend à ignorer les caractéristiques propres à chaque élément micro-architectural.

- Le sommeil dépend d'une multitude de facteurs dont la température (Borbély et Archermann, 1992). Un projet devrait donc être consacré à l'interaction du GHB et de la température dans le déclenchement du SP.

- Puisqu'il est probable que les effets du GHB impliquent des régions dopaminergiques, il serait également intéressant d'étudier le mode d'action du GHB au niveau de sites anatomiques directement impliqués dans la régulation du sommeil, notamment l'hypothalamus.

- Finalement, le potentiel clinique cognitif de GHB mériterait d'être exploré puisqu'il agit sur le SP, responsable de plusieurs fonctions cognitives (Kleitman, 1963; Wilkinson, 1968; Smith, 1985, 1995).

## 9.1 Le GHB et la micro-architecture du sommeil

Les enregistrements polysomnographiques standards peuvent suffire à l'étude de la macro-architecture du sommeil. Cependant, il est parfois nécessaire de recourir à des méthodes plus sophistiquées pour examiner les éléments micro-architecturaux du sommeil et obtenir des informations plus complètes et plus précises sur l'activité électrique du cerveau.

L'analyse quantifiée de l'EEG permet de mesurer la fréquence et l'amplitude des différentes bandes passantes définies en fonction de leur fréquence (alpha, thêta, delta, *etc.*). Elle permet aussi de différencier, sur une bande passante, les variations d'amplitude des ondes des variations de fréquence. Appliquée au sommeil, cette approche permettrait une analyse topographique corticale de la distribution de l'activité électroencéphalographique et d'obtenir une liste de réseaux neuronaux impliqués dans la genèse de l'EEG et affectés par le GHB (*e.g.* la boucle thalamo-corticale).

C'est aussi par l'analyse micro-architecturale que l'on peut différencier au cours du SP les événements toniques des événements phasiques. Les événements toniques (suppression des mouvements oculaires, activation électroencéphalographique et inhibition musculaire) sont générés par la formation réticulaire mésencéphalique. Les événements phasiques (MOR, secousses musculaires et pointes ponto-géniculo-occipitales) sont engendrés par la formation réticulaire protubérantielle. (Moruzzi, 1963). Ces éléments sont régis par divers systèmes et correspondent à différentes régions



anatomiques. Si le GHB modifie un des éléments micro-architecturaux, de nouvelles hypothèses pourront être émises quant aux sites d'action.

## 9.2 Le GHB et la température

Plusieurs études (Borbély et Neuhaus, 1978a, 1978b; Franken *et al.*, 1992; Wehr, 1990) montrent qu'il existe une corrélation entre les variations circadiennes de la température centrale et la probabilité d'apparition du sommeil, y compris du SP. Lorsque la température centrale est en phase descendante, l'endormissement se fait plus facilement. La phase ascendante est une phase plus propice à l'éveil. Il reste à savoir si c'est la température qui influe sur le sommeil ou l'inverse et quel est leur degré de corrélation. Selon le modèle de Borbély (1982), c'est l'interaction continue entre deux variables, les facteurs C et H, qui déterminerait la covariance entre les fluctuations de température et de vigilance.

Le facteur C représente un oscillateur circadien, sorte d'horloge biologique située au niveau du noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus antérieur. Cet oscillateur agit comme un synchroniseur qui fait covarier plusieurs fonctions physiologiques au cours du nyctémère. Le marqueur le plus utilisé pour quantifier l'action du facteur C est la température centrale. Il a été noté que la vigilance et la température corporelle baissaient simultanément au même moment de la journée (généralement le soir chez l'humain). La propension à l'endormissement est plus forte, la quantité de SL plus grande et la durée du sommeil plus longue lorsque la température centrale est en phase descendante. La propension à l'éveil et au SP est plus forte lorsque la température centrale monte.

Le facteur H correspond à un processus homéostatique ayant pour rôle celui de faciliter l'apparition des mécanismes correcteurs quand l'équilibre naturel de l'organisme est rompu. En compétition avec l'effet habituel de la température, il provoque un endormissement plus précoce ou plus rapide qu'en temps normal dans les cas de privation de sommeil. Le marqueur le plus utilisé pour mesurer le degré d'action du facteur H est la quantité d'ondes delta à l'EEG. Les ondes delta sont plus nombreuses au début de la nuit quand la dette de sommeil n'est pas encore comblée.

En bref, le facteur C agit sur l'agencement temporel des fonctions physiologiques selon un mode «idéal» et le facteur H ajuste le canevas circadien aux besoins homéostatiques.

L'apparition de certains stades spécifiques au cours du sommeil semble dépendre étroitement des variations ultradiennes de la température centrale: celle-ci s'abaisse pendant le SL et s'élève pendant le SP (Franken, *et al.*, 1992). La régulation thermique devient inefficace une fois le SP déclenché et l'organisme passe d'un état homéothermique à un état poïkilothermique (Parmeggiani, 1980). Le fractionnement du SP en plusieurs épisodes pendant le sommeil contribue au maintien d'un équilibre thermique et à la prévention des risques d'hypothermie ou d'hyperthermie (McGinty et Szymusiak, 1990).

Certaines études ont démontré que le GHB agissait sur la température (Godbout *et al.*, 1993; Kauffman, 1990). L'administration d'une faible dose a un effet hyperthermique qui peut être inhibé par l'administration simultanée de NCS-382. Une forte dose a un effet hypothermique qui résiste à l'administration du NCS-382 (Godbout *et al.*, 1993). Pour savoir si les effets du GHB sur le mécanisme de déclenchement du SP sont indépendants des effets du GHB sur la température il faudrait étudier simultanément les variations du sommeil et de la température. Cette étude peut se faire par l'observation et l'analyse des effets thermiques du GHB au cours des différents stades de sommeil.

### **9.3 Le GHB et l'hypothalamus**

Plusieurs observations tendent à indiquer que le contrôle du SP ne relève pas uniquement du tronc cérébral. Ce contrôle semble impliquer également une région cérébrale plus antérieure, et tout particulièrement l'hypothalamus. Des sites de liaisons et de synthèse de GHB se retrouvent dans la région hypothalamique (Snead et Liu, 1984; Hechler, 1991). Des lésions hypothalamiques, chirurgicales (Schwartz *et al.*, 1984) ou tumorales (Stahl *et al.*, 1980; Anderson et Salmon, 1977), entraînent une atonie musculaire, une paralysie du sommeil, des hallucinations hypnagogiques et, à l'endormissement, un SP sans temps de latence. De telles anomalies sont des caractéristiques dissociées du SP et s'observent dans les cas de narcolepsie. De plus, on sait que le GHB agit sur la température (Godbout *et al.*, 1993; Kaufman *et al.*, 1990). Or, l'hypothalamus est impliqué dans le contrôle de la température (Satinoff, 1978). Le GHB augmente aussi les niveaux d'hormone de croissance (Van Cauter *et al.* 1997) et de la prolactine (Takahara *et al.*, 1977), hormones sécrétées par l'hypothalamus alors que la sécrétion peut être inhibée par la stimulation de la DA (MacLeod, 1969; Kamberi *et al.*, 1971; Takahara *et al.*, 1974). Il se trouve donc plusieurs arguments pour relier

l'action du GHB au système dopaminergique et à l'hypothalamus qui orchestre l'horloge biologique des rythmes circadiens de la température et du sommeil.

Il reste à étudier les effets du GHB sur les cellules localisées dans l'hypothalamus. Cette étude nécessiterait l'enregistrement électrophysiologique des fréquences d'activité neuronale hypothalamique après administration de GHB.

#### **9.4 Le GHB et la cognition**

La littérature fournit de nombreux exemples montrant l'implication du SP dans la cognition. Le sommeil qui suit un apprentissage diurne se caractérise par une durée plus grande de SP et une privation de SP occasionne des déficits mnésiques (Smith, 1985, 1995). Des maladies neurologiques comme la narcolepsie (Broughton *et al.*, 1988) et certaines maladies neuro-psychiatriques, la maladie d'Alzheimer (Prinz *et al.*, 1982; Vitiello *et al.*, 1984; Bliwize *et al.*, 1989) par exemple, s'accompagnent d'une modification de quelques paramètres du SP. Or, ces maladies sont également associées à une atteinte des fonctions cognitives (Loewenstein *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1992).

Dans le cas de la narcolepsie, on retrouve une latence au SP raccourcie et un SP particulièrement fragmenté. Plusieurs auteurs justifiaient les troubles de mémoire rapportés par les individus atteints par la narcolepsie comme étant la conséquence d'un trouble de somnolence (Aguirre *et al.*, 1985; Rogers et Rosemberg, 1990). Cependant, si l'on distingue les différents mécanismes mnésiques (encodage, récupération et consolidation de l'information), on est en mesure de valider les plaintes mnésiques et les relier à un déficit de récupération indépendant de la somnolence (Smith *et al.*, 1992). L'atteinte des fonctions cognitives dans la narcolepsie ne semble pas être simplement la conséquence d'une somnolence diurne excessive. Il serait donc intéressant d'effectuer une étude sur les effets du GHB sur la capacité de récupération chez les individus traités par cette drogue.

Dans les cas de maladie d'Alzheimer, le SP est relativement épargné en début de maladie (Vitiello *et al.*, 1984) mais en cours d'évolution le délai d'apparition du SP s'allonge progressivement (Prinz *et al.*, 1982). Toutefois, un important ralentissement de l'EEG en SP est déjà détectable à un stade précoce de la maladie (Petit *et al.*, 1993). Nos observations cliniques nous ont permis de remarquer qu'au stade précoce, seule la mémoire épisodique est atteinte; à un stade tardif, la mémoire procédurale fait aussi défaut. La défaillance de la mémoire procédurale survient parallèlement à la perturbation des paramètres du SP.

Certains types d'apprentissage seraient plus vulnérables que d'autres à une privation de SP. Les apprentissages de type procédural obtenus de façon automatique par simple répétition de la tâche sans l'intervention de processus conscients diminuent lors d'une privation de SP; les autres types d'apprentissages (qui nécessitent l'intervention de processus conscients) sont épargnés. La mémoire procédurale semblerait donc être dépendante du SP (Smith, 1995).

Quelques études nous permettent d'attribuer des propriétés nootropes au GHB. L'administration de GHB chez des rats dont la mère a souffert d'hypoxie durant la gestation, restaure les fonctions mnésiques défailtantes et corrige les troubles du sommeil chez ces rats nouveau-nés (Trofimov *et al.*, 1993). Si le GHB est administré durant la gestation d'une rate ayant souffert d'hypoxie et non après la naissance, les troubles mnésiques et du sommeil n'apparaîtront pas chez les rats (Koziar *et al.*, 1994). Le GHB semble donc pouvoir remédier, voire même, prévenir les déficits mnésiques et les troubles du sommeil dans certains cas.

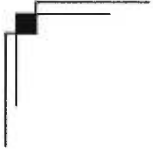
L'administration du GHB chez des rats privés de SP et soumis à des épreuves de type procédural pourrait faire l'objet d'une étude particulière. Cette étude viserait à vérifier si le GHB peut prévenir les déficits cognitifs consécutifs à une perte de SP et à évaluer l'impact clinique éventuel des résultats obtenus. Les récepteurs à GHB sont nombreux dans l'hippocampe (Snead et Liu, 1984; Maitre et Mandel, 1984; Vayer *et al.*, 1987; Hechler *et al.*, 1991), support anatomique de la mémoire et région cérébrale précocement atteinte dans la maladie d'Alzheimer (Brun et Englund, 1981). La possibilité que le GHB puisse prévenir, pallier ou traiter les déficits cognitifs reste à évaluer.

## **10. Mot de la fin...**

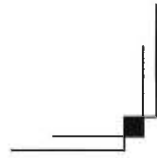
Les données actuelles de la littérature scientifique et le résultat de nos propres travaux, font apparaître le GHB comme un agent prometteur ayant, entre autres caractéristiques, des propriétés hypnotiques, thermiques et nootropes.

Contrairement à de nombreux traitements biochimiques, le GHB à des doses thérapeutiques ne donne qu'un minimum d'effets secondaires, effets mineurs qui se dissipent en quelques jours (Broughton et Mamelak, 1979; Mamelak *et al.*, 1986). Il a déjà été utilisé pendant neuf ans chez un même individu atteint de la narcolepsie et aucun effet d'accoutumance n'a encore été rapporté (Scharf *et al.*, 1985).

Le GHB apparaît comme un neurotransmetteur (Maitre, 1997) capable de moduler le sommeil au même titre que la Na, 5-HT et l'ACh. Par conséquent, nous proposons d'inclure le GHB dans le modèle de McCarley et Hobson (1975) comme agent permissif du SP.



## *Références*



## Références

Adam, K. et Oswald, I. (1983). Protein synthesis, bodily renewal and the sleep-wake cycle. *Clin. Sci.*, 65, 561-657.

Aghajanian, G.K. et Roth, R.H. (1970). Gamma-hydroxybutyrate-induced increase in brain dopamine: Localization by fluorescence microscopy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 175, 131-138.

Aguirre, M., Broughton, R. et Stuss, D. (1985). Does memory impairment exist in narcolepsy-cataplexy? *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, 7, 14-24.

Alföldi, P., Tobler, I. et Borbély, A.A. (1990). Sleep regulation in rats during early development. *Am. J. Physiol.*, 27, r634-r644.

Anderson, M. et Salmon, M.V. (1977). Symptomatic cataplexy. *J. Neuro. Neurosurg. Psychiatry*, 40, 186-191.

Arena, C. et Fung, L.H. (1980). Absorption of sodium gamma-hydroxybutyrate and its prodrug gamma-butyrolactone: relationship between *in vitro* transport and *in vivo* absorption. *J. Pharm. Sci.*, 69, 356-358.

Banerjee, R.K. et Snead, C.O. (1995). Presynaptic gamma-hydroxybutyric acid (GHB) and gamma-aminobutyric acid<sub>B</sub> (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.

Berger, R.J. (1969). Oculomotor control: A possible function of REM sleep. *Psychol. Rev.*, 76 (2), 144-164.

Berger, R.J. (1984). Slow wave sleep, shallow torpor and hibernation: Homologous states of diminished metabolism and body temperature. *Biol. Psychol.*, 10, 305-326.

Berger, R.J. et Phillips, N.H. (1988). Comparative aspects of energy metabolism, body temperature and sleep. *Acta Physiol. Scand.*, 133, supp. 574, 21-28.

Berger, R.J. et Philips, N.H. (1990). Comparative physiology in sleep, thermoregulation and metabolism from the perspective of energy conservation. *Progr. Clin. Bio. Res.*, 345, 41-52.

Bernavides, J., Rumigny, J.F., Bourguignon, J.J., Cash, C., Wermuth, C.G., Mandel, P., Vincendon, G. et Maitre, M. (1982). High affinity binding sites for gamma-hydroxybutyric acid in rat brain. *Life Sci.*, 30, 953-961.

Biggio, G., Cibir M., Diana M., Fadda, F., Ferrara, S.D., Gallimberti L., Gessa, G.L. Mereu, G.P., Rossetti, Z.L. and Serra, M. (1992). Suppression of voluntary alcohol intake in rats and alcoholics by gamma-hydroxybutyric acid: a non-GABAergic mechanism. Dans G. Biggio, A. Concas et E. Costa (eds). *GABAergic synaptic transmission*. (pp. 281-288). Raven, New-York.

Bliwise, D.L., Tinklenberg, J., Yesavage, J.A., Davies, H., Pursley, A.M., Petta, D.E., Widrow, L. Guilleminault, C., Zarcone, V.P. et Dement, W.C. (1989). REM latency in Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry*, 25, 320-328.

Borbély, A.A. (1982). A two-process model of sleep regulation. *Human Neurobiol.*, 1, 195-204

Borbély, A.A. et Neuhaus, H.U. (1978a). Daily pattern of sleep, motor activity and feeding in the rat. *J. Comp. Physiol*, 133, 71-87.

Borbély, A.A. et Neuhaus, H.U. (1978b). Circadian rhythm of sleep and motor activity in the rat during skeleton photoperiod, continuous darkness and continuous light. *J. Comp. Physiol.*, 128, 37-46.

Borbély, A.A. et Archermann, P. (1992). Concepts and models of sleep regulation: an overview. *J. Sleep Res.*, 1, 63-79.

Borenstein, P., Champion C. et Cujo, P.H. (1969). Étude polygraphique du "sommeil" provoqué par le gamma-hydroxybutyrate de sodium et le diazepam. *Sem. Hôp. Paris*, 45, 1290-1300.

Born, J. Muth, S. et Fehm, H.L. (1988). The significance of sleep onset and slow wave sleep for nocturnal release of growth hormone (GH) and cortisol. *Psychoneuroendocrinology*, 13, 233-243.



Broughton, R., Dunham, W., Newman, J., Lutley, K., Duschesne, P. et Rivers, M. (1988). Ambulatory 24 hour sleep-wake monitoring in narcoleptic-cataplexy compared to matched controls, *Electroencephalograph Clin. Neurophysiol.*, 70 (6), 473-481.

Broughton, R. et Mamelak, M. (1979). The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can. J. Neurol. Sci.*, 6, 1.

Broughton, R. et Mamelak, M. (1980). Effects of nocturnal gamma-hydroxybutyrate on sleep/waking patterns in narcolepsy-cataplexy. *Can. J. Neurol. Sci.*, 7, 23-31.

Brun, A. et Englund, E. (1981). Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: Neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology*, 5, 549-564.

Bustos, G. et Roth, R.H. (1972a). Effet of  $\gamma$ -hydroxybutyrate on the release of monoamines from the rat striatum. *Br. J. Pharmacol.*, 44, 817-820.

Bustos, G. et Roth, R.H. (1972b). Release of monoamines from the striatum and hypothalamus: effect of  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptors form rat. *Br. J. Pharmacol.*, 46, 101-115.

Cespuglio, R., Sarda, N., Gharib, A., Chastrette, N., Houdouin, F., Rampin, C. et Jouvét, M. (1990). Voltammetric detection of the release of 5-hydroxyindole compounds throughout the sleep-waking cycle of the rat. *Exp. Brain. Res.*, 80, 121-128.

Chrapusta, S.J., Karoum, F., Egan, M.F. et Wyatt, R.J. (1992).  $\gamma$ -butyrolactone-sensitive and -insensitive dopamine release, and their relationship to dopamine metabolism in three rat brain regions. *Eur. J. Pharmacol.*, 222, 129-135.

Crick, F. et Mitchison, G. (1995). REM sleep and neural nets. *Behav. Brain Res.*, 69, 147-155.

Czeisler, C.A, Weitzman, E.D., Moore-Ede, M.C., Zimmerman, J.C. et Krauer, R.S. (1990). Human sleep: its duration and organization depend on its circadian phase. *Science*, 210, 1264-1267.

Delorme, F., Riette M. et Jouvét, M. (1966). Conditions de déclenchement du sommeil paradoxal par les acides gras à chaîne courte chez le rat pontique chronique. *C. R. Soc. Biol.*, 160, 1457-1460.

Dement, W.C. (1957). Dream recall and eye movement during sleep in schizophrenics and normals. *J. Appl. Physiol.*, 8, 1-10.

Dement, W.C. et Kleitman, N. (1957a). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, bodily motility and dreaming. *Electroencephalograph. Clin. Neurophysiol.*, 9, 673-690.

Dement, W. C. et Kleitman, N. (1957b). The relation of eye movements during sleep to dream activity: An objective method for the study of dreaming. *J. Exp. Psychol.*, 53, 339-346.

Dement, W.C. et Wolpert, E. (1958a). Interrelations in the manifest content of dreams occurring on the same night. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 126, 568-578.

Dement, W.C. et Wolpert, E. (1958b). The relation of eye movements, body motility, and external stimuli to dream content. *J. Exp. Psychol.*, 55, 543-554.

Diana, M., Mereu, G., Mura, A., Fadda, F., Passino, N. et Gessa, G.L. (1991). Low doses of gamma-hydroxybutyric acid stimulate the firing rate of dopaminergic neurons in unesthetized rats. *Brain Res.*, 566, 208-211.

Di Chiara, G. et Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increased synaptic dopamine concentration in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5274-5278.

Endberg, G. et Nissbrandt, H. (1993). Gamma-hydroxybutyric acid (GHBA) induces pacemaker activity and inhibition of substantia nigra dopamine neurons by activating GABAB-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 348, 491-497.

Ephron, H.S. et Carrington, P. (1966). Rapid Eye Movement Sleep and Cortical Homeostasis. *Psychol. Rev.*, 73 (6), 500-526.

Fadda, F., Argiolas, A. Melis, M.R., De Montis, G. et Gessa, G.L. (1983). Suppression of voluntary alcohol consumption in rats by gamma-butyrolactone. *Life Sci.* 32, 1471-1477.

Fadda, F., Colombo, G., Mosca, E. et Gessa, G.L. (1989). Suppression by gamma-hydroxybutyric acid of ethanol withdrawal syndrome in rats. *Alcohol Alcohol.*, 24, 447-451.

Feldman, R.S. et Quenzer. L.F. (1984). *Fundamentals of Neuropsychopharmacology*, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.

Ferrara, S.D., Zotti, S., Tedeschi, L., Frison, G., Castagna, F., Gallimberti, L., Gessa, G.L. et Palatini, P. (1992). Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol-dependant patients after single and repeated oral doses. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 34, 231-235.

Fiss, H., Klein, G et Bokert, E. (1966). Waking Fantasies Following Interruptions in the Types of Sleep. *Arch. Gen. Psychiatry*, 14 (5), 543-55

Foulkes, D. (1962). Dream reports and dream experiences. *Exp. Neurol.*, 19, (suppl. 4), 4-15.

Franken, P., Tobler, I. et Borbély, A.A. (1992). Cortical temperature and EEG slow-wave activity in the rat: Analysis of vigilance state related changes. *Pflügers Arch.*, 420, 500-507.

Gallimberti, L. Cibir, M., Pagnin, P., Sabbion, R., Pani, P.P., Pirastu., R., Ferrara, S.D. et Gessa, G.L. (1993). Gamma-hydroxybutyric acid for treatment of opiate withdrawal syndrome. *Neuropsychopharmacology*, 9, 77-81.

Galloway, G.P, Frederick, S.L. Staggers, F.E., Gonzales, M., Statcup, S.A. et Smith, D.E. (1997). Gamma-hydroxybutyrate: An emerging drug of abuse that causes physical dependence. *Addiction*, 92, 89-96.

Gessa, G.L., Vargiu, L., Crabai, F., Boero, G.C., Caboni F. et Camba, R. (1966). Selective increase of brain dopamine induced by gamma-hydroxybutyrate. *Life Sci.*, 5, 1921-1930.

Gallimberti, L., Ferrara, S.D., Fadda, F. et Gessa, G.L. (1992). Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol dependence: a double blind study. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 16, 673-676.

Giarman, N.J. et Schmidt, K.F. (1963). Some neurochemical aspects of the depressant action of butyrolactone on the central nervous system. *Br. J. Pharmacol.*, 20, 593-568.

Godbout, R., Jelenic, P., Schmitt, M. et Bourguignon, J.J. (1995). Effects of Gamma-hydroxybutyrate and its antagonist NCS-382 on spontaneous cells firing in the prefrontal cortex of the rat. *Brain Res.*, 673, 157-160.

Godbout, R. et Pivik, R.T. (1982). EEG and behavioral effects of gamma-hydroxybutyrate in the rabbit. *Life Sc.*, 31, 739-748.

Godbout, R., Rompré, P.P., Schmitt, M. et Bourguignon, J.J. (1993). Dose-effect of gamma-hydroxybutyrate on rectal temperature in rats: hyperthermia is blocked by the GHB receptor antagonist NCS-382. *Sleep Res.*, 22, 24.

Godbout, R., Rompré, P.P., Schmitt, M. et Bourguignon, J.J. (1994). NCS-382 reverses hyperthermia, not hypothermia, induced by gamma-hydroxybutyrate in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 20, 1563.

Gottesmann, C. (1992). Detection of seven sleep-waking stages in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 31-38.

Grove-White, I.G. et Kelman, G.R. (1971). Critical flicker frequency after small doses of methohexifone, diazepam and sodium 4-hydroxybutyrate. *Br. J. Anaesth.*, 43, 110-112.

Hayashi, T. (1967). The relationship between circadian sleep and gamma-hydroxybutyrate (4HB) in brain. *Exp. Med. Surg.* 25, 148-155.

Hechler, V., Bourguignon, J.J., Wermuth, C.G., Mandel, P. et Maitre, M. (1985). Gamma-hydroxybutyrate uptake by rat brain striatal slices. *Neurochem. Res.* 10, 387-396.

Hechler, V., Gobaille, S., Bourguignon, J.J. et Maitre, M. (1991). Extracellular events induced by  $\gamma$ -hydroxybutyrate in striatum: A microdialysis study. *J. Neurochem.*, 56, 938-944.

Hechler, V., Gobaille, S. et Maitre, M. (1992). Selective distribution pattern of  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptors in rat striatum and hippocampus. *Brain Res.* 572, 345-348.

Hechler, V., Weissmann, D., Mach, E., Pujol, J. et Maitre, M. (1987). Regional distribution of high-affinity  $\gamma$ -[<sup>3</sup>H]hydroxybutyrate binding sites as determined by quantitative autoradiography. *J. Neurochem.*, 49, 1025-1032.

Hedner, T.H. et Lundborg, P. (1983). Effect of gamma-hydroxybutyric acid on serotonin synthesis, concentration and metabolism in the developing rat brain. *J. Neural. Trans.*, 57, 39-48.

Heller, H.C., Glotzbach, S., Grahn, D. et Radeke, C. (1988). Sleep-dependent changes in the thermoregulatory system. Dans R. Lydic, J.F. Biebuyck (eds). *Clinical Physiology of Sleep*. (pp. 145-158). American Physiological Society. Bethesda, Maryland.

Hoes, M.J., Vree, T. et Guelen, P.J. (1980). Gamma-hydroxybutyric acid as hypnotic. Clinical and pharmacokinetic evaluation of gamma-hydroxybutyric acid as hypnotic in man. *Encephale*, 6, 93-99.

Horne, J. (1988). *Why we sleep: The functions of sleep in humans and other mammals*. Oxford University, Press.

Horne, J. (1992a). Human slow wave sleep: A review and appraisal of recent findings, with implications for sleep functions, and psychiatric illness. *Experientia*, 48, 941-954.

Horne, J. (1992b). "Core" and "optional" sleepiness. Dans R.J. Broughton et R.D. Olgivie (eds). *Sleep arousal and performance*. (pp 27-44). Boston, Birkhäuser.

Jouvet, M. (1982). Mécanismes des états du sommeil. Dans O. Benoit (ed.) *Physiologie du sommeil*. (pp. 1-29). Masson, Paris.

Jouvet, M. (1991). Le sommeil paradoxal: est-il le gardien de l'individuation psychologique? *Can. J. Psychol.* 45, 148-168.

Jouvet, M., Cier A, Mounier D., Valatx J.L. (1961). Effets du 4-butyrolactone et du 4-hydroxybutyrate de sodium sur l'E.E.G. et le comportement du chat. *C. R. Soc. Biol.* 155, 1313-1316.

Kamberi, I.A., Mica, R.S. et Porter, J.C. (1971). Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines on prolactin release. *Endocrinology*, 88, 1012-1020.

Kaufman, E.E., Porrino, L.J. et Nelson, T. (1990). Pyretic action of low doses of gamma-hydroxybutyrate in rats. *Bioch. Pharmacol.*, 12, 2637-40.

Krilowicz, B.L., Glotzbach, S. et Heller, H.C. (1988). Neuronal activity during sleep and complete bouts of hibernation. *Am. J. Physiol.*, 24, R1008-R1019.

Kleitman, N. (1963). *Sleep and Wakefulness*. University of Chicago Press, Chicago.

Koziar, V.S., Trofimov, S.S. Ostrovskaia, R.U., Sariev, A.K. et Zherde, V.P. (1994) Prenatal exposure to sodium oxybutyrate prevents a disorder of general behavior, learning and memory in the progeny of rats subjected to chronic hemic hypoxia. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 57(1), 8-11. *Résumé en russe*.

Laborit, H. (1964). Sodium 4-hydroxybutyrate. *Int. J. Neuropharmacol.*, 3, 433-452.

Laborit, H. (1973). Gamma-hydroxybutyrate, succinic semialdehyde and sleep. *Prog. Neurobiol.*, 1, 257-274.

Laborit, H., Jouany, J.M., Gerard, J. et Fabiani, P. (1960). Généralités concernant l'étude expérimentale et l'emploi clinique du gamma-hydroxybutyrate de Na. *Agressologie*, 1, 397-406.

Ladinsky, H., Consolo, S., Zatta, A. et Vezzani, A. (1983). Mode of action of gamma-butyrolactone on the central cholinergic system. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 322, 42-48.

Lapierre, O., Montplaisir, J., Lamarre, M. et Bédard, M.A. (1990). The effect of gamma-hydroxybutyrate on nocturnal and diurnal sleep of normal subjects: further consideration on REM sleep-triggering mechanisms. *Sleep*, 13, 24-30.

Loewenstein, R.J., Weingartner, H., Gillin, J.C., Kaye, W., Eberts, M. et Mendelson, W.B. (1982). Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia. *Neurobiol. Aging*, 3, 371-377.

MacLeod, R.M. (1969). Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone. *Endocrinology*, 85, 916-923.

MacMillan, V. (1978). The effects of gamma-hydroxybutyrate and gamma-butyrolactone upon the energy metabolism of the normoxic and hypoxic rat brain. *Brain*, 146, 117-187.

Maeda, Y., Kitahama, K. et Geffard, M. (1994). Dopaminergic innervation of rat locus coeruleus: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Microsc Res. Tech.*, 29, 211-218.

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, C.D., Schmitt, M. et Bourguignon, J.J. (1990). A specific  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 255, 657-663.

Maitre, M et Mandel, P. (1984). Propriétés permettant d'attribuer au gamma-hydroxybutyrate la qualité de neurotransmetteur du système nerveux central. *C. R. Acad. Sci. Paris Série III*, 12, 341-345.

Maitre, M., Rumigny, J.F., Cash, C. et Mandel, P. (1983a). Subcellular distribution of  $\gamma$ -hydroxybutyrate binding sites in rat brain principal localization in the synaptosomal fraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 110, 262.

Maitre, M, Rumigny, J.F. et Mandel, P. (1983b). Positive cooperativity in high affinity binding sites for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in rat brain. *Neurochem. Res.*, 8, 113-120.

Mamelak, M., Scharf, M.B. et Woods, M. (1986). Treatment of narcolepsy with  $\gamma$ -hydroxybutyrate. A review of clinical and sleep laboratory findings. *Sleep*, 9, 285-289.

Mamelak, M., Escriu, J.M. et Stokan O. (1977). The effects of  $\gamma$ -hydroxybutyrate on sleep. *Biol. Psychiatry*, 12, 273-288.

Mandel, P., Maitre, M., Vayer, P. et Hechler, V. (1987). Function of gamma-hydroxybutyrate: A putative neurotransmitter. *Soc. Trans.*, 5, 215-217.

Marcus, R. J., Winters, W. D., Mori, K. et Spooner C. (1967). EEG and behavioral comparison of the effects of gamma-hydroxybutyrate, gamma-hydroxylactone and short chain fatty acids in the rat. *Int. J. Neuropharmacol.*, 6, 175-185.

Matsuzaki, M. (1967). Sleep induced by sodium butyrate in the cat. *Brain Res.*, 4, 206-222.

McCarley, R.W. et Hobson J.A. (1975). Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science*, 189, 58-60.

McCarley, R.W. et Massaquoi, S.G. (1992). Neurobiological structure of the revised limit cycle reciprocal interaction model of REM cycle control. *J. Sleep. Res.*, 1, 132-137.

McGinty, D. et Szymusiak. R. (1990). Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep. *TINS*, 13, 480-487.

Metcalf, D.R., Emde, R.N. et Stripe, J.T. (1966). An EEG-behavioral study of sodium-hydroxybutyate in humans. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 20, 506-512.

Miguez, I., Aldegunde, M., Duran, R. et Veira, J.A. (1988). Effects of low dose of gamma-hydroxybutyric acid on serotonin, noradrenaline and dopamine concentrations in rat brain areas. *Neurochem. Res.*, 13, 531-533.

Molinari, S. et Foulkes, D. (1969). Tonic and phasic events during sleep: Psychological correlates and implications. *Percept. Mot. Skills*, 29, 343-368.

Montplaisir, J. et Barbezieux, M. (1981). Le gamma-hydroxybutyrate de sodium (GHB) dans le traitement de l'hypersomnie essentielle. *Can. J. Psychiatry*, 26, 162-166.

Moruzzi, G. (1963). Active processes in the brain stem during sleep, *Harvey Lect.*, 58, 233-297.

Murrin, L.C. et Roth, R.H. (1976) Dopaminergic neurons: reversal effects elicited by  $\gamma$ -butyrolactone by stimulation of the nigro-neostriatal pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 295, 15-20.

Olpe, H.R. et Koella, W.P. (1979). Inhibition of nigral and neocortical cells by gamma-hydroxybutyrate: a microiontophoretic investigation. *Eur. J. Pharmacol.* 53, 359-364.

Parmeggiani, P.L. (1980). Temperature regulation during sleep: A study in homeostasis. Dans J. Orem et C.D. Barnes (eds). *Physiology in Sleep*. (pp. 98-143). Academic Press, New York.

Petit, D., Lorrain, D. Gauthier, S. et Montplaisir, J. (1993). Regional spectral analysis of the REM sleep Eeg in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging*, 14, 141-145.

Pilliat, B. et Gottesmann, C. (1995). The reticular arousal threshold during the transition from slow wave sleep to paradoxical sleep in rat. *Physiol. Behav.*, 58, 199-202.

Pivik, R.T. et Braün, C. (1981). Nuchal muscle tonus during sleep, wakefulness and tonic immobility in the rabbit. *Physiol. Behav.*, 26, 13-20.

Pivik, R.T. et Foulkes, D. (1968). NREM mentation: Relation to personality, orientation time, and time of night. *J. Consult. Clin. Psychol.*, 37, 144-151.



Prinz, P.N., Larsen, L.H., Moe, K.E. et Vitiello, M.V. (1992). EEG markers of early Alzheimer's disease in computer selected tonic REM sleep. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 83, 36-43.

Racagny, G., Apud, J., Cocchi, D., Locatelli, V. et Muller, E.E. (1982). GABAergic control of anterior pituitary hormone secretion. *Life Sci.* 31(9), 823-838.

Radullovacki, M. (1985). Role of adenosine in sleep in rats. *Rev. Clin. Basic Pharmacol.*, 5, 327-339.

Rechtschaffen, A. et Kales, A. (1968). A manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring Systems for Sleep Stages of Human Subjects. Brain Research Institute, UCLA, Los Angeles. UCLA.

Rechtschaffen, A., Verdonne, P. et Wheaton, J. (1963). Reports of mental activity during sleep. *Can. Psychiatr. Assoc. J.*, 8, 409-414.

Redgrave, P., Taha, E.B., White, L. et Dean, P. (1982). Increased food intake following the manipulation of intracerebral dopamine levels with gamma-hydroxybutyrate. *Psychopharmacology (Berl.)*, 76, 273-277.

Roffwarg, H.P., Muzio, J. et W.C. Dement. (1966). Ontogenetic development of the human sleep-dream cycle. *Science*, 152, 604-619.

Rogers, A.E. et Rosenberg, R.S. (1990). Tests of memory in narcoleptics. *Sleep*, 13 (1), 42-52.

Roth, R.H. (1970). Formation and regional distribution of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in mammalian brain. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 3013-3019.

Roth, R.H. (1987). Biochemical correlates of the electrophysiological activity of dopaminergic neurons. Dans L.A. Chiodo, A.S. Freeman (eds). *Neurophysiology of dopaminergic systems. Current status and clinical perspectives.* (pp.187-203). Lakeshore Publishing Company, Grosse Pointe, Michigan.

Roth, R.H., Doherty, J.D. et Walters, J.R. (1980). Gamma-hydroxybutyrate: a role in the regulation of central dopaminergic neurons? *Brain Res.*, 189, 556-560.

Roth, R.H. et Giarman, N.J. (1966). Gamma-butyrolactone and gamma-hydroxybutyrate increase in brain dopamine and its relationship to "sleep". *Biochem. Pharmacol.*, 19, 3001-3012.

Roth, R.H. et Suhr, Y. (1970). Mechanism of the gamma-hydroxybutyrate-induced increase in brain dopamine in brain dopamine and its relationship to "sleep". *Biochem. Pharmacol.*, 19, 3001-3012.

Roth, R.H., Walters, J. R. et Aghajanian, G.K. (1973). Effect of impulse flow on the release and synthesis of dopamine in the rat striatum. Dans E. Usdin et S.H. Snyder (eds). *Frontiers in catecholamine research*. (pp.567- 574). Pergamon, Washington.

Rumigny, J.F., Maitre, M., Cash, C. et Mandel, P. (1981). Regional and subcellular localization in rat brain of the enzymes that can synthesize gamma-hydroxybutyric acid. *J. Neurochem.* 36, 1433-1438.

Satinoff, E. (1978). Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals. *Science*, 201, 16-22.

Scharf, M.B., Brown, D., Woods, M., Brown, L. et Hirschowitz, J. (1985). The effects and effectiveness of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in patients with narcolepsy. *J. Clin. Psychiatry*, 46, 222-225.

Schench, CH, Bundle SR, Ettinger, MG, Mahomald, MW. (1986). Chronic behavioral disorders of human sleep a new category of parasomnia. *Sleep*, 9, 293-308.

Schmidt, C., Gobaille, S., Hechler, V., Schmitt, M., Bourguignon, J.J. et Maitre, M. (1991). Anti-sedative and anti-cataleptic properties of NCS-382, a  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 203, 393-397.

Schmidt-Mutter, C. Pain, L, Sandner., G., Gobaille, S. et Maitre, M. (1998). The anxiolytic effect of gamma-hydroxybutyrate in the elevated plus maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil. *Eur. J. Pharmacol*, 342, 21-27.

Shapiro, C.M., Bortz, R., Mitchell, D., Bartel, P. et Jooste, P. (1981). Slow wave sleep: A recovery period after exercise. *Science*, 214, 1253-1254.

Schwartz, W.J., Stakes, J.W. et Hobson, J.A. (1984). Transient cataplexy after removal of a craniopharyngioma. *Neurology*, 34, 1372-1375.

Scrima, L., Hartman, P.G. Johnson, F.H., Thomas, E.E. et Hiller, F.C. (1990). The effect of gamma-hydroxybutyrate on the sleep of narcolepsy patients: a double-blind study. *Sleep*, 13, 479-490.

Pivik, P.T., Sircar, S. et Braün, C. (1981). Nuchal muscle tonus during sleep, wakefulness and tonic immobility in the rabbit. *Physiol. Behav*, 26, 13-20.

Smith, C. (1985). Sleep states and learning: A review of the animal literature. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 9, 157-168.

Smith, C. (1995). Sleep states and memory processes. *Beh. Brain. Res.*, 69, 137-145.

Smith, I., Beveridge, M.E. et Wyllie, A.M. (1972). 4-hydroxybutyrate narcosis for ophthalmic surgery. *Br. J. Ophthalmol.* 56, 429-430.

Smith, Y. et Bolam, J.P. (1990). The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 296, 47-64.

Smith, K.M., Merritt, S.L. et Cohen, F.L. (1992). Can We predict Cognitive Impairments in Persons with Narcolepsy? *Loss, Grief & Care*, 5 (3-4), 103-113.

Snead, O.C. (1978). Gamma-hydroxybutyrate in the monkey. III. Effects of intravenous anticonvulsant drugs. *Neurology*, 28, 1173-1178.

Snead, O.C. (1987). Gamma-hydroxybutyric acid in subcellular fractions of rat brain. *J. Neurochem*, 48, 196-201.

Snead, O.C. (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.

Snead, O.C. et Liu, C.C. (1984). Gamma-hydroxybutyrate binding sites in rat and human brain synaptosomal membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 2587-90.

Snead O.C., Yu, R.K. et Huttelocher, P.R. (1976). Gamma-hydroxybutyrate. Correlation of serum and cerebrospinal fluid levels with electroencephalographic and behavioral effects. *Neurology*, 36, 51-56.

Snyder, F. (1966). Toward an evolutionary theory of dreaming. *Am. J Psychiatry*, 122, 377-391.

Spano, P.F. et Przegalinski, E. (1973). Stimulation of serotonin synthesis by anesthetic and non-anesthetic doses of gamma-hydroxybutyrate. *Pharmacol. Res. Commun.*, 5, 55-69.

Stadler, H., Lloyd, K.G. et Bartholini, G. (1974). Dopaminergic inhibition of striatal cholinergic neurons: synergistic blocking action of gamma-butyrolactone and neuroleptic drugs. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 283, 129-134.

Stahl, S.M., Layzer, R.B. et Aminoff, M.J., Townsend, J.J. et Feldon, S. (1980). Continuous cataplexy in a patient with a midbrain tumor: the limp man syndrome. *Neurology*, 30, 1115-1158.

Steinbusch H.V.M. et Mudler A.H. (1984). Immunohistochemical localization of histamine in neurons and mast cells in the rat brain. Dans A. Bjorklund, T. Hokfelt et M.J. Kuhar (eds). *Handbook of Chemincal Neuroanatomy. Vol 3. Classiscal Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS, Part II.* (p. 126). Elsevier, Amsterdam.

Stern, W.C., Johnson, A., Bronzino, J.D. et Morgane, P.J. (1979). Influence of electrical stimulation of the substantia nigra on spontaneous activity of raphe neurons in the anesthetized rat. *Brain Res. Bull.*, 4, 561-565.

Tabakoff, B et Von Wartburg J.P. (1975). Separation of aldehyde reductases and alcohol dehydrogenase from brain by affinity chromatography: Metabolism of succinic semialdehyde and ethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 957-966.

Takahara, J., Arimuna, A. et Schally A.V. (1974). Supression of prolactin release by a purified porcine PIF preparation and catecholamines infused into a rat hypophysal portal vessel. *Endocrinology*, 95, 462-465.

Takahara, J., Yukoni, S., Yakushiji, W., Yamauchi, J., Yamane, Y. et Ofuji, T. (1977) Stimulatory effects of gamma-hydroxybutyric acid on growth hormone and prolactine release in humans. *J. Clin. Endocrinolol. Metab.*, 44, 1014-1017.

Taylor, R.S. et Driver, S.H. (1995). Is sleep affected by physical exercice and fitness? *Crit. Rev. Phys. Rehab. Med.*, 7, 131-145.

Timo-laria, C, Negrao, N, Schmidek, W.R., Hoshino, K., Lobato de Menezes, C.E. et Leme da Rocha, T. (1970). Phases and states of sleep in the rat. *Physiol. Behav.* 5, 1057-1062.

Thierry, A.M., Javoy, F., Glowinski, J. et Kety, S.S. (1968). Effects of stress on the metabolism of norepinephreine, dopamine and serotonin in the central nervous system

of the rat. Modifications of norepinephrine turnover. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 163, 163-171.

Trachsel, L., Tobler, I. et Borbély, A.A. (1988). Electroencephalogram analysis of non-rapid eye movement sleep in rats. *Am. J. Physiol.*, 255, R27-R37.

Tremblay, H., Godbout, R., Girodias, V., Schmitt, M. et Bourguignon, J.J. (1998). Effects of Gamma-hydroxybutyrate on Ventral Tegmental Unit Activity in the rat: Considerations on REM Sleep Control, *Sleep Res Online*, 1(4), 152-158.

Trofimov, S.S., Ostrovskaia, R.U., Smol'nikova, N.M., Kravchenko, E.V., Kutepova, O.A., Bondarenko, N.A., Neroblova, L.N., Nemova, E.P. et Voronina, T.A. (1993). Sodium oxybutyrate normalizes the central nervous system functions in the progeny of rats subjected to hypobaric hypoxia during pregnancy. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 56(6), 8-11. *Résumé en russe*

Van Cauter, E., Plat, L., Scharf, M.B., Leproult, R., Cespedes, S., L'Hermite-Baleriaux, M. et Copinschi, G. (1997). Simultaneous stimulation of slow-wave sleep and growth hormone secretion by gamma-hydroxybutyrate in normal young men. *J. Clin. Investigation*, 100, 745-753.

Vayer, P. et Maitre, M. (1989). Gamma-hydroxybutyrate stimulation of the formation of cyclic GMP and inositol phosphates in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 52, 1382-1387.

Vayer, P., Mandel, P. et Maitre, M. (1987). Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci.*, 41, 1547-1557.

Vickers, M.D. (1969). Gamma-hydroxybutyric acid. *Intern. Anesthesiol. Clin.*, 7, 75.

Vivaldi, E.A., Ocampo, A., Wyneken, U., Roncagliolo, M. et Zapata, A.M. (1994a). Short-term homeostasis of active sleep and the architecture of sleep in the rat. *J. Neurophysiol.*, 72 (4), 1745-1755.

Vivaldi, E.A., Wyneken, U., Roncagliolo, M., Ocampo, A. et Zapata, A.M. (1994b). Measures of location and dispersion of sleep state distributions within the circular frame of a 12:12 light: dark schedule in the rat. *Sleep*, 17(3), 208-219.

Vitiello, M.C., Bokan, J.A., Kukull, A.W., Muniz, R.L., Smallwood, R.G. et Prinz, P.N. (1984). Rapid eye movement sleep measures of alzheimer's-type dementia patients and optimally healthy aged individuals. *Soc. Biol. Psychiatry*, 19(5), 721-733.

Waldmeier, P. et Ferhr, B. (1978). Effects of baclofen and gamma-hydroxybutyrate on rat striatal and mesolimbic 5-HT metabolism. *Eur. J. Pharmacol.*, 49, 177-184.

Walters, R.J. et Roth, R.H. (1972). Effects of gamma-hydroxybutyrate on dopamine and dopamine metabolites in the rat striatum. *Biochem. Pharmacol.*, 21, 2111-2121.

Walters, R.J. et Roth, R.H. (1977).  $\gamma$ -hydroxybutyrate: considerations of endogenous role and therapeutic potential. Dans E. Ursin, D.A. Hamburg et J.D. Barchas (eds). *Neuroregulators and psychiatric disorders*.(pp.403-415). Oxford, New-York.

Wehr, T. A. (1990). Effect of wakefulness and sleep on depression and mania. Dans J. Montplaisir et R. Godbout (eds). *Sleep and biological rhythms. Basic mechanisms and applications to psychiatry*. (pp. 67-77). Oxford, New-York.

Weitzman, E.D., Czeisler, C.A., Zimmerman, J.C. et Ronda, J.M. (1980). Timing of REM and stage 3 + 4 sleep during temporal isolation in man. *Sleep*, 2, 391-407.

Whitehead, R.W. et Virtue, R.W. (1971). General anesthesia III: intravenous agents. Dans J.R. DiPalma (ed). *Drill's pharmacology in medicine* (pp. 179-189).

Wilkinson, R.T. (1968). Sleep deprivation: Performance test for partial and selective sleep deprivation. *Prog. Clin. Psychol.*, 8, 28-43.

Williams, S.R, Turner, J.P. and Crunelli, V., Gamma-hydroxybutyrate promotes oscillatory activity of rat and cat thalamocortical neurons by a tonic GABA<sub>B</sub> receptor-mediated hyperpolarization, *Neuroscience*, 66 (1995) 133—141

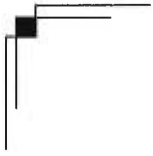
Winters, W.D. et Spooner, C. (1965). Various seizure activities following  $\gamma$ -hydroxybutyrate. *Intl. J. Pharmacol.* 4, 197-200.

Yamada, Y, Yamamoto, J. Fujiki, A., Hishikawa, Y. et Kanedo, Z. (1967). Effects of butyrolactone and gamma-hydroxybutyrate on the EEG and sleep cycle in man. *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.*, 22, 558-562.

Youngsted, S.D., O'Connor, P.J. et Dishman, R.K. (1997). The effects of acute exercise on sleep: A quantitative synthesis. *Sleep*, 20, 203-214.

Zepelin, H. (1980). REM sleep and the altrial-precocial dimension. *Sleep Res.*, 9, 114.

## *Annexe 1*



*«Effects of Gamma-hydroxybutyrate  
on Ventral Tegmental Unit Activity  
in the rat: Considerations on  
REM Sleep Control»*





# Effects of Gamma-hydroxybutyrate on Ventral Tegmental Unit Activity in the rat: Considerations on REM Sleep Control

Hugo Tremblay (1), Roger Godbout (1,2,4), Véronique Girodias (1),  
Martine Schmitt (3), and Jean-Jacques Bourguignon (3)

SRO Category: 14. Neurophysiology - General

Current claim: Gamma-hydroxybutyrate decreases at high doses and increases at low doses the firing activity of dopaminergic neurons of the Ventral Tegmental Area in anesthetized rats

(1) Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur  
5400 Boul. Gouin ouest, Montréal (Québec) Canada H4J 1C5  
Tel.: [REDACTED]  
Fax: (514) 338-2694

(2) Département de psychiatrie, Université de Montréal  
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

(3) Laboratoire de Pharmacochimie moléculaire, UPR 421 du CNRS  
5, rue Blaise Pascal  
67084 Strasbourg Cedex France  
Tel.: [REDACTED]  
Fax: (33)(3) 88.67.47.94

(4) Corresponding author:  
Roger Godbout, Ph.D.  
Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Cœur  
5400, Boul. Gouin Ouest  
Montréal (Québec) Canada H4J 1C5  
Tel.: (514) 338-2222, ext. 2460  
Fax: (514) 338-2694  
Email: [REDACTED]

**SOUS PRESSE DANS *SLEEP RESEARCH ONLINE***

## Abstract

The effect of gamma-hydroxybutyrate (GHB) administration on spontaneously active dopaminergic cells of the ventral tegmental area (VTA) was determined using extracellular single unit recordings in urethane-anesthetized rats. High doses (160-250 mg/kg, i.p.) of GHB reversibly decreased firing rate in 63,6% of the cells tested (n=11); remaining cells (36.4%) were unaffected. When the GHB receptor antagonist NCS-382 (10 mg/kg, i.p.) was co-administered with GHB at high doses, 50% of the cells became excited while remaining cells were unaffected. Of the 34 cells tested with GHB at low doses (10 mg/kg, i.p.), 21 (61.8%) changed their firing activity. Of these, 12 (57.1%) were excited, five (23.8%) were inhibited, and four (19.0%) were first excited then totally inhibited (E/I pattern). Out of the three E/I cells tested, two resumed their firing activity after apomorphine (50 $\mu$ g/kg s.c.), showing that they were in a state of depolarization inactivation. When NCS-382 (10 mg/kg, i.p.) was co-administered with GHB at low doses, only two of the seven cells tested (28,6%) changed their firing activity, both with excitations. We conclude that only low doses of GHB selectively activate GHB receptors. Mechanisms by which low doses of GHB facilitate REM sleep are discussed.

## Key words:

Gamma-hydroxybutyrate, dopamine, mesolimbic, prefrontal cortex, REM sleep.

## Introduction

Gamma-hydroxybutyrate (GHB) is an endogenous fatty acid that acts as a neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS) (Vayer *et al.*, 1987; Maitre, 1997). Among other characteristics, low and high affinity states of the central GHB receptor were described (Maitre *et al.*, 1983). GHB was first synthesized as an agonist of gamma-aminobutyric acid (GABA) that could readily cross the blood-brain barrier (Laborit, 1964). However, instead of significantly increasing GABA levels in the CNS, it was found that GHB selectively increased dopamine (DA) levels (Gessa *et al.*, 1966). Indeed it was shown that the cessation of impulse flow in DA neurotransmission systems caused by GHB activates tyrosine hydroxylase (Roth, 1987). Given the effect of GHB on DA impulse flow, the drug was widely used as a tool to induce a reversible lesion of the dopaminergic nigro-striatal pathway in experimental studies of the Parkinson's disease models (Roth, 1987).

GHB has long been used as a sedative-hypnotic both in animals and humans and it has been shown that it can readily induce rapid eye movement (REM) sleep at least in three species: rats, cats, and humans (Girodias *et al.*, 1996; Jouvet *et al.*, 1961; Lapierre *et al.*, 1990). Taken at bedtime GHB is an efficient treatment for cataplexy, a symptom related to the inappropriate daytime disinhibition of REM sleep muscle atonia in narcoleptics patients. It has been proposed that the therapeutic effect of this compound is achieved by consolidating nocturnal REM sleep, thus decreasing daytime pressure for REM sleep (Broughton and Mamelak, 1979).

The mechanism by which GHB interferes with normal and abnormal REM sleep physiology is still unknown. Available evidence, however, points to the limbic system as the preferential site of action of GHB (for a review, see Maitre, 1997). GHB synthesis, binding, and uptake sites are preferentially distributed in areas where DA neurons and terminal fields are found. Moreover, this system has been recently shown to be particularly important in the control of REM sleep in the canine model of narcolepsy-cataplexy (for a review, see Nishino and Mignot, 1997). For these reasons, we have chosen to characterize the effects of GHB in various sites of the meso-cortico-limbic system using clinically-relevant doses. In a first series of experiments, we studied the effects of various peripheral doses of GHB (5 to 320 mg/kg, i.p.) on the spontaneous firing activity of output neurons in the prefrontal cortex (PFC). We found that low doses

of GHB increased the firing activity of PFC output neurons, while highest doses decreased it; only the effect of low doses were blocked by NCS-382, the selective GHB receptor antagonist (Godbout *et al.*, 1995). These results suggested that only the effect of low doses of GHB on PFC neuronal firing could be attributed to a selective activation of GHB receptors.

The PFC is a major target of the ascending dopaminergic pathway originating from the ventral tegmental area (VTA) and PFC neurons are inhibited by DA release from VTA terminals (Godbout *et al.*, 1991). Thus, in the present study, we investigated the effects of GHB at high and at low (*i.e.*, REM sleep-inducing doses) on the firing activity of VTA cells bearing the electrographic characteristics of DA neurons. Moreover, we tested the selectivity of GHB effects by challenging these treatments with the specific GHB receptor antagonist NCS-382.

## Methods

Male Sprague-Dawley rats weighing 250 to 400 g were used (Charles River, St-Constant, Canada). Rats were housed 2 to 3 per cage in a room with a 12:12 hour light/dark cycle (lights on at 06:00). Food and water were available *ad libitum*. Experiments occurred during daytime hours. Animals were anesthetized with urethane (1.5 g/kg, *i.p.*; additional injections administered as needed) and were then mounted on a stereotaxic apparatus. Stereotaxic coordinates were determined according to Paxinos and Watson (1986). Body temperature was maintained throughout the experiments at 37°C with a thermostatically-regulated electrical heating pad. Extracellular single unit recordings of spontaneously active VTA neurons (4.8 to 5.3 mm posterior to bregma, 0.6 to 1.2 mm lateral to midline, and 7.5 to 8.5 mm below the cortical surface) were obtained using glass micropipettes filled with 4% Chicago Sky Blue dissolved in 2M NaCl solution (impedance 3 to 9 M  $\Omega$  at 1000 Hz). Electrophysiological signal was amplified, displayed on an oscilloscope, separated from noise using a window discriminator and then fed to a computer. Spike frequencies were monitored on-line using 10 sec. bins histograms.

At the end of each experiment, Chicago Sky Blue was ejected from the recording electrode by iontophoresis (8  $\mu$ A cathodal, 20 min.). Localization of recording sites were verified on serial frozen sections (20  $\mu$ m) under light microscopic examination.

Prior to drug administration, rats were injected with the vehicle (1 ml/kg) and firing activity was monitored for at least five minutes; this was considered as the baseline. After baseline recording, GHB (pH 6.5, dissolved in distilled water) was administered i.p. at a dose of 10 mg/kg, 160 mg/kg, or 250 mg/kg, in a volume of 1 ml/kg. Each dose was administered either alone or in conjunction with NCS-382 at a dose of 10 mg/kg, i.p. (1 ml/kg). Each data point is based on the injection of one GHB dose to one rat while recording from one VTA neuron.

The following variables were measured: the delay from time of injection to a change of at least 25% of the baseline firing rate, the amount of maximum change (expressed as % of the baseline firing rate), the latency to maximum change, and the duration of the effect (from 25% change until return to baseline firing rate  $\pm 10\%$ ). We choose 25% of the baseline firing rate as a cut-off value since it corresponded to three times the standard error of the mean (S.E.M.) of the baseline firing rate.

#### Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Contingency tables were constructed for all treatment levels. Results were compared using the  $\chi^2$  statistic, using the Fisher's Exact Test for 2x2 tables.

## Results

A total of 58 neurons were recorded, all within the region of the VTA (see Figure 1). During baseline recording these cells displayed the electrographic characteristics of DA cells (Bunney *et al.*, 1973; Chiodo *et al.*, 1984): a long bi- or triphasic action potential (3-4 ms), a positive-going first segment, and a high-amplitude negative-going second segment (Figure 2). Firing rate was tonic in all but one bursting cell; activity ranged from 2,0 Hz to 8,7 Hz (mean =  $4,6 \pm 0,3$ ). NCS-382 did not have any effect of its own on VTA firing at 10 mg/kg ( $n = 6$ ).

Figure 1. Location of the recording sites, all in the region of the Ventral Tegmental Area. Histological drawings are based on Paxinos and Watson (1986)

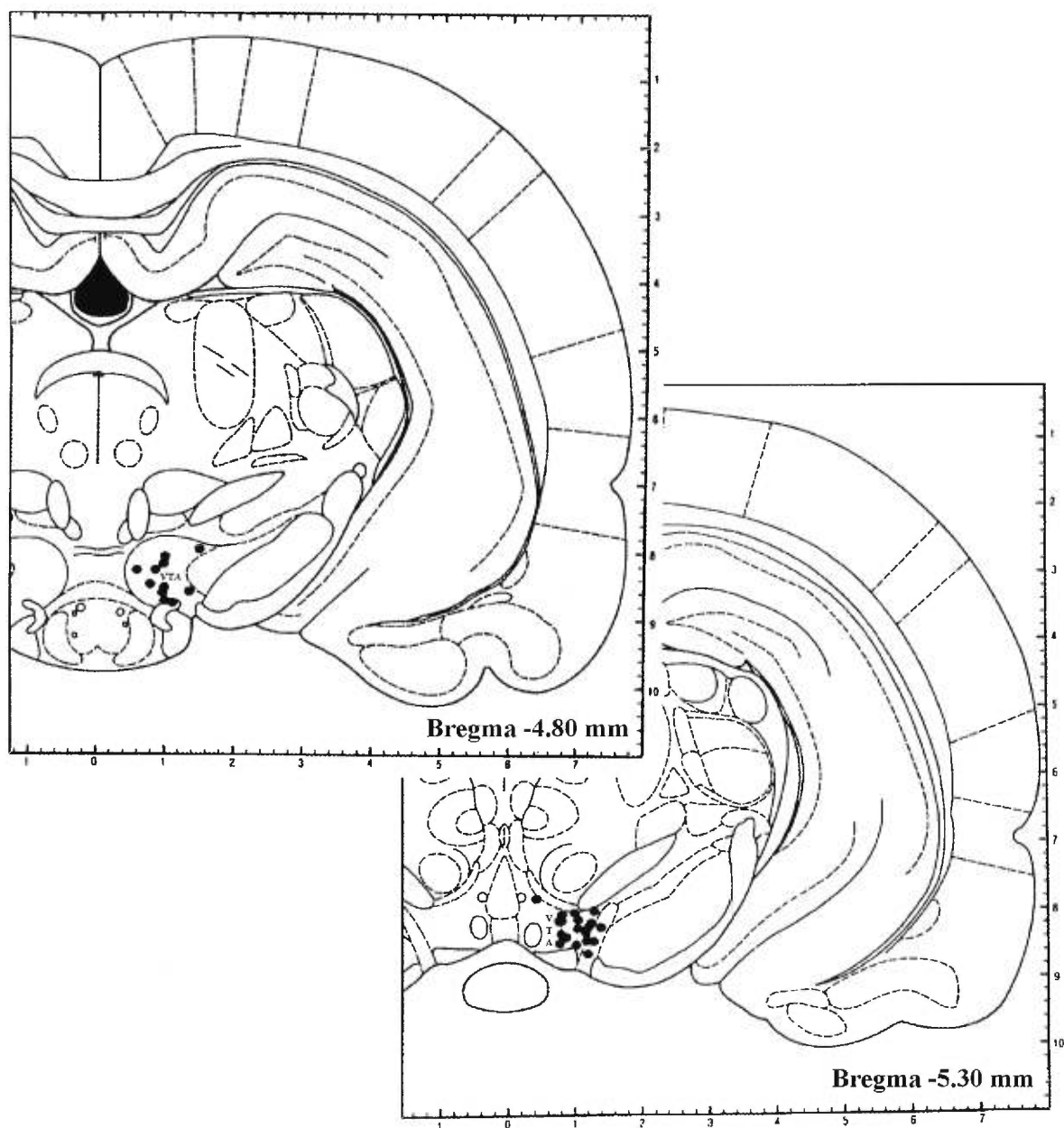


Figure 2. Digitized oscilloscope tracing of a typical Ventral Tegmental Area dopaminergic neuronal spike discharge, recorded extracellularly in an anesthetized rat.



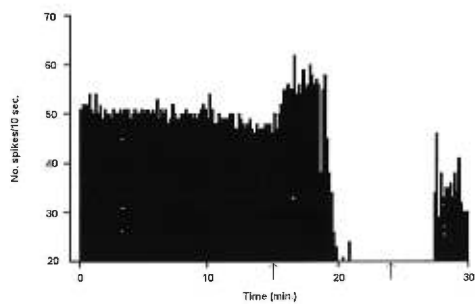
Results are summarized in the table below. Seven (63.6%) of the 11 cells tested were sensitive to high doses of GHB (160, 250 mg/kg) while the remaining (all tested at 160 mg/kg) were unresponsive ( $p < .004$ ); high GHB doses produced an inhibition of firing in all responsive cells ( $p < .00001$ ).

At 10 mg/kg, GHB modified the firing in 61.8% of the 34 cells tested while the remaining 13 cells were unresponsive ( $p < .0001$ ). Three types of effects were noted at this dose: the majority of cells (57,1%;  $p < .0002$ ) responded by increasing their firing rate, five other cells decreased it while the remaining four cells showed an excitation/inhibition (E/I) pattern (Figure 3).

In order to document the possibility that E/I cells were in a state of depolarization inactivation (DI) (Hand *et al.*, 1987), a low, *i.e.* pre-synaptic dose of apomorphine (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.c.) was injected during the inhibitory period in order to repolarize the cells ( $n=3$ ). Of these three cells, two resumed their firing activity shortly after the apomorphine injection, showing that they were indeed in a state of depolarization inactivation (see Figure 3). This phenomenon was replicated with a classical model of DI, *i.e.* using the injection of sulfated cholecystinin octapeptide (CCK-8S, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v.) (Skirboll *et al.*, 1981). In this series of experiments, one of the 11 cells tested entered a state of depolarization inactivation and its firing activity was restored by apomorphine.



Figure 3. Firing-rate histogram showing signs of depolarization inactivation in a dopaminergic neuron of the Ventral Tegmental Area. The first arrow indicates the injection of GHB 10 mg/kg. Note the transient excitation before the inhibitory period. The second arrow indicates the injection of apomorphine 50  $\mu$ g/kg, s.c. Firing activity resumed 3 minutes after the injection.



When NCS-382 was co-administered with a high GHB dose, the number of responsive cells was not statistically different from the condition where high GHB doses were given alone (50,0% vs. 63,6%, respectively). However, the nature of the response to high doses of GHB was reversed: the number of inhibited cells decreased from 100% to 0% and the number of excited cells increased from 0% to 100% ( $p < 0.008$ ).

The co-administration of NCS-382 and GHB 10 mg/kg significantly decreased the proportion of responsive cells compared to when GHB 10 mg/kg was given alone, falling from 61,8% to 22,3% ( $p < .05$ ). The nature of the response to the low dose of GHB was not changed, however: both responsive cells were excited by GHB 10 mg/kg.

Table 1. Effects of Gamma-hydroxybutyrate (GHB) on firing activity of Dopaminergic Neurons of the Ventral Tegmental Area in anesthetized rats

Drugs & Dosage (mg/kg)	Drug effect	# of cells	Latency to effect (min.)	Maximum effect (% of BL)	Latency to max. effect (min)	Duration of effect (min.)
GHB (160-250)	Excitation	0	-	-	-	-
	Inhibition	7*	15.3 ± 3.5	20.1 ± 9.1	36.5 ± 4.7	68.4 ± 20.7
	no effect	4	-	-	-	-
GHB (10)	Excitation	12*	8.9 ± 2.9	177.3 ± 13.1	13.0 ± 3.7	20.4 ± 6.0
	Inhibition	5	11.0 ± 5.5	39.6 ± 8.7	18.6 ± 7.3	29.2 ± 1.8
	Exc./ Inh.	4	17.3 ± 7.3	140.0 ± 12.2/ 0.0	17.3 ± 7.3	N.A.
	no effect	13	-	-	-	-
NCS-382 (10) +	Excitation	3**	5.8 ± 6.3	144.7 ± 24.5	10.6 ± 9.0	16.0 ± 10.5
	Inhibition	0	-	-	-	-
	GHB (160-250) no effect	3	-	-	-	-
NCS-382 (10) +	Excitation	2**	2.7 ± 0.5	151.0 ± 4.6	6.5 ± 4.0	11.3 ± 12.0
	Inhibition	0	-	-	-	-
	GHB (10) no effect	7	-	-	-	-

Numbers in parenthesis indicate the dose used. Drugs were administered i.p. When indicated, the GHB receptor antagonist NCS-382 was injected immediately prior to GHB. Latency to effect = delay in minutes from time of injection to a change of at least 25% of the baseline firing rate; Maximum effect: maximum change of firing, expressed as % of the baseline firing rate; Duration of effect = time in minutes from 25% change until return to baseline firing rate ±10%. Data is expressed as mean ± S.E.M.

\* = significantly different from control vehicle injections, Fisher's Exact Test,  $p < .05$  or better (see text).

\*\* = significantly different from GHB alone, Fisher's Exact Test,  $p < .05$  or better (see text).

## Discussion

It is generally reported that the peripheral administration of high GHB doses produces a cessation of impulse flow in meso-telencephalic dopaminergic neurons together with a decreased release of DA in terminal fields of meso-cortico-limbic and nigro-striatal pathways (Roth, 1987). The present study shows that GHB displays a dose-related effect on VTA DA cell firing rate in the anesthetized rat: highest doses (160-250 mg/kg) produced a decrease of firing rate while low doses (10 mg/kg) induced an increase. These results are consistent with previous work on the effects of high and low doses of GHB on PFC unit firing (Godbout *et al.*, 1995). The data is also congruent with previous work in conscious rats using the same dosages as in the present study: core body temperature was shown to decrease with high GHB doses and increase with low GHB doses (Kaufman *et al.*, 1990; Godbout *et al.*, 1994), and REM sleep was shown to be facilitated only by low doses of GHB (Girodias *et al.*, 1996).

### The effects of high GHB doses on the firing activity of DA cells of the VTA

In our previous work on the effects of GHB on PFC firing activity, we showed that the inhibitory effects of high GHB doses was not reversed by NCS-382. It was thus concluded that the effects of GHB at high doses involved non-GHB mechanisms and that only low doses of GHB selectively activated GHB receptors. These results were in accordance with those of Endberg *et al.* (1993) who showed that high doses of GHB inhibited the firing activity of substantia nigra DA cells firing; these authors further suggested that this effect was dependent upon the activation of GABA-B receptors. No such conclusions can be as easily drawn from the results of the present study in DA VTA neurons. Indeed we observed that, following the combined injection of high doses of GHB and NCS-382, the inhibitory effect of GHB on the firing activity of VTA DA cells was no longer present (as opposed to 100% of responsive cells when high doses of GHB were injected alone); instead, it was found that all three responsive cells (100%) actually increased their firing activity (versus 0% with GHB alone) while the other three remained unaffected (versus 36.4% with GHB alone). One explanation regarding these discrepancies is that in the former PFC study, NCS-382 itself was also used at high

doses (160-320 mg/kg) and it is possible that at such high doses NCS-382 loses its antagonistic effect on the activation of high affinity GHB receptors. This possibility is substantiated by recent electrophysiological studies performed using high concentrations of NCS-382 in thalamocortical and hippocampal neurons *in vitro* (Emri *et al.*, 1996; King *et al.*, 1997).

We can speculate that the low dose of NCS-382 used against high GHB doses in the present study acted in two different ways. First it is possible that such a low dose of NCS-382, having bound to GHB receptors, totally blocked the access of GHB to its receptors so that VTA firing activity remained unchanged in half the cells tested. Second, in the case of cells that were excited, it is possible that the low dose of NCS-382 insufficiently reduced the number and availability of GHB receptors, transforming the action of the high dose of GHB to that of a low dose. Increased firing rate following co-administration of GHB at 160-250 mg/kg combined with NCS-382 at 10 mg/kg could thus be a residual low-dose activation phenomenon. Whether this phenomenon concerns specific subclasses of GHB receptors, *i.e.*, with high and low affinity states (Maitre *et al.*, 1983) still needs to be determined.

### **The effects of low GHB doses on the firing activity of DA cells of the VTA**

The low dose of GHB produced three types of effects on DA cells of the VTA: excitation, inhibition and a sequence of excitation/inhibition. Excitatory effects in the VTA first appears to be consistent with our previous results in the PFC where the majority of responsive cells showed an increase firing rate at 5 and 10 mg/kg of GHB (Godbout *et al.*, 1995). Also consonant is the fact that a co-administration of NCS-382 caused a majority of VTA cells (77,7%) to become no longer sensitive to GHB, suggesting that this excitatory effect was associated to the selective activation of GHB receptors. The combined results from PFC and VTA firing do not, however, seem to be consistent with our previous work showing that DA innervation of the PFC by the VTA is inhibitory (Pirot *et al.*, 1992). Indeed, one should expect to observe a decrease of activity in DA cells of the VTA upon a low GHB dose since the same treatment causes PFC cells to be excited. On the contrary, what we observed was an increase of firing of VTA DA cells. Our speculation is that the effect of low doses of GHB affects primarily sites that feedback onto the VTA with an excitatory input, such as the aspartate-

glutamate innervation of the VTA by the PFC (Christie, 1985a; Gariano, 1988), an area where GHB receptors are found (Maitre *et al.*, 1990). In such cases, GHB would first increase PFC firing which, in turn, would activate the VTA via its excitatory cortico-fugal input. In cases where this excitatory afferent drive to the VTA would be particularly massive, sustained excitation of the VTA would lead to a depolarization inactivation of VTA neurons as it was documented here (Figure 3). Alternatively, the few cases (23,8%) where VTA cells were inhibited by a low dose of GHB would involve an inhibitory feedback loop impinging onto the recorded VTA cell. The GABAergic input to the VTA from the nucleus accumbens (Yim and Mogenson, 1980), where GHB receptors are found in high concentrations (Hechler *et al.*, 1992), is a plausible candidate: nucleus accumbens could either be directly excited by GHB (which still need to be demonstrated, however), or it could be excited by PFC excitatory inputs impinging onto it (Christie *et al.*, 1985b).

## **REM sleep triggering mechanisms involved with GHB administration**

Our results show that the doses of GHB which stimulate the firing of DA neurons of the VTA are in the same range as those capable to induce REM sleep both in rats and in humans (Girodias *et al.*, 1996; Lapierre *et al.*, 1990). Given that the stimulation of the mesencephalic dopaminergic nuclei is known to inhibit dorsal raphe nucleus neurons (Stern *et al.*, 1979), it is possible that low activating doses of GHB trigger REM sleep by an inhibition of dorsal raphe (REM-off) neurons due to increased DA release from VTA terminals. However, an additional but not incompatible hypothesis is proposed here. It is known that while GHB has no effects on brain acetylcholine (ACh) levels *per se*, it potentiates increases of ACh induced by neuroleptics such as clozapine and chlorpromazine in the striatum (Stadler *et al.*, 1974). We raise here the possibility that GHB could potentiate the already increased ACh (REM-on) neurotransmission that occurs just before natural REM sleep, therefore precipitating its onset. In support of this possibility is the fact that GHB was shown to induce REM sleep in the cat only when it was administered at a time close enough to the onset of the next expected REM sleep period (Delorme *et al.*, 1966). Accordingly, GHB was also shown to potentiate REM sleep-triggering mechanisms in human cases where REM sleep was already facilitated such as in patients with depression or narcolepsy (Mamelak *et al.*, 1977) or in older

subjects upon morning naps (Lapierre *et al.*, 1990). Whether the propensity for REM sleep in these conditions is a matter of increased REM-on tonus or decreased REM-off tonus (Hobson *et al.*, 1975) is still a matter of debate. With these hypothesis in mind, we are presently investigating the effects of GHB on neurotransmission in REM-on and REM-off systems.

## REFERENCES

- 1) Broughton R, Mamelak M. The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci* 1979; 6: 1-6.
- 2) Bunney BS, Walters JR, Roth RH, Aghajanian GK. Dopaminergic neurons: effect on antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 185: 560-571.
- 3) Chiodo LA, Bannon MJ, Grace AA, Roth RH, Bunney BS. Evidence for the absence of impulse-regulating somatodendritic and synthesis-modulating nerve terminal autoreceptors on subpopulations of mesocortical dopamine neurons. *Neuroscience* 1984; 12: 1-16.
- 4) Christie MJ, Bridge S, James LB, Beart PM. Excitotoxin lesions suggest an aspartatergic projection from rat prefrontal cortex to ventral tegmental area. *Brain Res* 1985a; 333: 169-172.
- 5) Christie MJ, James LB, Beart PM. An excitant amino acid projection from the medial prefrontal cortex to the anterior part of nucleus accumbens in the rat. *Journal of Neurochemistry* 1985b; 45: 477-482.
- 6) Delorme F, Riette M, Jouvet M. Conditions de déclenchement du sommeil paradoxal par les acides gras à chaîne courte chez le chat pontique chronique. *C R Soc Biol* 1966; 160: 1457-1460.
- 7) Emri Z, Antal K, Crunelli V. Gamma-hydroxybutyric acid decreases thalamic sensory excitatory postsynaptic potentials by an action on presynaptic GABAB receptors. *Neurosci Lett* 1996; 216: 121-124.
- 8) Endberg G, Nissbrandt H. Gamma-hydroxybutyric acid (GHBA) induces pacemaker activity and inhibition of substantia nigra dopamine neurons by activating GABAB-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 348: 491-497

- 9) Gariano RF, Groves PM. Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortices. *Brain Res* 1988; 462: 194-198.
- 10) Gessa GL, Vargiu L, Crabai F, Boero GC, Caboni F, Camba R. Selective increase of brain dopamine induced by gamma-hydroxybutyrate. *Life Sci* 1966; 5: 1921-1930.
- 11) Girodias V, Godbout R, Beaulieu I, Schmitt M, Bourguignon J-J, Webster HH. Triggering of paradoxical sleep with gamma-hydroxybutyrate (GHB) in the rat is blocked by the Ghb receptor antagonist NCS-382. *Sleep Res* 1996; 25: 9.
- 12) Godbout R, Jelenic P, Labrie C, Schmitt M, Bourguignon J-J. Effect of gamma-hydroxybutyrate and its antagonist NCS-382 on spontaneous cell firing in the prefrontal cortex of the rat. *Brain Res* 1995; 673: 157-160.
- 13) Godbout R, Mantz J, Pirot S, Glowinski J, Thierry A-M, inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic neurons on their target cells: Electrophysiological and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258: 728-738
- 14) Godbout R, Rompré, P-P, Schmitt M, Bourguignon J-J. NCS-382 reverses hyperthermia, not hypothermia, induced by gamma-hydroxybutyrate in the rat. *Soc Neurosci Abstr* 1994; 20: 1563.
- 15) Hand TH, Hu XT, Wang RY. Differential effects of acute clozapine and haloperidol on the activity of ventral tegmental (A10) and nigrostriatal (A9) dopamine neurons. *Brain Res* 1987; 415: 257-269.
- 16) Hechler V, Gobaille S, Maitre M. Selective distribution pattern of gamma-hydroxybutyrate receptors in the rat forebrain as revealed by quantitative autoradiography. *Brain Res* 1992; 572: 345-348.
- 17) Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 1975; 189: 55-58.
- 18) Jouvet M, Cier A, Mounier D, Valatx JL. Effets du 4-butyrolactone et du 4-hydroxybutyrate de sodium sur l'E.E.G. et le comportement du chat. *C R Soc Biol* 1961; 155: 1313-1316.
- 19) Kaufman EE, Porrino LJ, Nelson T. Pyretic action of low doses of  $\gamma$ -hydroxybutyrate in rats. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2637-2640.



- 20) King MA, Thinschmidt JS, Walker DW. Gammahydroxybutyrate (GHB) receptor ligand effects on evoked synaptic field potentials in CA1 of the rat hippocampal slice. *Journal of Neural Transmission* 1997; 104: 1177-1193.
- 21) Laborit H. Sodium 4-hydroxybutyrate. *Int J Neuropharmacol* 1964; 3: 433-452
- 22) Lapierre O, Montplaisir J, Lamarre M, Bédard MA. The effect of gamma-hydroxybutyrate on nocturnal and diurnal sleep of normal subjects: further consideration on REM sleep-triggering mechanisms. *Sleep* 1990; 13: 24-30.
- 23) Maitre M. The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol* 1997; 51: 337-361.
- 24) Maitre M, Hechler V, Vayer P, Gobaille S, Cash CD, Schmitt M, Bourguignon JJ. A specific  $\gamma$ -hydroxybutyrate receptor ligand possesses both antagonistic and anticonvulsant properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 657-663.
- 25) Maitre M, Rumigny JF, Cash C, Mandel P. Subcellular distribution of gamma-hydroxybutyrate binding sites in rat brain principal localization in the synaptosomal fraction. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 110: 262-265.
- 26) Mamelak M, Escriu JM, Stokan O. The effects of gamma-hydroxybutyrate on sleep. *Biol Psychiatry* 1977; 12: 273-288.
- 27) Nishino S, Mignot E. Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 27-78.
- 28) Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* New York: Academic Press, 1986.
- 29) Pirot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J, Thierry AM. Inhibitory effects of ventral tegmental are stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for tge involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* 1992; 49: 857-865.
- 30) Roth RH. Biochemical correlates of the electrophysiological activity of dopaminergic neurons. In: Chiodo LA, Freeman AS, eds *Neurophysiology of dopaminergic systems, Current status and clinical perspectives*. Grosse Pointe: Lakeshore Publishing Company 1987, pp.187-203.

31) Skirboll LR, Grace AA, Hommer DW, Rehfeld J, Goldstein M, Hekfelt T, Bunney BS. Peptide-monoamine coexistence: studies of the actions of cholecystinin-like peptide on the electrical activity of midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* 1981; 6: 2111-2124.

32) Stadler H, Lloyd KG, Bartholini G. Dopaminergic inhibition of striatal cholinergic neurons: synergistic blocking action of gamma -butyrolactone and neuroleptic drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1974; 283: 129-134.

33) Stern WC, Johnson A, Bronzino JD, Morgane PJ. Influence of electrical stimulation of the substantia nigra on spontaneous activity of raphe neurons in the anesthetized rat. *Brain Res Bull* 1979; 4: 561-565.

34) Vayer P, Mandel P, Maitre M. Gamma-hydroxybutyrate, a possible neurotransmitter. *Life Sci* 1987; 41: 1547-1557.

35) Yim CY, Mogenson GJ. Effect of picrotoxin and nipecotic acid on inhibitory response of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area to stimulation of the nucleus accumbens. *Brain Res* 1980; 199: 466-473.

## **Acknowledgments**

This research was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the «Fonds de la recherche en santé du Québec» and the «Conseil national de la recherche scientifique» (France). The authors wish to thank the skillful assistance of Annie Chantale Dallaire in helping with the electrophysiological recordings. R.G. is a Chercheur Boursier Junior 2 of the «Fonds de la Recherche en Santé du Québec».