

Université de Montréal

Étude de la régulation des tachykinines et son impact sur l'expression des peptides opioïdes à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance et de la spectrométrie de masse

par *Mouna Saidi*

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophae Doctor* (Ph.D.)
en sciences vétérinaires option pharmacologie

Mars 2017

© Mouna Saidi, 2017

Résumé

Les peptides appartenant à la famille des tachykinines tels que la substance P (SP) sont des acteurs essentiels contribuant à l'hyperalgésie primaire et secondaire. La SP libérée par les neurones afférents primaires, ne provoque pas à elle seule des décharges nociceptives, mais elle potentialise l'effet de divers neurotransmetteurs tel que le glutamate. Pour ces différentes raisons, de nombreuses recherches ont été effectuées avec des antagonistes des récepteurs neurokinines et en particulier des récepteurs NK1. Cependant, malgré des études précliniques prometteuses, les antagonistes du récepteur NK1 n'ont pas montré d'effet significatif chez l'Homme. La biosynthèse des neuropeptides actifs passe par la maturation protéolytique des pro-neuropeptides. La compréhension des mécanismes de la maturation enzymatique des précurseurs des tachykinines, ainsi que l'étude de la stabilité métabolique de la substance P (SP) permettraient d'élucider des stratégies de traitement innovateur en favorisant l'inhibition du processus de maturation ou la production de fragments peptidiques moins actifs ou inactifs. Le premier objectif de cette étude était d'élucider le rôle de la Proprotéine convertase 1 (PC1) et de la Proprotéine convertase 2 (PC2) dans la maturation de la protachykinine en utilisant des fractions S9 de la moelle épinière des souris du type sauvage (WT), PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. La caractérisation et la quantification des neuropeptides ont été réalisées à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance et de la spectrométrie de masse. Les résultats montrent que PC1 et PC2 interviennent dans la maturation de la protachykinine et ces deux enzymes sont essentielles pour la biosynthèse de la Tachykinine₅₈₋₇₁, le précurseur de la SP. Une réduction de plus de 50% de la vitesse de formation dans les fractions S9 de la moelle épinière de souris mutantes PC1 et PC2 a été observée. Les résultats obtenus révèlent que PC1 et PC2 sont impliquées dans la protéolyse de la protachykinine et suggèrent un rôle important de ces enzymes dans la maturation de la protachykinine-1.

La protéolyse régule probablement les concentrations extracellulaires de la SP, mais peu d'études ont été menées sur le métabolisme des tachykinines. Dans ce présent travail, nous démontrons que la protéolyse contrôle le niveau de la SP dans la moelle épinière menant à la formation de fragments C-terminaux actifs. La stabilité métabolique de la β -tachykinine₅₈₋₇₁ et de la SP était très courte, avec une demi-vie de 5.7 et 3.5 min, respectivement. Plusieurs fragments

C-terminaux ont été identifiés, y compris la SP₃₋₁₁, la SP₅₋₁₁ et la SP₈₋₁₁, qui conservent leurs affinités vis-à-vis des récepteurs neurokinines. La stabilité métabolique des fragments C-terminaux était significativement supérieure à celle de la β -Tachykinine₅₈₋₇₁ et de la SP. Deux inhibiteurs de Prolyl endopeptidase spécifiques ont été utilisés et ont montré une réduction significative de la vitesse de formation de SP₃₋₁₁ et de SP₅₋₁₁. Ainsi, nous avons démontré que le Prolyl endopeptidase est impliqué dans le traitement N-terminal de la SP dans la moelle épinière et dans la formation de la SP₃₋₁₁ et la SP₅₋₁₁.

Étant donné que la régulation des niveaux endogènes de peptides opioïdes (DynA, Leu-Enk, Met-Enk) et des tachykinines (Tach₅₈₋₇₁, SP) dépend fondamentalement de l'activité de PC1 et de celle de PC2, l'analyse des tachykinines et des neuropeptides opioïdes ont été réalisées. Les résultats obtenus révèlent une diminution significative des neuropeptides pro-nociceptifs la Tach₅₈₋₇₁ (p <0,05), de la SP (p <0,01) et du NKA (P <0,001)), et des neuropeptides opioïdes Dyn A (p <0,01), de Leu-Enk (p <0,001), de Met-Enk (p <0,001), dans la moelle épinière de souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. Par conséquent, la modulation de l'activité des PCs a un impact important sur les peptides pro-nociceptifs, mais également sur le système opioïde endogène et par conséquent elle affectera significativement les voies modulatrices de la douleur. Ces résultats suggèrent également que la réduction significative des concentrations de peptides pro-nociceptifs peut altérer la réponse du système opioïde endogène. Les analyses des concentrations des peptides opioïdes chez les souris *Tac1*^{-/-} ont montré spécifiquement que les concentrations en Endomorphine-2 (EM2), en Leu-Enk et en Dyn A sont significativement inférieures que celles obtenues dans la moelle épinière chez les souris WT. Par conséquent, l'absence de la SP a un impact sur les mécanismes endogènes de modulation de la douleur.

Mots clés : Tachykinines, substance P, proprotéines convertases, protéolyse, peptides opioïdes, moelle épinière, douleur, chromatographie liquide à haute performance, spectrométrie de masse.

Abstract

SP is a major proteolytic product of the protachykinin-1 primarily synthesized in neurons and plays a central role in nociceptive transmission. The SP does not act alone to cause nociceptive discharges, but it potentiates the effect of various neurotransmitters such as glutamate. For these various reasons, much research has been carried out with antagonists of neurokinin receptors and in particular NK1 receptors. However, despite promising pre-clinical studies, NK1 receptor antagonists have not shown significant effect in Humans. The proteolysis control of endogenous protachykinins has a profound impact on pain perception. Proprotein convertases (PCs) are extensively expressed in the central nervous system and specifically cleave at C-terminal of either a pair of basic amino acids, or a single basic residue but the role of PCs remains unclear. The first objective of this study was to decipher the role of PC1 and PC2 in the proteolysis of protachykinins using cellular fractions of spinal cords from wild type (WT), PC1^{-/-} and PC2^{-/-} mice and mass spectrometry. The results clearly demonstrate that both PC1 and PC2 mediate the formation of SP and β -Tachykinin₅₈₋₇₁, an important SP precursor, with over 50 % reduction of the rate of formation in mutant PC1 and PC2 mouse S9 spinal cord fractions. The results obtained revealed that PC1 and PC2 are involved in the C-terminal processing of protachykinin peptides and suggest a major role in the maturation of the protachykinin-1 protein.

The proteolysis is suspected to regulate extracellular SP concentrations but few studies were conducted on the metabolism of proneuropeptides and neuropeptides. In the present study, we provide evidence that proteolysis controls SP levels in the spinal cord leading to the formation of active C-terminal fragments. The metabolic stability of β -Tachykinin₅₈₋₇₁ and SP were very short resulting in half-life of 5.7 and 3.5 min, respectively. Several C-terminal fragments were identified, including SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and SP₈₋₁₁, which conserve affinity for the neurokinin receptors. Interestingly, the metabolic stability of C-terminal fragments were significantly superior. Two specific Prolyl endopeptidase inhibitors were used and showed a significant reduction in the rate of formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ providing strong evidence that Prolyl endopeptidase is involved into N-terminal processing of SP in the spinal cord.

The role of proprotein convertases (PCs) in the proteolysis of proneuropeptides was previously established but few studies have shown the direct impact of PCs on the regulation of

specific tachykinin and opioid peptides in the central nervous system. This study has determined the relative concentration of targeted neuropeptides in the spinal cord of WT, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mice to establish the impact of a restricted PCs activity on the regulation of specific neuropeptides. The results revealed a significant decrease of Dyn A (p < 0.01), Leu-Enk (p < 0.001), Met-Enk (p < 0.001), Tach₅₈₋₇₁ (p < 0.05), SP (p < 0.01) and NKA (p < 0.001) spinal cord concentrations in both, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mice. Therefore, the modulation of PCs activity has an important impact on specific pronociceptive peptides (SP and NKA), but the results also showed that endogenous opioid system is hindered and consequently it will affect significantly the pain modulatory pathways. Tachykinin and opioid peptides play a central role in pain transmission, modulation and inhibition. Recent investigations suggest that both pronociceptive tachykinins and the analgesic opioid systems are important for normal pain sensation. The analysis of opioid peptides in *Tac1*^{-/-} spinal cord tissues offers a great opportunity to verify the influence of the tachykinin system on specific opioid peptides. Our results reveal that Endomorphin-2 (EM2), Leu-Enk and Dyn A were down regulated in *Tac1*^{-/-} spinal cord tissues that strongly suggest a significant impact on the endogenous pain-relieving mechanisms. These results may have insightful impact on future analgesic drug developments and therapeutic strategies.

Key words: Tachykinins, substance P, proprotein convertases, proteolysis, opioid peptides, spinal cord, pain, high performance liquid chromatography, mass spectrometry.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	III
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
REMERCIEMENTS	XXI
INTRODUCTION	1
SECTION 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	6
CHAPITRE 1. PROTÉOMIQUE ET SOUS-PROTÉOME	7
1.1. PROTÉOLYSE	9
1.2. PEPTIDES ENDOGÈNES BIOACTIFS	12
CHAPITRE 2. MÉCANISMES ENDOGÈNES DE LA NOCICEPTION ET DE LA DOULEUR	14
2.1. NOCICEPTEURS.....	15
2.2. FIBRES NERVEUSES NOCICEPTIVES.....	16
2.3. RÉCEPTEURS DE LA DOULEUR.....	18
2.4. DÉFINITION DE LA DOULEUR.....	21
2.5. MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION	22
2.6. TRANSMISSION ET INTÉGRATION DE LA DOULEUR	23
2.7. HYPERALGÉSIE PRIMAIRE ET SECONDAIRE	26
2.8. PROPAGATION DU SIGNAL NOCICEPTIF	30
2.9. MODULATION DE DOULEUR.....	30
2.9.1. Contrôle spinal inhibiteur	31
2.9.2. Contrôle supra-spinal.....	31
2.10. SYSTÈME OPIOÏDES ENDOGÈNES	35
2.10.1. Peptides opioïdes endogènes.....	35
2.10.2. Récepteurs opioïdes	37
2.11. DOULEUR ET STRESS	43

2.12. GÉNÉTIQUE ET EPI-GÉNÉTIQUE DE DOULEUR.....	45
CHAPITRE 3 : TACHYKININES.....	47
3. 1. TACHYKININES : PEPTIDES ET GÈNES	48
3.1.1. Le gène Tac1	48
3.1.1.1. Substance P	49
3.1.1.2. Neurokinine A.....	50
3.1.1.3. NPK	50
3.1.2. Le gène Tac3	51
3.1.2.1. NKB	51
3.2. BIOSYNTÈSE DES TACHYKININES.....	52
3.3. STOCKAGE.....	52
3.4. MATURATION ET CLIVAGE ENZYMATIQUE.....	53
3.5. LIBÉRATION	54
3.6. RÉGULATION	55
3.7. RÉCEPTEURS DES TACHYKININES	57
3.7.1. Structure des récepteurs des tachykinines.....	57
3.7.2. Distribution	58
3.8. SIGNALISATION	59
CHAPITRE 4 : PROPROTEINES CONVERTASES	64
4.1. CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES ET ENZYMATIQUES DES CONVERTASES.....	65
4.2. LOCALISATION CELLULAIRE ET TISSULAIRE	69
4.3. SYNTHÈSE ET ACTIVATION DES PROTÉINES CONVERTASES	72
4.4. SUBSTRATS DES PROTÉINES CONVERTASES	75
4.5. PHÉNOTYPE DES SOURIS MUTANTES PC1 ET PC2	80
CHAPITRE 5 : SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	82
5. 1. SPECTROMÉTRIE DE MASSE COUPLÉE À LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE	84
5.1.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance ou HPLC.....	85
5.1.2. Spectrométrie de masse.....	86
5.1.2.1. Sources d'ionisation.....	87

5.1.2.1. 1. Sources ESI.....	89
5.1.2.2. Analyseur	93
5.1.2.2. 1. Analyseur quadripolaire.....	94
5.1.2.2. 2. Trappe ionique	96
5.1.2.2. 3. L'Orbitrap	99
5.1.2.3. Détecteur	100
5. 2. MODE D'ANALYSE MS.....	101
5. 3. MODE D'ANALYSE MS/MS (MS ²)	102
5.4. DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE D'UN PEPTIDE À L'AIDE DES SPECTRES MS ET MS/MS.....	103
5.5. MODE MULTIPLE RÉACTION MONITORING (MRM) ET SINGLE RÉACTION MONITORING (SRM)	104
5. 6. STRATÉGIE DE QUANTIFICATION	106
5. 6.1 Quantification absolue par la méthode de standard interne	108
5. 6.2. Quantification absolue par la méthode de dilution isotopique.....	109
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	112
SECTION 2 : ARTICLES.....	113
I. ARTICLE 1 : TACHYKININS PROCESSING IS SIGNIFICANTLY IMPAIRED IN PC1 AND PC2 MUTANT MOUSE SPINAL CORD S9 FRACTIONS.....	114
I. 1. Abstract.....	114
I. 2. Introduction	115
I. 3. Materials and Methods	116
I. 3. 1. Chemicals and reagents	116
I. 3. 2. Sample Preparation.....	117
I. 3.3. Metabolism study	117
I. 3. 4. Instrumentation.....	118
I. 3. 5. Peptide fragments identification.....	119
I. 3. 6. Protein extraction from S9 fraction and PC1/PC2 MS analysis.....	120
I. 3. 7. Bioanalytical methods	121
I. 3. 8. Statistical analysis.....	122
I. 4. Results and Discussion	122

I. 4. 1. Analysis of PC1 and PC2 in mouse spinal cord S9 fractions	122
I. 4.2. High-resolution mass spectrometry analysis	123
I. 4. 3. Quantitative analysis and Isotopic Dilution Method	125
I. 4. 4. Metabolic stability of Tach ₂₀₋₆₈ and Tach ₅₈₋₇₈ in mouse spinal cord S9 fractions	126
I. 4. 5. Contribution of PC1 and PC2 in Tach ₂₀₋₆₈ C-terminal processing	127
I. 4. 6. Contribution of PC1 and PC2 in Tach ₅₈₋₇₈ C-terminal processing	127
I. 5. Conclusion	128
I. 6. Acknowledgements	128
I. 7. References	129
I. 8. Table legend	132
I. 9. Figure legend	136
II. ARTICLE 2 : CHARACTERIZATION OF SUBSTANCE P PROCESSING IN MOUSE SPINAL CORD S9 FRACTIONS USING HIGH-RESOLUTION QUADRUPOLE-ORBITRAP MASS SPECTROMETRY	143
II. 1. Abstract	143
I. 2. Introduction	144
II. 3. Materials and Methods	146
II. 3. 1. Chemicals and reagents	146
II. 3. 2. Sample Preparation	146
II. 3. 3. Metabolism study	147
II. 3. 4. Proteases inhibitor studies using specific Prolyl Endopeptidase	148
II. 3. 5. Chromatographic conditions	148
II. 3. 6. Mass Spectrometry conditions	149
II. 3. 7. Statistical analysis	150
II. 4. Results and Discussion.....	150
II. 4. 1. High-resolution mass spectrometry analysis.....	150
II. 4. 2. Quantitative analysis of targeted peptides.....	152
II. 4. 3. Metabolic stability of Tach ₅₈₋₇₁ , SP and other N or C-terminal fragments in mouse spinal cord S9 fractions.....	153
II. 4. 4. Contribution of PREP in Tach ₅₈₋₇₁ and SP N-terminal processing.....	155
II. 5. Conclusion.....	156

II. 6. Acknowledgements	156
II. 7. References	157
II. 8. Table legends.....	161
II. 9. Figure legends	164
III. ARTICLE 3: TARGETED HIGH-RESOLUTION QUADRUPOLE-ORBITRAP MASS SPECTROMETRY ANALYSES REVEAL A SIGNIFICANT REDUCTION OF TACHYKININ AND OPIOID NEUROPEPTIDES LEVEL IN PC1 AND PC2 MUTANT MOUSE SPINAL CORDS	171
III. 1. Abstract	171
III.2. Introduction.....	172
III. 3. Materials and Methods.....	174
III. 3.1. Chemicals and reagents.....	174
III. 3.2. Sample Preparation	174
III. 3. 3. Chromatographic conditions	175
III. 3. 4. Mass spectrometry conditions.....	176
III. 3.5. Bioanalytical performance Assessments and Statistical analysis	177
III. 4. Results and discussion	177
III. 4.1. Mass spectrometry	177
III. 4. 2. Analytical performance.....	178
III. 4. 3. Targeted neuropeptide analysis of mouse spinal cords.....	179
III. 5. Conclusion	181
III. 6. Acknowledgments.....	182
III. 7. References.....	183
III. 8. Table legends	186
IV. ARTICLE 4: LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY LINEAR ION TRAP MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF TARGETED NEUROPEPTIDES IN TAC1^{-/-} MOUSE SPINAL CORDS REVEAL SIGNIFICANT LOWER CONCENTRATION OF OPIOID PEPTIDES.....	193
IV. 1. ABSTRACT.....	193
IV. 2. Introduction.....	194
IV. 3. Materials and Methods	197
IV. 3. 1 Chemicals and reagents	197
IV. 3. 2 Sample Preparation.....	197

IV. 3. 3. Instrumentation	198
IV. 3. 4. Bioanalytical methods	198
IV. 3. 5. Statistical analysis.....	200
IV. 4. Results.....	200
IV.4. 1 Mass spectrometry	200
IV. 4. 2. Analytical performance	201
IV.4. 3. LC-MS/MS analysis of mouse spinal cords	201
IV. 5. Discussion.....	202
IV. 6. Conclusion	205
IV. 7. Acknowledgments	205
IV. 8. References.....	207
SECTION 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE	217
I. IMPLICATION DES PCs DANS LE MÉTABOLISME DES TACHYKININES	218
II. MÉCANISME DE RÉGULATION DE LA SP	221
III. DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS EN PEPTIDES ENDOGÈNES CHEZ LES SOURIS PC1 ^{+/-} ET PC2 ^{+/-}	225
IV. DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS DES PEPTIDES ENDOGÈNES CHEZ LES SOURIS TAC1 KO.....	229
PERSPECTIVES.....	233
CONCLUSION	234
LISTE DES RÉFÈRENCES	236

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différents canaux impliqués dans la nociception (thermosensible, mécano sensible et celle à sensibilité chimique).....	20
Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes familles opioïdes, des précurseurs et des peptides de chaque famille ainsi que leurs structures et récepteurs respectifs.....	42
Tableau 3. Tableau récapitulatif des différents récepteurs, leurs localisations, fonctions et de leurs agonistes respectifs.....	42
Tableau 4. Tableau récapitulatif des produits des gènes Tac1 et Tac2 ainsi que leur séquences (Steinhoff et al., 2014)	48
Tableau 5. Affinité entre les récepteurs NK1, NK2 et NK3 et les peptides SP, NKA et NKB....	50
Tableau 6. Tableau récapitulatif des enzymes clivants la SP en relation avec la stabilité métabolique (Karlsson, 2004).....	57
Tableau 7. Distribution des tachykinines (SP, NKA, NKB) ainsi que leurs récepteurs (NK1, NK2, NK3) chez le rat (Modifié de Otsuka et al., 1993).....	60
Tableau 8. Présentation des 9 protéines convertases de la famille des subtilisines. Pour chacune d'entre elles, est donnée la localisation tissulaire et cellulaire ainsi que des exemples de substrats clivés (Seidah et al., 1999).....	71
Tableau 9. Liste des substrats de la PC1 et de PC2 ainsi que leurs fonctions régulatrices (Hook et al., 2008).	79
Tableau 10. Critères de choix du type de source d'ionisation selon le type de l'échantillon à analyser	89

Tableau 11. Récapitulatif des avantages et inconvénients associés à l'utilisation d'une source ESI ou MALDI 91

Tableau 12. Différents types d'analyseurs utilisés en spectrométrie de masse ainsi que leurs principes 94

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma des fibres nociceptives (Inspirée de Julius and Basbaum, 2001).....	16
Figure 2. Représentation schématique de la corne dorsale de la moelle épinière (Inspirée de McMahon and Koltzenbur, 2008; Di Lernia et al., 2016).	17
Figure 3. Schéma représentant les récepteurs et les canaux transmembranaires nociceptifs (Inspirée de Scholz and Woolf, 2002).	18
Figure 4. Représentation schématique des thermorécepteurs TRP: températures d'activation, agoniste et distribution tissulaire (Modifiée de Jordt et al., 2003; Beaulieu, 2013)	19
Figure 5. Schéma de l'hyperalgésie primaire avec la mise en jeu de substances pro-nociceptives et des facteurs inflammatoires au niveau des tissus périphériques. (Inspirée de Julius and Basbaum., 2001).	23
Figure 6. Schéma général des voies de la douleur (Modifiée d'après Fields, 2004; Beaulieu, 2013).	25
Figure 7. Schéma représentant l'hyperalgésie primaire et secondaire (Inspirée de Julius and Basbaum., 2001).	29
Figure 8. Représentation schématique des mécanismes de modulation de douleur : Contrôle spinal et supra-spinal (Inspirée de Melzack and Wall, 1965).....	34
Figure 9. Représentation schématique du contrôle spinale de modulation de la douleur : Implication de la DynA et de l'EM-2.	40
Figure 10. Shéma de la structure du gène Tac1 et épissage alternatif de l'ARN _m (Modifiée de Shimizu et al., 2008).	48
Figure 11. Schéma de la structure du gène Tac3 et épissage de l'ARN _m (Shimizu et al., 2008). .	51

Figure 12. Schéma récapitulant la voie de synthèse des tachykinines ainsi que leur transport axonal (Modifiée de Hook et al., 2008).	53
Figure 13. Implication probable de PC1 et PC2 dans la maturation des tachykinines.	54
Figure 14. Représentation des sites de clivage enzymatique des proneuropeptides par la voie de cysteines proteases et de la subtilisine like protease (Hook et al., 2008).	55
Figure 15. Représentation de la structure des récepteurs couplés à une protéine G (Cas de NKR).	58
Figure 16. Schéma montrant la cascade de signalisation intracellulaire par un récepteur couplé à une protéine G (NKR) suite à leur interaction avec leurs ligands (tachykinines).	61
Figure 17. Réponse aux stimuli nociceptifs chez les souris Tac1 KO / WT (Extrait de Cao et al., 1998)	63
Figure 18. Classification des convertases basée sur l'homologie de séquence de leur domaine catalytique (Inspirée de Zhou et al., 1999).	66
Figure 19. Sites de clivage enzymatique des PCs (Inspirée de Elbitar et al, 2016; Seidah et al., 2017).	67
Figure 20. Représentation schématique des motifs structuraux des proprotéines convertases de mammifères (Extrait de Creemers and Khatib, 2007).	69
Figure 21. Schéma des mécanismes d'activation des différentes PCs.....	74
Figure 22. Schéma de la synthèse et de l'activation des neuropeptides selon la voie de sécrétion régulée (Modifiée de Hook et al., 2008).	76
Figure 23. Représentation schématique d'un neuropeptide depuis la synthèse à la libération.	78
Figure 24. Représentation schématique du traitement protéolytique des proneuropeptides associés à PC1 et PC2.	80

Figure 25. Schéma simplifié des différentes informations qui peuvent être apportées par la spectrométrie de masse cas de la SP (Mass moléculaire =1 347,63).....	83
Figure 26. Moyen de détermination de la masse mono-isotopique et de la masse chimique ou moyenne à partir d'un spectromètre de masse.....	84
Figure 27. Composantes d'un spectrometre de masse.....	86
Figure 28. Exemple de mécanisme d'ionisation en spectrometrie de masse.....	88
Figure 29. Schéma décrivant le principe de la formation ionique en électro spray ionization (ESI) (Modifiée de Soares et al., 2012).....	92
Figure 30. Résolution d'un spectromètre de masse.....	93
Figure 31. Schéma d'un analyseur quadripolaire (Inspirée de De Hoffmann and Stroobant, 2007).....	96
Figure 32. Principe de la trappe ionique a) Trappe 3D, b) Trappe linéaire.....	99
Figure 33. Principe de l'Orbitrap.....	100
Figure 34. Diagramme conceptuel du multiplicateur d'électrons avec dynode (McFadden, 1973).....	101
Figure 35. Schéma de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	103
Figure 36. Schéma d'un patron de fragmentation protéique et détermination de la structure d'une protéine à partir du spectre MS et MS/MS (Inspirée de Roepstorff and Fohlman, 1984; Biemann, 1990).....	104
Figure 37. Représentation schématique du mode MRM et SRM.....	105
Figure 38. Présentation d'une courbe de calibration et détermination de la concentration d'un échantillon.....	109

Figure 39. Représentation schématique de la quantification par dilution isotopique. 110

Figure 40. Différentes étapes de la quantification peptidique par la méthode de dilution isotopique..... 111

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT :	Récepteurs 5-hydroxytryptamine
7B2 :	Protéine 7B2
ACE:	Enzyme de conversion de l'angiotensine (<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>)
ACN :	Acétonitrile
ACTH :	Adrénocorticotropine protéine
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
ARN_m :	Acide Ribonucléique messager
ASIC :	Canal ionique activé par l'acidification (<i>Acid-Sensing Ion Channel</i>)
ATP :	Adénosine triphosphate
Aα :	Fibre A alpha
Aβ :	Fibre A beta
Aδ :	Fibre A delta
BK :	Bradykinine
CAV :	Canaux calciques voltage dépendants
CGRP:	Peptide relié au gène de la calcitonine (Calcitonin Gene-Related Peptide)
CPE :	Carboxypeptidase E
Da:	Dalton
DAG:	Diacyl Glycérol
DOR :	Récepteur Opioïde Delta (Delta Opioïde Receptor)
DRG :	Ganglion spinal (Dorsal root ganglion)
DynA :	Dynorphine A
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra acétique
EM2 :	Endomorphine 2
ENK :	Enképhaline
ERK1/2 :	Les kinases des signaux extracellulaires (Extracellular signal-regulated kinases)
ESI :	Ionisation électrospray (Electrospray ionization)
FWHM :	Largeur à mi-hauteur du pic (Full width at half maximum)

G :	Constante gravitationnelle
GHRH :	Hormones de croissance (Growth Hormone Factor)
GnRH :	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
IASP :	Association internationale de l'étude de la douleur (International association for study of pain)
IL-1β :	Interleukine-1 β
IL-6 :	Interleukine 6
IL-8 :	Interleukine 8
IP₃ :	Inositol triphosphate
IS :	Standard interne (Internal standard)
IT :	Trappe ionique (Ion trap)
kDa :	Kilo Dalton
KO :	Knockout
KOR :	Récepteur opioïde Kappa
LCDV :	Vésicules Synaptique a cœur dense (Large corps vésicule)
LIT :	Trappe ionique linéaire (Linear ion trappe)
m-GLU :	Récepteur métabotrope du glutamate
m/z :	Ratio masse sur charge
MAPKs :	Protéine Mitogène d'activation des protéines kinase (Mitogen-activated protein kinases)
mGluR :	Récepteurs métabotropes au glutamate
MOR :	Récepteurs opioïdes Mu (Morphine opioïde receptor)
MRM :	Mode de surveillance des réactions multiples (Multiple reaction monitoring)
MS :	Spectrométrie de masse (Masse spectrometry)
MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem
MSCL :	Canal Mécano-Sensitive à grande conductance (Mécano-Sensitive Channel of large conductance)
NARC1 :	Proteine convertase d'apoptose neuronale régulée (Neuronal apoptosis regulated convertase)
NaV :	Canaux sodique voltage dépendants

NEP :	Endo-peptidase neutre (neutral endopeptidase)
NGF :	Facteur de croissance des nerfs (Nerve growth factor)
NK1 :	Récepteurs neurokinine 1
NK2 :	Récepteurs neurokinine 2
NK3 :	Récepteur neurokinine 3
NKA :	Neurokinin A
NKB :	Neurokinin B
NKR :	Récepteurs des neurokinines
NMDA :	Récepteurs N-méthyl-D-aspartate
NPK :	Neuropeptide K
NPY :	Neuropeptide Y
NPγ :	Neuropeptide gamma
NRM :	Noyau du Raphé Magnus
ORL1 :	Récepteur opioïde like 1 (Opioïde receptor like 1)
P :	L'ordre du niveau significatif en statistique
PAM :	Peptidylglycine- α -amidating mono-oxygenase
PC1^{-/+} :	Souris PC1 mutant (Knock-down)
PC2^{-/+} :	Souris PC2 mutant (Knock-down)
PC1 :	Proprotéine convertase 1
PC2 :	Proprotéine convertase 2
PCs :	Proprotéines convertases ou proprotein convertase Subtilisin/Kexin
<i>PCSK1</i> :	Gène codant la proprotein convertase Subtilisin/Kexin Type 1
<i>PCSK2</i> :	Gène codant la proprotein convertase Subtilisin/Kexin Type 2
<i>PDYN</i> :	Gène des Dynorphines
<i>PENK</i> :	Gène des Enképhaline
PGE :	Prostaglandine
pH :	Potentiel d'hydrogène
PHM :	Peptidylglycine hydroxylase
pI :	Point isoélectrique
PIP₂ :	Phosphoinositol bisphosphate

PKA :	Protéine kinase A
PKC :	Protéine kinase C
PLC :	Phospholipase C
POMC :	Gène des opio-mélanocortines
Ppm :	Partie par millions
PREP :	Prolyl-endorpeptidase
Pro-CCK :	Pro Cholecystokinine
RE :	Réticulum endoplasmique
RVM :	Moelle rostrale ventromédiale
SG :	Substance Gélatineuse,
SGPA :	Substance Grise Périaqueducule
SIC :	Canal cationique dépolarisant (<i>Stretch Inactivated Channel</i>)
SKI-1/S1P :	Subtilisin kexin isozyme-1
SNC :	Système nerveux central
SNP :	Système nerveux périphérique
SP :	Substance P
SRM :	Suivi de réaction unique (Single reaction monitoring)
Tac1 :	Gène précurseur de la protéine pré-protachykinine-1
Tac1^{-/-} :	Souris mutante Tac1 (Knock-out)
Tac2 :	Gène précurseur de la protéine pré-protachykinine-2
TFA :	Acide tri-fluoroacétique
TGN :	Réseau trans-golgien
TNF :	Facteur de nécrose tumoral
TrkA :	Récepteurs de la tyrosine kinase
TRPV :	Récepteur transitoire Potentiel vanilloïde (Transient receptor potential vanilloïde)
VSM :	Voie spino mésencéphalique
VSR :	Voie spino-réticulée
WT :	Type sauvage (Wild-type)

Remerciements

Une thèse est une expérience enrichissante et formidable, elle comprend des périodes de stress, de doutes et de joies. L'ensemble constitue le meilleur apprentissage du métier de chercheur. Quelqu'un m'a déjà dit que pour faire un Ph.D., « *it takes Passion, Heart and Determination* ». Et bien pour la réussir, il est nécessaire de s'entourer des meilleurs pour soutenir cette passion, alimenter le cœur et inspirer la détermination. Les prochaines lignes seront dédiées à ces gens d'exception avec qui j'ai l'honneur de partager ma vie.

Cette thèse n'aura pas vu le jour sans *la Mission Universitaire de la Tunisie à Montréal* et le *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Tunisien*. Je tiens à les remercier pour le financement des frais liés à mon programme de *Ph.D.* La Tunisie est un pays en voie de développement mais généreux et riche pour le savoir et l'apprentissage. Je tiens aussi à remercier *la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université De Montréal* pour le financement lié aux frais de scolarité de mon programme. Merci pour le Québec pour sa collaboration avec la Tunisie pour l'avancée des connaissances et de la recherche scientifique.

Je tiens ensuite vivement à remercier *Dr. Francis Beaudry mon Directeur de thèse* de m'avoir accueillie dans son Laboratoire. Ses précieux conseils, son encadrement sont autant de qualités que je ne pourrai pas oublier. Merci pour ton expertise, ta disponibilité, tes méthodes de travail rigoureuses. Tes qualités de chercheur sont immenses, je suis privilégiée d'en avoir profitées.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux *Dr. Klaus Klarskov, Dr. Pascale Vachon*. Je voudrais aussi remercier *Dr. Kalidou Ndiaye*, pour avoir accepté d'être le Président-rapporteur de ma thèse de doctorat.

Je suis très reconnaissante envers mon comité conseil, *Dr. Pascal Vachon et Dr. Paul Carrière* qui n'ont jamais hésité à m'aider, vos remarques pertinentes et nos discussions m'ont permis d'améliorer ce travail de thèse, Merci pour vos commentaires éclairants et pertinents qui ont permis de pousser ma réflexion plus loin.

Je tiens à remercier également tous les membres du secrétariat aux affaires étudiants pour leur aide inestimable tout au long de mon cursus Merci *Christine Blondin et Diane Rodier*.

Je me dois également à remercier très chaleureusement mes chers parents *Neila et Mejid*, ma sœur *Amal* et bien évidemment ma petite *Elyne*, qui ont été toujours à mes cotés malgré les distances, les décalages horaires, ils n'ont jamais hésité à m'épauler et à me pousser de donner le meilleur de moi et de continuer à réaliser mes rêves même dans les moments les plus difficiles. Merci de m'avoir permis d'être qui je suis, librement, avec un soutien indéfectible et affectueux.

Merci à toutes les autres personnes qui m'ont encouragées tout au long de mon parcours. Au risque d'en oublier, à toutes les personnes compréhensives, à qui j'ai souvent répondu que je manquais de temps ces dernières années.

À vous tous et à vous toutes.

Introduction

Les informations en provenance de notre milieu interne et externe sont captées d'une façon continue par des récepteurs sensoriels (Nishio et al., 2016). Une information nociceptive est captée par des nocicepteurs qui sont des récepteurs sensoriels de haut seuil d'activation, répondant à des stimulations d'intensité forte (Julius and Basbaum, 2001; Delaunay, 2013 ; Baliki and Apkarian, 2015). Ainsi, suite à une stimulation périphérique intense, le signal nociceptif est transformé en un influx électrique provoquant la libération de neuropeptides pro-nociceptifs matures, favorisant l'hyperexcitabilité centrale suite à leur fixation sur leurs récepteurs pré et post-synaptiques. Les messages nociceptifs font relais dans des cellules situées dans les couches superficielles et profondes de la corne dorsale de la moelle épinière, où plusieurs neuropeptides clés ont été identifiés, y compris les tachykinines (Kuner, 2010; Mika et al., 2011; Felippotti et al., 2012). La SP est un neuropeptide de la famille des tachykinines omniprésent dans les systèmes nerveux central et périphérique de mammifères. Au niveau central, la SP participe à différents processus physiologiques telles que la régulation des troubles de l'humeur, l'anxiété, la dépression (Geraciotti et al., 2006), l'asthme (Li et al., 2011), le syndrome du côlon irritable, le rythme respiratoire, les nausées et la douleur. Au niveau périphérique, la SP agit par un phénomène nommé réflexe d'axone; libérée au niveau du site de lésion la SP provoque une forte vasodilatation induisant la libération de différentes substances (bradykinine, histamine, sérotonine, etc) et la dégranulation des mastocytes. Ainsi, la SP est reconnue comme un pro-inflammatoire et un pro-nociceptif puissant (Gao and Peet, 1999; Chakraborty et al., 2011; Pailleux et al., 2013; Schröder et al., 2014). La SP est synthétisée principalement dans les neurones et possède une large distribution dans les systèmes nerveux central et périphérique. Plus particulièrement, une proportion significative des neurones afférents primaires situés dans les

ganglions de la racine dorsale exprime des niveaux élevés de SP. La SP est transportée à la fois vers les terminaux périphériques et centraux. L'expression de la SP et de son récepteur neurokinine 1 (NK1) situé dans la lamina I de la moelle épinière (Yu et al., 1999; Teodoro et al., 2013) est en corrélation avec l'intensité, la fréquence et la durée de la douleur (Sluka et al., 1997). Les agonistes des récepteurs NK1 provoquent une dépolarisation lente qui contribue de manière significative au développement de l'hyperalgésie secondaire (Levine et al., 1993; Dickenson, 1995 ; Baumbauer et al., 2009). Ainsi, le système de modulation de la douleur est activé d'où la libération des peptides opioïdes (ex., les endomorphines, les enképhalines et les dynorphines) produisant ainsi des effets analgésiques puissants dans le système nerveux central (SNC) et inhibant la douleur endogène (Machelska, 2007; Wahlert et al., 2013; Bali et al., 2014). Par conséquent, la SP peut augmenter l'intrant d'inhibiteurs dans certaines régions du système nerveux. Cette inhibition indirecte pourrait jouer un rôle dans la régulation de la plasticité synaptique à court et à longs termes et pourrait promouvoir la synchronisation des circuits neuronaux. Les informations sur l'ensemble des protéines exprimées par l'activation des gènes associés aux mécanismes de sensibilisation et d'inhibition de la douleur demeurent très limitées, particulièrement, les mécanismes biomoléculaires associés aux processus de maturation post-traductionnels de précurseurs protéiques au cours du transport axonal, notamment ceux des tachykinines.

La plupart des neuropeptides et hormones peptidiques sont initialement synthétisés sous forme de précurseurs polypeptidiques et la formation de molécules bioactives nécessite de nombreuses étapes de maturation post-traductionnelles. Pour les tachykinines, le gène *Tac1* code pour la protéine précurseure pro-tachykinin-1 contenant la séquence de quatre peptides de la tachykinine, incluant la SP (Basbaum, 1999). La protéine pro-tachykinin-1 est clivée par l'action de protéases

spécifiques pendant le transport axonal (Hook et al., 2008). Le clivage endo-protéolytique permet la libération des peptides découlant du précurseur et plus spécifiquement, une famille importante d'enzymes réalisant cette protéolyse des précurseurs polypeptidiques est nommée proprotéine convertase (PCs). Les principales PCs présentes dans la plupart des cellules endocrines et neuronales sont la proprotéine convertase 1 (PC1) et la proprotéine convertase 2 (PC2). Ces PCs clivent sélectivement les protéines à des sites distincts généralement occupés soit par une paire d'acides aminés basiques tels que KR, RR, RK et KK et parfois après un simple résidu basique (R ou K). Les données récentes démontrent que les PCs possèdent un rôle physiologique important et distinct, pour la biosynthèse des neuropeptides. Le rôle des PCs dans la maturation des tachykinines reste à être démontré. Vu que la séquence primaire de la protéine précurseur protachykinin-1 contient divers sites mono et dibasiques ceci suppose que les PC1 et PC2 peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme des tachykinines et dans la production de la SP. En conséquence, les PC1 et PC2 peuvent jouer un rôle majeur dans la maturation enzymatique des pro-tachykinines.

Plusieurs mécanismes régulent les tachykinines endogènes et les niveaux de la SP, y compris l'expression différentielle de l'ARN_m de la protachykinine et la sécrétion contrôlée des tachykinines à partir des neurones. La protéolyse est soupçonnée de réguler les concentrations de SP extracellulaire (Mitchell et al., 2013). Il est bien connu que lors de leur libération, la SP peut être attaquée, clivée et inactivée par de nombreuses enzymes (Snijdelaar et al., 2000). Plusieurs enzymes sont soupçonnées d'être impliquées dans la conversion de la SP en fragments N- et C-terminaux spécifiques. Il est connu que les fragments C-terminaux de la SP jouent un rôle important dans l'effet pro-nociceptif favorisant la libération des acides aminés excitateurs (Skilling et al., 1990). Cependant, les fragments C-terminaux de la SP ont des affinités de liaison

distinctes avec le récepteur NK1 (Vasiliou et al., 2007; Mistrova et al., 2016) et l'effet résultant dépendra fortement de l'abondance relative de fragments de métabolites. Il en résulte que, non seulement la SP doit être considérée, mais aussi ses métabolites C-terminaux qui peuvent avoir des fonctions importantes lors du développement de l'hyperalgésie secondaire. Pour cela les prolyl-endopeptidases (PREP) sont suspectes de cliver la SP et de générer des fragments C-terminaux impliqués dans la nociception. Les PREP catalysent l'hydrolyse de la liaison Pro-X de peptides avec une séquence primaire inférieure à 30 acides aminés (Polgár, 2002; Nolte et al., 2009). L'expression de l'ARN_m de PREP dans la moelle épinière a été décrite et il a été suggéré que les peptides de tachykinine peuvent être hydrolysés par le PREP (Nolte et al., 2009).

D'autre part, il a été démontré qu'il existe une interdépendance entre le système pro-nociceptif et le système opioïde, vu l'importance de la SP dans la transmission du message nociceptif. Ainsi, si PC1 et/ou PC2 sont impliquées dans le métabolisme des tachykinines et que la production de la SP est significativement touchée, une diminution significative, voir même l'absence totale de la SP, (ex., chez les souris Tac1 KO) provoquerait certainement une diminution significative des peptides opioïdes.

Dans le cadre de ce travail de thèse, ce projet s'est particulièrement intéressé aux métabolismes des tachykinines afin d'apporter de nouvelles connaissances au niveau des mécanismes moléculaires centraux et périphériques. Dans un premier temps, des méthodes bioanalytiques fiables, robustes et précises ont été développées et validées afin de pouvoir identifier, caractériser et quantifier les neuropeptides ciblés par HPLC-MS/MS en utilisant une méthode de dilution isotopique.

Ce présent travail a pour objectif d'appliquer la méthode de HPLC-MS/MS afin de **(i)** caractériser le métabolisme des tachykinines **(ii)** définir les rôles des proprotéines convertases dans la maturation de la pro-tachykinin-1 et du PREP dans la dégradation de la SP **(iii)** Déterminer l'effet de l'inactivation de *Tac1* sur le système endogène opioïde.

SECTION 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Protéomique et sous-protéome

Le terme protéome résulte de la contraction des mots « protéine » et « génome » employés pour la première fois par Wilkins et al., (1996). Ce terme désigne l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, une partie d'une cellule (membranes, organites) ou un groupe de cellules (organe, organisme, groupe d'organismes) dans des conditions données et à un moment donné.

Dans la pratique, la protéomique vise à identifier de manière globale les protéines extraites d'une culture cellulaire, d'un tissu ou d'un fluide biologique, leur localisation dans les compartiments cellulaires, leurs éventuelles modifications post-traductionnelles ainsi que leurs concentrations (Gokhale et al., 2012). Également, la protéomique permet de quantifier les variations de leur taux d'expression en fonction du temps, de leur environnement, de leur état de développement. Ainsi, la protéomique permet de déterminer l'état physiologique et pathologique d'une espèce donnée (Gfeller et al., 2016; Mommen et al., 2016). Elle étudie aussi les interactions que les protéines possèdent avec d'autres protéines, avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou d'acide ribonucléique (ARN), ou avec d'autres molécules (Berthier, 2008; Nouschi, 2015). La protéomique fonctionnelle étudie les fonctions de chaque protéine. Également, la protéomique étudie la structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines. Les analyses génomiques ne donnent qu'une vue partielle du fonctionnement cellulaire vu que la séquence d'un gène et son profil d'activité ne sont pas directement corrélés à l'abondance d'une protéine, de l'état de son activité ou de sa structure moléculaire finale (Haynes et al., 1998; Lescuyer et al., 2004). En effet, le transcrit d'un gène peut être épissé de différentes façons avant la traduction de la protéine. Grâce aux ribosomes, l'acide ribonucléique messager (ARN_m) est traduit en protéines selon le

code génétique. Les codons de l'ARN_m ont une correspondance pour les acides aminés qui sont polymérisés pour pouvoir former une protéine (Kierszenbaum, 2006). L'épissage alternatif de l'ARN_m ainsi que les modifications post-traductionnelles possibles telles que la phosphorylation, la glycosylation, la sulfatation (Hook, 2008) mais aussi la protéolyse augmentent très significativement le nombre de protéines ou de fragments protéiques et peuvent mener à différentes fonctions biologiques incluant des rôles structurels, de reconnaissance, de transport, de catalyse et de protéolyse (Hovasse, 2010). Ainsi, un seul gène peut encoder plusieurs protéines différentes (Ong and Mann, 2003; Komurov and White, 2007). En conséquence, le protéome est bien plus complexe que le génome (Kosak and Groudine, 2004) et l'analyse seule de la séquence d'ADN ou la quantification des ARN_m ne suffit pas à prédire les formes actives des protéines ni à déterminer leurs niveaux d'expression (Gygi et al., 1999; Wang et al. 2006). Vu que les protéines sont impliquées dans la plupart des processus biochimiques normaux ou pathologiques, l'étude directe des protéines permet une meilleure compréhension des maladies et des cascades d'évènements impliquées (Woolf and Salter, 2000; Chaurand et al., 2004).

Étant donné que la protéolyse est l'une des modifications post-traductionnelle d'une importance majeure dans la régulation des fonctions biologiques et que divers peptides s'avèrent indispensables pour l'organisme, il est aussi important de s'intéresser à la peptidomique. La peptidomique est définie comme étant un sous-ensemble de la protéomique pour la description des peptides, considérés, eux aussi, comme produits de gènes (Schrader and Schulz-Knappe, 2001; Schulz-Knappe et al., 2001). La peptidomique a pour but d'identifier, caractériser et quantifier tous les peptides endogènes d'une cellule, d'un organe ou d'un organisme (ex., le peptidome). La peptidomique se définit comme une méthodologie permettant la description la

plus complète possible des peptides d'un échantillon biologique dans différentes conditions physiologiques (Yin et al., 2011).

1.1. Protéolyse

Les protéases possèdent un rôle important dans le métabolisme des organismes vivants. Elles interviennent dans de différents processus physiologiques y compris le développement, la coagulation du sang, la mort cellulaire, la digestion et la maturation des protéines (Hubbard, 1998). Pour cela 1,7% du génome de mammifère code pour des enzymes protéolytiques (Lopez-Otin and Overall, 2002). Il existe différentes familles fonctionnelles de protéase, qui sont classées en fonction de la position où a lieu la coupure dans la chaîne peptidique : **(i)** Les exopeptidases tels que les amino-peptidases qui coupent entre le premier acide aminé et le second acide aminé de la chaîne, libèrent donc l'acide aminé N-terminale, et les carboxypeptidases qui coupent entre l'avant dernier et le dernier acide aminé de la chaîne, libèrent donc l'acide aminé C-terminale. **(ii)** Les endopeptidases qui peuvent couper à l'intérieur de la chaîne peptidique.

La plupart des protéases clivent préférentiellement la chaîne peptidique à des positions précises, en fonction de la nature des chaînes latérales des acides aminés qui entourent le site de coupure. Dans certains cas, cette spécificité est faible, mais dans d'autres, elle peut être très sélective. La coupure peut aussi être influencée par la structure de la protéine. Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases, ce qui permet de les regrouper en grandes familles, en fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif impliqué dans la catalyse. Nous distinguons ainsi six familles de protéase: les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases à aspartyle, les métallo-protéases, les protéases à thréonine, les protéases à acide glutamique (Seidah et al., 2006). Ces protéases sont impliquées dans le clivage de liaisons peptidiques de

diverses protéines et peptides au niveau de multiples compartiments cellulaires, y compris ceux de la voie sécrétoire (le réticulum endoplasmique (RE), les endosomes, les lysosomes et les vésicules sécrétoires), du cytosol, des peroxysomes, de la mitochondrie et du noyau, ainsi qu'au niveau de la matrice extracellulaire (Winchester, 2005).

Le traitement post-traductionnelle des pro-protéines et pro-peptides est une étape essentielle dans la formation du peptide bioactif, ce qui est particulièrement important dans le système nerveux (Pejaver et al., 2014; Murphy and Gainer, 2016). Beaucoup de neuropeptides sont synthétisés sous forme de protéines précurseurs inactives, qui subissent une cascade enzymatique de transformations et de modifications post-traductionnelles au cours de leurs transports intracellulaire avant l'obtention des produits bioactifs qui sont sécrétés et agissent au niveau des récepteurs pré et post-synaptiques (Salio et al., 2006; Zipfel and Skerka, 2009; Krishnan and Schiöth, 2015).

Le traitement protéolytique commence au niveau du réticulum endoplasmique rugueux où le peptide signal du côté N-terminal est clivé par le signal peptidase. Le pro-neuropeptide résultant est acheminé à travers l'appareil de Golgi et est emballé dans des vésicules sécrétoires nouvellement formées avec des protéases de traitement. Tout au long du transport axonal, la vésicule sécrétoire arrive à maturité et le traitement protéolytique se produit de telle sorte que la vésicule sécrétoire mature contient les neuropeptides biologiquement actifs (Sossin et al., 1989; Hook et al., 2008; Bulgari et al., 2014). Bien que chaque pro-neuropeptide possède une séquence primaire distincte, le traitement protéolytique se produit sur les sites dibasiques du côté N et C terminales des précurseurs de neuropeptides. Les neuropeptides sont généralement clivés au niveau des résidus dibasiques Lys-Arg (KR), Lys-Lys (KK), Arg-Arg (RR), Arg-Lys (RK) et

parfois au niveau des sites Arg (R) monobasiques (ex., pro-vasopressine, pro-somatostatine) (Coates and Birch, 1998). Bien que plusieurs neuropeptides proviennent du clivage à des sites basiques, des clivages protéolytiques peuvent se réaliser au niveau des résidus non-basiques (Marcinkiewicz et al., 1993; Hook et al., 2008; Fricker, 2016).

Le traitement protéolytique sur les sites dibasiques ou monobasiques de proneuropeptides se produit principalement dans les vésicules de sécrétion (Docherty and Steiner, 1982; Crochet et al., 2004; Hook et al., 2008; Fricker, 2016). Ces protéases peuvent être des endo-protéases telle que la cathepsine L appartenant à la famille des cystéine-protéases ou des proprotéines convertases appartenant à la famille de *subtilisine-like calcium-dépendante*. La cathepsine L clive préférentiellement du côté N-terminal au niveau des sites dibasiques tandis que les PCs clivent préférentiellement du côté C-terminal au niveau d'une séquence d'AA mono ou dibasique KR, RR, et RK mais pas lorsqu'ils sont suivis d'une proline (P) (Seidah and Chrétien, 1999; Duckert et al., 2004). L'action de la cathepsine L et des PCs, conduit à des intermédiaires peptidiques avec des extensions de résidus dibasiques à leurs extrémités N et C terminales. Ces résidus basiques sont éliminés par des exopeptidases telle que l'Arg/Lys amino-peptidase qui clive du côté N-terminal et la carboxypeptidase E qui est relativement abondante au niveau du SNC et qui clive du côté C-terminal des pro-neuropeptides.

L'ensemble de ces clivages protéolytiques est indispensable à la formation de neuropeptides biologiquement actifs et fonctionnels. Ainsi, la régulation de l'expression des neuropeptides par des enzymes impliquées dans le traitement de proneuropeptides est d'une importance majeure.

1.2. Peptides endogènes bioactifs

Les neuropeptides sont nécessaires pour des fonctions physiologiques comme neurotransmetteurs ou neuromodulateurs dans le système nerveux et sont essentiels comme les hormones peptidiques pour la régulation du système endocrinien. Ainsi, les neuropeptides sont des médiateurs essentiels de la communication cellulaire dans les systèmes neuroendocrines. Ces neuropeptides sont composés de séquences de peptides diverses typiquement constituées d'environ 4 à 40 résidus. Il existe différents peptides endogènes ayant des différentes fonctions et activités biologiques selon le site où ils sont localisés. Par exemple, les peptides endogènes peuvent jouer un rôle actif au niveau des mécanismes biologiques y compris la régulation de la croissance par la somatostatine (Bertherat, 1992; Steyn et al., 2016), la pigmentation de la peau et la régulation de l'appétit par l' α -MSH (Baltatzi et al., 2008), la reproduction par l'ocytocine (Gimpl and Fahrenholz, 2001), la glycémie par l'insuline et le glucagon (Duparc, 2012), la vasodilatation et le contrôle de la pression artérielle avec la bradykinine (BK), le neuropeptide Y (NPY) et l'angiotensine (Souza et al., 2013), l'inflammation avec les interleukines (Sendur et al., 2013), la douleur avec les peptides de la famille des tachykinines telles que la substance P (SP) et la neurokinine A (NKA) (Gutierrez et al., 2016) et la modulation de la douleur par les peptides opioïdes telle que la dynorphine A (DynA) (Podvin et al., 2016).

L'ensemble de ces peptides est le résultat de la protéolyse de protéines précurseur clivées au niveau de motifs spécifiques, suite à un signal déclenchant l'activité enzymatique (Werle and Bernkop-Schnürch, 2006). Le pro-neuropeptide résultant acheminé à travers l'appareil de Golgi est emballé dans des vésicules sécrétoires nouvellement formées avec des protéases de traitement. Les vésicules sont transportées jusqu'aux terminaisons axonales. Durant ce transport axonal, les précurseurs de neuropeptides subissent des clivages enzymatiques générant les neuropeptides

bioactifs capables de se lier à leurs récepteurs et d'accomplir leurs fonctions biologiques (Hook et al., 2008).

Chapitre 2. Mécanismes endogènes de la nociception et de la douleur

Le système nerveux permet à l'organisme de se repérer et d'agir dans son environnement (Wilaöcher, 2002). Le système nerveux est divisé en système nerveux central (SNC) et système nerveux périphérique (SNP). Le SNC inclue l'encéphale regroupant le cerveau, le tronc cérébral, et le cervelet ainsi que la moelle épinière. Le SNC possède un rôle de réception, de traitement, d'intégration et d'émission des messages nerveux reçus à partir du système nerveux périphérique. Le SNP, quant à lui, est constitué des nerfs sensitifs et moteurs, qui sont issus essentiellement de la moelle et du tronc cérébral, et qui se terminent au niveau d'un ou de plusieurs organes (peau, muscle, viscère). Ainsi, toutes les informations de l'organisme affluent vers le SNC à partir des détecteurs sensoriels du SNP. Le SNP est constitué par deux voies : **(i)** une voie sensitive (afférente) constituée de neurones sensitifs et viscéraux, et au niveau de laquelle la propagation de l'influx vient du récepteur périphérique, **(ii)** une voie motrice (efférente) constituée de neurones moteurs dont l'origine des influx est le SNC. Cette voie motrice peut être divisée en système nerveux autonome ou végétatif et en système nerveux somatique. Le système nerveux autonome est associé au contrôle involontaire des muscles lisses, de la digestion, de la respiration, des muscles cardiaques ou de certaines glandes (Beaulieu, 2005). Tandis que le système nerveux somatique est associé au contrôle volontaire des mouvements du corps dans son environnement extérieur. Ainsi, le système somato-sensoriel collecte toutes les informations sensorielles provenant de l'organisme. Les sensations tactiles et les variations de pression sont détectées par des mécanorécepteurs. Cependant, les variations thermiques sont détectées par des thermorécepteurs, les variations chimiques par des chémorécepteurs et les sensations douloureuses par des nocicepteurs (Julius and Basbaum, 2001).

2.1. Nocicepteurs

Les informations en provenance de notre milieu interne et externe sont captées d'une façon continue par des récepteurs sensoriels (Nishio et al., 2016). Ces récepteurs peuvent être à bas seuil de stimulation ou à haut seuil de stimulation. Une information nociceptive est captée par des nocicepteurs qui sont des récepteurs sensoriels à haut seuil d'activation, répondant à des stimulations d'intensité forte (Baliki and Apkarian, 2015). Ils sont localisés essentiellement au niveau des terminaisons libres des fibres nerveuses afférentes nociceptives (Fibre A δ , Fibre C) (Gazerani et al., 2016), et formant des arborisations au niveau des tissus cutanés, musculaires, articulaires ainsi que dans les parois des viscères (Ness and Gebhart, 1990). Ces fibres transforment l'énergie physique/chimique en influx nerveux. Ainsi, le message douloureux est converti en potentiel d'action (Woolf and Salter, 2000; Marchand, 2008). Les nocicepteurs sont sensibles aux stimuli douloureux et transmettent des informations relatives aux dommages tissulaires et à l'intensité des stimuli (mécaniques, chimiques et thermiques) (Julius and Basbaum, 2001; Delaunay, 2013). Certains nocicepteurs sont activés par différents types de stimuli à la fois, ce sont des nocicepteurs dit multimodaux, d'autres nocicepteurs répondent à un seul type de stimuli (Hellyer et al., 2007). Le mécanisme de nociception comprend quatre étapes majeures : la transduction du message sensoriel à partir d'un stimulus nociceptif, la transmission du message nerveux en premier lieu vers la moelle épinière puis vers le centre supérieur intégrateur, l'intégration du message douloureux au niveau du cortex cérébral et finalement la modulation du message nociceptif par les voies descendantes (Fein, 2012; Pasero and McCaffery, 2010). La nociception correspond donc à l'ensemble des fonctions de l'organisme qui permettent de détecter, percevoir et réagir à des stimulations internes et externes potentiellement nocives pour l'organisme (Costigan and Woolf, 2000; Référent, 2017).

2.2. Fibres nerveuses nociceptives

Ils existent trois types de fibres nerveuses classés selon leur diamètre et la vitesse de conduction de l'influx nerveux (myélinisé ou non myélinisé) (Figure 1).

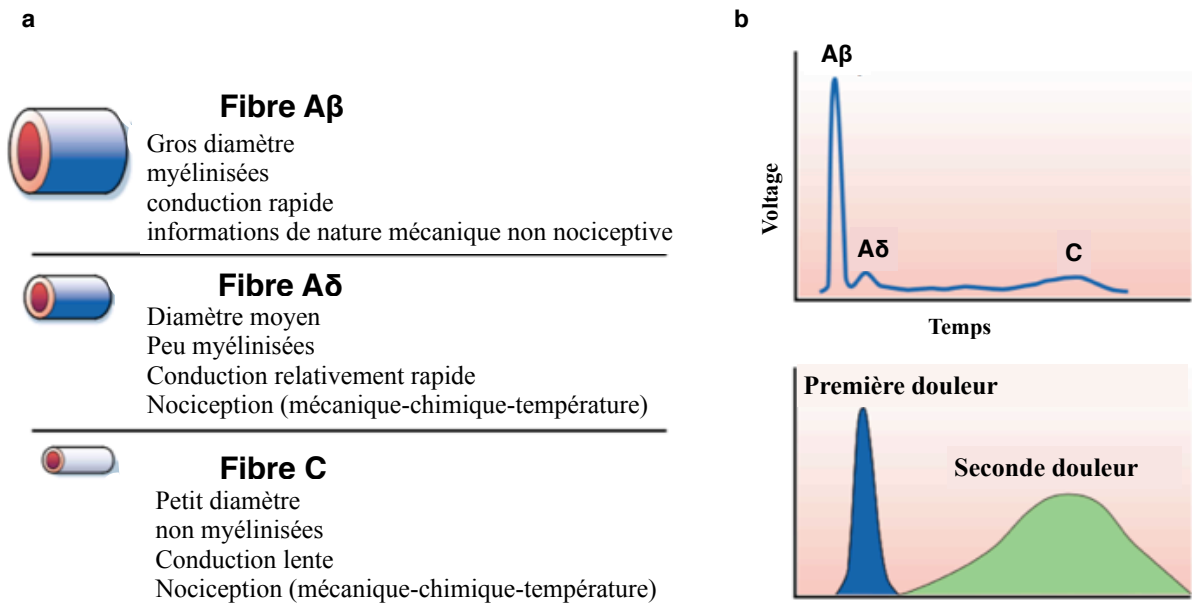


Figure 1. Schéma des fibres nociceptives (Inspirée de Julius and Basbaum, 2001).

a) Schéma représentant les différents types de fibres nociceptives classées selon leurs diamètres, le taux de myéline et la vitesse de conduction. b) Schéma représentant l'action des différentes fibres en fonction du stade de douleur. Les fibres A δ sont associées à la perception des douleurs primaires de type piques localisées et brèves généralement d'origine mécanique (Marchand, 2005; Bouhassira, 2009). Ces fibres sont responsables du réflexe de retrait. Les fibres C sont associées aux douleurs de deuxième ordre de type brûlure qui sont diffuses (Marchand, 2009; Bouhassira, 2009). Ces fibres sont dites polymodales (Marchand, 2005), sensibles à la fois aux stimuli mécanique, chimique et thermique. Les fibres C constituent les 3/4 des fibres des nerfs périphériques et peuvent être peptidinerigiques contenant des neuropeptides tels que la SP et le Calcitonin gene-related peptide (CGRP) ou non peptidinerigiques ne contenant pas de neuropeptide.

La corne dorsale est depuis longtemps considérée comme un niveau clé de régulation du message nociceptif (Melzack and Wall, 1965; Mattera, 1998). Comme illustrée au niveau de la Figure 2, la corne dorsale est composée de différentes couches appelées des lamina où arrivent et partent les informations nociceptives. Ainsi, les neurones de projection du lamina I et V reçoivent l'influx

des fibres A δ (Dahlhaus et al., 2005; Reragui, 2012; Di Lerna et al., 2016). Les neurones de projection recevant l'influx des fibres A δ , reçoivent aussi des influx venant des fibres C par l'intermédiaire d'interneurones dont le corps cellulaire se trouve dans la lamina II (McMahon and Koltzenbur, 2008).

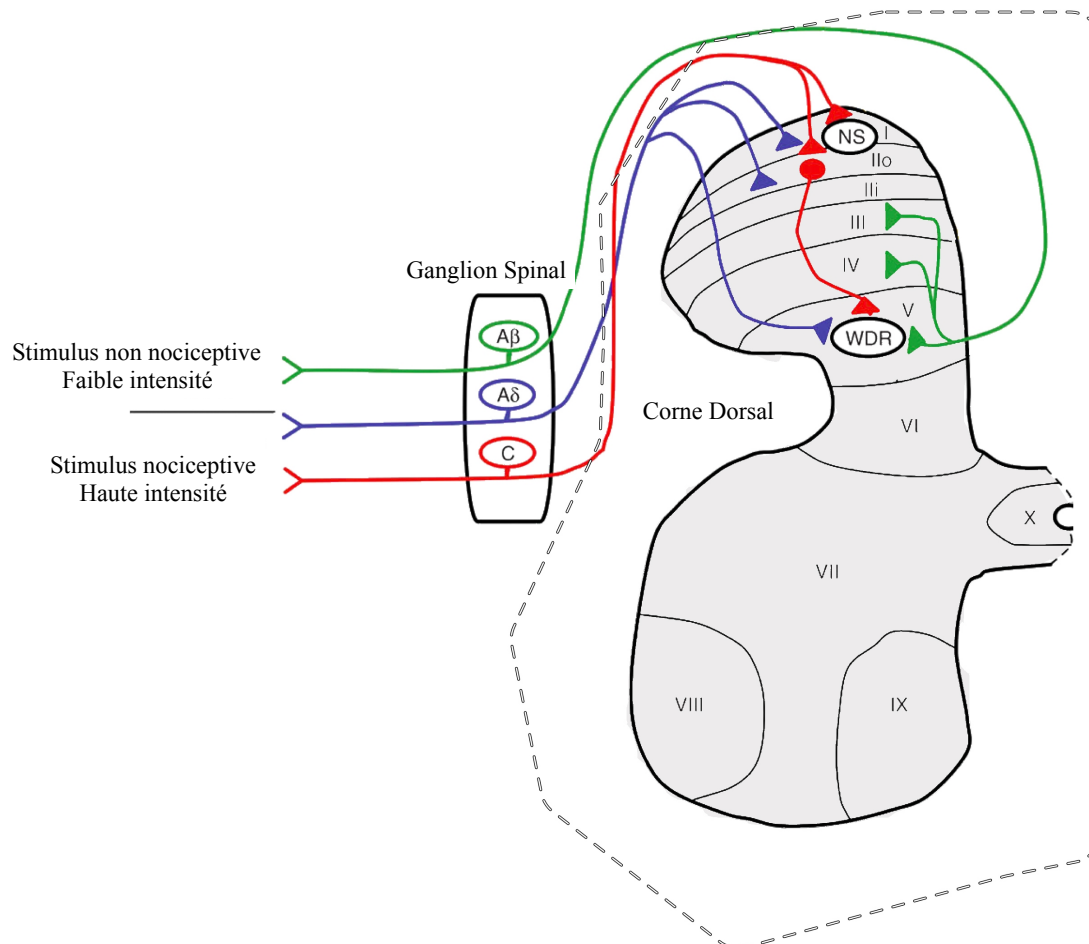


Figure 2. Représentation schématique de la corne dorsale de la moelle épinière (Inspirée de McMahon and Koltzenbur, 2008; Di Lerna et al., 2016).

Les fibres nerveuses sensorielles entrent dans la moelle épinière par la corne dorsale et se retrouvent dans les 6 couches (laminae) distinctes de la corne dorsale de la moelle épinière. Dans les lames I et II, les cornes dorsales superficielles, les cellules nociceptives spécifiques (NS) reçoivent des apports des fibres C et A δ directs. Dans les lames IV et V, les neurones à large gamme dynamique (WDR) reçoivent des entrées convergentes directes et indirectes (via les interneurones) de tous les types de fibres. Des interneurones inhibiteurs sont également présents dans toute la corne dorsale (ils sont particulièrement fréquents dans la région de Substantia Gelatinosa dans la Lamina II).

2. 3. Récepteurs de la douleur

Les nocicepteurs captent les informations nociceptives grâce à de nombreux récepteurs et canaux transmembranaires qu'ils expriment. Ces récepteurs sont responsables de la transduction des stimuli chimiques, mécaniques et thermiques (Figure 3). Ils sont des protéines ou un ensemble de protéines capables de transformer l'énergie thermique (Pogorzala et al., 2013; Yarmolinsky et al., 2016) (Figure 4), mécanique (Shah et al., 2014; Ranade et al., 2015) ou une concentration d'une substance chimique donnée (Deval et al., 2010; Brain and Moore, 2013; Kweon et al., 2016; Bonvini et al., 2016) en un signal électrique donnant un potentiel d'action (PA) si le seuil de stimulation est suffisant (Fein, 2012).

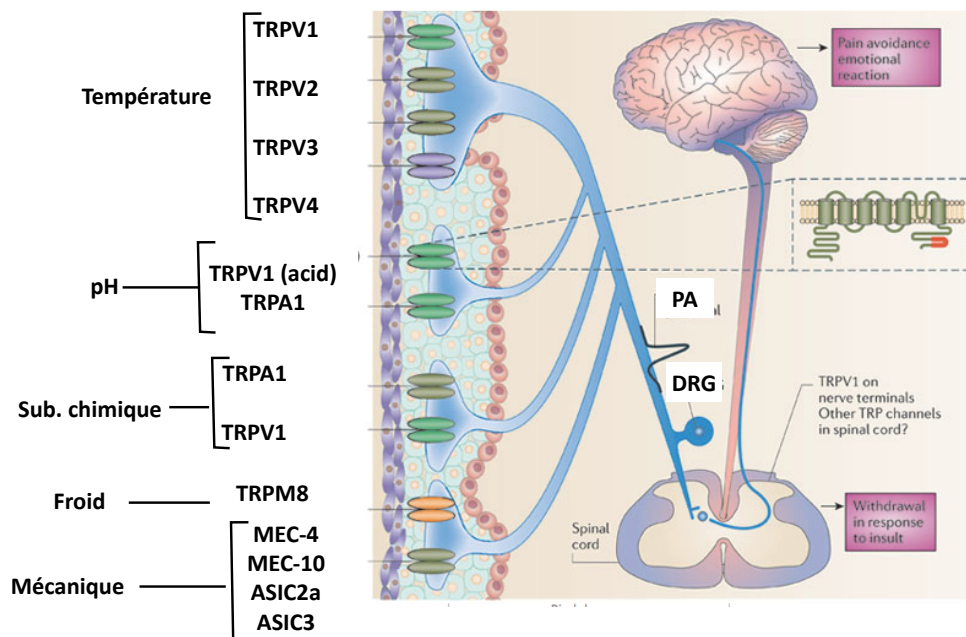


Figure 3. Schéma représentant les récepteurs et les canaux transmembranaires nociceptifs (Inspirée de Scholz and Woolf, 2002).

Les informations nociceptives chimiques, mécaniques et thermiques sont captées par de nombreux récepteurs et canaux transmembranaires ainsi le message nociceptif est acheminé par les fibres nociceptives vers le ganglion spinal (DRG). À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière se produit un premier contact synaptique entre les fibres afférentes nociceptives et des neurones de projection. Ce premier contact synaptique est clé dans la transmission et la modulation de la douleur (Melzack and Wall, 1965). Divers neuropeptides sont libérés à ce niveau afin d'acheminer le message nociceptif vers les centres supérieurs intégrateurs.

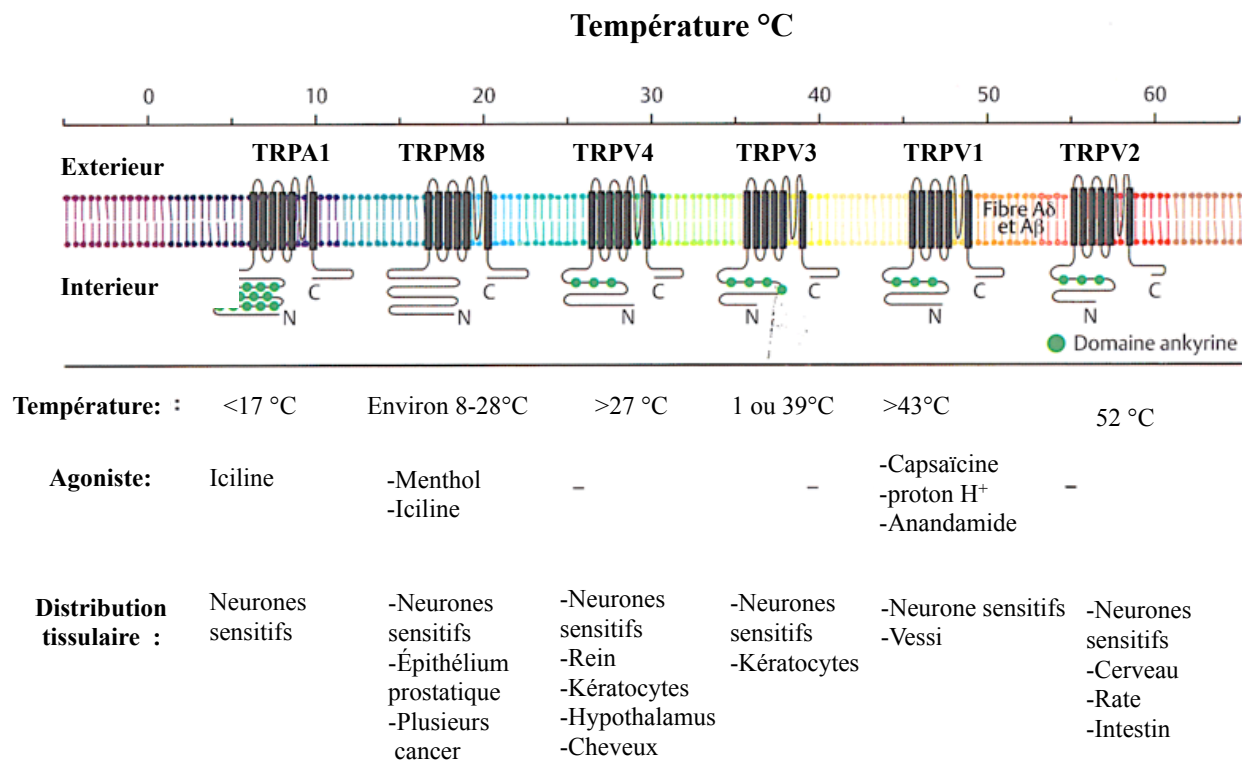


Figure 4. Représentation schématique des thermorécepteurs TRP: températures d'activation, agoniste et distribution tissulaire (Modifiée de Jordt et al., 2003; Beaulieu, 2013)

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différents canaux impliqués dans la nociception (thermosensible, mécano sensible et celle à sensibilité chimique)

Type	Canal	Activation	Référence
Sensibilité thermique	TRPV1	T°C > 42°C Capsaïcine	Patapoutian et al., 2003; Dhaka et al., 2006 Szallasi and Blumberg, 1999
	TRPV2	T°C > 52°C	Patapoutian et al., 2003
	TRPV3	25°C < T < 42°C	Dhaka et al., 2006
	TRPV4		
	TRPM8	18°C	Dhaka et al., 2006
Sensibilité mécanique	Msc1	Changement de pression osmotique	Garcia-Anoveros and Corey, 1997; Mazzuca, 2007
	P2Y1	Déformation membranaire	Nakamura and Strittmatter, 1996; Burnstock and Sawynok, 2010
	SIC	Activité pour la pression osmotique	Suzuki, et al., 1999)
	TRPV1		
	MEC -4	Pression osmotique	Huang and Chalfie, 1994 ; Martinac, 2004
	MEC -10		
ASIC2a et ASIC3	Mécano-transduction	Olson et al., 1998; Ranade et al., 2015	
Sensibilité chimique	Variation du pH	ASIC	Acidose (inflammation, lésion tissulaire ou exercice physique intense, Proton H+) à des pH d'activité situés entre 4 et 6,9, Lésion tissulaire les cellules endommagées libèrent de l'ATP qui stimule les fibres C et les fibres Aδ, L'ATP libéré agit sur les récepteurs purinergiques et produit un courant entrant cationique
	Sensibilité à l'ATP	P2X	Schlichter, 2007; Bonvini et al., 2016

2.4. Définition de la douleur

L'évolution des connaissances sur les bases neurophysiologiques de la douleur rend compte de la complexité du phénomène « douleur ». La douleur est définie comme étant une sensation sensorielle ou émotionnelle déplaisante associée à des dommages tissulaires réels ou potentiels (IASP, 1979; Portenoy et al., 1996). La capacité à ressentir la douleur possède un rôle protecteur, afin de nous mettre en garde d'un dégât tissulaire ou fonctionnel mettant en jeu l'intégrité de l'organisme (Woolf and Mannion, 1999). Ainsi, la douleur implique la transduction des stimuli douloureux par les fibres nerveuses à terminaison libre (nocicepteurs). Ces fibres acheminent le message douloureux jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière puis vers les centres supérieurs intégrateurs où il sera traité afin de déclencher les voies descendantes (Le Bars, 2010). Ainsi, et selon le type de lésion, le sujet ressent une douleur brève nommée douleur aiguë. Cette douleur peut être suivie d'une douleur inflammatoire suite à la libération de substances pro-inflammatoires au site de lésion et stimulant excessivement les récepteurs (Tsui, et al., 2010). Cependant, si cette douleur se prolonge au-delà de 6 mois, il s'agit de douleur chronique qui perdure même après la réparation de la lésion (Turk and Okifuji, 2001; Bouhassira, 2008). De même, cette douleur chronique peut se développer en douleur neuropathique qui est soit périphérique (par exemple les compressions nerveuses causées par les hernies discales) ou centrale due aux dommages et aux traumatismes spinaux et centraux (atteinte du thalamus) (Castel et al., 2013; Jonsson, 2015). Ainsi, la sensation de la douleur ne joue plus le rôle d'alarme pour le système puisqu'elle n'indique plus un dommage corporel et subit des dérèglements tels que des excès de nociception ou des lésions neurologiques sur les voies nociceptives entraînant des modifications du système nociceptif telles que l'hyperalgésie et l'allodynie (Sandkühler, 2009). L'hyperalgésie est due à une hyperexcitabilité du système nerveux s'exprimant par une

amplification des stimuli douloureux ce qui provoque une réponse douloureuse exagérée vis-à-vis d'un stimulus nocif (Faure et al., 2015). L'hyperalgésie peut être primaire localisée au niveau du tissu lésé ou secondaire issue d'un mécanisme central. De même, l'excès de nociception peut provoquer de l'allodynie qui correspond à une douleur déclenchée par un stimulus non nociceptif (tel que le toucher) (Julius and Basbaum, 2001; Coutaux et al., 2005; Baron, 2006; Attal, 2010).

2.5. Médiateurs de l'inflammation

Suite à une stimulation périphérique intense (mécanique, thermique) ou suite à une lésion tissulaire (stimuli chimique), la majorité des nocicepteurs se comporte comme des chémorécepteurs provoquant des douleurs inflammatoires suite à la libération de substances allogènes ou pro-inflammatoires au niveau du tissu lésé (Le Bars and Adam, 2002; Wang and Woolf, 2005; Cavaillon, 2005) (Figure 5). Les substances pro-inflammatoires proviennent principalement de trois sources (Guirimand, 2003). **(i)** des cellules endommagées : des protons (K^+ , H^+), ATP, histamine et sérotonine **(ii)** des cellules immunitaires suite à leur phagocytose tels que les cytokines (Interleukines, Interféran, facteur de nécrose tumoral (TNF), facteur de croissance tumoral (NGF), prostaglandine E et leucotrienes **(iii)** secrétées par l'activation des nocicepteurs localisés sur les terminaisons nerveuses des fibres $A\delta$ et des Fibre C tels que le Glutamate, la BK, la SP et le CGRP qui peuvent être libérés au niveau périphérique suite à un phénomène nommé réflexe d'axone (Kidd and Urban, 2001; Pethő and Reeh 2012; Beaulieu et al., 2014). Ces peptides pro-inflammatoires sont considérés comme des activateurs puissants des nocicepteurs car ils déclenchent la libération de substances pro-inflammatoires telles que l'histamine et la prostaglandine (Dray and Bevan, 1993; Calvino, 2006; Fischer et al., 2010).

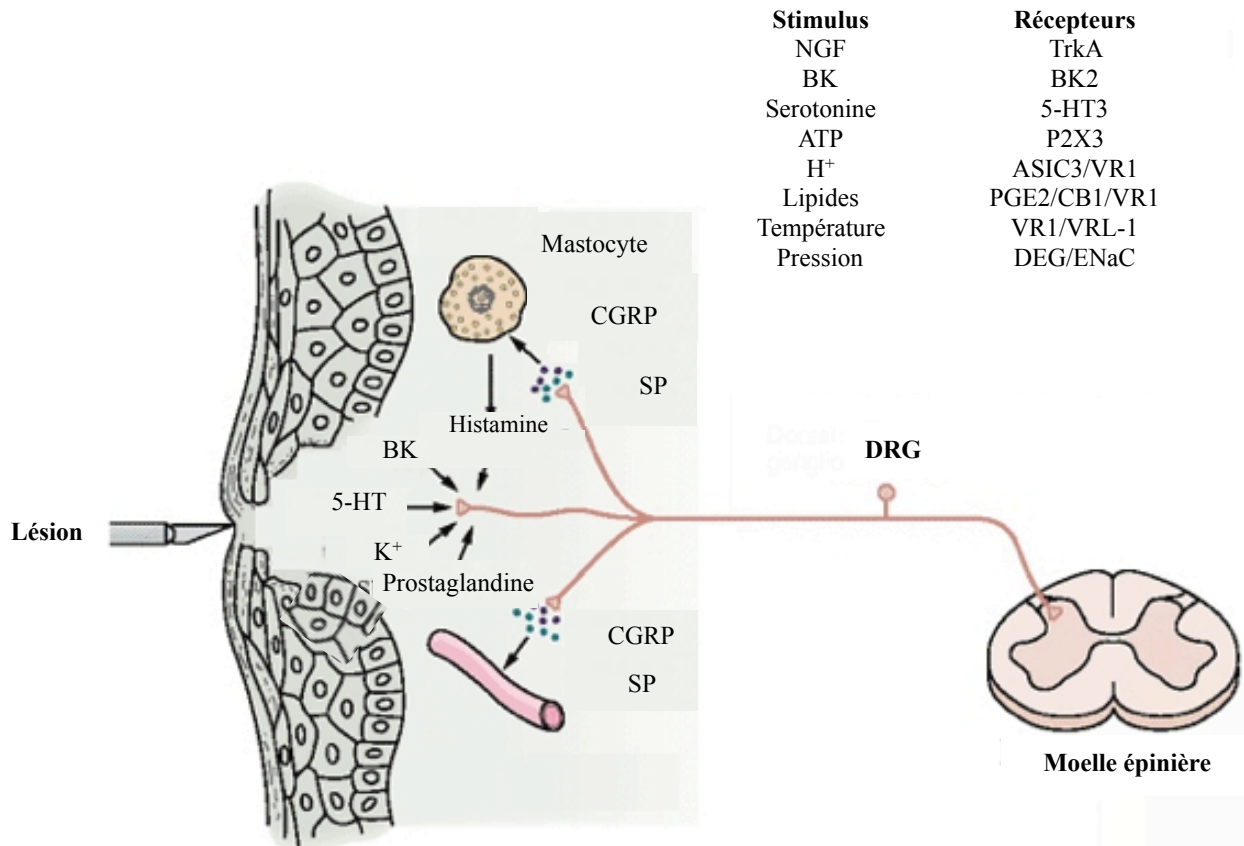


Figure 5. Schéma de l'hyperalgésie primaire avec la mise en jeu de substances pro-nociceptives et des facteurs inflammatoires au niveau des tissus périphériques. (Inspirée de Julius and Basbaum., 2001).

Une lésion de nature mécanique, thermique ou chimique produit une cascade d'évènements provoquant la libération de substances potentiellement nociceptives ainsi que la mise en jeu de nombreuses cellules immunitaires activées, telles que les macrophages et les cellules lymphocytaires. Ces cellules incluent les mastocytes, les plaquettes, les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Ces cellules neuronales et non neuronales sont responsables de cette soupe lésionnelle périphérique constituée de sérotonine, histamine, glutamate, ATP, adénosine, SP, CGRP, BK, des prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes, facteur de croissance du nerf (NGF), facteur de nécrose tumoral (TNF- α), interleukine-1 β (IL-1 β), des protéases extracellulaires et des protons. Ces facteurs chimiques agissent directement sur le neurone nocicepteur en se liant à des récepteurs de surface dont à des protéines G couplées aux récepteurs, des canaux vanilloïde (TRPV), canaux ioniques acide-sensibles (ASIC), et des récepteurs de la tyrosine kinase (TrkA).

2.6. Transmission et intégration de la douleur

Une stimulation périphérique nociceptive (mécanique, chimique ou thermique) recrute des nocicepteurs localisés sur les terminaisons libres des fibres nocicepteurs (A δ , C) conduisant

l'information par le 1^{er} neurone situé au niveau du ganglion spinal (Protoneurone) jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière. Le 1^{er} neurone à son tour fera synapse avec le deuxième neurone de projection supra spinal (Deuténeurone) (Schaible, 2006). La transmission de l'influx nerveux ne se résume pas uniquement au passage de l'information nociceptive entre le neurone afférent primaire et le second neurone de projection dans la moelle (Janin, 2009). Avant d'être acheminées vers les centres supérieurs, les voies de la nociception, comme toutes les afférences sensorielles, traversent le thalamus. Les chemins que peuvent prendre les informations nociceptives sont divisés en deux voies principales : la voie spino-thalamique et la voie spino-réticulée (Fields, 1987; Maarawi, 2013). A ce niveau, le deuxième neurone fait synapse avec le troisième neurone conduisant l'information au cortex (Figure 6). La voie spino-thalamique se subdivise en deux niveaux : le faisceau spino-thalamique latéral et le faisceau spino-réticulaire. Le faisceau spino-thalamique latéral se projette directement vers les noyaux thalamiques latéraux dont les neurones tertiaires se projettent à leur tour vers le cortex somato-sensoriel, ce qui contribue à l'aspect sensoriel discriminatif de la douleur et il est responsable de la transmission de la douleur superficielle et des sensations tactiles (Willis et al., 2012) (Figure 6).

Le faisceau spino-réticulaire forme des synapses au niveau de la formation réticulée (noyau de raphé NRM) puis se projettent vers les noyaux médians du thalamus et la substance grise périaqueducule (SGPA) et se projette vers différentes structures du système limbique (cortex cingulaire antérieur). Le système spino-réticulaire et le système limbique sont impliqués dans les aspects émotionnels de la douleur (Figure 6). Tandis que, le faisceau spino-réticulaire constitué principalement de fibre C est responsable de la transmission des douleurs profondes et diffuses vu son trajet complexe qui ne permet pas une localisation précise de la douleur (Almeida et al., 2004; Djouhri and Lawson, 2004; Campbell and Meyer, 2006; Beaulieu, 2013). Le cortex

somatosensoriel est connecté aux voies ascendantes nociceptives ce qui permet la perception consciente de la douleur. L'information nociceptive est régulée en permanence par des systèmes moléculaires endogènes spécifiques d'activation et de modulation de la nociception (Julius and Basbaum, 2001; Dubin and Patapoutian, 2010; Ossipov et al., 2014).

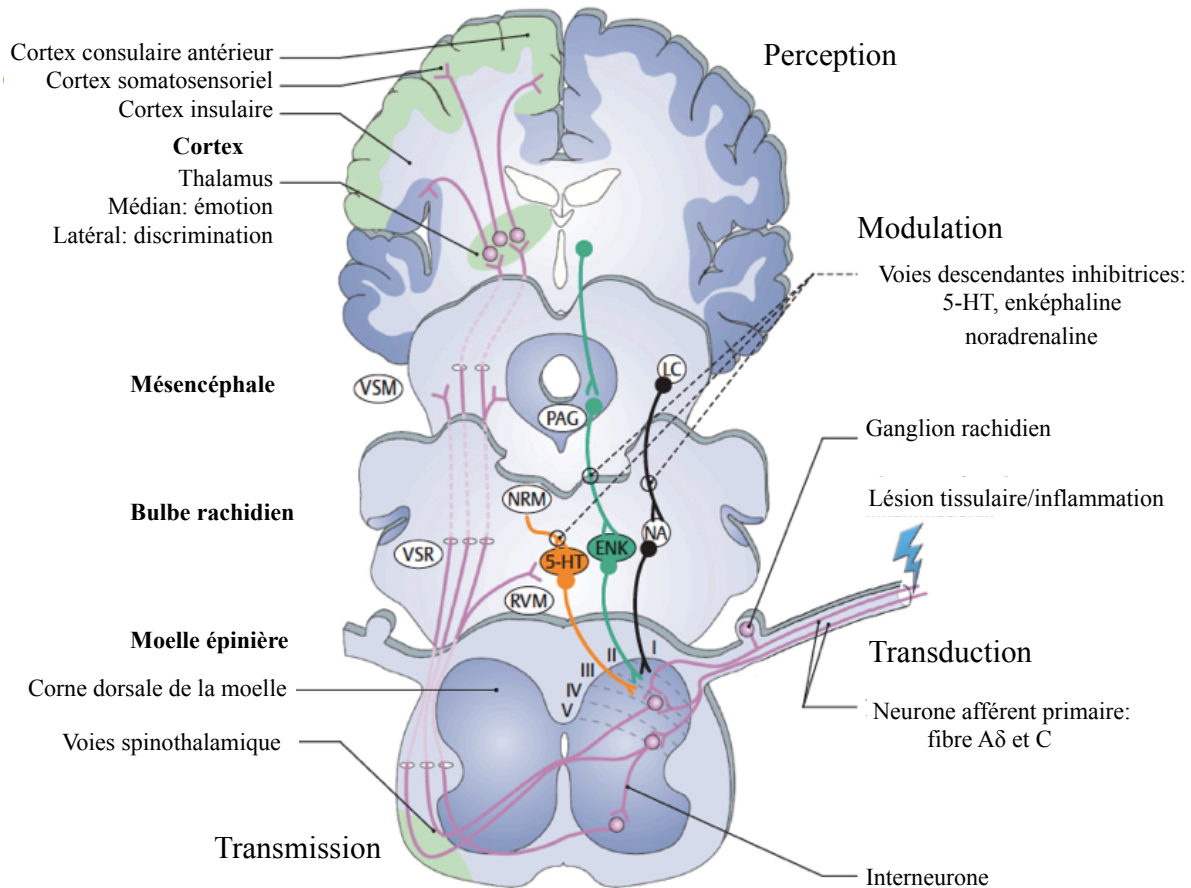


Figure 6. Schéma général des voies de la douleur (Modifiée d'après Fields, 2004; Beaulieu, 2013).

Suite à l'activation des nocicepteurs en périphérie, les influx nociceptifs sont relayés à la corne dorsale de la moelle épinière par les fibres nerveuses Aδ et C. Les nocicepteurs sont classiquement associés aux fibres Aδ et C, bien qu'il soit reconnu qu'une proportion significative de nocicepteurs soit associée à des fibres Aβ (Djoughri and Lawson, 2004). L'information nociceptive emprunte ensuite de nombreuses voies entre la moelle épinière et le cerveau, où elle active de multiples régions. Parallèlement, il existe des systèmes de modulation descendante de la douleur constitués par des projections descendantes du cerveau vers la corne dorsale pouvant inhiber ou faciliter la transmission nociceptive spinale. Il existe également des connexions entre les différentes structures cérébrales permettant l'intégration des diverses composantes de la douleur et de sa modulation. 5-HT : sérotonine; ENK : enképhaline; LC : locus coeruleus; NA : noradrénaline; NRM : noyau du raphé magnus; PAG : substance grise périaqueducule; RVM : moelle rostrale ventromédiale; VSM : voie spino mésentérique; VSR : voie spino-réticulée.

2.7. Hyperalgésie primaire et secondaire

Suite à une stimulation périphérique intense, le signal nociceptif est transformé en influx électrique (potentiel d'action) suite à l'activation des canaux sodiques voltages dépendants. Cet influx active plusieurs canaux voltage-dépendant dont les canaux calciques sensibles au voltage, conduisant à une entrée massive du Ca^{2+} . L'influx de Ca^{2+} induit la libération du glutamate considéré comme le principal neurotransmetteur excitateur du SNC chez les vertébrés (Fonnum 1984). D'autre part le flux de Ca^{2+} augmente la vitesse de migration des vésicules synaptiques LCDV (vésicules à corps dense) contenant les neuropeptides matures (Bao et al., 2003) et entraîne leur fusion avec la membrane synaptique, libérant ainsi leur contenu dans la fente synaptique. Parmi ces neuropeptides la SP, le CGRP, la BK et plusieurs autres neuropeptides sont libérés, favorisant l'hyperexcitabilité centrale et une sensibilité accrue suite à leur fixation sur leurs récepteurs pré et post-synaptiques (Ji and Woolf, 2001; Mazzuca, 2007). Ainsi, il s'agit d'hyperalgésie primaire localisée dans la zone douloureuse (Figure 7).

Le glutamate libéré par les terminaisons nerveuses agit sur deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropes (AMPA et NMDA, le kainate), qui comportent un canal ionique intrinsèque activé par le ligand et qui possèdent une cinétique d'activation très rapide (Tang et al. 1989; Trussell and Fischbach 1989), et les récepteurs métabotropes (mGlu), couplés à de différents messagers intracellulaires via l'activation des protéines G et fonctionnent soit en libérant des seconds messagers dans le cytoplasme, soit en influençant les canaux ioniques par la libération de sous-unités de protéines G dans la membrane (Conn and Pin 1997).

Lors de situations physiologiques normales, le glutamate libéré à partir des afférents primaires active les récepteurs AMPA et mGlu, cependant le récepteur NMDA reste inactif (Commare, 2014). Le NMDA contient un site de liaison pour le Mg^{2+} dans le canal ionique. L'action du Mg^{2+} dépend du potentiel de membrane (PM) de la cellule. A un PM proche du potentiel de repos,

le Mg^{2+} extracellulaire à sa concentration physiologique (1-2 mM) bloque le canal et empêche le passage des cations (K^+ , Na^+ et Ca^{2+}) (Bancila, 2004). Cependant, suite à une stimulation nociceptive intense, la libération prolongée de la SP et du glutamate et l'activation de leurs récepteurs respectifs (NK1 et AMPA), dépolarisent peu à peu la membrane neuronale, jusqu'à un seuil à partir duquel le blocage du NMDA par les ions Mg^{2+} disparaît (Latremolière and Woolf, 2009). L'ouverture des récepteurs/canaux NMDA provoque une augmentation du calcium intracellulaire. La forte concentration du calcium active notamment la NO synthase, source de production de NO intracellulaire et la cyclooxygénase de type 2 (COX 2) à l'origine de la synthèse de la prostaglandines (Castel, 2009). Le NO et le calcium agissent aussi au niveau transcriptionnel en modifiant l'expression de certains gènes, comme les gènes dits à expression immédiate (c-FOS, c-JUN et COX 2) et ceux à réponse tardive codant notamment pour la prodynorphine, le récepteur de la substance P (récepteur NK1), pour les neurotrophines tel que le BDNF (brain derived nerve growth factor), ou pour des récepteurs tel que le récepteur trkB sur lequel le BDNF se fixe (Chauvin, 2011). Ces protéines ainsi synthétisées sont responsables d'activation cellulaire à long terme à l'origine d'une neuroplasticité centrale.

Le signal nociceptif est ensuite transmis aux centres supérieurs intégrateurs par le tractus spinothalamique (Bernard and Villanueva, 2009). En premier lieu, le signal nociceptif est transmis à la moelle épinière par le premier contact synaptique, où les neurones de la corne dorsale sont activés puis le signal nociceptif est transmis à son tour aux centres supérieurs de l'encéphale. A ce niveau, les signaux électriques sont traduits en message douloureux (Brooks and Tracey, 2005; Calvino and Grilo, 2006). Ainsi, on parle d'hyperalgésie secondaire et de sensibilisation centrale (Le Bars and Adam, 2002; Wang and Woolf, 2005) (Figure 7). Les informations peuvent alors redescendre via les voies descendantes afin de moduler et de contrôler la douleur perçue. La modulation de la douleur se fait via trois mécanismes principaux : *(i)*

l'inhibition de la production de substances allogènes, **(ii)** l'inhibition du déclenchement et/ou de la propagation du signal nociceptif, et **(iii)** le contrôle des afférences douloureuses au niveau central mettant en jeu les voies des opioïdes endogènes et générant une réduction de la douleur (Willis, 1986; Julius and Basbaum, 2001; Volkow and Morales, 2015).

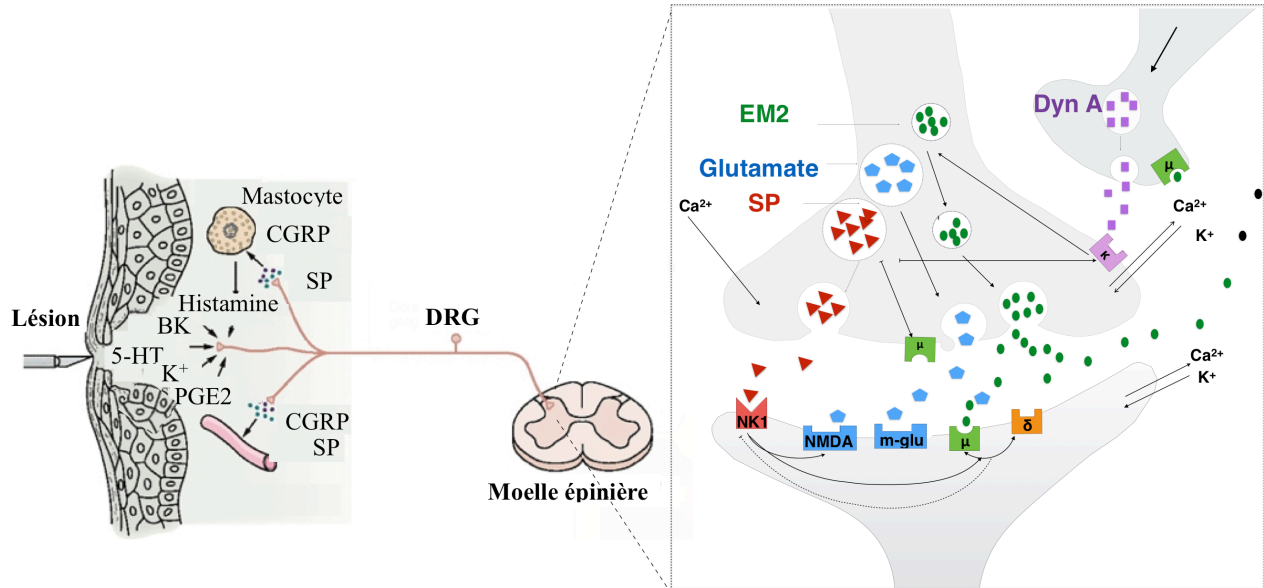


Figure 7. Schéma représentant l'hyperalgésie primaire et secondaire (Inspirée de Julius and Basbaum., 2001).

Une lésion de nature mécanique, thermique ou chimique produit une cascade d'évènements provoquant la libération de substances potentiellement nociceptives (ATP, H^+ , K^+ , 5-HT, BK, Histamine, prostaglandine) ainsi que la mise en jeu de nombreuses cellules immunitaires activées, tels que les macrophages et les cellules lymphocytaires. De même, différents neuropeptides (SP, CGRP) sont libérés en périphérie grâce au réflex d'axone ainsi les nocicepteurs se comportent comme des chémorécepteurs (Le Bars and Adam, 2002; Wang and Woolf, 2005). Cette fonction chémoréceptrice est essentielle pour engendrer les douleurs inflammatoires. À ce niveau on parle d'hyperalgésie primaire (sensibilisation périphérique au niveau de la lésion). Le message nociceptif est par la suite acheminé par les fibres nociceptives vers le ganglion spinal (DRG). À l'intérieur de la corne dorsale de la moelle épinière se produit un premier contact synaptique entre les fibres afférentes nociceptives et les neurones de projection. Ce premier contact synaptique est une étape clé dans la transmission et de la modulation de la douleur (Melzack and Wall, 1965). La transduction du message nociceptif implique des récepteurs / canaux qui répondent de façon sélective aux stimuli engendrés par les lésions tissulaires (Sherrington, 1906). Ceci active ainsi des canaux ioniques dépendants du voltage (Nav 1.6 - 1.9) (Waxman et al., 1999; Wood et al., 2004), permettant la génération et la propagation du potentiel d'action; l'ouverture de ces canaux permet l'augmentation de vitesse de migration des vésicules synaptiques. De même, des stimuli forts et persistants peuvent déclencher des changements dans l'expression des gènes dans les neurones afférents primaires grâce à l'activation de facteurs de transcription (Woolf and Salter, 2000). Ainsi, divers neuropeptides sont libérés à ce niveau afin d'acheminer le message nociceptif vers les centres supérieurs intégrateurs, à ce niveau on parle d'hyperalgésie secondaire (reflète une hyperexcitabilité centrale). La libération d'une multitude de protéines est augmentée dans les neurones afférents primaires en réponse à l'inflammation. Cette amplification de la réactivité du nocicepteur participe aux phénomènes cliniques de réduction du seuil nociceptif (allodynie) et d'amplification de la douleur après stimulation au-dessus du seuil nociceptif (hyperalgésie).

2.8. Propagation du signal nociceptif

La propagation du signal nociceptif se réalise grâce de nombreux canaux ioniques. Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires perméables à différents ions tels que le sodium (Na^{2+}), le potassium (K^+), le calcium (Ca^{2+}) ou le chlore (Cl^-). Ils peuvent être sélectifs pour un ion ou en laisser passer plusieurs à la fois. Ils existent différents canaux impliqués dans la nociception tels que les canaux ioniques dépendant du voltage Na_v , Ca_v , K_v (McCleskey and Gold, 1999; Catterall et al., 2003; Wood et al., 2004; Thibault, 2009; Nimmrich and Gross, 2012; Yin et al., 2016, Sun et al., 2016). Ce sont des acteurs extrêmement importants du système nerveux. En modulant le potentiel membranaire des cellules, ils produisent les signaux électriques des neurones, régulent la sécrétion de neurotransmetteurs ils convertissent les signaux chimiques en signaux électriques (Waxman et al., 1999). Les canaux ioniques permettent donc la conduction de l'influx nociceptif et participent aux mécanismes de douleur. Leur expression est en outre liée à la plasticité neuronale. Il existe des canaux ioniques ayant le rôle de récepteur, c'est à dire que la liaison du ligand sur le canal va entraîner l'ouverture de ce dernier et modifier la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions concernés, c'est le cas par exemple, des récepteurs NMDA associés aux glutamate (Klippenstein et al., 2017).

2.9. Modulation de douleur

L'information nociceptive est modulée à tous les niveaux du SNC (Melzack et Wall, 1965; Pomares, 2012). Cette modulation peut être excitatrice augmentant la réponse nociceptive ou inhibitrice produisant une analgésie (Millan, 2002). Les influences inhibitrices, se trouvent à divers niveaux du système nerveux central: spinal, tronc cérébral et cortical (Marchand, 2005; Moisset et al., 2016). De multiples mécanismes de contrôles périphériques, spinaux et centraux

modulent le message douloureux. Cette inhibition se fait principalement grâce à un contrôle spinal ou un contrôle supra-spinal.

2.9.1. Contrôle spinal inhibiteur

Le contrôle spinal consiste en un blocage pré et post- synaptique de la transmission des stimuli douloureux du protoneurone au deutoneurone (Woda and Pionchon, 2008; Jayr, 2010). Ce blocage est réalisé par l'intermédiaire d'un inter neurone inhibitrice. Ce système spécifique de modulation de l'information nociceptive a été proposé par Melzack and Wall (1965) avec la théorie du portillon (gâte-control). Ils supposent l'existence d'un inter-neurone inhibiteur dans la substance gélatineuse (SG) de la moelle épinière, excité par les petites fibres ($A\delta$ et C) et inhibé par les grosses fibres ($A\alpha$ et $A\beta$) (Figure 8), modulant ainsi la douleur (Melzack and Wall, 1965; Djouhri and Lawson, 2004; Marchand, 2009).

2.9.2. Contrôle supra-spinal

Le contrôle supra-spinal consiste en un blocage pré et post- synaptique de la transmission du stimulus douloureux du protoneurone au deutoneurone (Figure 8). À la différence du contrôle spinal, l'inhibition se fait via des fibres inhibitrices descendantes provenant de l'hypothalamus (Suzuki et al., 2004; Ossipov et al., 2010). Cette inhibition bloque la transmission spinale des messages nociceptifs. Contrairement à la théorie du portillon (gâte contrôle), le contrôle supra spinal avec la théorie du contrôles inhibiteurs diffus (Le Bars, 1979 a, b; Calvino et al., 2006), suppose que suite à des stimulations nociceptives se produit l'activation d'un système descendant mettant en jeu la substance grise périaqueducule, le noyau raphé magnus et les cornes postérieures de la moelle épinière (Basbaum et al., 1978; Fields and Heinricher, 1985; Labat et al.,

2010; Vuillet-A-Ciles and Billet, 2013). Selon ce modèle, une stimulation des fibres à petit diamètre déclenche, vers les neurones nociceptifs des couches I et V des cornes postérieures de la moelle, un système d'inhibition descendant issu de **(i)** la substance grise périaqueducale (SGPA) du mésencéphale; **(ii)** le noyau raphé, la formation réticulée, la zone du locus coeruleus de la protubérance et la région bulbaire rostro-ventrale qui comprend le noyau raphé magnus, le noyau para giganto-cellulaire et le noyau giganto-cellulaire; **(iii)** la corne dorsale de la moelle épinière (Fields and Basbaum, 1999). Plusieurs voies ainsi que plusieurs neuromédiateurs sont impliqués dans les mécanismes descendants. Une de ces voies partirait de la SGPA et passerait par le bulbe rachidien. Ainsi, les neurones de la SGPA stimuleraient les neurones de la région bulbaire rostro-ventrale qui enverraient des projections sérotoninergiques vers la moelle (Basbaum and Fields, 1984). De même, à partir de cette voie les fibres noradrénergiques sont activées (Ruda et al., 1986). Une autre voie partirait de la SGPA vers la moelle (Terman and Bonica, 2001). Ainsi, et contrairement au système de modulation proposé par la théorie du portillon, le contrôle inhibiteur diffus produit une inhibition descendante qui ne se limite plus à la région stimulée (Talbot et al., 1989). Selon cette théorie, la douleur ne serait pas uniquement déclenchée par des processus excitateurs, mais par la perception d'un contraste entre les activités de deux pools de neurones (Besson et al., 1982). Ce modèle explique bien l'inhibition généralisée de la douleur produite par des stimulations intenses. Ainsi, les douleurs persistantes peuvent surgir suite soit à une augmentation des afférences nociceptives, mais peuvent aussi résulter d'une baisse de l'inhibition ou d'une augmentation de l'excitation centrale. Ces mécanismes endogènes sont complexes et font appel à une large gamme de neurotransmetteurs dont plusieurs peptides, ont été identifiés. Parmi les neuromédiateurs impliqués dans les mécanismes descendants, la sérotonine, la noradrénaline et les opioïdes. La dopamine potentialise les effets anti-nociceptifs **(i)** des opioïdes (Zubieta et al., 2003) et **(ii)** de la sérotonine et/ou de la noradrénaline dans les voies inhibitrices

descendantes (Munro, 2007). La sérotonine, issue des neurones sérotoninergiques, agit directement sur les neurones de la corne dorsale pour les inhiber mais elle peut aussi être activatrice jouant un rôle important dans la dépression et l'augmentation de la perception de la douleur. Ainsi, les neurones sérotoninergiques agissent directement et de façon post-synaptique sur les cellules de la corne dorsale.

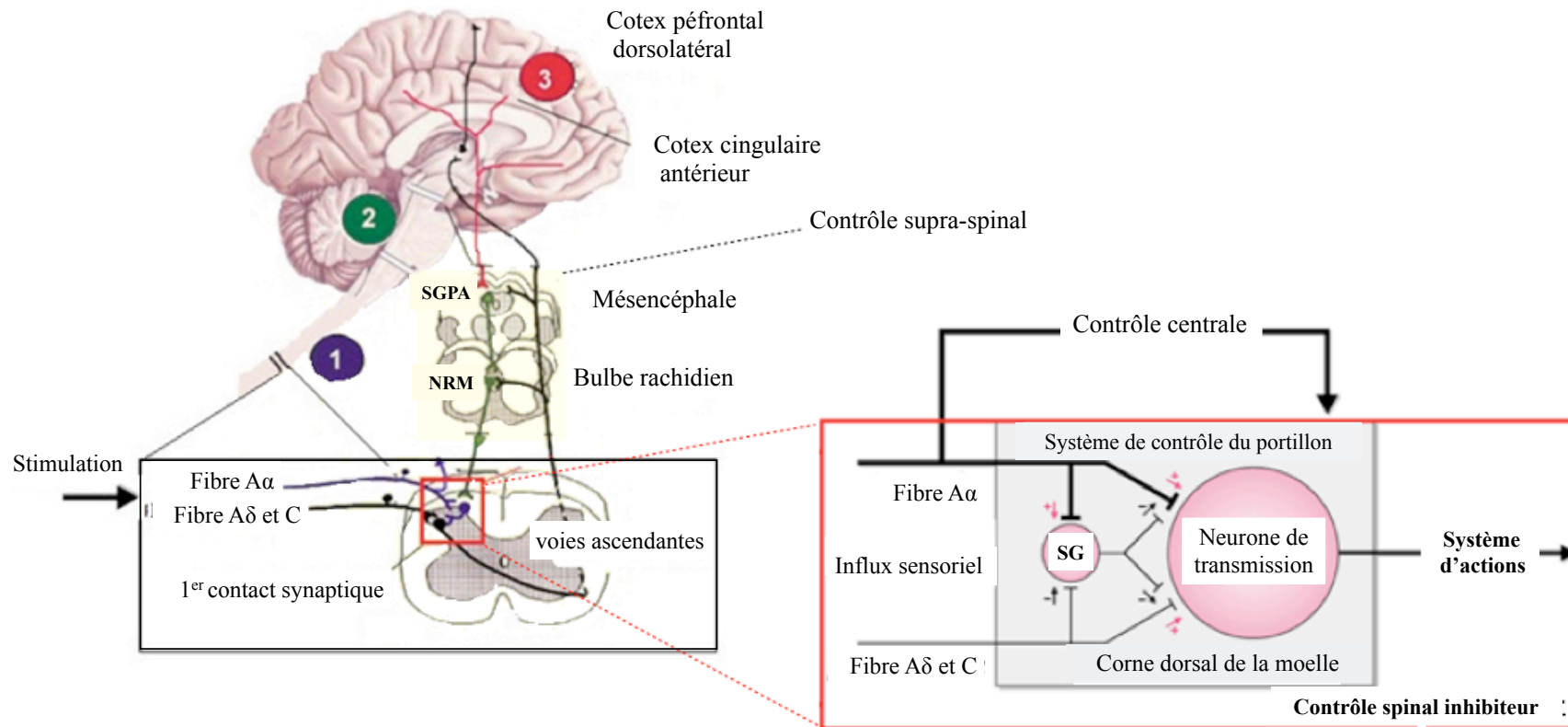


Figure 8. Représentation schématique des mécanismes de modulation de douleur : Contrôle spinal et supra-spinal (Inspirée de Melzack and Wall, 1965).

Tout au long de son trajet nerveux, le message nociceptif fait l'objet de modulations facilitatrices ou inhibitrices. Le contrôle inhibiteur de la modulation des messages douloureux s'effectue plus spécifiquement via trois mécanismes: **1) Contrôle médullaire** (théorie du portillon ou gâte contrôle) représenté par le carré rouge, En mauve: **Contrôle segmentaire** d'origine périphérique non douloureux. **2) Contrôle inhibiteur diffus** induit par des stimulations nociceptives représenté en vert et **3) Contrôle supra-spinal** exercé par les centres supérieurs du SNC associés à des facteurs psychologiques (Marchand, 2009) représenté en rouge. **SG:** Substance Gélatineuse, **NRM:** Noyau Raphé Magnus, **SGPA:** Substance Grise Périaqueducale.

2.10. Système opioïdes endogènes

Le système opioïde possède un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques, en particulier dans l'analgésie, la réponse au stress et la régulation du système de récompense (Froehlich, 1997; Mague and Blendy, 2010). Le système opioïde endogène est représenté par des peptides opioïdes et des récepteurs opioïdes largement distribués dans le SNC (Brownstein, 1993; Fields, 2004), ainsi, que dans plusieurs tissus périphériques (Payen, 2002; Millan, 2002; Kapitzke et al., 2005; Chauvin and Beaulieu, 2005).

Les peptides opioïdes endogènes sont synthétisés sous forme d'un grand précurseur biologiquement inactif au niveau du DRG, de l'hypophyse et de la glande surrénale. La protéine précurseur stockée au niveau des vésicules synaptiques nécessite un traitement enzymatique pour générer des peptides actifs (Hook et al., 2008). A la suite des stimuli nocifs, la synthèse et la libération de ces vésicules sont renforcées, conduisant à des effets de modulation de la douleur (Alberts et al., 2002).

2.10.1. Peptides opioïdes endogènes

Il existe quatre grandes familles de peptides opioïdes endogènes qui sont identifiées à ce jour, dérivant chacune d'un précurseur (Kieffer and Gavériaux, 2002; Siebenhuener et al., 2017; Parchman et al., 2017) (Tableau 2).

a) Famille des Enképhalines

Les enképhalines sont synthétisées à partir du gène *PENK* qui code pour la pré-pro-enképhaline composé de 267 acides aminés contenant six copies de met-enképhaline et une copie de leu-enképhaline (Rossier, 1988). Le clivage de la protéine précurseur est réalisé par les PC1 et PC2 (Breslin et al., 1993; Johannig et al., 1996). Les enképhalines sont des neurotransmetteurs inhibant les voies de la douleur durant une courte période d'action en agissant sur les récepteurs opioïdes (Kiguchi et al., 2008). La dégradation des enképhalines se fait par des amino-peptidases N (Irazusta et al., 2003) et des enképhalinases (Hersh, 1984).

b) Famille des Dynorphines

Les dynorphines sont synthétisées à partir du gène *PDYN* qui code pour un précurseur de 245 acides aminés, qui est clivé en l' α -néoendorphine, la β -néoendorphine, big-dynorphine, dynorphine A (Dyn A), dynorphine B (Dyn B) (Seizinger et al., 1984 ; Merg et al., 2006) et Leu-enképhaline (Leu-enk) (Orduna and Beaudry, 2016). L'hydrolyse du précurseur protéique de la pré-pro-Dynorphines se réalise principalement grâce à l'activité enzymatique des PC1 et PC2 (Perone and Castro, 1997). Les interneurons des pro-dynorphines sont localisées dans les terminaisons centrales des afférentes primaires de la lamina superficielle (Lai et al., 2006). Il a été suggéré que les dynorphines peuvent avoir à la fois des effets anti-nociceptifs ou pro-nociceptifs selon les concentrations physiologiques (Cesselin, 2002; Orsal, 2011). Également, il a été prouvé que la quantité d'ARN_m des pré-pro-dynorphines est sensiblement augmentée (Labombarda et al., 2008) suite à l'activation du système pro-nociceptif effectuant ainsi, une action anti-nociceptive. Tandis que pour des concentrations physiopathologiques élevées, ce système serait pro-nociceptif, en participant au maintien de la douleur neuropathique en induisant la libération d'acides aminés excitateurs, en activant les fibres C entraînant ainsi la libération du

CGRP et en agissant au niveau des récepteurs NMDA (Hauser et al., 1999 ; Tan-No et al., 2005; Kuzmin et al., 2006) menant ainsi au développement de l'hyperalgésie (Lai et al., 2006).

c) Famille des endomorphines

Les endomorphines 1 et 2 sécrétées par l'hypophyse et l'hypothalamus et le précurseur des endomorphines sont encore à ce jour méconnus. L'endomorphine-1 (EM1) est largement distribuée dans le cerveau (Schreff et al., 1998; Martin-Schild et al., 1999) tandis que l'endomorphine-2 (EM2) est localisée majoritairement dans la moelle épinière zone importante de transmission nociceptive (Martin-Schild et al., 1999; Pierce and Wessendorf, 2000 ; Fichna et al., 2007). L'EM2 est largement impliquée dans les mécanismes anti-nociceptives médiés par la Dyn A au niveau de la moelle épinière et ayant une fonction autorégulatrice importante sur la libération de Dyn A (Bodnar, 2008).

d) Famille des opio-mélanocortines

Les opio-mélanocortines sont synthétisés à partir du gène de la *POMC* qui code pour un précurseur de 267 acides aminés qui donne, après clivage, une copie de β -endorphine (Bloom et al., 1979), une copie d'adrénocorticotropine (ACTH) et plusieurs peptides stimulants les mélanocytes α -MSH, β -MSH et γ -MSH. Le clivage de la protéine précurseur est réalisé par les PC1 et PC2 (Breslin et al., 1993; Johanning et al., 1996).

2.10.2. Récepteurs opioïdes

Les différences structurales entre les peptides opioïdes confèrent à ces molécules des affinités différentes pour les trois sous-types de récepteurs opioïdiques μ ou « MOR » (morphine

opioïde receptor), δ ou « DOR » (delta opioïde receptor) (Evans et al., 1992; Kieffer and Gavériaux, 1992) et κ ou « KOR » (kappa opioïde receptor) (Snyder and Pasternak, 2003)(Tableau 3). Un quatrième récepteur opioïde, ORL1 (opioïde receptor like 1), a aussi été recensé mais il n'est pas toujours considéré comme possédant une action opioïdergique (Mollereau et al., 1994; Meunier et al., 1995). La structure des peptides opioïdes leurs confèrent des affinités différentes vis-à-vis de ces récepteurs. Ainsi, les enképhalines (met-enképhaline et leu-enképhaline) montrent une affinité pour les récepteurs δ (Bagheri, 2015), les Dynorphines (Dyn-A, Dyn-B ainsi que leurs métabolites) montrent une affinité pour les récepteurs κ (Rezaï, 2011) et les endorphines (EM2, EM1) manifestent une affinité préférentielle pour les récepteurs μ (Yu et al., 1999; Janecka et al., 2004). L'interaction des peptides opioïdes avec leurs récepteurs respectifs inhibent l'adénylate cyclase et donc le contenu intracellulaire d'AMP cyclique, inhibe l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique (Le Bars, 2010; Maarrawi and Garcia-Larrea, 2014). De même, l'interaction ligand-récepteur permet aussi l'ouverture des canaux potassiques entraînant une hyper polarisation cellulaire au niveau post-synaptique (Beaulieu, 2013).

Les récepteurs opioïdes appartiennent à la famille de récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, à 7 domaines transmembranaires (Mague and Blendy, 2010). Ces récepteurs sont abondants dans le cerveau, la corne dorsale de la moelle épinière (Zollner et Stein, 2007), la substance grise périaqueducale (PAG) et la médullo-rostro-ventrale (RVM) et au niveau des terminaisons périphériques des neurones afférents primaires (Stein et al., 2001). Les récepteurs opioïdes sont localisés à des endroits stratégiques pour effectuer un contrôle central et périphérique des voies de douleur. Ainsi, les opioïdes peuvent produire une analgésie par action à

trois niveaux différents de voies de la douleur : au niveau central, au niveau de la moelle épinière et en périphérie (Besson, 1999; Millan, 2002; Woolf, 2011).

a) Mécanisme d'action central

Au niveau du système nerveux central, les récepteurs opioïdes se retrouvent principalement au niveau de régions impliquées dans la transmission et la modulation du message nociceptif (Dickenson, 1995; Woolf, 2010). Un mécanisme majeur implique également l'activation des récepteurs opioïdes au niveau du mésencéphale, en particulier de la substance grise périaqueducale et des voies descendantes inhibitrices.

b) Mécanisme d'action spinal

Les récepteurs opioïdes sont trouvés en grande concentration au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Plus spécifiquement, au niveau du ganglion rachidien et de la corne dorsale de la moelle épinière (Arvidsson et al., 1995). La présence de ces récepteurs permet la modulation de la douleur, l'inhibition de la transmission des impulsions nociceptives à travers la moelle épinière par un mécanisme d'action principalement pré-synaptique mais également post-synaptique (Besse et al., 1990). L'EM2 est largement impliquée dans les mécanismes anti-nociceptives médiés par la Dyn A au niveau de la moelle épinière (Draisci et al., 1991). Comme montre la figure 9, la libération de la Dyn A à partir d'interneurones descendants et son interaction subséquente avec le KOR au niveau pré-synaptique, favorisent la production et la libération de l'EM2. L'EM2 libérée stimulent préférentiellement le récepteur MOR au niveau pré-synaptique et post-synaptique, conduisant à l'inhibition de l'expression membranaire des récepteurs pro-nociceptifs (ex., NK1, NMDA) et l'inhibition de neuropeptides pro-nociceptives (ex., SP, CRGP). Ainsi, l'EM-2 possède une fonction autorégulatrice importante sur la libération de la Dyn A et

sur l'excitabilité neuronale (Ohsawa et al., 2001; Sakurada et al., 2001; Mizoguchi et al., 2006; Fichna et al., 2007).

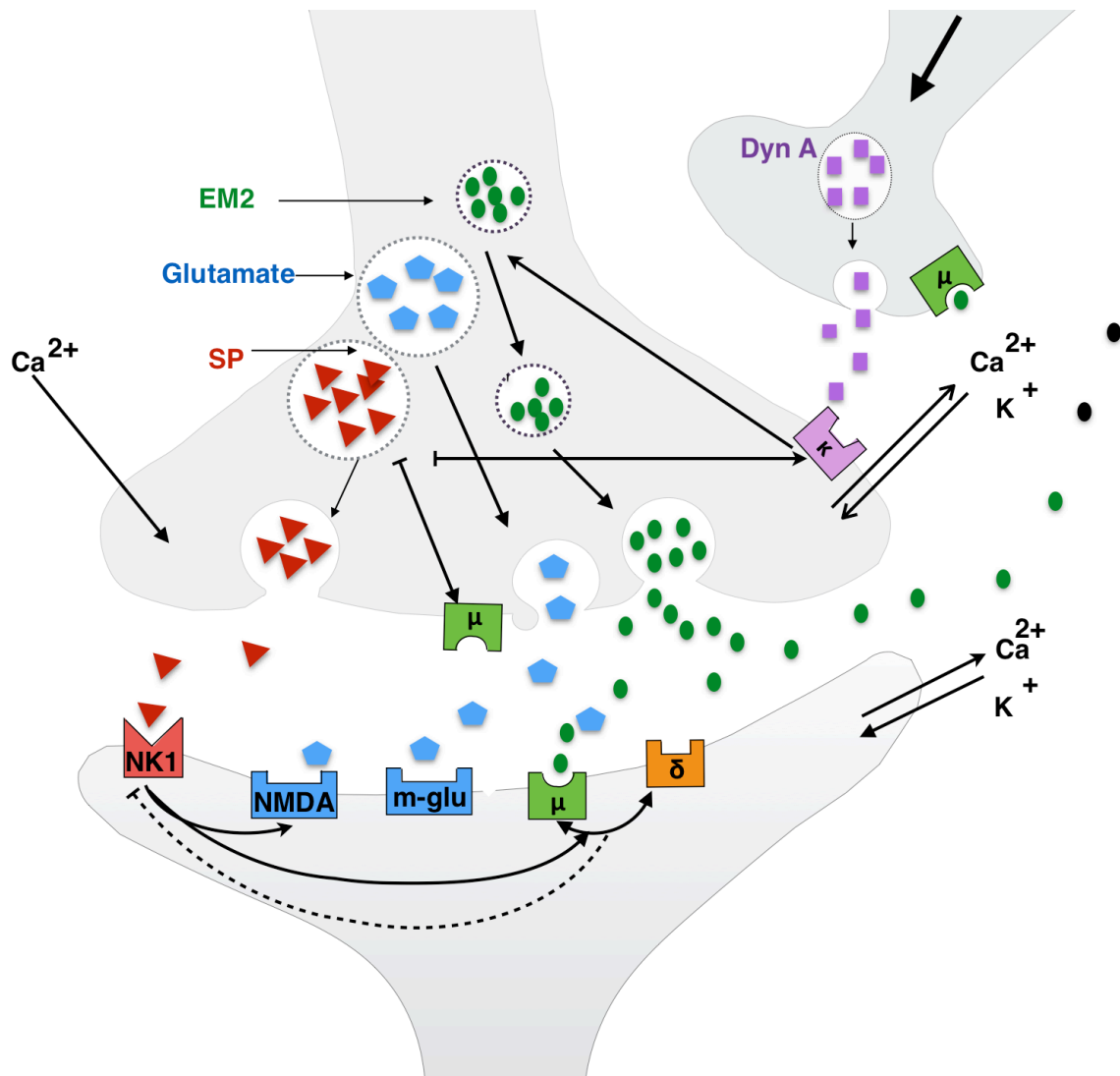


Figure 9. Représentation schématique du contrôle spinale de modulation de la douleur : Implication de la DynA et de l'EM-2.

L'activation du système de modulation de la douleur induit une surexpression des récepteurs opioïdes au niveau pré et post synaptique, une augmentation de la libération de Dyn A à partir des neurones de la voie descendante. Par conséquent, l'interaction entre la Dyn A et son récepteur κ est augmentée favorisant la libération de l'EM2. Une fois libéré l'EM2 interagit avec son récepteur μ au niveau pré et post synaptique inhibant ainsi la libération de neuropeptides pro-inflammatoires (tels que la SP, le Glutamate,...) et inhibant l'expression membranaire de leurs récepteurs respectifs.

c) Mécanisme d'action périphérique

Les récepteurs opioïdes se trouvent sur les terminaisons périphériques des neurones afférents primaires. Les opioïdes peuvent ainsi inhiber la libération, dépendante du calcium, de composés pro-nociceptifs et pro-inflammatoires (comme la SP) à partir des terminaisons sensibles des neurones périphériques (Price, 2001). Ainsi, pendant le processus inflammatoire, une augmentation du transport axonal des récepteurs opioïdes et une expression à la hausse de ces mêmes récepteurs sont observées au niveau des terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents primaires (Muthuraman et al., 2014). Par ailleurs, les ligands opioïdes endogènes sont présents au niveau des cellules immunitaires du tissu inflammatoire local (Walker 2003; Nalini Sehgal et al., 2011). Dans des conditions de stress ou lors de la libération de cytokines, les peptides opioïdes endogènes peuvent être libérés localement et être analgésiques (Schäfer et al., 1994). Les récepteurs opioïdes situés sur les cellules immunitaires peuvent supprimer l'activité des lymphocytes et également inhiber la synthèse ou la libération de cytokines (Vallejo et al., 2004). Les récepteurs κ seraient plus particulièrement impliqués dans ces effets. Toutefois, les récepteurs δ sont impliqués de façon modeste dans la douleur aiguë à ce niveau, par contre ils ont un rôle important à jouer dans des conditions inflammatoires et neuropathiques.

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes familles opioïdes, des précurseurs et des peptides de chaque famille ainsi que leurs structures et récepteurs respectifs

Famille	Gène	Précurseur	Peptide opioïde	Structure	Récepteur
Enképhaline	<i>PENK</i>	Pro-enképhaline	Met-enképhaline	YGGFM	δ
			Leu-enképhaline	YGGFL	
Dynorphine	<i>PDYN</i>	Pro-dynorphine	α -néoendorphine	YGGFLRKYPK	κ
			β -néoendorphine	YGGFLRKYP	
			Dynorphine A	YGGFLRRIRPKLK WDNQ	
			Dynorphine B	YGGFLRRQFKVVT	
			Leu-enképhaline	YGGFL	
Opiomélanocortine	<i>POMC</i>	Pro-opiomélanocortine	β _endorphine	YGGFMTSEKSQTP LVTLFKNAIKNAY KKGE	μ / δ
Endomorphine	?	?	EM1	YPWF	μ
			EM2	YPPF	

Tableau 3. Tableau récapitulatif des différents récepteurs, leurs localisations, fonctions et de leurs agonistes respectifs

Récepteurs	Fonctions	Affinité des peptides opioïdes endogènes
Mu (μ) Pré et poste synaptique	-Analgésie au niveau spinal et supra-spinal -Sédation -Propriétés euphorisantes -Propriétés dépressives respiratoires -Induction de la dépendance physique	β -endorphine > enképhaline > dynorphine
Delta (δ) essentiellement pré-synaptique	-Analgésie au niveau spinal et supra-spinal	Enképhaline >> β -endorphine et dynorphine
Kappa (κ) essentiellement pré-synaptique	-Analgésie au niveau spinal et supra-spinal -Activité hallucinogène -Sédation	Dynorphine >> β -endorphine et enképhaline

2.11. Douleur et stress

Le stress et la douleur sont des systèmes d'alerte indispensables à la conservation de l'intégrité de l'individu. Ils permettent de réagir efficacement face à un danger réel ou potentiel. Tous les rythmes biologiques, métaboliques, endocriniens, cellulaires, veille-sommeil, sont modulés par des afférences extérieures. Le système nerveux autonome est un système effecteur réagissant à un ensemble d'information d'origine périphérique ou centrale. Il est responsable des fonctions automatiques de l'organisme (digestion, rythme cardiaque, transpiration, ect.) (Mathias, 1999). Il comprend deux systèmes : les systèmes nerveux sympathique et parasympathique. Ces deux systèmes contrôlent l'activité des organes internes. Leurs fibres communiquent avec les cellules des muscles lisses (présents dans la paroi de nombreux organes), du muscle cardiaque, des glandes et des cellules du système immunitaire. Le système sympathique répond au stress en préparant l'organisme à l'action. Alors que, le système parasympathique amène un ralentissement général des fonctions de l'organisme. Devant un stress important, le système nerveux sympathique orchestre la réponse dite de combat ou de fuite (« fight or flight ») (Beaulieu, 2005). Il dilate les bronches, accélère l'activité cardiaque et respiratoire, augmente la tension artérielle, dilate les pupilles et augmente la transpiration, diminue l'activité digestive. Ce système est associé à l'activité de deux neurotransmetteurs : la noradrénaline et l'adrénaline.

L'association de signes sympathiques dysfonctionnels avec des situations de douleurs intense à été sujet de plusieurs recherche afin de comprendre le rôle du système nerveux sympathique dans la douleur.

Plusieurs études ont mesuré le seuil nociceptif suite à un stress, à l'aide de stimulations nociceptives électriques (Ben-Tovim et al., 1981; Adler and Gattaz 1993); thermiques (Hall and Stride, 1954; Otto et al.,1989) ou mécaniques (Stengel et al., 1955; Miczek ,1991; Croissandeau

et al., 2006). Elles notent une diminution du seuil nociceptif, une réponse de stress aiguë est suffisante pour inhiber le système de douleur. De même, plusieurs études animales ont montré que les mécanismes de régulation de douleur par le stress implique une combinaison de catécholamines (Bodnar et al., 1983; Butler and Finn, 2009) et d'opioïdes endogènes (Willer and al., 1981; Akil et al., 1986) qui modulent la réponse nociceptive des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière.

Cependant en présence de douleur chronique ou de lésions nerveuses, l'interaction entre le stress et la douleur se traduit par une augmentation à la sensibilité douloureuse (Gatchel et al., 2007; Turk, 2002; Andre et al., 2003). A la suite de lésions nerveuses, le ganglion rachidien devient également un site de décharges spontanées ou d'interactions entre fibres myélinisées et non myélinisées, de remodelage induit par les NGF. Ainsi, des troubles anxieux, tels les états de stress post-traumatique, les attaques de panique, l'anxiété généralisée, coexistent avec une très forte prévalence avec certains types de douleurs chroniques (fibromyalgie, syndrome du colon irritable, etc.) (Farthing, 1995; Blomhoff, 2001). La douleur chronique représente une menace constante où l'incertitude et le manque de control face à la situation modifient le niveau d'activité métabolique de l'organisme afin de s'adapter à la situation. À long terme, la réponse de stress peut devenir inadaptée et induire une série de modifications physiopathologiques (McEwen, 1998b). Un tel état, qualifié de «charge allostatique», pourrait potentiellement contribuer au déclenchement, l'amplification et à la persistance de la douleur chronique (Borsook et al., 2012).

2.12. Génétique et epi-génétique de douleur

Les organismes vivants ne sont pas tous égaux face à la douleur, la sensibilité nociceptive, les réponses anti nociceptives et anti-inflammatoires (Huskisson et al., 1976 ; Scott et al, 1982 , Bellamy, 1985 , Day et al ., 1988 ; Walker et al., 1994). Certains sont plus prédisposés à développer des douleurs chroniques, du stress ou des dépressions tandis que d'autres semblent y être résistants.

Les facteurs génétiques, environnementaux et épi-génétiques peuvent définir ces variabilités (Bateson, 1991, Crabbe et al., 1999). Pour mieux comprendre les mécanismes d'héritabilité, des modèles animaux sont utilisés dans l'étude des mécanismes héréditaires de douleur et d'analgésie. Les modèles animaux offrent un bon contrôle sur le génotype, l'histoire antérieure, l'environnement. Le choix judicieux du modèle animal peut maximiser le rendement des expériences et permet des comparaisons judicieuses des expériences. Il existe plusieurs méthodes et modèles animaux utilisés pour déterminer si un trait est héréditaire (Berge, 2011). L'élevage sélectif de souris est une méthode pour démontrer que les facteurs génétiques contribuent à un trait de douleur. Plusieurs exemples de sélection sélective de traits de douleur existent dans la littérature, y compris des programmes de douleur neuropathique, et une analgésie induite par le médicament et le stress (DeGrazia, and Rowan, 1991).

De même, les facteurs environnementaux et épi-génétiques peuvent avoir un impact significatif sur l'établissement d'un état douloureux (Tajerian et al., 2013; Vachon et al., 2013 ; Bai et al., 2015). Les modifications épi-génétiques sont l'interface entre l'environnement et la génétique, créant un mécanisme par lequel les expériences de vie (ex., douleur chronique, stress, anxiété, lésion nerveuse..) conduisent à des changements durables dans l'expression des gènes d'une manière dynamique et réversible. Les mécanismes de régulation épi-génétiques n'affectent pas la séquence de l'ADN. Ils comprennent les ARN non codants, la méthylation de l'ADN, et les

modifications post-traductionnelles (Greiner, 2012). L'ensemble de ces modifications induit une répression ou une surexpression des gènes. Le contrôle de l'expression des gènes joue également un rôle prépondérant dans le développement et le maintien des douleurs chroniques. En effet, des variations du niveau d'expression de certaines protéines ou certains ARNm dans les systèmes nerveux central ou périphérique ont été mises en évidence dans différents modèles de douleurs neuropathiques ou inflammatoires.

Étant donné que les facteurs environnementaux peuvent interagir avec les gènes, les expériences établies dans des laboratoires sont généralement supposées être « contrôlée », avec peu d'impact sur les résultats. Cependant, de nombreux facteurs varient entre les différents laboratoires (l'expérimentateur, la saison, l'humidité, la densité de la cage, le temps de la journée, le sexe et l'ordre des tests au sein de la cage) (Chesler et al., 2002). Pour cela, des chercheurs ont évalué une approche de calcul pour identifier le taux de variabilité des réponses nociceptives (Chesler et al., 2002). Ils concluent que, bien que la génétique a un impact non négligeable (18%), les conditions environnementales s'avèrent d'une importance majeure (42%) et l'impacte de la génétique et de l'environnement unis est de 18 % (Chesler et al., 2002)

Ainsi, l'ensemble des facteurs environnementaux et épi-génétiques peut avoir un impact significatif sur l'établissement d'un état douloureux (Vachon et al., 2013).

Chapitre 3 : Tachykinines

Les tachykinines sont une grande famille de neuropeptide découverte chez les amphibiens et les mammifères (Yankner, et al. 1990, Thibault, 2009). Elles comprennent une série de peptides structurellement apparentée caractérisée par une séquence carboxyle terminale commune : **GLM-NH₂** qui est nécessaire pour l'activation des récepteurs NKR (Tableau 4). Les principales tachykinines de mammifères sont la SP (Studer et al., 1973), le NKA, le NKB et le NPY (Kangawa et al., 1983; Kimura et al., 1983) qui découlent essentiellement de deux gènes *Tac*. Les tachykinines interagissent avec trois types des récepteurs couplés à une protéine G le NK1, le NK2 et le NK3 (Saffroy et al., 1987). Cependant, il existe un phénomène de réactivité croisée dû à la séquence carboxyle terminale commune à tous les membres de la famille des tachykinines. Les tachykinines participent à de différents processus physiologiques dans le SNC (nociception) ainsi que périphérique (respiratoires, gastro-intestinaux, immunitaire, génito-urinaires, l'inflammation...) (Lecci and Maggi, 2003; Improta and Broccardo, 2006; Guo et al., 2014). De même, Ils contribuent à plusieurs pathologies, telles que les inflammations aiguës et chroniques, la douleur, la fibrose et les troubles de l'humeur (Steinhoff et al., 2014). Les tachykinines sont reconnues par leur capacité de stimulation rapide par comparaison à la BK à action plus lente (Geppetti, 1993). Principalement trois gènes codent les tachykinines: *Tac1*, *Tac3*, et *Tac4*. Le gène *Tac1* code pour la SP, la NKA, la NPK, et la NPY. Le gène *Tac3* ne code que pour la NKB (Tableau 4). Alors que le gène *Tac4* code pour le HK-1, le EKA, le EKB, le CCE, et le EKD (Carter and Krause, 1990; Maggi, 1995; Harrison and Geppetti, 2001).

Tableau 4. Tableau récapitulatif des produits des gènes *Tac1* et *Tac2* ainsi que leur séquences (Steinhoff et al., 2014)

Gène	Produits du gène	Séquence
<i>Tac1</i>	SP	RPKPQQFFGLM-NH2
	NKA	HKTDSFVGLM-NH2
	NPK	DADSSIEKQVALLKAKYGHGQISHKRHKTDSFVGLM-NH2
	NPY	DAGHGQISHKRHKTDSFVGLM-NH2
<i>Tac2</i>	NKB	DMHDFVGLM-NH2

La séquence C-terminale commune est présentée en rouge

3. 1. Tachykinines : peptides et gènes

3.1.1. Le gène *Tac1*

Le gène *Tac1* code pour trois types d'ARN_m selon l'épissage alternatif : ARN_m α-Tac1, β-Tac1, et γ-Tac1. L'ARN_m α-Tac1 et δ-Tac1 codent uniquement pour la SP. À la différence, l'ARN_m β-Tac1 code à la fois pour la SP, la NKA et la NPK. Également, l'ARN_m γ-Tac1 code pour la SP, la NKA et la NPY (Figure 10). Dans le SNC, le niveau d'ARN_m α-Tac1 est de deux à trois fois plus élevé que l'ARN_m β-Tac1, tandis que dans les tissus périphériques cette relation est inversée et le niveau de l'ARN_m β-Tac1 est de 7 à 100 fois plus élevé que α-Tac1 (Shimizu et al., 2008)

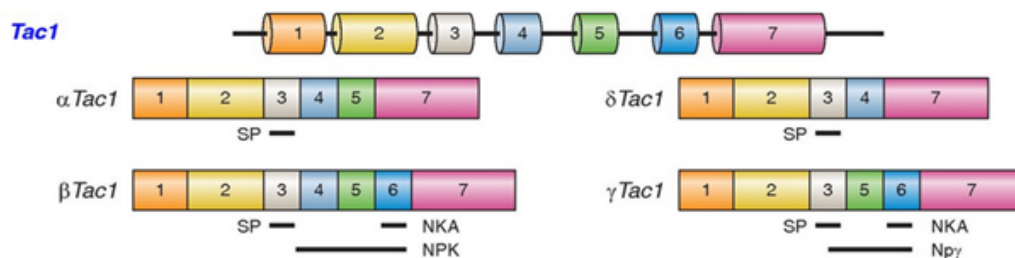


Figure 10. Schéma de la structure du gène *Tac1* et épissage alternatif de l'ARN_m (Modifiée de Shimizu et al., 2008).

Les peptides produits après clivage des pré-pro-tachykinines correspondantes sont indiqués par les barres noires horizontales situées au-dessous des structures d'ARN_m.

3.1.1.1. Substance P

La substance P (SP), un peptide de 11 AA : RPKPQQFFGLM(NH₂) qui peut provenir de la traduction des quatre types d'ARN_m (α , β , γ , δ) codées par le gène *Tac1*. La SP agit principalement (mais non exclusivement) par l'intermédiaire du récepteur NK1 (Burrell, 2017). Ainsi, la SP peut interagir avec moins d'affinité avec le NK2 et le NK3 (Tableau 5) vu la séquence carboxylique terminale provoquant une réactivité croisée (Maggi, 1997). La SP est omniprésente dans les systèmes nerveux central et périphérique de mammifères (Tableau 6). Ainsi, elle participe à de différents processus physiologiques au niveau central tel que la transmission de la douleur au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. De même, la SP est associée à la régulation des troubles de l'humeur, de l'anxiété, de la dépression (Geraciotti et al., 2006), de l'asthme (Ramalho et al., 2013), du syndrome d'irritation du côlon, du rythme respiratoire, des nausées et de la douleur (Joos et al., 2000).

La SP agit aussi au niveau périphérique par un phénomène nommé réflexe d'axone. En effet, suite à une lésion périphérique la SP est libérée au niveau du site de lésion où elle provoque une forte vasodilatation induisant la libération de différentes substances (BK, histamine, sérotonine...) et la dégranulation des mastocytes. Ainsi, la SP est reconnue comme un pro-inflammatoire puissant (Chakraborty et al., 2011) favorisant la libération **(i)** des cytokines pro-inflammatoires, tel que l'interleukine IL-6 et IL-8 (Serra et al., 1994), **(ii)** de facteur de nécrose (TNF- α) (Ansel et al., 1993; Cocchiara et al., 1999), **(iii)** l'expression et la production de la cyclo-oxygénase-2 et de la prostaglandine (PGE₂). Cinquante pour cent de la SP sont localisés au niveau des fibres C et seulement 20% au niveau des fibres A δ . Tandis que la SP n'existe pas au niveau des fibres A α et A β .

Tableau 5. Affinité entre les récepteurs NK1, NK2 et NK3 et les peptides SP, NKA et NKB

Récepteur/Peptide	SP	NKA	NKB
NK1	+++	++	+
NK2	+	+++	++
NK3	+	++	+++

3.1.1.2. Neurokinine A

La neurokinine A (NKA) est un peptide de 10 AA : HKTDSFVGLM(NH₂) qui provient principalement de la traduction de l'ARN_m β Tac1 et en second lieu de l'ARN_m γ Tac1 (Klassert et al., 2010). Le NKA a une séquence C-terminale commune avec le NPK. La NKA est omniprésente dans les systèmes nerveux central (Calvino, 1998) et périphérique de mammifères (Schierhorn et al., 2002; Pennefather et al., 2004) (Tableau 7), et semble être impliquée dans les réactions de la douleur et les réactions inflammatoires (Otsuka and Yoshioka, 1993). La NKA agit principalement par l'intermédiaire du récepteur NK2 mais peut se lier également à NK1 avec moins d'affinité (Tableau 4).

3.1.1.3. NPK

Le NPK est un peptide de 36 acides aminés (Tableau 4), provient uniquement de la traduction de l'ARN_m codées par le β-Tac1 (Karlsson, 2004). La séquence du NPK inclus celle du NKA pouvant ainsi être le précurseur de NKA. Le NPK a été d'abord isolé dans des cerveaux porcins (Tatemoto et al., 1985), et semble être distribué différemment dans le SNC du rat (Arai and Emson., 1986 ; Valentino et al., 1986). Le NPK est aussi un peptide biologiquement actif, il

stimule la contraction de la vésicule biliaire, l'extravasation du plasma et possède un effet sur la bronchoconstriction et sur la pression artérielle systémique (Tatemoto et al., 1985; Arai and Emson, 1986; Valentino et al., 1986). Le NPK exprimé par les fibres C nociceptives agit sur le récepteur NK1, mais avec moins d'affinité que celle pour la SP (Takeda and Krause, 1989), ainsi qu'une activité biologique différente de celle de la SP ou du NKA (Martling et al., 1987).

3.1.2. Le gène *Tac3*

Le gène *Tac3* code pour 2 types d'ARN_m α et β mais les deux donnent naissance à une seule tachykinine qui est le neuromédine K (NKB) (Kotani et al., 1986; Krause et al., 1987; Page et al., 2000) (Figure 11). Ces ARN_m sont localisés dans l'hypothalamus et les intestins de mammifère (Kotani et al., 1986).

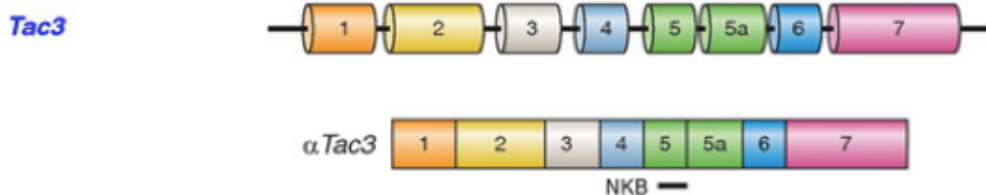


Figure 11. Schéma de la structure du gène *Tac3* et épissage de l'ARN_m (Shimizu et al., 2008). Les peptides produits sont indiqués par les barres en noire horizontales au-dessous des structures d'ARN_m.

3.1.2.1. NKB

La NKB est un peptide de 10 acides aminés (Tableau 4), localisée au niveau du SNC (Kangawa et al., 1983; Moussaoui et al., 1992; Goubillon et al., 2000; Patacchini et al., 2000). Le NKB est aussi un peptide biologiquement actif impliquée dans la régulation endocrinienne de la reproduction tel que la libération de gonadotrophines (GnRH) chez les mammifères (Topaloglu et

al., 2009). Le NKB agit sur les récepteurs NK1, NK2 et NK3, avec plus d'affinité vis-à-vis du NK3. Ainsi, il transmet l'information au niveau des SNC et SNP en induisant l'expression du gène *c-fos* (Spitznagel et al., 2001).

3.2. Biosynthèse des tachykinines

La biosynthèse des tachykinines se fait par le système ribosomal, où le gène *Tac1* code pour trois ARN_m qui sont α , β , γ . Ces trois ARN_m traduites donnent une protéine non active nommée pré-pro-tachykinines. Cette protéine précurseur nécessite des clivages enzymatiques pour donner les peptides actifs (Douglas and Leeman, 2011). Ainsi, l' α -pré-pro-tachykinines et la δ -pré-pro-tachykinines donneront uniquement la SP, tandis que le β pré-pro-tachykinines donnera la SP, la NKA et la NPK. Cependant, le γ pré-pro-tachykinines code pour la SP, la NKA et la NPY (Figure 10). Le gène *Tac3* code pour 2 types d'ARN_m α et β . Ces deux ARN_m seront traduites en α pré-pro-tachykinines et β pré-pro-tachykinines. Ces pré-pro-tachykinines clivées donnent une seule tachykinine c'est le neuromédine K (NKB) (Figure 11).

3.3. Stockage

Dès la traduction des ARN_m des gènes *Tac1* et *Tac3*, les pré-pro-tachykinines sont stockés dans des vésicules synaptiques. Ces vésicules contiennent un ensemble de protéases avec les pré-pro-tachykinines inactifs (Severini et al., 2002; Hook et al., 2008). Ainsi, au cours du transport axonale, ces tachykinines subissent une maturation enzymatique. En conséquence, les tachykinines produites dans le corps cellulaire du neurone initialement inactif, sont transportées sous forme de vésicules vers les terminaisons axonales pour être ensuite libérées sous leurs formes actives (Hook et al., 2008) (Figure 12).

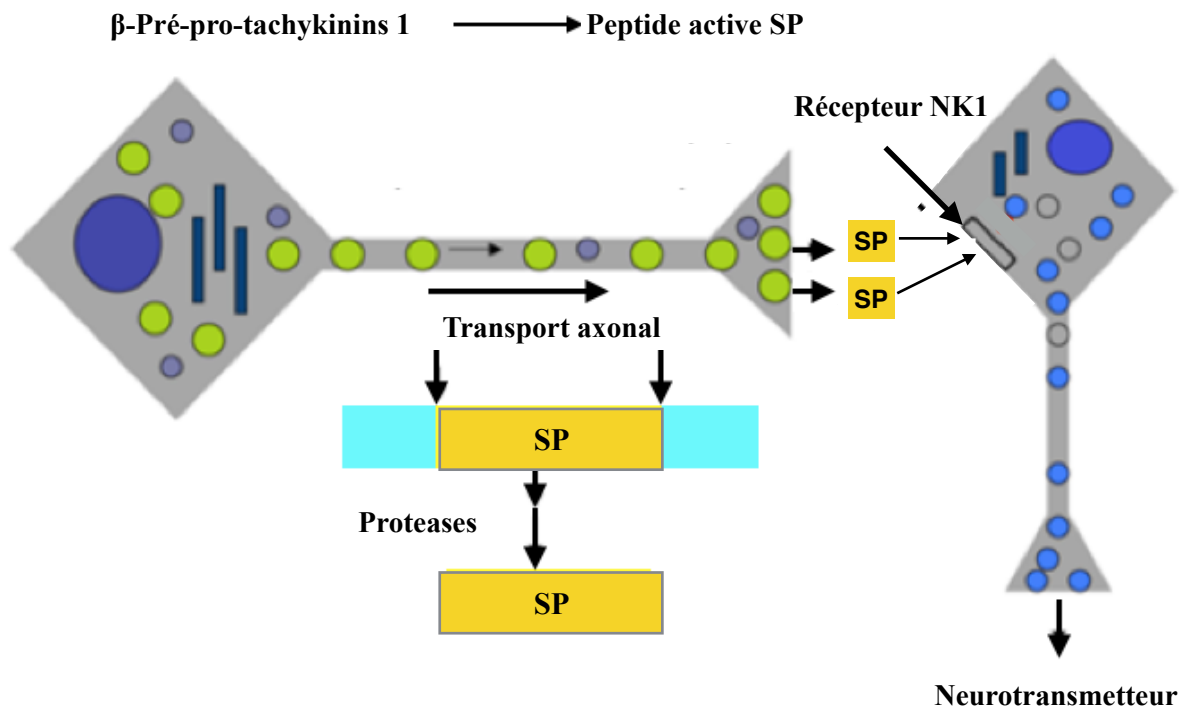


Figure 12. Schéma récapitulant la voie de synthèse des tachykinines ainsi que leur transport axonal (Modifiée de Hook et al., 2008).

3.4. Maturation et clivage enzymatique

Les pré-pro-tachykinines subissent des clivages enzymatiques pour devenir actives. Ces protéases peuvent être des endo-protéases telle que la cathepsine L appartenant à la famille des cystéine-protéases. De même, les PCs appartenant à la famille de *subtilisine-like calcium-dépendante* (PC1 et PC2) peuvent être d'une importance majeure dans le processus de maturation des tachykinins (Figure 13). La cathepsine L clive préférentiellement du côté N-terminal au niveau des sites dibasiques tandis que PC1 et PC2 clivent préférentiellement du côté C-terminal au niveau d'une séquence d'AA mono ou dibasique KR, RR, et RK (Chrétien and Mbikay, 2016) mais pas lorsqu'ils sont suivis d'une proline (Cromlish et al., 1985; Friedrichs et al., 2003; Yasothornsrikul et al., 2003). L'action de la cathepsine L et des PCs, conduit à des intermédiaires peptidiques avec des extensions de résidus dibasiques à leur extrémité N- et C-terminale. Ces

résidus basiques sont éliminés par des exopeptidases tel que l'Arg/Lys amino-peptidases qui clive du côté N-terminal et la carboxypeptidase E qui est relativement abondante au niveau du SNC et qui clive du côté C-terminal des proneuropeptides (Figure 14).

3.5. Libération

Les vésicules à cœur dense et à cœur clair contenant les tachykinines migrent en permanence du corps cellulaire du neurone vers les terminaisons nerveuses centrales et périphériques où elles vont fusionner avec la membrane synaptique et libérer leur contenu dans la fente synaptique. Ainsi, ils vont rencontrer leurs récepteurs respectifs au niveau de la membrane post synaptique. Mais, suite à une stimulation intense le flux massif de Ca^{2+} augmente la vitesse de migration de ces vésicules d'où augmentation du taux de synthèse et de libération des tachykinines (SP, NKA).

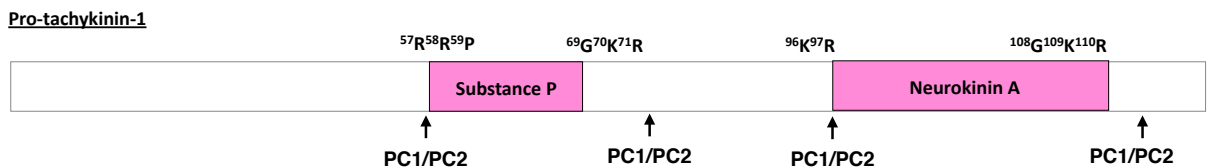


Figure 13. Implication probable de PC1 et PC2 dans la maturation des tachykinines.

La séquence primaire de la protéine précurseur de tachykinines (pro-tachykinine 1) montre divers sites mono et dibasique. Vu que PC1 et PC2 clivent préférentiellement du côté C-terminal au niveau d'une séquence d'acide aminée mono ou dibasique (KR), (RR), et (RK) (Chrétien and Mbikay, 2016) mais pas lorsqu'ils sont suivis d'une proline (Cromlish et al., 1985; Friedrichs et al., 2003; Yasothornsrikul et al., 2003). Ainsi, PC1 et PC2 peuvent cliver la pro-tachykinine 1 et générer des intermédiaires peptidiques avec des extensions de résidus dibasiques. Ces résidus basiques sont éliminés par des exopeptidases telle que la carboxypeptidase E afin de générer la SP et le NKA.

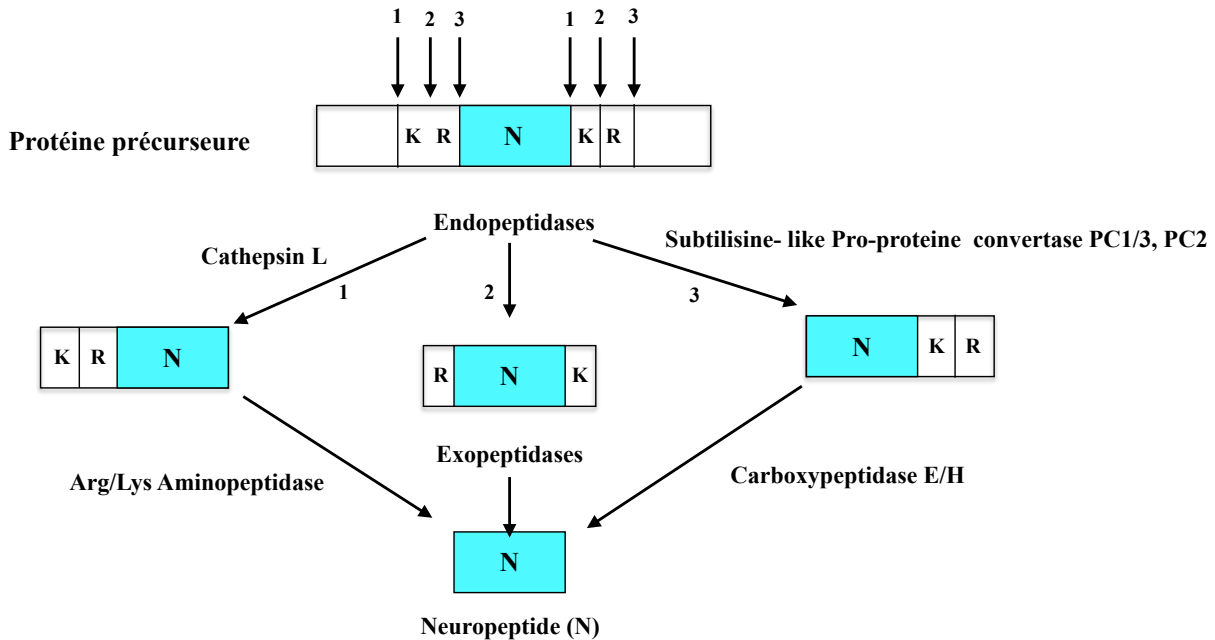


Figure 14. Représentation des sites de clivage enzymatique des proneuropeptides par la voie de cysteines proteases et de la subtilisine like protease (Hook et al., 2008).

Présentation de la voie de la cystéine protéase : **(1)** la cathepsine L clive au niveau du site mono ou dibasique (K, R) du côté N-terminal suivie de l'action de l'amino-peptidase afin d'éliminer les résidus basiques du côté N-terminal **(2)** la voie de la subtilisine-like qui clive les pro-neuropeptides au niveau de site mono ou dibasique (K, R) du côté C-terminal suivie de l'action de la carboxypeptidase afin d'éliminer les résidus basiques du côté C-terminal.

3.6. Régulation

Dès leur libération, les tachykinines peuvent être attaquées, clivées, et inactivées par de nombreuses enzymes qui agissent à différente intensité selon les membres de la famille des tachykinines. Le plus vulnérable aux clivages enzymatiques est la SP (Mitchell et al., 2013). Dans la voie de dégradation métabolique de la SP plusieurs enzymes semblent avoir un rôle essentiel tels que le dipeptidyl-amino peptidase (Snijdelaar et al., 2000 ; Grouzmann et al., 2002), le post-proline endo-peptidase (Blumberg et al., 1980), la cathepsine D, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), une endo-peptidase neutre 24.11 (NEP) (Nadel, 1991), et une enzyme de dégradation de la SP (SPDE) (Lee et al., 1981) (Tableau 6). Le clivage de la SP produit

plusieurs types de fragment N-terminaux et C-terminaux (Mitchell et al., 2013). Il est connu que les fragments C-terminaux de la SP jouent un rôle important dans l'effet pro-nociceptif favorisant la libération des acides aminés excitateurs (Skilling et al., 1990; Pailleux et al., 2013), c'est le cas des fragments C-terminaux SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ et SP₈₋₁₁. Les fragments C-terminaux de la SP ont des affinités de liaisons distinctes avec le récepteur NK1 (Vasiliou et al., 2007; Mistrova et al., 2016). Tandis que les fragments N-terminaux perdent leurs affinités vis-à-vis de NK1 causant une perte de leur rôle nociceptif, c'est le cas du fragment N-terminal SP₁₋₇ produit du clivage de la SP au niveau du F⁷-F⁸ par des metallopeptidases et des endopeptidase neutre 24-11 (Hall et al., 1989). La SP₁₋₇ a des activités anti-nociceptives démontrées suite au test plaque chaude (hot-plate-test). Tout de même, la NKA est clivée par divers peptidases générant divers fragments N et C terminaux. Il est connu que l'ACE et l'endopeptidase neutre 24.11 clivent la NKA pour donner la NKA₄₋₁₀. Il a été démontré que le clivage de NKA en NKA₄₋₁₁ se produit surtout en périphérie, ainsi le NKA₄₋₁₁ est d'une importance majeure au niveau de l'inflammation neurogénique (Henry, 2004; Couture et al., 2012).

Il a été prouvé que les fragments C-terminaux de la SP, de la NKA et de la NKB gardent leurs affinités vis-à-vis des récepteurs NK1, NK2 et NK3. Mais, les fragments N-terminaux n'interagissent pas avec les NKR. Ceci suggère que la partie C-terminale est essentielle pour l'action des tachykinines sur les récepteurs NK1, NK2 et NK3. Ainsi, la concentration des métabolites C-terminaux des tachykinines affectera de façon inhérente les mécanismes de transmission de la douleur, y compris les actions pro-nociceptives et anti-nociceptives (Pailleux et al., 2013). Par conséquent, la protéolyse des tachykinines est d'une importance majeure lors du développement de l'hyperalgésie secondaire.

Tableau 6. Tableau récapitulatif des enzymes clivants la SP en relation avec la stabilité métabolique (Karlsson, 2004)

Enzyme	Site de clivage	Référence
Angiotensine converting enzyme	Gly-Leu	Skidgel et al., 1987 Lantz et al., 1991
Dipeptidyl peptidase	Pro-X X-Arg/ X-Lys	Demuth et al., 1993 Yaron and Naider, 1993 Watanabe et al., 1993
Endopeptidase neutre 24.11	Phe-Phe	Matsas et al. 1983 Presson et al., 1995
SP endopeptidase (SPE)	Phe-Phe Phe-Gly	Nyberg et al., 1984 Persson et al., 1995 Karlsson et al., 1997

3.7. Récepteurs des tachykinines

Les tachykinines interagissent avec trois types des récepteurs couplés à une protéine G, NK1, NK2 et NK3 (Saffroy et al., 1987; Grady et al., 1996, Nakanishi et al., 2013). Mais, un phénomène de réactivité croisée se présente qui est dû à la séquence carboxyle terminale commune à tous les membres de la famille des tachykinines (Pennefather et al., 2004). Ainsi, la SP possède une affinité maximale avec le NK1, la NKA a une affinité maximale avec le NK2 et le NKB avec le NK3 (Tableau 4).

3.7.1. Structure des récepteurs des tachykinines

Les NKR appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G. Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires hydrophobiques couplés à une protéine G-GTP

(Figure 15). Cette structure permet la détection des molécules à l'extérieur de la cellule et le déclenchement d'une cascade de réaction intracellulaire provoquant la signalisation cellulaire (Steinhoff et al., 2014).

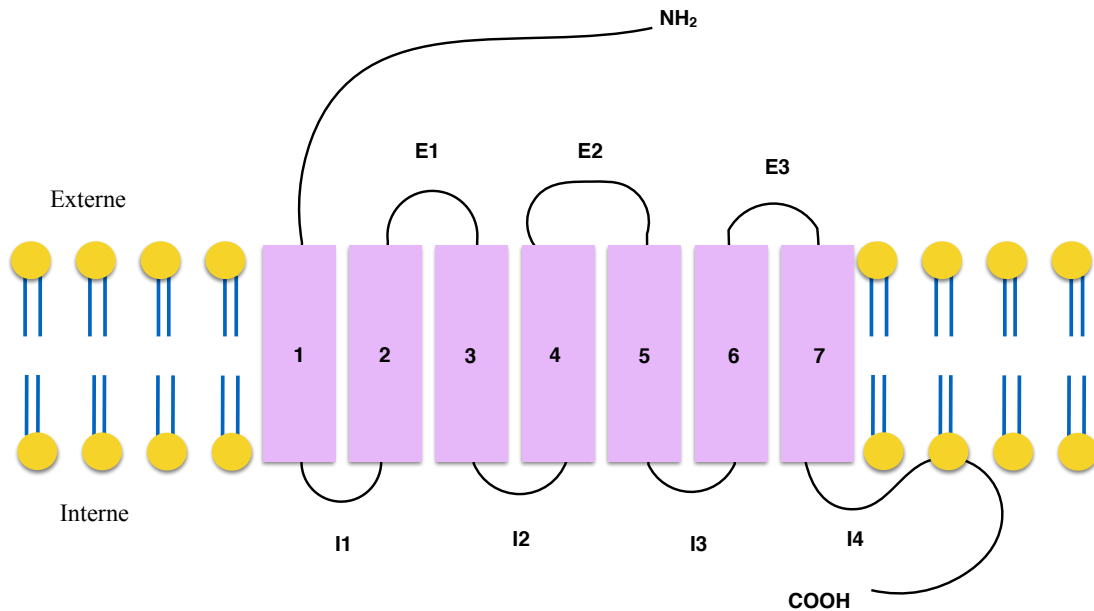


Figure 15. Représentation de la structure des récepteurs couplés à une protéine G (Cas de NK1R). Les récepteurs couplés à une protéine G présentent une structure commune à sept hélices alpha transmembranaires : L'extrémité N-terminale de la protéine est extracellulaire. L'extrémité C-terminale est intracellulaire. On peut observer 3 boucles extracellulaires (E₁, E₂ et E₃) et 3 boucles intracellulaires (I₁, I₂ et I₃). Ces protéines peuvent être sujettes à des modifications post-traductionnelles, de type N-glycosylation, acylation formant parfois une pseudo-quatrième boucle intracellulaire (I₄). L'activation d'un récepteur couplé aux protéines-G, par son ligand, entraîne un remaniement de la structure du récepteur, qui devient capable d'activer des protéines-G intracellulaires. Ces protéines-G activent à leur tour toute une série d'effecteurs intracellulaires (enzymes, canaux ioniques, transporteurs...), membranaires ou bien cytosoliques. Ces effecteurs permettent la plupart du temps, la modulation de la concentration intracellulaires de messagers secondaires (second messagers) tels l'AMPc, l'IP₃, le calcium, les diacylglycérols ou DAG...)

3.7.2. Distribution

Les résultats d'autoradiographie visant les récepteurs des tachykinines montrent que les sites de liaison des tachykinines sont principalement situés sur la membrane post-synaptique des neurones spinaux (Helke et al., 1986; Dubois, 2010). Les récepteurs NK1 sont présents dans le SNC et périphérique, tandis que les récepteurs NK2 sont localisés au niveau du SNP. Les récepteurs NK3

sont présents à la fois au niveau du SNC et du SNP mais à un niveau plus élevé au niveau du SNC (Tableau 7). Il semble qu'il existe une bonne corrélation entre la localisation du récepteur et son ligand respectif dans certaine région et non dans d'autre c'est le cas du NKA qui est considérablement présent dans le SNC tandis que ses récepteurs NK2 n'y sont pas présents.

3.8. Signalisation

Au repos la protéine G couplée au récepteur NKR est constituée de 3 sous unités protéiques (α , β et γ). L'interaction du ligand (SP, NKA, NKB) à son récepteur NKR (NK1, NK2, NK3) produit un changement de conformation de la protéine G (Sauliere, 2007). Ce changement de conformation correspond à une activation qui consiste en une hydrolyse du GDP en GTP. Une fois la protéine G est activée la sous unité α se dissocie de la protéine G tandis que les sous unités β et γ demeurent associées (Lopez and Salomé, 2009). La sous unité α s'associe au GTP provoquant une cascade de réaction intracellulaire telle que l'activation de la phospholipase C (PLC) considérée comme le premier effecteur intracellulaire. La PLC activée induit la dégradation du phosphoinositol (PIP_2) en inositol triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol (DAG) (McNamee et al., 1993). L' IP_3 mobilise les réserves intracellulaires de Ca^{2+} , tandis que le DAG active les protéines kinase C (PKC) contribuant à l'ouverture des canaux Ca^{2+} . Ainsi, se produit une signalisation intracellulaire via la création d'un second messenger (Figure 16) (Khawaja et al., 1996; Steinhoff et al., 2014).

Tableau 7. Distribution des tachykinines (SP, NKA, NKB) ainsi que leurs récepteurs (NK1, NK2, NK3) chez le rat (Modifié de Otsuka et al., 1993)

Régions	Tachykinines pmol/g			Récepteurs		
	SP	NKA	NKB	NK1	NK2	NK3
Cortex*	7	4	2,9	-	-	++++
Striatum	312,2	26,2	1,2	++++	-	-
Aire tegmentale ventrale	115,4	68,9	17,2	-	-	+
Noyau accumbens	122,9	70,4		+++	-	-
Hippocampe	4,1	3	1,1	++	-	+
Hypothalamus	201,4	171,3	31,4	+	-	-
Habenula	406	240,2		++	-	+
Noyau interpédonculaire	474,6	168,3		++	-	++
Cervelet	4,7	1,6	1,6	++	-	-
Noyau solitaire	459	389,2	21,7	+++	-	++++
Noyaux de raphé	275	83		+	-	-
Bulbe rachidien	226,4	71,1	7,2	++	-	-
Corde Spinal						
Corne dorsal	503,7	65,9	9,1	++	-	++++
Noyau intermédiolatéral	121,6	126	31,6	++++	-	-
Corne ventrale	117,4	16,1	2	++	-	-

+ : Présence ; - : Absence
* laminae IV-V du cortex frontal-pariétal;

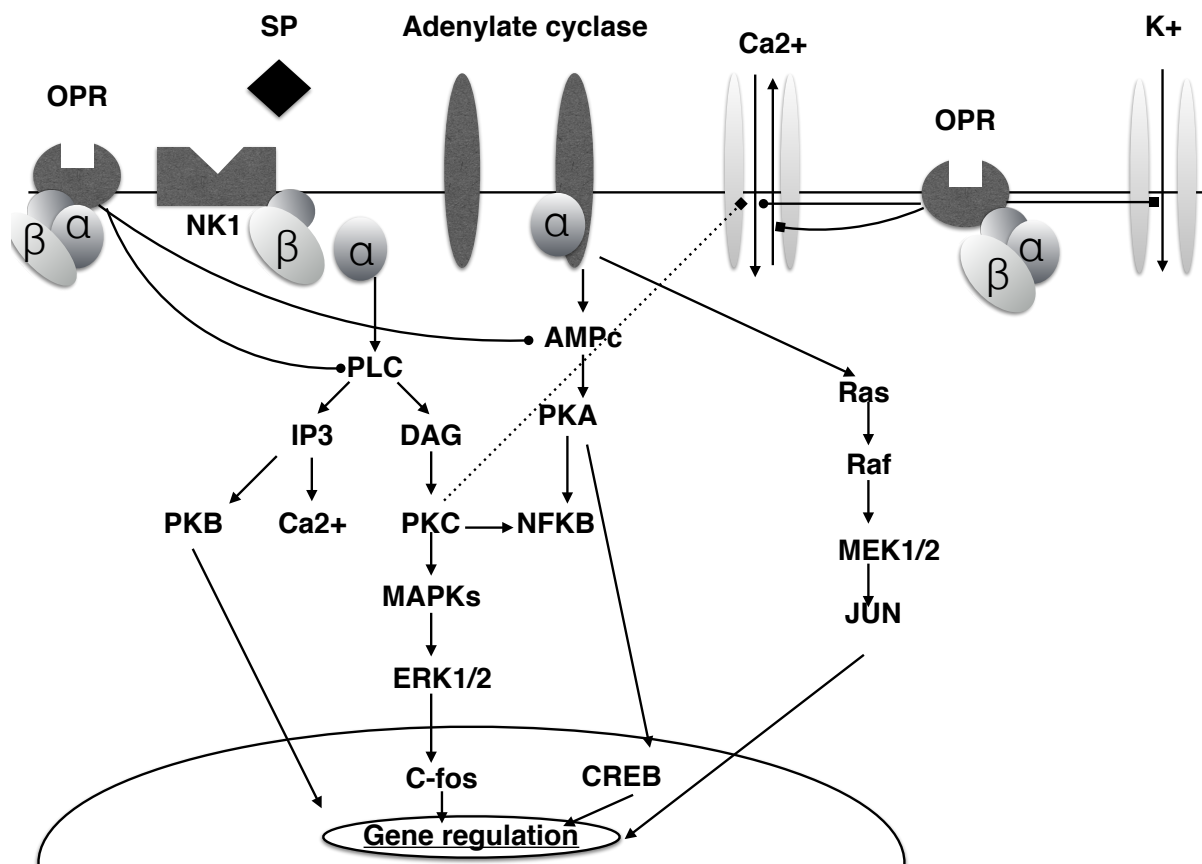


Figure 16. Schéma montrant la cascade de signalisation intracellulaire par un récepteur couplé à une protéine G (NKR) suite à leur interaction avec leurs ligands (tachykinines). L'interaction du ligand (SP, NKA, NKB) à son récepteur NKR (NK1, NK2, NK3) active la protéine G associée au récepteur. Une fois la protéine G est activée, la sous unité α se dissocie de la protéine G et s'associe au GTP provoquant des cascades de réaction intracellulaire d'où l'activation de PLC considérée comme le premier effecteur intracellulaire conduisant à la dégradation du PIP₂ en IP₃ et en DAG. L'IP₃ mobilise ainsi les réserves intracellulaires de Ca²⁺, tandis que le DAG active les PKC contribuant à l'ouverture des canaux Ca²⁺, de même le PKC active des facteurs cellulaires comme les protéine (MAPKs), les kinases des signaux extracellulaires (ERK1/2) et les facteurs de transcription (c-fos), l'ensemble de ces facteurs agit au niveau de régulation de gène augmentant l'expression membranaire des récepteurs NKR, à l'inverse l'activation du système de modulation de la douleur inhibe l'ensemble de ces facteurs.

3.9. Souris Tac1 Knockout

D'une manière générale, les souris "Knock Out" (KO) sont des souris chez lesquelles le gène codant pour une protéine donnée a été éliminé du génome par recombinaison homologue,

c'est à dire que l'ADN d'une cellule souche embryonnaire a été modifié et que le gène d'intérêt a été excisé (Babinet and Cohen-Tannoudji, 2000). Particulièrement, chez les souris *Tac1* KO le gène *Tac1* codant pour les tachykinines : SP, NKA a été excisé du génome. Les cellules souches sont ensuite réintroduites dans l'embryon de souris et si elles se localisent au niveau de la lignée germinale (phénomène aléatoire), pourraient donner naissance à un individu portant la délétion (au niveau de la 2^{ème} génération) (Blesson, 2002). Par conséquent, ces souris ne possèdent pas les produits du gène *Tac1* (Cao et al., 1998; Zimmer et al., 1998)

3.9.1. Phénotypes des souris *Tac1* KO

Les souris *Tac1* KO ont montré moins de douleur nociceptive (Zimmer et al., 1998), et une augmentation du seuil de douleur suite au test de la plaque chaude (Hot-plate-test) (Cao et al., 1998; Lin et al., 2012) (Figure 17). De même, les souris *Tac1* KO ont montré une diminution de la sensibilité chimique vis-à-vis de la capsaïcine (Simons et al., 2001) et de la formaline, avec une absence d'inflammation neurogénique. Également, le test « tail flick assay » effectué sur des souris mutantes suite à leurs stimulations par l'acide acétique montre les mêmes mouvements des queues que ceux des phénotypes sauvages WT (Zimmer et al., 1998) (Figure 17). Les souris *Tac1* KO ont montré aussi moins d'anxiété et de dépression que les souris de type sauvage WT (Bilkei-Gorzo et al., 2002).

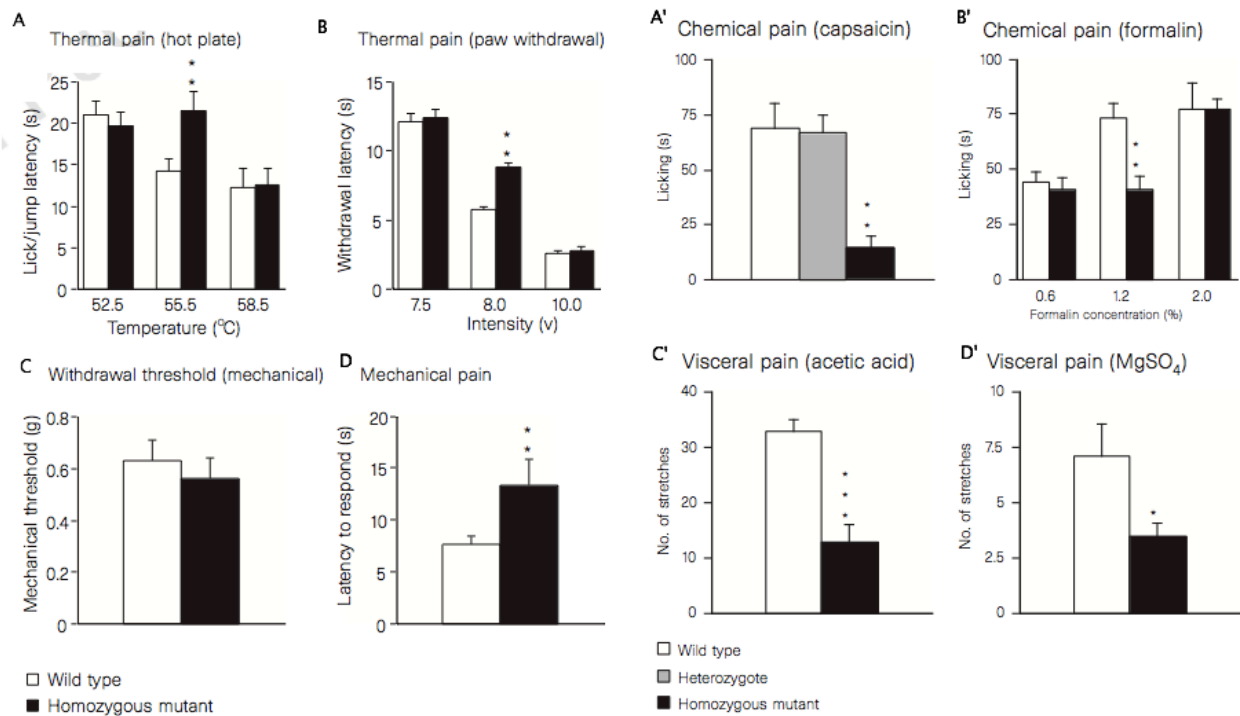


Figure 17. Réponse aux stimuli nociceptifs chez les souris *Tac1* KO / WT (Extrait de Cao et al., 1998)

(A) test de la plaque chaude à 55,5°C les souris mutantes homozygotes (barres noires) ont montré une réponse à la douleur diminuée par rapport au type sauvage (barres blanches). **(B)** suite à des stimuli thermiques nocifs (8,0 volts), les souris mutantes ont montré que la réponse à la douleur a diminué. **(C)** suite à un stimulus mécanique le seuil de retrait des souris de type sauvage et les souris mutantes sont différents. **(D)** la réponse à la douleur des souris mutantes est retardée de façon significative par rapport au souris sauvage WT. **(A') Test tail flick suite à l'injection de la capsaïcine** (4,5 mg, n=8) la durée de lécher du queue est considérablement réduite chez les souris *Tac1*KO (barres noires) par rapport au type sauvage (barres blanches) et les souris hétérozygotes (barre grise); les deux derniers groupes ne sont pas différents. **(B') Test tail flick suite à l'injection de formaline** la durée de lécher des queues varie considérablement entre les souris *Tac1* KO (barres noires) comparées par rapport au type sauvage (barres blanches) et ceci à partir d'une concentration en formaline de 1,2%. **(C')** et **(D')** La réponse à la douleur viscérale (abdominale étirage) produite par injection de l'acide acétique dilué ou de MgSO₄ par voie intrapéritonéale.

Chapitre 4 : Proprotéines convertases

En protéomique, les peptidases présentent la plus grande classe des enzymes au niveau post-traductionnel. On estime que 2% des gènes codent pour 687 peptidases ou des transcrits homologues du type peptidase qui se traduisent par environ 550 enzymes actives (Puente et al., 2005). Le protéome représente la bibliothèque potentielle de substrat pour ces enzymes, et toutes les protéines sont protéolytiquement modifiées, soit par une protéolyse limitée ou par une dégradation finale. Découvrir le substrat et la spécificité de ces peptidases sont essentiels pour comprendre leur rôles physiologiques (Puente et al., 2005; Quesada et al., 2009; Adams et al., 2011; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2015; Carniglia et al., 2017). Beaucoup de neuropeptides sont synthétisés sous forme de protéines précurseurs inactives, qui subissent une cascade enzymatique de transformation et de modification post-traductionnelle au cours de leur transport intracellulaire avant l'obtention de produits bioactifs finaux qui sont sécrétés pour agir au niveau des récepteurs pré et post-synaptiques (Kitamura et al., 2012; Steinhoff et al., 2014; Mashaghi et al., 2016). Le traitement protéolytique sur les sites dibasiques ou monobasiques de proneuropeptides se produit principalement dans les vésicules de sécrétion (Docherty and Steiner, 1982; Crochet et al., 2004; Rholam and Fahy, 2009). Ces protéases peuvent être des endoprotéases telle que la cathepsine L appartenant à la famille des cystéine-protéases ou des proprotéines convertases (PCs) appartenant à la famille de *subtilisine-like calcium-dépendante* (Hagemann et al., 2004). La cathepsine L clive préférentiellement du côté N-terminal au niveau des sites dibasiques tandis que les PCs clivent préférentiellement du côté C-terminal au niveau d'une séquence d'AA mono ou dibasique KR, RR et RK mais pas lorsqu'ils sont suivis d'une proline (Hook et al., 2008; Zeeuwen et al., 2009). L'action de la cathepsine L et des PCs, conduit à des intermédiaires peptidiques avec des extensions de

résidus dibasiques à leurs extrémités N et C terminales. Ces résidus basiques sont éliminés par des exopeptidases telle que l'Arg/Lys amino-peptidases qui clive du coté N-terminale et la carboxypeptidase E qui est relativement abondante au niveau du SNC et qui clive du coté C-terminale des pro-neuropeptides (Yasothornsrikul et al., 2003; Hook et al., 2009).

L'ensemble de ces clivages protéolytiques sont indispensables à la formation de neuropeptides biologiquement actifs et fonctionnels. Ainsi, la régulation de l'expression des neuropeptides par des enzymes impliquées dans le traitement de pro-neuropeptides est d'une importance majeure. Dans ce rapport de thèse une famille particulière de protéases sera détaillée, ce sont les serines protases regroupées sous le nom de convertases ou pro-protéines convertases (PCs).

4.1. Caractéristiques structurales et enzymatiques des convertases

Les pro-protéines convertases appartiennent à la superfamille des endoprotéases (Marcinkiewicz et al., 1993; Siezen and Leunissen, 1997). Par homologie de séquence entre les domaines catalytiques des PCs et d'après leur spécificité de clivage, les PCs sont réparties en six grandes sous familles (Siezen and Leunissen, 1997) (Figure 18). Les sous familles de PCs sont : **(I)** les subtilisines, initialement identifiées chez les microorganismes, **(II)** les kexines identifiées chez les eucaryotes, **(III)** les thermitases, **(IV)** les protéases K, **(V)** les peptidases lantibiotiques et **(VI)** les pyrolysines (Figure 18). Neuf PCs ont été caractérisées chez les mammifères supérieurs, qui sont PC1/3, PC2, furin, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, SKI-1/S1P and PCSK9 (Seidah and Prat, 2007; Seidah, 2013). La PC1/3, la PC2 et la PC4 qui s'apparentent à la sous-famille des subtilisines. Cependant, la Furine/PACE (paired amino-acid converting enzyme), la PACE4, la PC5 et la PC7 s'apparentent au sous-groupe des kexines.

La PC1/3, la PC2, la furine, la PC4, la PC5/6, la PACE4 et la PC7 clivent leurs substrats au niveau des motifs mono ou dibasiques en C-terminale (Scamuffa et al., 2006; Seidah et al., 1999) (Figure 19). Tandis que d'autres PCs telles que la subtilisin kexin isozyme-1 (SKI-1/S1P) et la protéine convertase d'apoptose neuronale régulée (NARC-1) clivent leurs substrats au niveau de résidus non basiques (Pasquato et al., 2006). Ainsi, la SKI-1/S1P, clive au niveau de résidus hydrophobes variables (G, A, V, L, I, P) et rejoint la famille des pyrolysines (Seidah et al., 1999; Pullikotil et al., 2004) et la NARC1 se rapproche de la sous famille des protéases K et clive les précurseurs après une leucine ou une méthionine (Naureckiene et al., 2003 ; Seidah et al., 2003) (Figure 19).

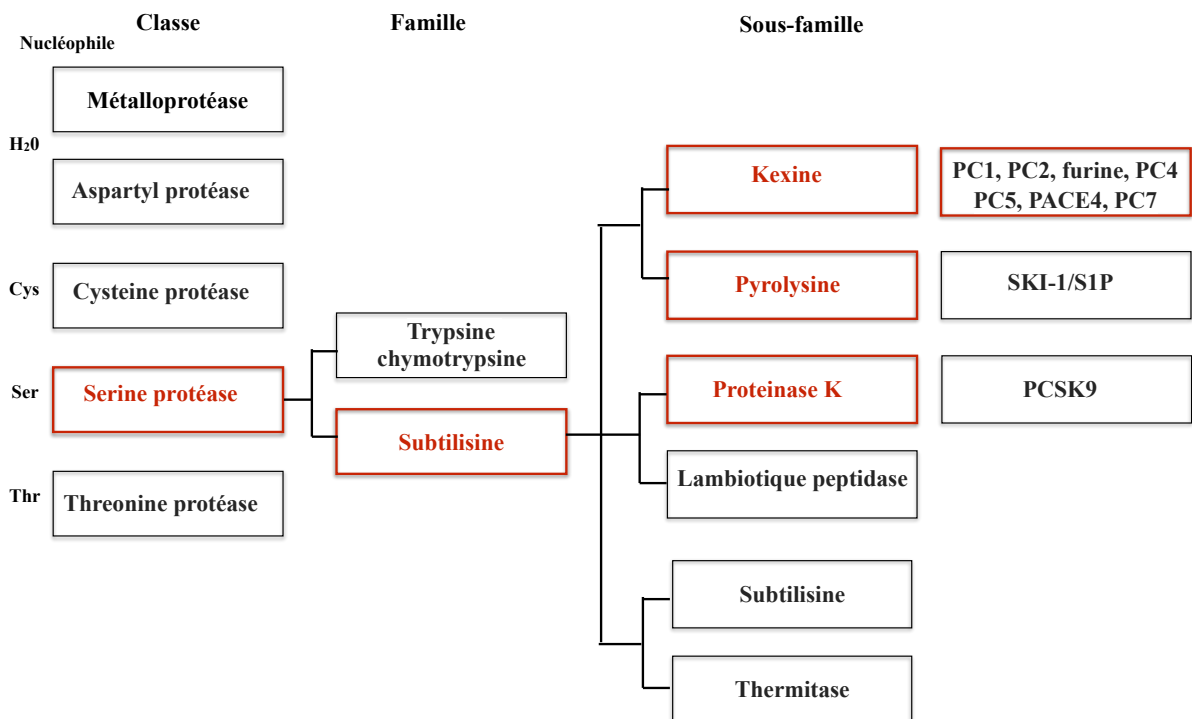
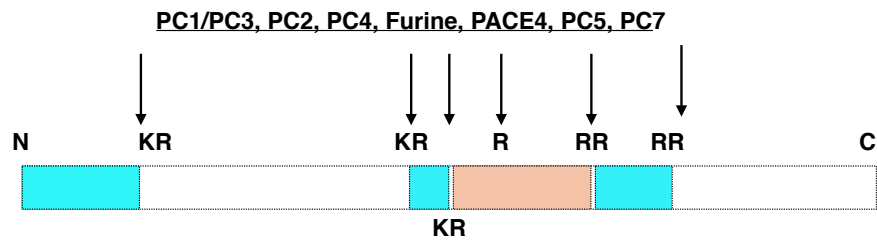
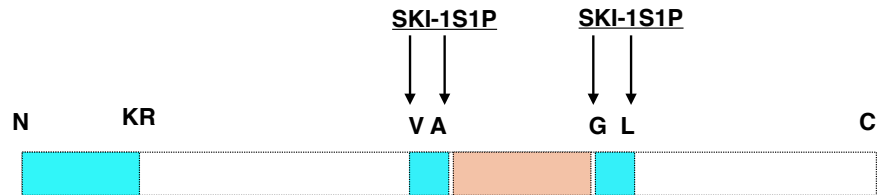


Figure 18. Classification des convertases basée sur l'homologie de séquence de leur domaine catalytique (Inspirée de Zhou et al., 1999).

Subtilisines-Kexines



Pyrolisines



Protease K

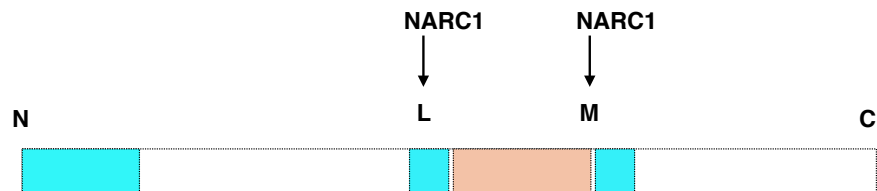


Figure 19. Sites de clivage enzymatique des PCs (Inspirée de Elbitar et al, 2016; Seidah et al., 2017).

PC1/3, PC2, la furine, la PC4, la PC5/6, la PACE4 et la PC7 clivent leur substrat au niveau des motifs mono- ou dibasiques en C-terminal. SKI-1/S1P et NARC-1 clivent leurs substrats au niveau de résidus non basiques : la SKI-1/S1P, clive son substrat au niveau de résidus hydrophobes variables (G, A, V, L, I, P) et NARC1 clive son substrat après une leucine (L) ou une méthionine (M)

La furine, la PC7, la PC5/6B, et la SKI-1 sont des protéases membranaires, tandis que les autres membres sont soit emballés dans des vésicules à cœur denses telles que la PC1/3, la PC2, et la PC5/6A soit constitutivement sécrétés dans le milieu extracellulaire telles que la PC4, la PC5/6A, la PACE4 et la PCSK9 (Seidah et al., 2006; Dubuc, 2010).

Bien que les PCs aient des spécificités de clivage, elles disposent toutes d'une structure similaire (Figure 20) (Zhou et al., 1999). Après une séquence signal, de 24 à 62 résidus, les PCs présentent un domaine pro-peptidique composé de 80 à 104 résidus (<http://merops.sanger.ac.uk>). Le domaine catalytique qui suit le pro-peptide est d'environ 330

résidus qui forment la triade catalytique indispensable à l'activité biologique endoprotéasique des PCs (Duckert et al., 2004). On trouve ainsi les résidus d'arginine et d'histidine en position N-terminale du domaine ainsi qu'une sérine à l'extrémité C-terminale. Après repliement correct et activation des PCs, ces résidus se trouvent à proximité les uns des autres dans le site catalytique actif. A la suite de cette région amino-terminale très fortement conservée (30 et 70% d'homologie) (Seidah et al., 1999), les PCs présentent une région variable spécifique du sous-groupe de PCs auquel elles appartiennent. Un domaine plus ou moins long, nommé P-domaine, possédant des séquences riches en Cys ou en Ser/Thr impliqué dans le trafic intracellulaire des PCs. Certaines PCs portent à la suite de cette région un domaine transmembranaire, c'est le cas de la furine, la PC5, la PC7, la SKI-1 et le NARC-1 (Figure 20).

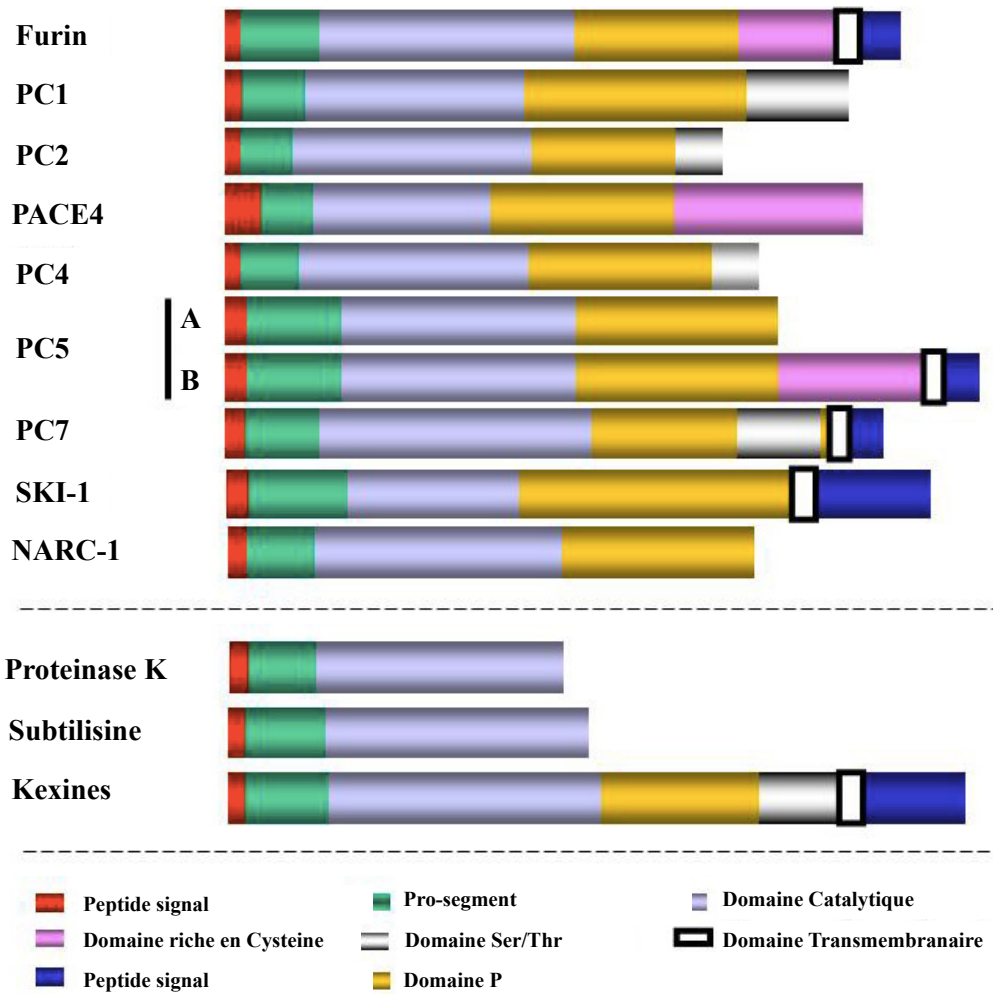


Figure 20. Représentation schématique des motifs structuraux des proprotéines convertases de mammifères (Extrait de Creemers and Khatib, 2007).

4.2. Localisation cellulaire et tissulaire

Le suivi de l'expression des PCs au niveau de différents tissus et organes (Tableau 8) montre que la furine, la PC7, la SKI-1 et la NARC-1 sont largement exprimées dans une variété de tissu (Seidah et al., 1996, 1999, 2003). Ainsi, la furine (Day et al., 1993) et la SKI-1 (Hendy et al., 1995) sont exprimées dans les tissus endocriniens comme l'hypophyse et la thyroïde. Elles clivent généralement leurs substrats au niveau du réseau Trans-golgien (TGN), dans les vésicules de sécrétion ou à la surface cellulaire. En ce qui concerne la SKI-1, son activité peut intervenir dès le RE, lieu de son activation. La PACE4 et la PC5, sont exprimées dans les

cellules endocriniennes et non endocriniennes, au niveau du réseau trans-golgien (TGN). A la différence, l'expression de PC1/PC3, PC2 et PC4 est beaucoup plus restreinte. Ainsi, l'expression PC4 est limitée aux cellules germinales (Raffin-Sanson et al., 1997; Tadros et al., 2001; Seidah, 2011a). Quant à PC1 et PC2, elles sont exprimées uniquement au niveau des cellules neuro-endocriniennes, notamment du système nerveux central: le cortex cérébral (Schâfer et al., 1993; Winsky-Sommerer et al., 2000; Duhamel et al., 2016), la moelle épinière et l'hypophyse (Day et al., 1995; Seidah et al., 1999, Hajebrahimi et al., 2008), ainsi qu'au niveau de la thyroïde (Kurabuchi et al., 2002; Shen et al., 2004; Hoshino and Lindberg, 2012) et de la médullosurrénale (Azaryan et al., 1995, Hook et al., 2008). Ces zones sont caractérisées par l'expression relativement élevée de carboxypeptidase E (CPE) et de la peptidylglycine (PAM) (Husson et al., 2014). Ainsi, et en collaborant avec ces enzymes, PC1 et PC2 responsables du clivage de nombreux proneuropeptides sont exprimées au niveau de la voie de sécrétion régulée au sein des vésicules de sécrétion.

Tableau 8. Présentation des 9 protéines convertases de la famille des subtilisines. Pour chacune d'entre elles, est donnée la localisation tissulaire et cellulaire ainsi que des exemples de substrats clivés (Seidah et al., 1999).

Enzyme	Localisation tissulaire	Localisation cellulaire	Précurseur protéique
Furine PC7/PC8 PACE4 PC5/PC6	Système nerveux (SN): neurones, cellules gliales Système endocrinien: Hypothalamus Thyroïde Parathyroïde Pancréas -(+SN, neurone) -(+intestin grêle)	TGN/ Surface cellulaire Endosomes	Proneuropeptides: -pro-NGF, pro-BDNF, proneurotrophines Prohormone: -pro-PTH -pro-somatostatine Pro-récepteur/pro-protéases: -Pro-récepteur à l'insuline -MMPs et MT-MMPs Protéines pathogènes -GP virales (gp160) -pro -toxines (pro -HA...)
PC1/PC3 PC2	Cellules neuro/endocriniennes : Système Nerveux: neurones Hypophyse Thyroïde Pancréas	Granules de sécrétion	Pro-hormones: -POMC (ACTH, β -LPH) -POMC (ACTH, α -MSH) -pro -insuline -pro -glucagon
PC4	Cellules germinales: testicules ovaires	ND	-pro -PACAP (polypeptide activant l'adnylate cyclase) -pro -ADAMs/integrines
SKI -1	Expression ubiquitaire en particulier: hypophyse, thyroïde foie neurones (SNC et SNP)	RE/TGN Surface cellulaire Endosome	Pro -hormones: -POMC, pro -somatostatine Protéines pathogènes: - GP virales (GP du virus de lassa, LCMV)
NARC -1	Expression transitoire Neurones Intestin grêle foie, rein	ND	Role dans la prolifération/différenciation Role dans la neurogénèse, l'hépathogénèse et le néphrogénèse.

4.3. Synthèse et activation des protéines convertases

Les PCs responsables des clivages endo-protéolytiques des précurseurs protéiques sont synthétisées au niveau du RE (Vey et al., 1994). Comme leurs futurs substrats, ces PCs subissent des processus endo-protéolytiques pour être activées (Anderson et al., 1997). En effet, les PCs sont produites sous formes de zymogènes, dont la région pro-peptidique aminoterminal doit être clivée pour qu'elles soient actives (Germain et al., 1991 ; Vey et al., 1994). Les zymogènes inactifs subissent une succession de traitement auto catalytique initial dans le RE (toutes les PCs à l'exception de PC2) ou dans les granules de sécrétion immatures (cas de PC2) pour générer un hétéro-dimère pro-segment inhibiteur couplé au reste de la séquence PC (pro-segment-PC). Le pro-peptide joue alors un rôle d'inhibiteur des PCs en bloquant l'accès au site actif de la protéase, garantissant ainsi la protection des protéines de la voie de sécrétion contre les protéolyses (Sakr, 2007).

La présence de la séquence pro-peptidique est indispensable pour la production de PCs actives. En effet, des mutations par délétion du pro-peptide conduisent à la rétention des PCs dans les compartiments du RE (Anderson et al., 2002; Artenstein and Opal, 2011). L'hétéro dimère inactif est alors transporté hors du RE vers d'autres compartiments cellulaires spécifiques où l'activité catalytique sera établie (Ennemann et al., 2013). Généralement, à la suite d'un second évènement de clivage auto catalytique du pro-segment celui-ci libère l'enzyme active (Seidah and Prat, 2007). Ce mécanisme d'activation de zymogène bien orchestré assure que la protéine convertase soit active uniquement dans le compartiment intracellulaire où les conditions de pH et de calcium sont optimales pour le clivage du substrat (Gawlik et al., 2009). Ces conditions favorisent la dissociation du pro-peptide du site catalytique.

Contrairement aux autres PCs, le mécanisme d'activation de PC2 paraît plus complexe (Figure 21). En effet, ce dernier requiert la présence d'une protéine accessoire, nommée 7B2, elle-même synthétisée sous forme de précurseur. C'est au niveau du RE, que les deux précurseurs, pro-PC2 et pro-7B2, s'associent (Benjannet et al., 1995; Kim and Arvan, 1998). Des expériences de mutagenèse dirigées ont montré que ces dernières se lient au niveau du domaine catalytique de PC2 et forment un complexe inactif mais compétent pour le transport vers l'appareil de Golgi (Benjannet et al., 1998; Cameron et al., 2001). Dans le réseau trans Golgien (TGN), pro-PC2 et pro-7B2 sont clivées au niveau de leurs pro-séquences. La région C-terminale du 7B2 joue alors au même titre que le pro-peptide de PC2 un rôle inhibiteur de l'activité de PC2 en restant fixée au niveau du domaine catalytique de la protéase (Zhu and Lindberg, 1995; Fortenberry et al., 2002) (Figure 21).

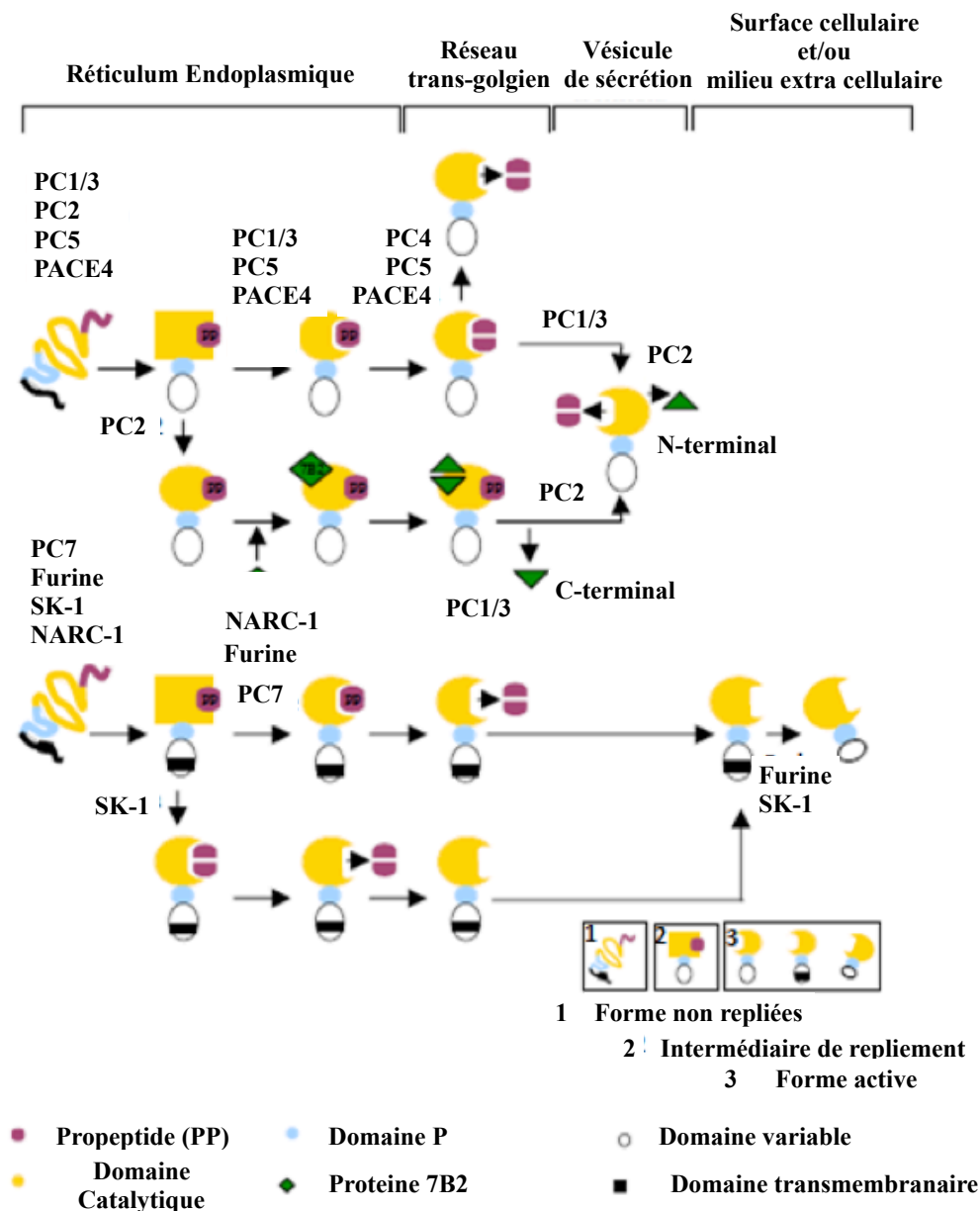


Figure 21. Schéma des mécanismes d'activation des différentes PCs.

Les étapes d'activation des PCs solubles (PC1/3, PC2, PC5, PC4, PACE4) et des PCs membranaires (furine, PC7, SKI-1 et NARC-1) sont schématisées suivant leurs compartiments d'activation et leurs particularités (protéine 7B2 pour PC2...). La furine (Molloy et al., 1994; Creemers et al., 1995) et la PC7 (Seidah et al., 1996; Munzer et al., 1997; Wouters et al., 1999) sont activées dans le réseau trans-Golgien (TGN) et elles atteignent la surface cellulaire ou retournent au réseau TGN par les endosomes (Van de Loo et al., 1997; Thomas, 2002). Les PC5 et PACE4 sont activées dans le réseau TGN (Seidah et al., 1999; Nour et al., 2005) et / ou à la surface de la cellule. La SKI-1 est active au sein même du Réticulum endoplasmique (RE) (Cheng et al., 1999) ou dans le réseau cis / médial -Golgien (Espenshade et al., 1999; Pullikotil et al., 2007). Pour PC1/3 et PC2, l'activation se réalise au niveau des vésicules de sécrétion (Benjannet et al., 1993). Le mécanisme d'activation de PC2 nécessite la présence d'une protéine, nommée 7B2. C'est au niveau du RE, que les deux précurseurs, pro-PC2 et pro-7B2, s'associent. Dans le réseau TGN, pro-PC2 et pro-7B2 sont clivées au niveau de leurs pro-séquences. La région C-terminale de 7B2 joue alors un rôle inhibiteur de l'activité de PC2 en restant fixée au niveau du domaine catalytique de la protéase.

4.4. Substrats des protéines convertases

De nombreuses pro-protéines sont soumises à l'action des PCs (Tableau 9), c'est le cas des précurseurs de plusieurs hormones peptidiques, des enzymes protéolytiques, des facteurs de croissance, et de nombreuses protéines de type I liées à la membrane, y compris des récepteurs, des molécules d'adhésion cellulaire, la surface cellulaire des glycoprotéines d'espèces pathogènes tels que les virus et les bactéries et même la signalisation cellulaire (Southey et al., 2006; Orduna and Beaudry, 2016; Jaaks et al., 2016). Ces clivages se produisent dans le RE, dans l'appareil de trans-Golgi (Rabbani and Patel, 1990), le long de la voie de sécrétion, dans les granules de sécrétion (Burbach et al., 1986), à la surface des cellules, ou dans les endosomes (Gupta et al., 1995; Rosendahl et al., 1997).

Rôle de PC1 et PC2 dans la maturation protéique et la régulation des fonctions endocrines

Les neuropeptides sont synthétisés à partir de précurseurs de protéines appelées pro-neuropeptides qui nécessitent un traitement protéolytique principalement dans des vésicules de sécrétion qui stockent et sécrètent les neuropeptides matures pour contrôler les systèmes cibles cellulaires. Ainsi, les neuropeptides matures s'avèrent nécessaires pour la communication cellulaire et pour la régulation des fonctions endocrines (Figure 22).

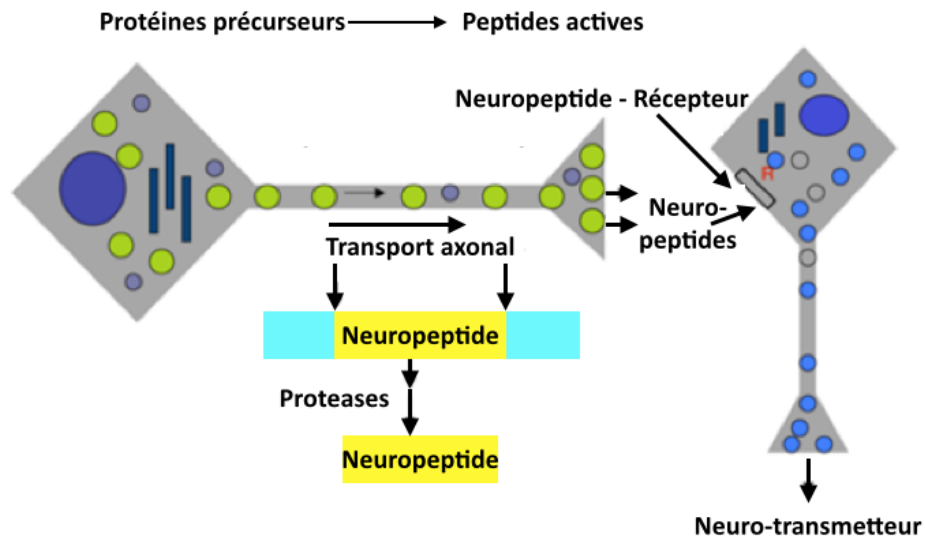


Figure 22. Schéma de la synthèse et de l'activation des neuropeptides selon la voie de sécrétion régulée (Modifiée de Hook et al., 2008).

Les proneuropeptides sont stockés au niveau de vésicules sécrétoires nouvellement formées dans le corps de la cellule. A l'intérieur des vésicules, les précurseurs protéiques subissent des clivages protéolytiques pendant leur transport axonal qui se fait à partir du corps cellulaire jusqu'à la terminaison nerveuse. Ainsi, au cours du transport axonal le neuropeptide trouve sa forme active au niveau des vésicules sécrétoires.

La biosynthèse des neuropeptides commence avec la traduction des ARN_m respectifs pour générer les pré-pro-neuropeptides précurseurs (Mirabeau, 2008). Le traitement protéolytique commence au niveau du RE, où le peptide signal N-terminal du pré-pro-neuropeptide est clivé. Le pro-neuropeptide résultant est acheminé à travers l'appareil de Golgi et emballé dans des vésicules sécrétoires nouvellement formées avec des protéases (pro-PC1 /Pro- PC2) (Salvas, 2004). Donc, en premier lieu PC1 et PC2 retrouvent leurs formes matures puis clivent les proneuropeptides en collaborant avec la carboxypeptidase et dans certains cas la cathepsine L et l' amino-peptidase (Figure 14). Ainsi, la cathepsine L clive au niveau de site mono- dibasique du côté N-terminale (Yasothornsrikul et al., 2003) et par la suite les résidus basiques (K ou R) situés du coté N-terminale sont éliminés par amino-peptidase (voies de cystéine protéase). Tandis que les PC1 et PC2 clivent spécifiquement au niveau du site mono- dibasique du côté C-terminale et par la suite les résidus basiques (K ou R) situés du coté C-terminale sont éliminés par la

carboxypeptidase E (Hook et al., 2004) (voies subtilisine protéase). Les neuropeptides peuvent également subir une modification post-traductionnelle qui modifie l'activité biologique des peptides telles que la formation de liaisons disulfure, la glycosylation, l' α -amidation, la phosphorylation, la sulfatation, et l'acétylation (Wilkinson, 2006; Scamuffa et al., 2006; Seidah, 2011b).

Ces mécanismes de maturation se produisent au niveau des vésicules de sécrétion avec des conditions internes spécifiques (pH acide maintenus par les ATP-ases) favorisant ainsi le repliement des chaînes protéiques, pendant le transport axonal qui se fait du corps cellulaire jusqu'aux terminaisons nerveuses. Ainsi, au cours du transport axonal le neuropeptide trouve sa forme active au niveau des vésicules sécrétoires. Une fois que les vésicules de sécrétion arrivent au niveau de la terminaison nerveuse un phénomène d'exocytose se produit. Ce mécanisme de libération régulé peut être augmenté suite à une stimulation qui augmente la vitesse de migration des vésicules de sécrétion suite à une entrée massive de Ca^{2+} (Figure 23).

Ainsi, les PCs sont impliquées dans la production de peptides bioactifs tels que l' α -neuroendocrinien et le γ -endorphine (Ling et al., 1976), la vasopressine 1-19 à partir de la pro-vasopressine (Burbach et al., 1986), le fragment N-terminal de la pro-somatostatine (Rabbani and Patel, 1990), le facteur plaquettaire 4 (Gupta et al., 1995), l'hormone relaxine (Hudson et al., 1981), la métallo-protéase ADAM-10 (Rosendahl et al., 1997), ainsi que dans la production de peptides A β amyloïdogènes de la maladie d'Alzheimer (Rosendahl et al., 1997).

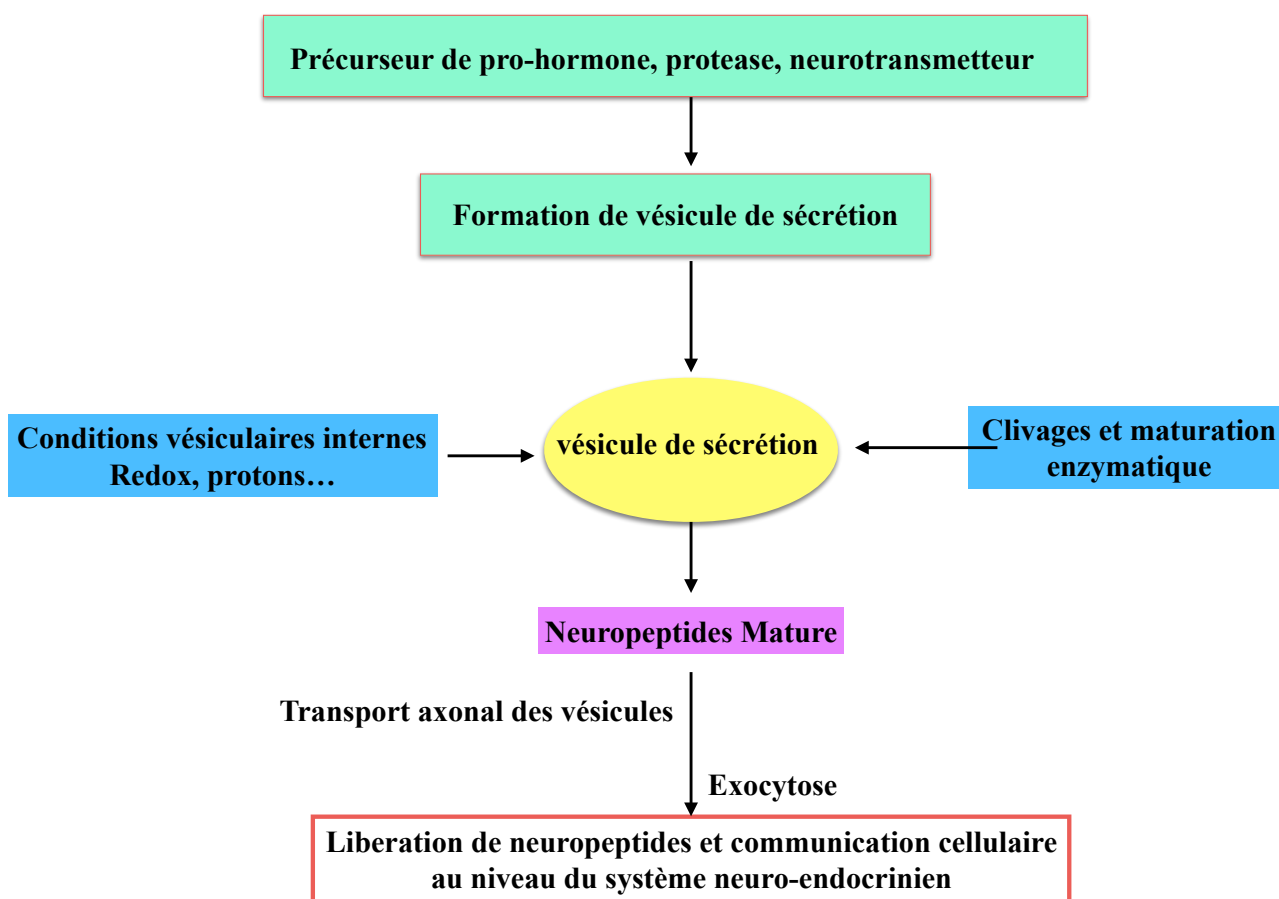


Figure 23. Représentation schématique d'un neuropeptide depuis la synthèse à la libération. (1) la production de neuropeptides (2) les conditions vésiculaires internes (un pH acide maintenu par les ATP ases) favorisant le repliement de la chaîne protéique, (3) le trafic des vésicules de sécrétion et (4) exocytose des vésicules. L'ensemble de ces mécanismes coordonnés permet la communication de cellule à cellule et ainsi le contrôle des fonctions endocrines.

La protéine précurseure peut contenir une ou plusieurs copies du neuropeptide actif. Par exemple, la pro-NPY, la galanine, le CRF, la vasopressine et la β -pro-Tac1 contiennent une seule copie du neuropeptide actif. Tandis que la pro-enképhaline contient quatre copies de Met-enképhaline et une copie de la Leu-enképhaline. De même, certains précurseurs contiennent différentes hormones peptidiques au sein du même précurseur, c'est le cas de la POMC qui donne naissance à des peptides distincts l'ACTH, l' α -MSH, et la β -endorphine (Hook et al., 2008) (Figure 24).

Tableau 9. Liste des substrats de la PC1 et de PC2 ainsi que leurs fonctions régulatrices (Hook et al., 2008).

Neuropeptide	Fonctions régulatrices
Enkephaline	Analgésie, modulation de la douleur
Beta-endorphine	Analgésie, modulation de la douleur
ACTH	Production de stéroïdes
α-MSH	Pigmentation de la peau, appétit
CRF (corticotropin releasing factor)	Secrétion de l'ACTH
Insuline	Métabolisme du glucose
Glucagon	Métabolisme du glucose
Gelatine	Cognition
NPY	Obésité, pression artérielle
Somatostatine	Régulation de la croissance
Vasopressine	Equilibre de l'eau
Calcitonine	Régulation du calcium
Cholecystokinine	mémoire, l'appétit
PACAP	Différentiation neurale

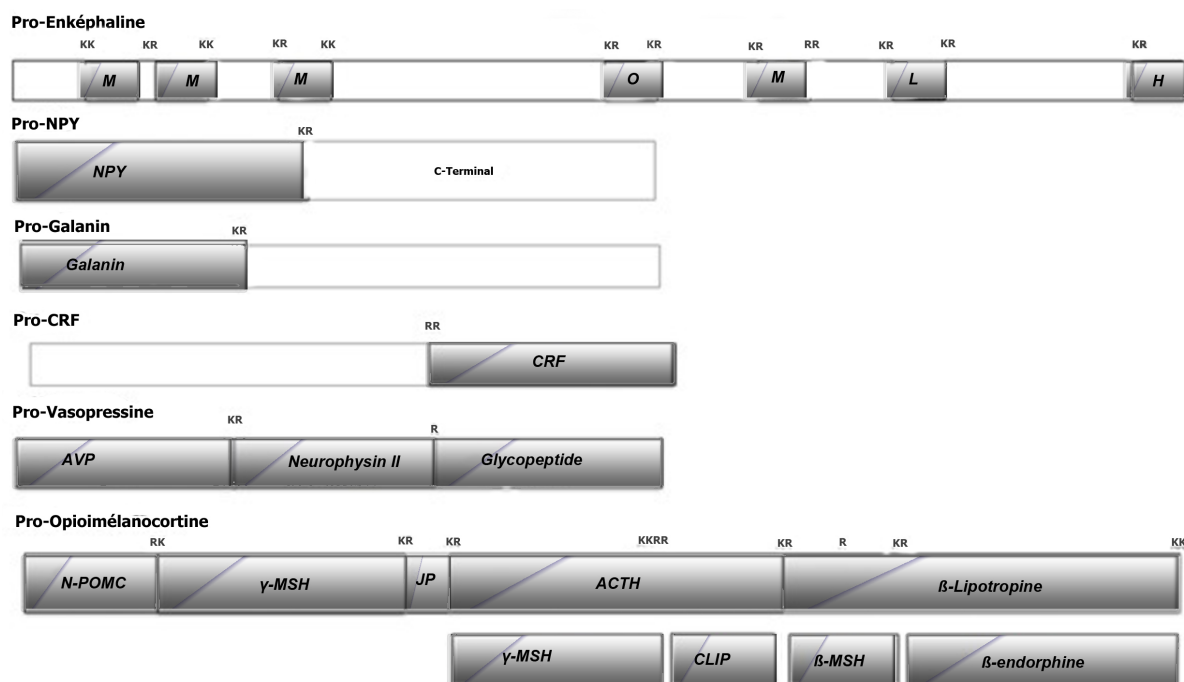


Figure 24. Représentation schématique du traitement protéolytique des proneuropeptides associés à PC1 et PC2.

La protéine précurseur peut contenir une ou plusieurs copies du neuropeptide actif. La pro-NPY, la galanine, le CRF, la vasopressine et la β -pro-tac1 contiennent une copie du neuropeptide actif. Tandis que certains proneuropeptides renferment des copies multiples du neuropeptide actif telle que la pro-enképhaline qui contient quatre copies de Met-enképhaline (ME), une copie de la Leu-enképhaline (LE), et les peptides liés aux opioïdes ME-Arg-Phe (H) et ME-Arg-Gly-LEU (O). Certains précurseurs possèdent différentes hormones peptidiques au sein du même précurseur, c'est le cas de la POMC qui donne naissance à des peptides distinct ACTH, α -MSH, et la β -endorphine.

4.5. Phénotype des souris mutantes PC1 et PC2

Étant donné que PC1 et PC2 s'avèrent indispensable à la synthèse de divers neuropeptides, plusieurs études ont montré que les souris PC1 knockout ($PC1^{-/-}$) présentent des anomalies sévères de développement et un taux élevé de létalité embryonnaire (Zhu et al., 2002 a). Pour cela, les expériences visant l'étude de PC1 utilisent généralement des souris knockdown ($PC1^{-/+}$) qui sont viables. Vu que PC1 est impliquée dans la maturation d'hormones de croissance (GHRH) (Zhu et al., 2002b) et de facteur insuline-like-1, les souris $PC1^{-/+}$ ont montré des anomalies dans le développement et un retard dans la croissance (Zhu et al., 2002b; Gaylinn et al., 1999). De même, les souris $PC1^{-/+}$ ont montré une réduction de diverses hormones matures tels que le

GHRH hypothalamique, la POMC hypophysaire, la pro-insuline, et le pro-glucagon intestinal (Zhu et al., 2002b).

Contrairement aux souris PC1^{-/-}, les souris PC2 Knockout (PC2^{-/-}) sont viables (Furuta et al., 1997a). Bien que, les souris PC2^{-/-} sont viables et semblent normales à la naissance, elles présentent un retard de croissance (Scamuffa et al., 2006), une hypoglycémie chronique à jeun et un déficit en glucagon (Rouille et al., 1994; Furuta et al., 1997b; Furuta et al., 2001; Laurent, 2002). D'autre part, étant donnée que PC2 s'avère indispensable dans le clivage de divers précurseurs au niveau des cellules neuronales et endocriniennes, les souris PC2 Knockout ont montré une déficience de divers neuropeptides tels que la pro-CCK neuronale (Rehfeld et al., 2002), la neurotensine, la neuroméline N (Villeneuve et al., 2002), la pro-dynorphine (Berman et al., 2000), les peptides pro-orphanin FQ / nociceptine, et les dérivés pro-opiomélanocortine (POMC) (Allen et al., 2001). Également, les souris PC2 knockout n'ont pas démontré une sensibilité à la douleur différente de celle des souris wild type dans une évaluation normalisée. Par contre, elles ont montré significativement moins de sensibilité à la douleur suite à une stimulation nociceptive intense suite à un stress (Croissandeau et al., 2006). Le stress a été induit en forçant la souris à nager pendant 180 s dans de l'eau à 10°C (bain froid) ou à 33°C (bain chaud). Après, 5 min et 30 min de la baignade, des essais nociceptives mécaniques (von Frey), thermiques (tail-flick/ test de plaque chaude), et chimiques (formaline) ont été réalisés. Les résultats ont démontré que sans condition de stress, les deux génotypes (WT et PC2^{-/+}) montrent un comportement nociceptif similaire. Cependant, après un bain froid, les souris mutante ont montré significativement moins de sensibilité à la douleur. Croissandeau et al., concluent que la diminution de la sensibilité à la douleur était due à l'augmentation de la libération des peptides opioïdes suite à un stress (Willer et al., 1981; Akil et al., 1986).

Chapitre 5 : Spectrométrie de masse

Lors des dernières années, les biologistes ont séquencé plusieurs génomes bactériens, de végétaux et de mammifères (Man et al., 2012; Ravelomanantsoa, 2016). Cependant le séquençage de ces différents génomes ne permet pas d'identifier et de quantifier les protéines exprimées dans une cellule à un moment donné de sa vie (Biemann, 1990a; Lottspeich, 1999; Bhalla et al., 2002; Patterson and Aebersold, 2003; Mortazavi et al., 2008). Ainsi, l'analyse protéomique permet d'identifier les protéines exprimées par un organisme (Malmstrom et al., 2004) comparer les protéomes de deux états distincts, rechercher des modifications post-traductionnelles portées par les protéines d'intérêts (McGregor and Dunn, 2006). Cependant, les analyses biochimiques classiques de protéines ont été une tâche ardue et de longue haleine, et n'ont conduit qu'à des séries de données incomplètes avec peu d'informations quantitatives. Récemment, d'énormes progrès ont été réalisés visant les technologies protéomiques permettant d'accélérer la caractérisation des protéines par le développement de nouvelles méthodes d'analyse (Fratuzzi et al., 2017). En effet, la spectrométrie de masse couplée à des techniques de séparation chromatographiques, continuent à se développer dans la quête de l'amélioration de la sensibilité (Lee and Kerns, 1999; Beaudry et al., 2004; Lavoie et al., 2013). La spectrométrie de masse est l'outil de choix d'analyse du protéome, de sous protéomes et des peptides vu sa capacité d'obtenir des informations quantitatives précises sur des échantillons biologiques d'une énorme complexité (Pandey and Mann, 2000; Finehout and Lee, 2004; Beaudry et al., 2006; Guichou, 2015).

De même, la spectrométrie de masse permet de déterminer la masse moléculaire, ainsi que la séquence primaire de la protéine étudiée (Figure 25) (Mann and Jensen, 2003; Coon et al., 2005). Elle permet également d'identifier le type de modification (phosphorylation, glycosylation,

oxydation...) ainsi que son emplacement sur la séquence des protéines (Heintz, 2004; Sagan and Bolbach, 2009; Bertaccini, 2014). Son principe réside en une séparation en phase gazeuse des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Botter and Bouchoux, 1995; Banerjee and Mazumdar, 2012). De plus, la spectrométrie de masse permet de déterminer la masse moléculaire d'un composé inconnu. La masse moléculaire est déduite de la valeur m/z du pic moléculaire dans le spectre. Celui-ci correspond à un ion qui contient tous les atomes de la molécule étudiée, sans qu'il y ait eu rupture d'une liaison (Hao et al., 2015). La molécule a été ionisée grâce à un gain d'au moins une charge électrique négative ou positive (Jacob, 2010; Ham, 2011).

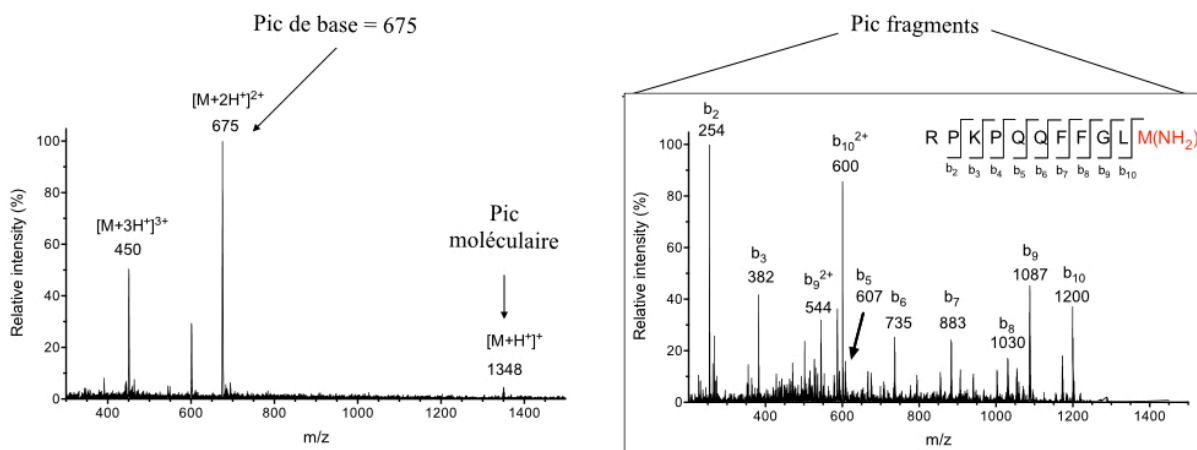


Figure 25. Schéma simplifié des différentes informations qui peuvent être apportées par la spectrométrie de masse cas de la SP (Mass moléculaire =1 347,63).

Les différents types de pics observés dans un spectre de masse sont : **(1)** Le pic de base : c'est le pic le plus intense du spectre. Il correspond à l'ion le plus abondant donc le plus stable. **(2)** Le pic moléculaire ou pic parent : il correspond à l'ion de nombre de masse égal à la masse moléculaire de la substance. **(3)** Les pics fragments correspondent aux différents ions fragments.

L'existence d'isotopes c'est à dire des atomes d'un même élément, différents par leur nombre de neutrons mais ayant le même nombre de protons et d'électrons, et possédants ainsi les mêmes propriétés chimiques, se traduit par la présence de plusieurs pics moléculaires (Meija, 2006;

Valkenburg et al., 2012). On observe, non pas un pic moléculaire, mais un groupe de pics moléculaires (un « massif moléculaire » ou un « cluster moléculaire »).

Principalement la masse qu'on utilise est la masse mono-isotopique qui est la masse du premier pic du profil isotopique c'est-à-dire celle qui ne prend en compte que les masses des isotopes les plus stables (^{12}C , ^1H , ^{16}O , ^{32}S , ^{14}N , ...), et la masse chimique ou moyenne qui est le barycentre (centroïde) des masses des pics constituant le profil isotopique c'est-à-dire la masse qui considère la masse des éléments donnés par le tableau périodique (par exemple $\text{C}=12,011$) (Figure 26).

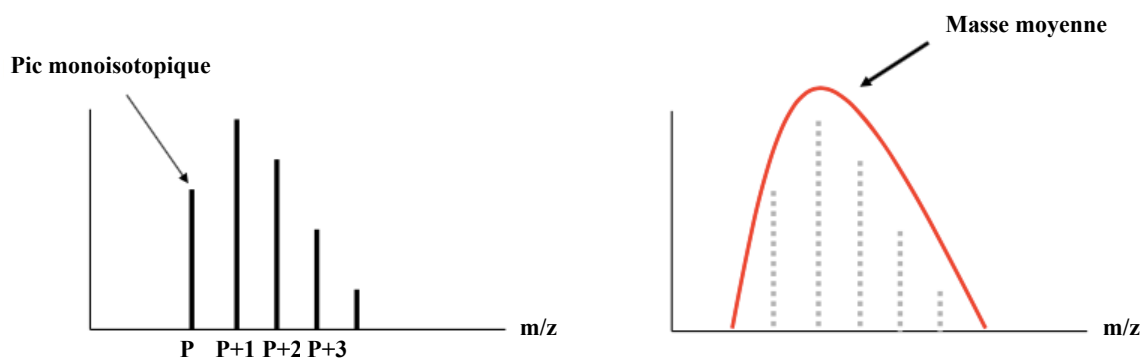


Figure 26. Moyen de détermination de la masse mono-isotopique et de la masse chimique ou moyenne à partir d'un spectromètre de masse.

Masse mono-isotopique: dans le massif isotopique, on l'appelle le pic P. Les autres pics du massif isotopique sont appelés les pics P+1, P+2, P+3. Ils contiennent tous au moins 1 des isotopes lourds d'un élément.

5. 1. Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide à haute performance

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (HPLC-MS) a été conceptualisée en 1973 et continu à se développer dans la quête de l'amélioration de la résolution et la précision de masse (Baldwin and McLafferty, 1973). Le HPLC-MS est une technique d'actualité qui offre quatre fonctions principales : la quantification, l'identification, la sensibilité

et la spécificité (Poletini, 2006; Evans et al., 2009; Banerjee and Mazumdar, 2012; Pailleux and Beaudry, 2012; Mao et al., 2016; Bao et al., 2017).

5.1.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance ou HPLC

L'HPLC permet de séparer les composés d'un échantillon afin de pouvoir les identifier et les quantifier. En effet, l'HPLC permettant de séparer les peptides en fonction de leurs diverses propriétés physicochimiques issues des acides aminés qui les composent (charge, pI, degré d'hydrophobicité, taille...) (Jadaun et al., 2017; Kromidas, 2017; Teixeira et al., 2017). L'échantillon à analyser est entraîné par la phase mobile dans une colonne correspondant à la phase stationnaire ayant une grande affinité ou non avec les substances passant à travers (Hemström and Irgum, 2006). Le choix de la phase stationnaire dépend des propriétés physicochimiques des molécules recherchées en se basant principalement sur la volatilité et la polarité de ces dernières (McCue, 2009; Fekete et al., 2016; Tyteca et al., 2016). Ainsi, les molécules n'ayant aucune affinité avec les groupes fonctionnels de la colonne ne s'adhèrent pas, alors que les molécules ayant une grande affinité avec les composés de la colonne s'adhèrent à la surface de celle-ci. Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire (Manes et al., 2015; Moruz and Käll, 2016). La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants (Snyder et al., 1997).

Placé à la sortie de la colonne, un détecteur, couplé à un enregistreur, permet d'obtenir un tracé nommé chromatogramme, où le signal est fonction de la concentration de l'analyte. Ainsi, dans

des conditions chromatographiques données, le temps de rétention qui correspond au temps d'éluion et de détection d'un composé, caractérise qualitativement une substance.

Cependant, l'identification des peptides uniquement par une technique de séparation chromatographique n'est pas suffisante. En peptidomique, le couplage HPLC-MS est un outil sensible qui permet d'identifier, caractériser et quantifier les peptides dans des mélanges complexes.

5.1.2. Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est constitué principalement de 3 parties distinctes (Figure 27) : d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur.

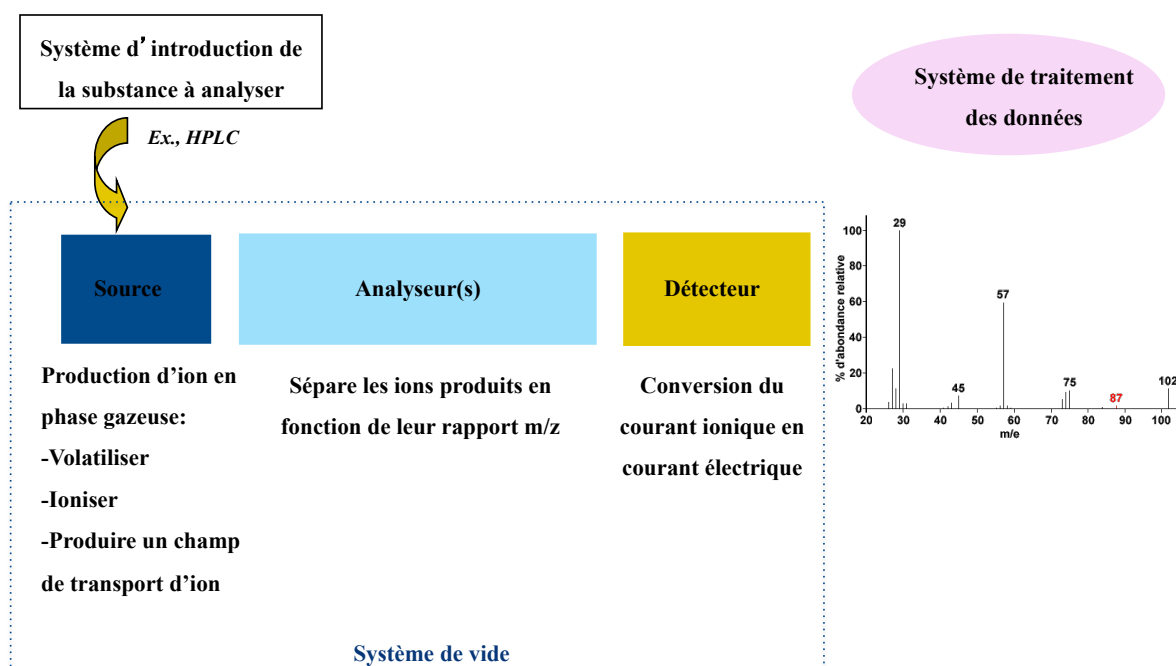


Figure 27. Composantes d'un spectrometre de masse.

Un spectromètre de masse est composé principalement d'un système d'introduction de l'échantillon, d'une source d'ionisation, d'un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge et d'un détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur

5.1.2.1. Sources d'ionisation

Toutes les techniques de spectrométrie de masse font appel, non pas aux espèces moléculaires en tant que telles, mais aussi aux molécules ionisées. Tous les procédés reposent sur les déplacements d'ions moléculaires chargés formés à partir d'une molécule. Afin que l'analyse soit réalisable, cela nécessite donc une étape préalable d'ionisation de l'échantillon (Zhu et al., 2013).

La source d'ionisation electrospray assure trois fonctions: nébuliser, ioniser et produire un champ de transport des ions. **(i)** La nébulisation permet une séparation des molécules introduites dans le spectromètre par passage de l'état liquide à un état gazeux (Botter and Bouchoux, 1995). **(ii)** L'ionisation permet de transformer les molécules en ions grâce à des champs électriques (De Hoffmann and Stroobant, 2002) **(iii)** et alors production d'un champ de transport des ions. Ainsi, les molécules libérées par HPLC se chargent dans la source par l'ionisation. Les molécules acides sont capables de céder un proton H^+ qui entraîne la formation d'un ion négatif ($[M-H]^-$) et l'analyse s'effectuera en mode négatif. En parallèle, les molécules basiques sont aptes à capter un H^+ qui entrainera la formation d'ion positif ($[M+H]^+$) et l'analyse s'effectuera en mode positif (Dunham et al., 2012) (Figure 28). La très grande majorité des analyses peptidomiques et protéomiques sont réalisés en mode positif.

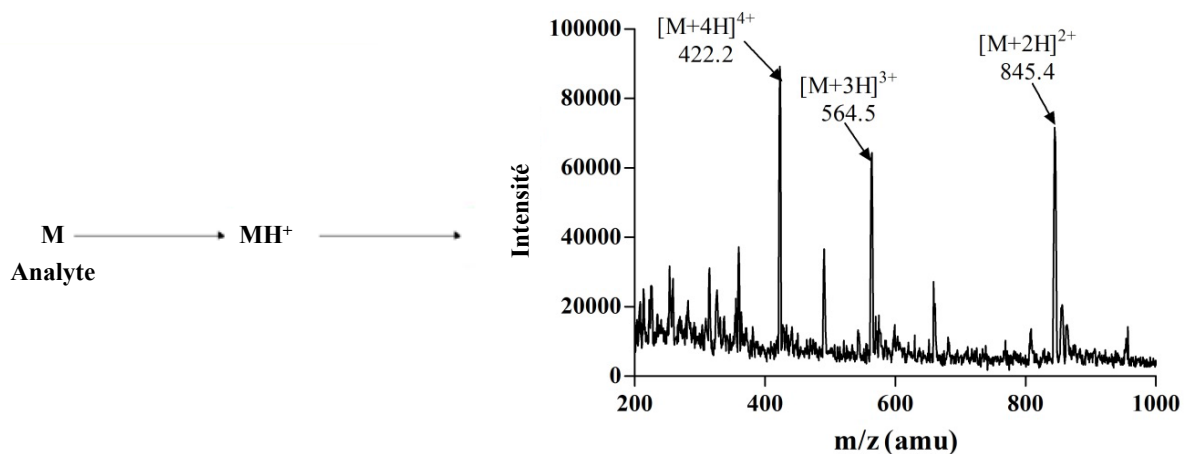


Figure 28. Exemple de mécanisme d'ionisation en spectrométrie de masse

Spectre MS de la β tachykinine₅₈₋₇₁ obtenu avec une source d'ionisation ESI, sur un analyseur Trappe ionique. Chaque ion détecté correspond à un état de charge précis du peptide.

Les critères de choix du type de source d'ionisation sont: la volatilité, la stabilité thermique du composé à analyser, la labilité chimique, les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation, la taille des molécules, les quantités de produit disponibles et le type d'introduction souhaitée (directe ou en HPLC) (Ong and Mann, 2003; Gautier et al., 2012a) (Tableau 10).

Les sources d'ionisation les plus utilisées en spectrométrie de masse sont la désorption, l'ionisation laser assistée par une matrice ou Matrix Assisted Laser Désorption Ionisation (MALDI) (Karas et al., 1989; Rusconi and Schmitter, 1998), et l'ionisation électro-spray ou Electro-Spray Ionisation (ESI) (Fenn et al., 1989; Baudin, 2015), car elles entraînent la formation d'ions stables avec peu ou pas de fragmentation (Griffiths and Wang, 2009) (Tableau 11).

Tableau 10. Critères de choix du type de source d'ionisation selon le type de l'échantillon à analyser

Type d'ionisation	Symbole	Type de molécules
Ionisation à impact électronique	IE	Petites molécules volatiles et thermostables
Ionisation chimique	IC	
Ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides	LSIMS ou FAB	
Ionisation par électroébullition	ESI	Biomolécules (1 300 kDa) et complexes protéique non-covalents
Désorption/Ionisation Laser assistée par Matrice	MALDI	

5.1.2.1. 1. Sources ESI

L'ESI produit des ions multichargés en phase gazeuse, ce qui ne nécessite pas le couplage avec un analyseur possédant une gamme de masse très étendue (Kalbaugh, 2009). Ainsi, la source ESI peut être couplée à tous types d'analyseur (Le Gac, 2004). En électrospray ionisation (ESI), l'analyte en solution est introduit dans la source à travers un capillaire métallique, entre ce capillaire et la contre-électrode séparée de quelques millimètres, une différence de potentiel de 3 à 6 kV est appliquée induisant un fort champ électrique (Smith et al., 1989; Gottardo et al., 2007) (Figure 29). En mode positif, ce champ électrique induit la migration des ions positifs du capillaire vers la contre-électrode. A la sortie du capillaire, les charges positives s'accumulent à la surface du liquide. Quand la répulsion entre les charges positives combinée à l'attraction du champ électrique dépasse la tension de surface du liquide (Yamashita and Fenn, 1984), il y a formation d'un cône de Taylor (Kearle, 2000). Toujours sous l'effet du champ électrique, le cône de Taylor se rompt pour former un filament qui produit des gouttelettes hautement chargées. Sous l'effet conjugué des gaz favorisant la nébulisation, du chauffage dans la source, le solvant des gouttelettes est évaporé (désolvation), conduisant à des gouttelettes de plus en plus petites

et de charge constante mais la densité de charge augmente significativement (Smith et al., 1990). Les gouttelettes explosent (explosion Coulombienne) quand la densité de la charge est suffisamment importante pour dépasser la tension de surface qui maintient les gouttelettes ensemble (limite de Rayleigh) (Figure 29). Pour ce dernier point, deux théories principales sont énoncées. La première, proposée par Dole et al., (1968), est connue sous le nom du "modèle du résidu chargé" (CRM). D'après cette théorie, il se produit une série de fissions conduisant à des microgouttelettes finales comportant une ou plusieurs charges en excès mais seulement une molécule d'analyte. La seconde théorie, réalisée par Iribarne et Thomson (1976), nommée « mécanisme d'évaporation de l'ion », rapporte que l'évaporation du solvant s'accompagne d'une série de fissions engendrant une réduction de la taille des microgouttelettes finales à un rayon de 10 à 20 nm.

Tableau 11. Récapitulatif des avantages et inconvénients associés à l'utilisation d'une source ESI ou MALDI

Source	Avantages	Inconvénients
ESI	-Reproductible	-Spectres de masse complexes
	-Formation d'ions multichargés -Couplage HPLC	-Consommation importante de l'échantillon (sauf en nano spray ou quand couplé avec l'HPLC ou l'électrophorèse capillaire)
MALDI	-Rapidité d'analyse	-Faible reproductibilité
	-Large gamme de masse analysée (de peptides à protéines)	-Résolution faible pour les grosses molécules
	-Spectre de masse simple (ion mono-chargée)	-Interférence des ions de matrice dans les basses masses, empêchant la détection de petites molécules
	-Imagerie moléculaire possible pour les tissus	-Couplage surtout à l'analyseur de type TOF
	-Grande sensibilité	-Cartographie peptidique en mode MALDI non applicable directement pour l'identification de peptides endogènes car pas de digestion enzymatique.

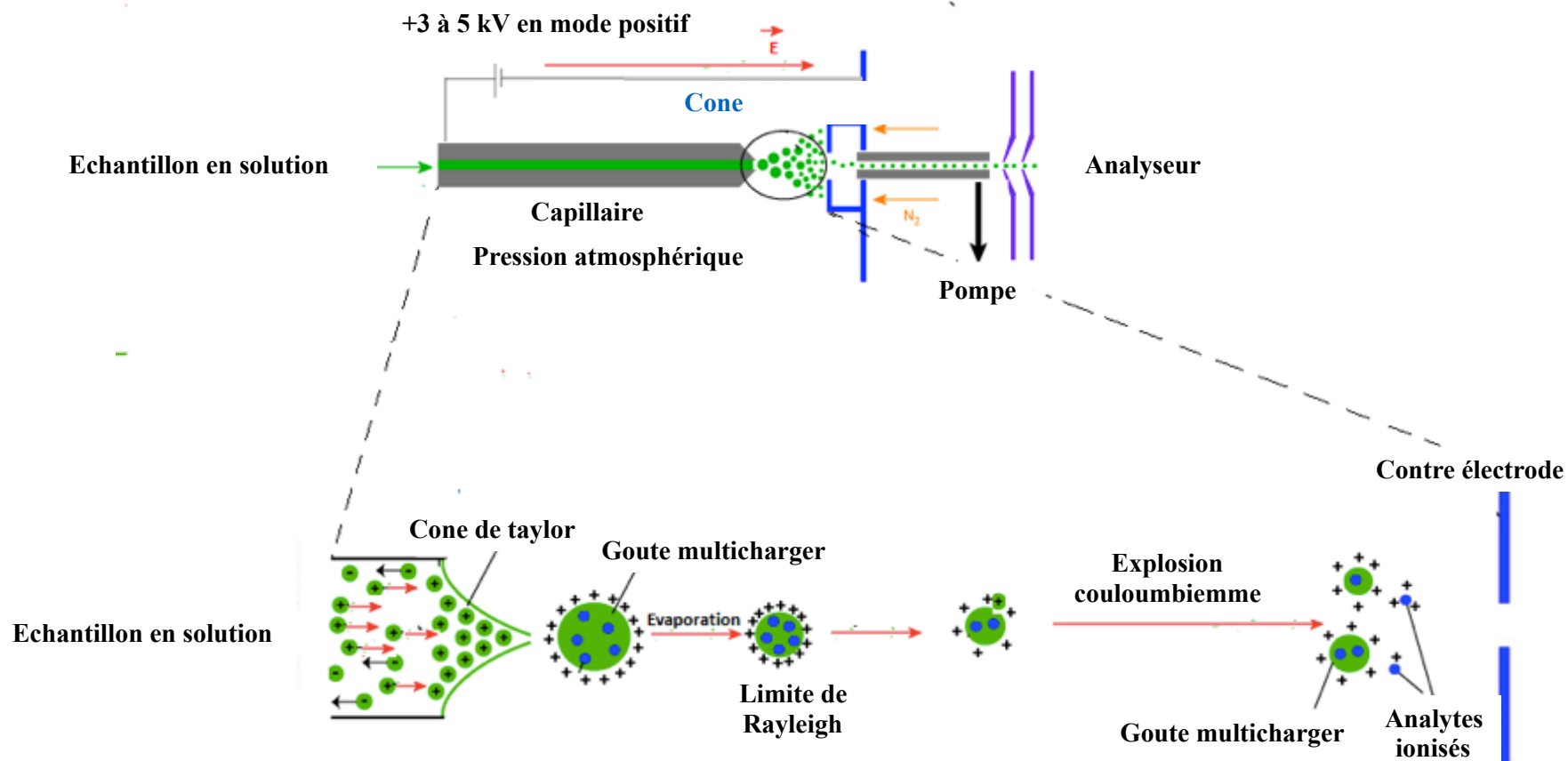


Figure 29. Schéma décrivant le principe de la formation ionique en électro spray ionization (ESI) (Modifiée de Soares et al., 2012). En électro-spray l'ionisation de l'échantillon arrive sous forme liquide, sous la production d'un champ électrique intense une cône de Taylor se forme, avec apparition de gouttelettes multichargées qui, suite à une désolvatation et une explosion, atteignent la limite de Rayleigh afin de former les composés ionisés qui seront par la suite analysés.

5.1.2.2. Analyseur

L'analyseur permet de séparer les ions produits en fonction du rapport masse/charge (appelé m/z) qui s'exprime en Thomson (Th). Il existe de différents types d'analyseurs (Tableau 12). Les caractéristiques principales d'un analyseur sont la résolution R , la gamme m/z qu'il peut analyser, la rapidité de balayage, la sensibilité et la vitesse avec laquelle les ions le traversent (Menet, 2011). La vitesse de balayage d'un analyseur, varie énormément en fonction des différents types d'analyseurs (Harakat, 2011).

La résolution R d'un analyseur définit la capacité de distinguer une masse M par rapport à une masse $M + \Delta M$. Il est admis que deux pics sont résolus quand l'intensité de la vallée entre ces pics soit égale à 10% de l'intensité du pic le plus faible. La résolution pour un pic isolé se calcule en prenant la largeur du pic Δm à 50% de son maximum. Alors dans ce cas il s'agit de résolution FWHM (Full Width at Half Maximum) (Van Loef et al., 2001), et la largeur Δm est prise à 50% de son maximum (Figure 30).

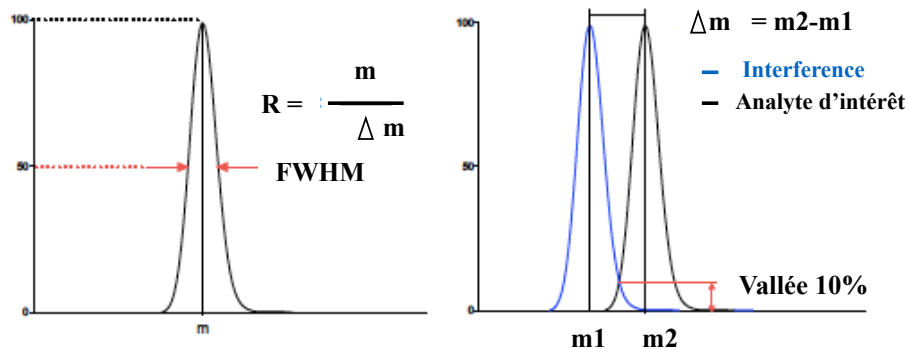


Figure 30. Résolution d'un spectromètre de masse

Les analyseurs les plus utilisés en peptidomique, sont les analyseurs de type quadripolaire (Q), les trappes ioniques ou pièges à ions (IT) et les trappes ioniques linéaires (LIT) (Vatansever et al., 2010) (Tableau 12). Ainsi que des analyseurs hybrides couplant deux ou plusieurs analyseurs tels que les triples quadripôles (QqQ), le quadripôles couplé au temps de vol (QqTOF) (Rusconi,

2011), et également, l'hybride QqOrbitrap (Scigelova and Makarov, 2006; Westman-Brinkmalm and Brinkmalm, 2008; Senko et al., 2013). Les analyseurs hybrides permettent d'obtenir des informations complémentaires, une sensibilité et une capacité de séparation encore plus importante que l'analyseur seul. Chacun de ces instruments possèdent ses propres caractéristiques dont il faut tenir compte afin de choisir le meilleur analyseur pour l'étude souhaitée. En peptidomique, l'analyseur permet à la fois de réaliser la détection et l'identification en mode MS, ainsi que la quantification et la caractérisation en mode MS/MS (Aebersold and Mann, 2003; Ouedraogo, 2013).

Tableau 12. Différents types d'analyseurs utilisés en spectrométrie de masse ainsi que leurs principes

Type	Symbole	Principe
Secteur électrostatique	E	Dispersion d'un faisceau ionique continu dans un champ électrique constant; séparation selon l'énergie cinétique des ions
Secteur magnétique	B	Dispersion d'un faisceau ionique continu; séparation selon le momentum des ions dans un champ magnétique
Temps de vol	TOF	Dispersion temporelle d'un faisceau ionique pulsé; séparation selon le temps de vol
Quadripôle linéaire	Q	Faisceau ionique continu dans un champ quadripolaire linéaire de radio fréquence; séparation selon la stabilité de trajectoire
Trappe ionique quadripolaire linéaire	LIT	Faisceau ionique continu et ion piégés; accumulation et séparation dans un champ linéaire de radio fréquence quadripolaire
Trappe ionique quadripolaire	QIT	Ions piégés; séparation selon la trajectoire stable d'ions dans un champ quadripolaire tridimensionnelle de radio –fréquence
Résonance ionique cyclotronique	ICR	Ions piégés; séparation selon la fréquence cyclotronique dans un champ magnétique

En protéomique analyseurs de masse les plus utilisés sont sélectionnés en gris

5.1.2.2. 1. Analyseur quadripolaire

Le principe du quadripôle a été décrit par Paul et Steinweger (1953). Un quadripôle est composé de quatre barreaux hyperboliques parallèles sur les lesquels est appliqué de façon alternative un

potentiel positif ou négatif : Le potentiel appliqué $\Phi_0 = U - V \cos(\omega t)$ est composé d'une tension continue U et d'une tension alternative d'amplitude maximale V et de fréquence angulaire (Menet, 2011) (Figure 31). Lorsque les ions pénètrent dans le quadripôle, ils se déplacent selon l'axe z grâce à leur vitesse initiale. Au temps t_1 , la polarité des barreaux situés sur l'axe y est négative. Les ions positifs vont donc être déviés selon l'axe y . Puisque le potentiel appliqué sur les barreaux est constitué d'une tension alternative, la polarité des barreaux au temps t_2 va être inversée. De ce fait, les ions positifs seront déviés selon l'axe x . Cette polarité est alternée au cours du temps ce qui a pour effet de donner aux ions une trajectoire oscillante (Ardrey, 2003). Ainsi, l'ion pourrait avoir deux destinations soit de traverser le quadripôle en ayant une trajectoire oscillante (ion stable), soit de percuter l'un des quatre barreaux (ion instable) (March and Todd, 2005). Pour prédire quels ions seront stables, il faut revenir aux forces d'attraction et de répulsion que subissent les ions dans le quadripôle (Walther and Mann, 2010). Pour effectuer un balayage dans un quadripôle, il faut donc faire varier simultanément U et V en gardant le rapport U/V constant. Plus ce rapport est élevé, plus la sélectivité du filtre en masse est importante donnant donc une meilleure résolution (Lippert, 2016). Le quadripôle est donc un analyseur séquentiel, il analyse les ions masse par masse d'abord m_1 pendant une durée t_1 , puis m_2 pendant une durée t_2 . Une grande partie des ions arrivant à l'entrée du quadripôle est donc perdue vu que la trajectoire des ions de masse m_1 n'est pas stable pendant la durée d'analyse des ions m_2 (Rusconi, 2011). Un quadripôle permet donc soit d'analyser un seul ion, soit de balayer une plage de masse de façon séquentielle afin de reconstituer un spectre de masse (Gallien et al., 2012). Le quadripôle est un analyseur à basse résolution (de l'ordre de 2000 pour un ion ayant un rapport m/z de 1 000). Cependant, un triple quadripôle est un analyseur hybride constitué de trois quadripôles positionnés en série, avec des fonctions propres. Le premier quadripôle (Q_1) et le troisième quadripôle (Q_3) fonctionnent comme des filtres de masse qui laissent passer tous les ions ou seulement les ions sélectionnés, selon le mode de balayage utilisé. Le second quadripôle

(Q_2) est une chambre de collision qui permet de fragmenter les ions sélectionnés. L'avantage de cet instrument est l'augmentation de la sélectivité via l'utilisation de deux filtres de masses, l'un à la suite de l'autre (Yost and Enke, 1979; Hopfgartner et al., 2004).

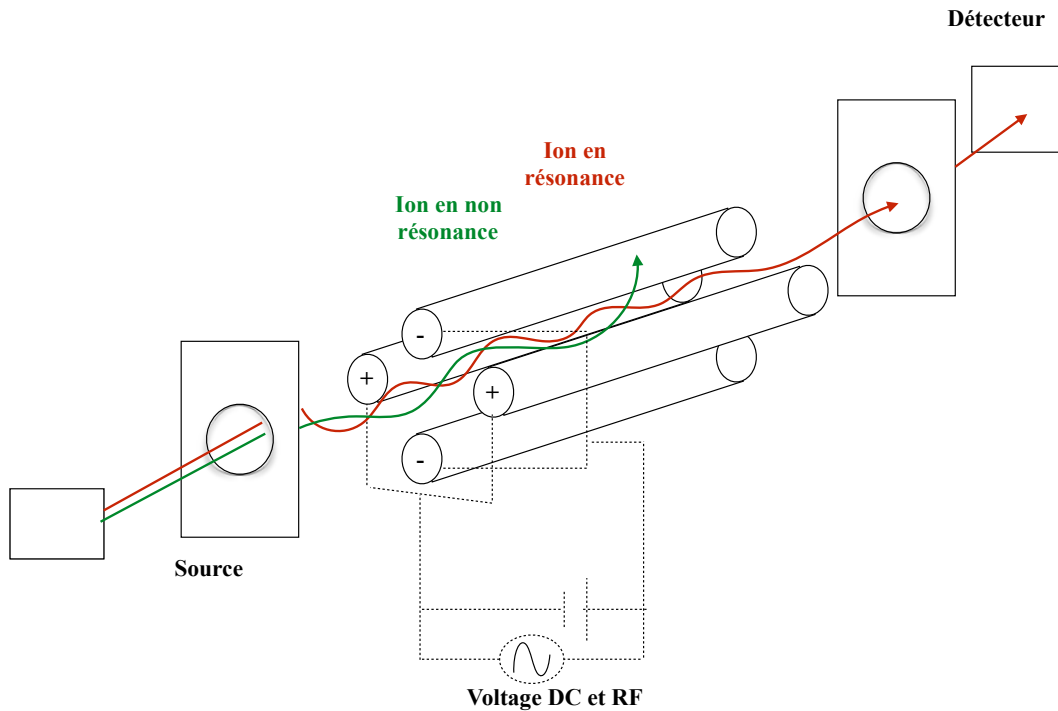


Figure 31. Schéma d'un analyseur quadripolaire (Inspirée de De Hoffmann and Stroobant, 2007) Un filtre de masse quadripolaire se compose de quatre tiges métalliques parallèles disposées. Deux barres opposées ont un potentiel appliqué de $(U + V\cos(\omega t))$ et les deux autres barres ont un potentiel de $-(U + V\cos(\omega t))$, où U est une tension continue et $V\cos(\omega t)$ est une tension alternative. Les tensions appliquées affectent la trajectoire des ions parcourant le quadripôle. Seuls les ions d'un certain rapport m/z traversent le filtre quadripolaire et tous les autres ions sont rejetés hors de leur chemin d'origine.

5.1.2.2. 2. Trappe ionique

Les analyseurs de type trappe ionique (IT pour ion trappe) permettent de capturer les ions en direction axiale avec application d'une radiofréquence et en présence d'hélium pour l'IT de Thermo Scientific, et de les accumuler pendant un temps donné pour les analyser (McLucky et al., 1994; Makarov et al., 2006). Il existe deux types d'IT : la trappe tridimensionnelle (3D) et la trappe linéaire (LIT). Les IT sont robustes, sensibles, abordables et permettent de produire

beaucoup d'informations structurales en effectuant la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (Michalski et al., 2011; Liu et al., 2016).

a) Trappe tridimensionnelle ou quadripolaire

La trappe tridimensionnelle a été décrite en 1953 par Paul et Steinwedel en même temps que le quadripôle. Elle a été décrite et utilisée également dans de nombreuses études (March, 2009; Marinach-Patrice et al., 2011; Menet, 2011; Rösch et al., 2016; Matamala et al., 2017). Il y a en effet de fortes analogies entre ces deux types d'analyseur. La trappe est constituée de trois électrodes (Figure 32a), une électrode annulaire recouverte de part et d'autre de l'espace central et deux électrodes hyperboliques (électrodes chapeaux) (Jonscher and Yates, 1997; Gross, 2006). Un potentiel est appliqué sur l'électrode annulaire. Ce potentiel est semblable à celui appliqué sur les barreaux d'un quadripôle : il est composé d'une tension continue U et d'une tension alternative d'amplitude V . L'entrée des ions s'effectue à travers un orifice percé dans l'une de ces électrodes (calotte supérieure) (Cravello, 2005). A l'intérieur de la trappe, les ions suivent une trajectoire oscillante et la stabilité de la trajectoire dépend de la radiofréquence appliquée sur l'électrode annulaire; plus la radiofréquence est élevée, plus le puits de potentiel sera important, améliorant ainsi le piégeage des ions (Malcolm et al., 2010; Gang et al., 2015). Par contre, la profondeur du puits de potentiel est inversement proportionnelle au rapport m/z des différents ions piégés, ce qui signifie que plus l'amplitude sera importante, plus les ions de faible ratio m/z auront une trajectoire instable et risqueront de ne pas être piégés par la trappe (Dugourd, 2013; Deeb, 2014). Ensuite, la radiofréquence appliquée sur l'électrode annulaire est augmentée progressivement, entraînant une déstabilisation de la trajectoire des ions et donc leur éjection successive vers le détecteur par l'orifice de l'électrode chapeau de sortie, dans l'ordre des rapports m/z croissants (Jardino et al., 1983; Carapito, 2006; Ayoub, 2012). Ainsi, les ions peuvent rester piégés dans la trappe pendant le temps nécessaire au déroulement de l'analyse,

mais le nombre d'ions piégés dans une IT conventionnelle reste limité afin de ne pas saturer le piège et donc préserver la sensibilité. De même, la résolution d'une trappe 3D est inversement proportionnelle à la vitesse de scan (Träbert, 2016).

La différence majeure avec le quadripôle est que dans une trappe, tous les ions sont piégés simultanément à l'intérieur de la trappe, qui possède un volume de 1 à 2 cm³ quelque soit leur rapport m/z et leur énergie cinétique est réduite par les collisions provoquées avec le gaz de collision, l'hélium, présent dans le piège (Thébault et al., 2001; Ayoub, 2012; Thalhamer, 2017).

b) Trappe ionique linéaire

La trappe ionique linéaire (LIT) possède la capacité de stocker les ions dans un cylindre bien plus large que la trappe ionique 3D permettant ainsi d'augmenter la sensibilité, la résolution et la précision de la masse (Douglas et al., 2005; Austin et al., 2007). Son fonctionnement est basé sur l'action d'un champ électrique de radiofréquences (Hager and Le Blanc, 2003) (figure 32b). Dans une première étape, les ions pénètrent dans la trappe à travers l'électrode E₁ dont le potentiel est faible. Cependant, le potentiel de la seconde électrode E₂ est élevé afin d'empêcher la sortie des ions (Hübschmann, 2015). Ensuite, le potentiel de l'électrode E₁ est également augmenté de façon à ce que les ions soient piégés selon l'axe z (piège axial). Les ions ainsi piégés font des oscillations selon l'axe z. Le mouvement des ions dépend de leur rapport m/z car il existe des zones de stabilité ou un ion d'une masse « m » demeure en mouvement oscillatoire donc piégé dans la trappe (Pang et al., 2016).

Par la suite, les ions piégés sont éjectés sélectivement en fonction de leur rapport m/z. De plus, la sensibilité du balayage est améliorée, facilitant la spectrométrie de masse en tandem (Guan et al., 2017). La résolution dans une trappe à ions est légèrement supérieure à celle rencontrée dans un quadripôle (de l'ordre de 4 000 pour un ion de rapport masse sur charge de 1000). La limitation

des trappes à ions apparaît lorsqu'une fragmentation des ions est nécessaire comme c'est généralement le cas en quantification. En effet, pour réaliser une quantification les ions doivent être piégés avant de pouvoir générer un signal (Simon et al., 2012). Le temps nécessaire à ce piégeage (de l'ordre de quelques dizaines à centaines de millisecondes) n'est généralement pas compatible avec une quantification sensible et simultanée de plusieurs composés. En revanche, couplés avec un analyseur comme l'Orbitrap ou le quadripôle les pièges à ions peuvent apporter un réel gain de spécificité qui se traduit par un gain de sensibilité (Allegrand, 2012).

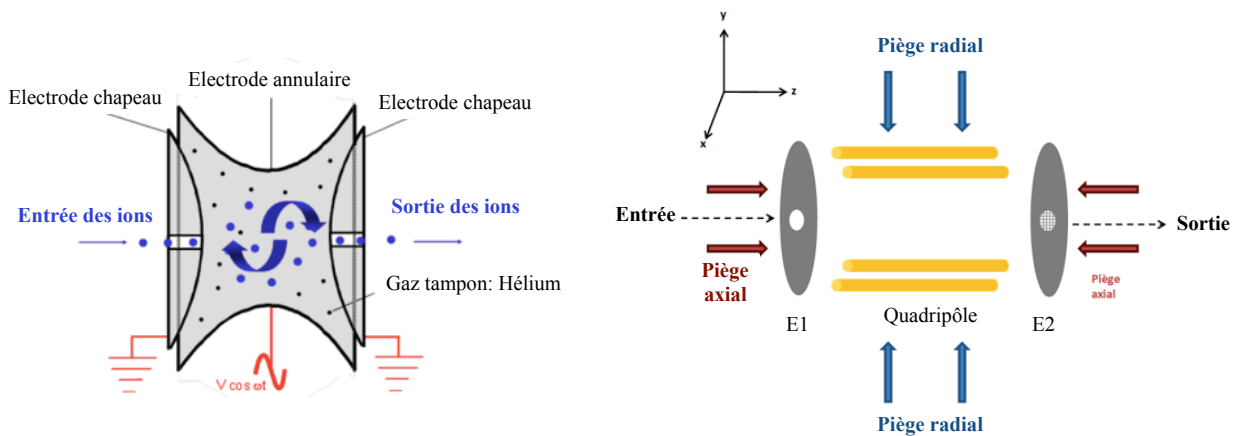


Figure 32. Principe de la trappe ionique a) Trappe 3D, b) Trappe linéaire

5.1.2.2. 3. L'Orbitrap

Un analyseur Orbitrap basé sur le même principe que celui de la trappe à ion est composé d'une électrode creuse dans laquelle se positionne une électrode en forme de fuseau (Figure 33). Cette géométrie permet l'imposition d'un champ électrostatique quadro-logarithmique sous tension (Hu et al., 2005; Becker, 2013). Les ions entrent tangentiuellement à l'électrode centrale puis tournent autour de celle-ci. Les forces électrostatiques compensent les forces centrifuges et selon l'axe z, les ions oscillent en fonction de leur rapport m/z à une fréquence f donnée (Andriamanana, 2009).

La mesure de cette fréquence permet ensuite de remonter à la masse des ions par transformée de Fourier.

Les spectromètres de masse de type orbitrap les plus utilisés sont souvent des analyseurs hybrides. C'est-à-dire que l'orbitrap est couplé avec d'autres analyseurs comme le piège ionique linéaire ou le quadripôle. Les analyseur de type orbitrap permet des analyse à haute résolution allant jusqu'à 1 000 000 (Denisov, 2012) et d'obtenir des mesures de masse exacte avec une précision de masse ≤ 2 ppm (Washburn et al., 2001).

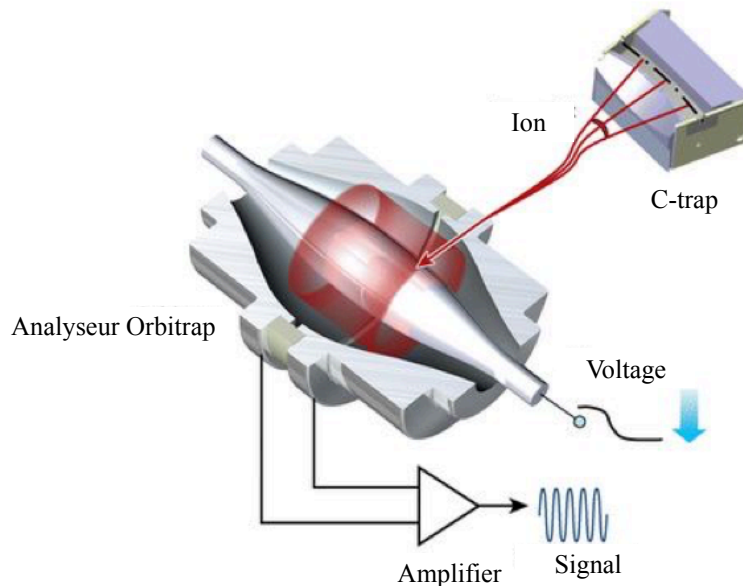


Figure 33. Principe de l'Orbitrap.

Les ions sont injectés dans l'espace séparé par deux électrodes de forme géométrique parfaitement définie. Suivant son rapport m/z , l'ion oscille autour de l'électrode centrale avec une fréquence caractéristique. La mesure de cette fréquence permet d'atteindre une grande précision et de séparer des ions de masses très proches.

5.1.2.3. Détecteur

Le détecteur permettant la conversion d'un courant ionique en courant électrique, mesure en fonction des valeurs de m/z l'intensité du signal correspondante. Ainsi, les résultats sont exprimés par des spectres de masse présentant les variations du courant ionique en fonction du

rapport m/z (Ganem et al., 1991). Ceci implique, la création des champs électrostatiques très précis pour guider et déplacer les ions dans l'appareil (lentilles électrostatiques, optique ionique) et un vide suffisant pour déplacer les ions sans être détruits ou déviés par des molécules résiduelles (notion de libre parcours moyen). Il existe différents types de détecteurs permettant de compter les ions et d'amplifier le signal. Les trois, plus courants sont le cylindre de Faraday, le multiplicateur d'électrons et le multiplicateur de photons (Daly, 1960). Le détecteur le plus utilisé est le multiplicateur d'électrons qui utilise le principe de l'émission d'électrons secondaires pour amplifier le signal (Harris et al., 1984). Le faisceau d'ions sortant de l'analyseur est focalisé sur la dynode de conversion qui émet des électrons directement proportionnels au nombre d'ions présents (conversion ions à électrons). Les électrons secondaires obtenus avec la dynode sont accélérés et focalisés sur une seconde dynode qui émet à son tour des électrons secondaires (conversion électrons à électrons). Chaque étape est connectée à un potentiel de plus en plus élevé, et le collecteur final (ou anode) est connecté à un amplificateur conventionnel (McFadden, 1973) (Figure 34) qui possède une bonne sensibilité avec une forte amplification.

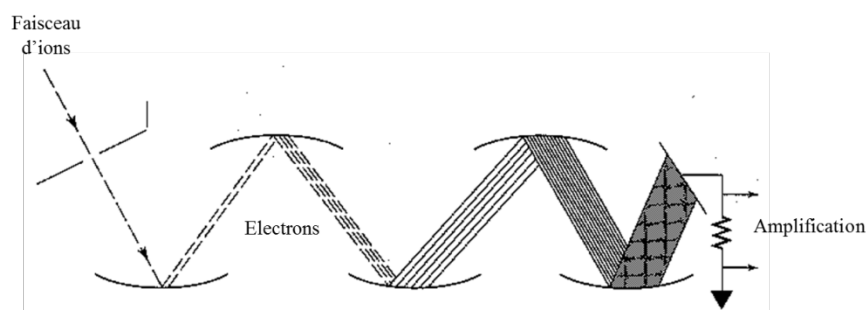


Figure 34. Diagramme conceptuel du multiplicateur d'électrons avec dynode (McFadden, 1973).

5. 2. Mode d'analyse MS

Les ions issus de l'interface et piégés dans l'analyseur sont sélectionnés selon un rapport m/z donc un ion présent dans un mélange complexe d'ion pourrait être purifié. Différents modes de balayage peuvent être utilisés, selon l'information recherchée. Le mode « full scan MS » balaye

tous les rapports m/z. Ainsi, les ions sont séparés dans l'espace en fonction du temps. Il en résulte la détection d'un grand nombre d'ions issus de la source et ayant des rapports m/z différents appartenant à l'intervalle ciblé (Bouchonnet and Libong, 2004; Chughtai and Heeren, 2010; Fay and Kussmann, 2010; Menet, 2011; Plumel, 2015).

Suite à l'obtention d'un spectre de masse, un processus d'interprétation doit être établi telle que l'identification des ions précurseurs (parents) des bruits de fond. En effet, il faut programmer l'acquisition des fragments uniquement à partir d'une certaine masse dans la configuration de l'appareil (Botter and Bouchoux, 1995; Buridon, 2013). Une fois les pics moléculaires des ions précurseurs sont identifiés la réalisation d'une fragmentation en mode MS-MS devient possible afin de déterminer la structure de l'analyte (Beaudry et al., 2009).

5. 3. Mode d'analyse MS/MS (MS²)

La spectrométrie de masse en tandem permet d'étudier la structure des molécules et d'identifier de manière très spécifique certains ions (Hunt et al., 1986; Peng et al., 2003; Kappelmann et al., 2017; Carson and Kerrigan, 2017). Son principe se base sur l'isolement d'une part de l'ion précurseur (ion parent) que l'on désire fragmenter, d'autre part de sa fragmentation (Schwartz 1990; Biemann, 1990a). Ainsi, l'ion sélectionné par un premier analyseur se décompose spontanément (ion métastable) et entre en collision dans une cellule, remplie d'un gaz inerte le plus souvent de l'Argon, de l'azote ou de l'Hélium (Coon et al., 2005). Ensuite, les fragments résultants sont étudiés par un second analyseur. Les différents ions produits (ion fragments) générés ne seront plus déstabilisés (la fréquence appliquée ne correspondra plus au rapport m/z des différents ions produits) (Chaimbault, 2000). En utilisant un ESI, les différents ions produits seront alors éjectés de l'analyseur vers le détecteur, comme décrit précédemment. Ce mode de balayage est relativement sélectif car, par exemple, deux ions précurseurs de même rapport m/z

ne se fragmentent pas selon le même patron, entraînant donc la formation d'ions fragments différents et possédants des rapports m/z propres à leurs structures (Perry et al., 2008) (Figure 35). La méthode MS/MS peut être réalisée en combinant plusieurs analyseurs de même type comme le triple quadripôle ou de types différents, ce sont des analyseurs dits hybrides comme le Q-TOF (Kang, 2012; Wang et al., 2014) qui consiste en une association d'un quadripôle et d'un analyseur à temps de vol.

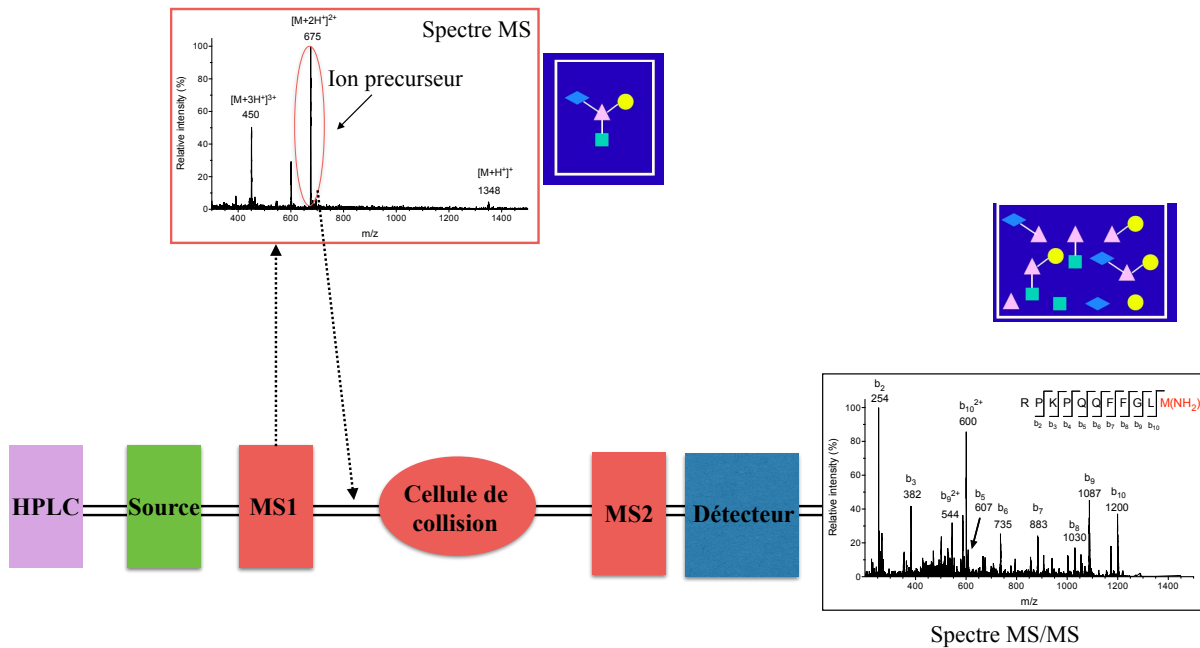


Figure 35. Schéma de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

5.4. Détermination de la structure primaire d'un peptide à l'aide des spectres MS et MS/MS

La détermination de la structure primaire d'un peptide peut se faire par des spectres MS/MS (Bertaccini, 2014; Mechref and Novotny, 2002; Srebalus Barnes and Lim, 2007; Adamson, 2008; Alayi, 2013). L'échantillon biologique contenant le peptide ciblé est analysée par HPLC-MS. Les peptides sont analysés en spectrométrie de masse en mode full scan. Le pic abondant est sélectionné pour la fragmentation. Par la suite, les différentes transitions de fragments sont

identifiées. L'ensemble des fragments observés, comparée avec les fragments générés *in silico* (ex., Mmass).

Les ions résultants de la fragmentation d'un peptide sont illustrés par un patron de fragmentation. La rupture d'une liaison de la chaîne peptidique peut avoir lieu au niveau de trois types de liaisons C α -C, C-N ou N-C α pour donner six types de fragments désignés par a_n, b_n et c_n du côté N-terminal et des fragments x_n, y_n et z_n du côté C-terminal (Figure 36).

Les ions observés dépendent de nombreux facteurs, notamment de la séquence du peptide, de sa charge initiale, de l'énergie de la collision induisant la fragmentation, de la nature et de la localisation d'acide aminée basique. La présence d'acide aminée basique au niveau du peptide oriente la nature des ions fragments obtenus en b et y (Tsaprailis et al., 2000).

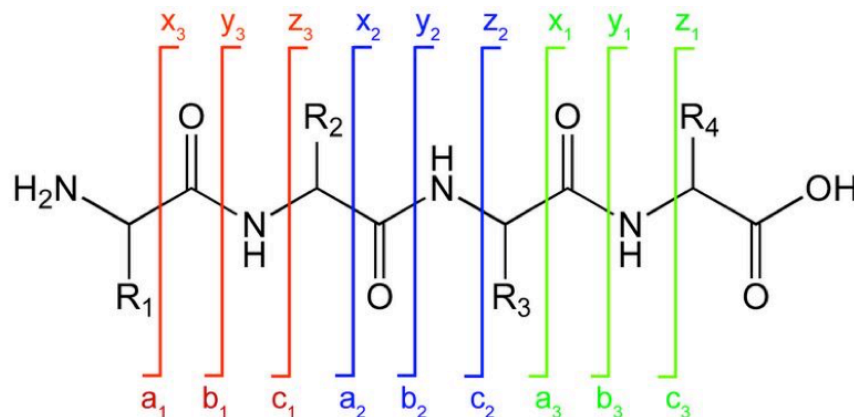


Figure 36. Schéma d'un patron de fragmentation protéique et détermination de la structure d'une protéine à partir du spectre MS et MS/MS (Inspirée de Roepstorff and Fohlman, 1984; Biemann, 1990)

Les fragmentations de peptides de faible énergie produisent généralement des ions y, a et b, avec des pics résultants de la perte de NH₃ (a*, b* et y*). Les fragmentations du peptide sur ses deux sites b et y forment un fragment interne. Les fragments a, b et c contiennent l'extrémité N-terminale, tandis que les fragments x, y et z possèdent l'extrémité C-terminale du peptide. Le numéro indiqué (n) correspond au nombre d'acides aminés contenu par le fragment.

5.5. Mode Multiple Réaction Monitoring (MRM) et Single Réaction Monitoring (SRM)

Les modes MRM et SRM permettent de quantifier des ions avec une très grande sensibilité (Phinney et al., 1998; Hunter and Simons, 2008). Les paramètres du premier analyseur sont

choisis en considérant le rapport m/z à étudier. L'ion est fragmenté dans la cellule de collision et le second analyseur est focalisé sur l'un des fragments produits (Lange et al., 2008; Vidova and Spacil, 2017). Ainsi, l'analyse inclut deux étapes : **(1)** sélection soit de différents ions de m/z prédéfinis (mode MRM) ou un seul ion de m/z prédéfinis (mode SRM), un ion précurseur et un ion fragment qui lui est caractéristique, **(2)** Ces deux ions sont sélectionnés et analysés simultanément. Enfin, un fragment spécifique de l'ion précurseur, de valeur m/z prédéfinie, est sélectionné. C'est l'intensité du signal généré par ce fragment qui est utilisée pour la quantification de la molécule analysée. Cette méthode permet de minimiser le bruit de fond en augmentant la sélectivité de l'analyse (Figure 37).

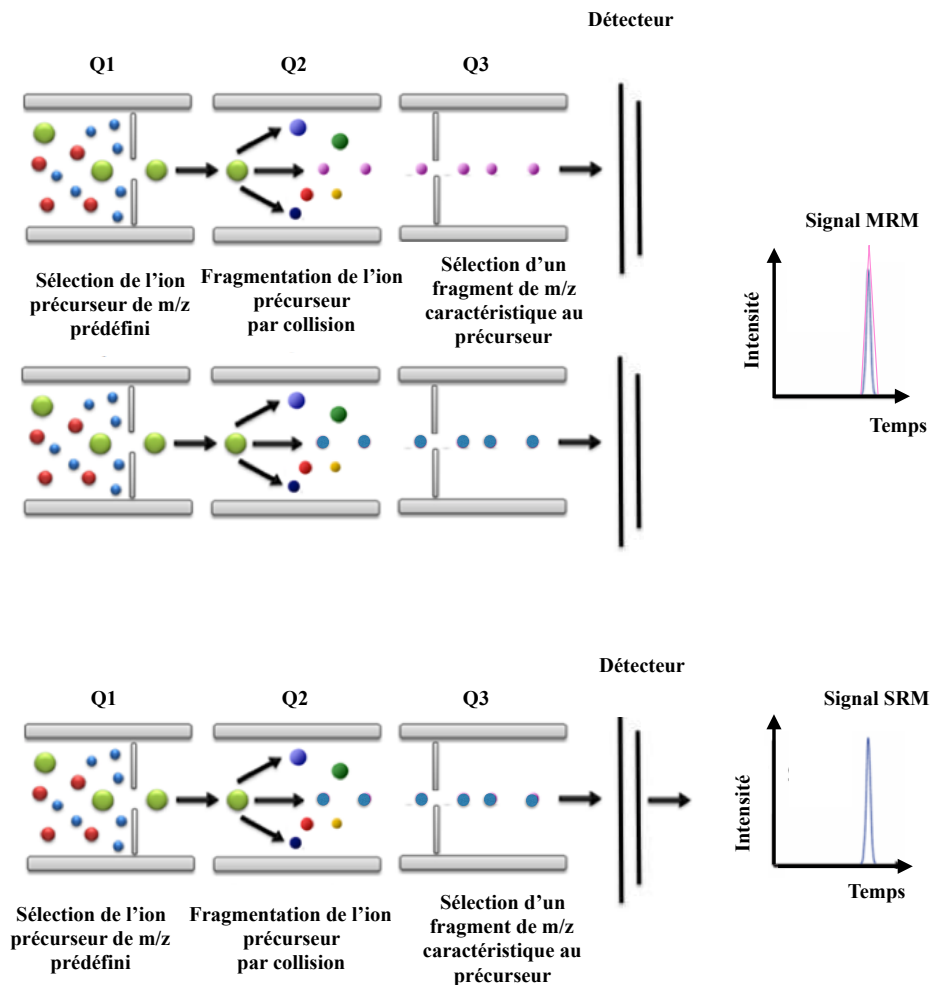


Figure 37. Représentation schématique du mode MRM et SRM

5. 6. Stratégie de quantification

Diverses stratégies de la quantification ont été développées pour détecter des changements par rapport à l'abondance peptidique entre divers échantillons à comparer (Bantscheff et al., 2007; Mueller et al., 2008). De même, la quantification de peptides par spectrométrie de masse peut être relative ou absolue (Griffiths et Wang, 2009; Vogel and Marcotte, 2012). La quantification relative fournit des comparaisons relatives de l'abondance des protéines entre un ensemble d'échantillons (Bogdanoff et al., 2016). Par exemple, entre un groupe sain et un ou plusieurs groupes pathologiques (Raj et al., 2012). Il s'agit, en effet, de comparer les aires des pics des analytes d'intérêt. A l'inverse, la quantification absolue vise à déterminer les concentrations des peptides dans des échantillons biologiques, permettant ainsi la comparaison de données exactes (Smith et al., 2007).

Les analyses spectrométriques peuvent être divisées en deux catégories. La première catégorie est basée sur un marquage isotopique stable (Yin et al., 2011; Bohnenberger et al., 2015). Cependant, la deuxième catégorie est réalisée sans marquage isotopique nommée « label free » (Mouton-Barbosa et al., 2010; Im et al., 2014).

Au niveau des analyses réalisées par marquage isotopique stable, une distinction entre les échantillons marqués de ceux non marqués est possible (Ayoub, 2012). Les valeurs quantitatives sont calculées par rapport au ratio de l'intensité des pics, dont l'une comporte seulement l'isotope natif tandis que l'autre porte un certain nombre d'isotopes lourds stables. Ayant les mêmes propriétés chimiques, les isotopes peuvent être introduits simultanément mais clairement distingués par leur différence de masse. A partir des ratios peptides lourd et léger, est mesurée l'abondance relative entre les échantillons.

Toutefois, les approches basées sur un marquage isotopique ne sont pas toujours pratiques ou faisables pour cela des méthodes sans marquage (label free) sont considérées (Gautier, 2012a), qui est une technique de plus en plus utilisée en peptidomique, car elle ne nécessite aucune préparation chimique et donc aucune modification de l'échantillon à analyser (Cox et al., 2014). Elle permet aussi d'analyser un grand nombre de peptides simultanément. C'est une méthode sans marquage où les échantillons à comparer sont introduits individuellement dans un spectromètre de masse, et les intensités et les fréquences des pics sont comparées dans des analyses séparées, afin de calculer l'abondance relative (Bantscheff et al., 2007; Mueller et al., 2008). Dans un premier temps, il est nécessaire d'aligner les transitions de masses sélectionnées afin de s'assurer qu'elles correspondent à la structure du peptide ciblé (Rusconi, 2011). Ensuite, une optimisation de ces transitions utilisées pour créer une méthode analytique sensible serait envisagée (Geer et al., 2004). Ces opérations sont suivies par un traitement statistique des données relatives aux transitions. La quantification est basée sur la comparaison de profils MS et la comparaison des intensités du signal observées entre les deux échantillons (Le Bihan et al., 2006). Ceci permet de corrélérer les changements de concentrations peptidiques entre de différents phénotypes et/ou génotypes (wild-type vs knockout) et de comparer un nombre illimité d'échantillon même si chaque échantillon doit être analysé individuellement (Fantuzzi and Dinarello, 1996; Weinstock et al., 2003; Glaser et al., 2011). L'inconvénient de cette méthode est que chaque variation dans la préparation, l'injection et l'analyse d'échantillon peut mener à plusieurs erreurs expérimentales, et compliquera de manière significative la comparaison des échantillons. Des changements chromatographiques peuvent survenir à la suite d'injections multiples d'échantillons sur la même colonne. Le biais expérimental peut donc avoir un impact important sur le résultat final .

5. 6.1 Quantification absolue par la méthode de standard interne

La quantification absolue peut être obtenue par l'addition d'une quantité connue d'un peptide étalon (marqué ou non par un isotope stable). C'est ce qu'on appelle étalonnage interne (Ciccimaro and Blair, 2010). L'étalonnage interne, repose sur l'ajout d'une quantité connue et unique dans toutes les solutions étalons et tous les échantillons d'une molécule servant de référence durant les phases de l'analyse (Brun et al., 2007). Bien évidemment, l'étalon interne doit être distinguable des analytes cibles et avoir des propriétés physiques et chimiques proches des analytes à analyser (Lodge, 1988; Xu et al., 2005; Stokvis et al., 2005). Lors de l'analyse, les éventuelles variations d'intensité (instrumentales, erreur de prises d'échantillon, dilutions,...) dans la détection des analytes sont également observées pour les étalons internes puisque ces molécules se comportent de la même façon. En travaillant avec le rapport des deux signaux (analyte et étalon interne), il est alors possible de s'affranchir de ces variations (Finley-Jones et al., 2008). Par ailleurs, si l'échantillon subit un traitement au préalable, les mêmes pertes en analyte et en étalon interne en résultent (MacCoss and Matthews, 2005). Il est alors possible, grâce à cette technique, de déterminer la concentration en analyte dans l'échantillon. Ainsi, le traçage d'une droite de calibration ou droite d'étalonnage permet de déterminer la concentration des échantillons à analyser en faisant le rapport de la surface du standard interne/surface de l'analyte (Figure 38) (Sojo et al., 2003; Wu et al., 2005).

Dans cette méthode de standard interne, les peptides sont soit marqués ^1H , ^{12}C ou ^{14}N (léger), soit ^2H , ^{13}C ou ^{15}N (lourd), ce qui permet de les différencier par leurs masses respectives (Schulte et al., 1998). La différence de masse entre le peptide léger et le peptide lourd dépend du nombre d'atomes lourds incorporés (^{13}C , ^{15}N , ^2H) sur les résidus acides aminés du peptide. Le plus souvent, ce sont les résidus glycine, leucine et phénylalanine qui sont marqués car la réaction est simple et facilement contrôlable (Godin and Schierbeek, 2017), mais tous les acides aminés

sont disponibles commercialement pour la synthèse de novo des peptides ciblés. Dans le cas de ce marquage, les propriétés physicochimiques demeurent relativement similaires tout en permettant de savoir si un peptide est sur ou sous exprimé vis-à-vis de la pathologie étudiée (Fenselau and Yao, 2009; Hall et al., 2012). Également, Il existe des marquages par dérivation chimique (Garcia et al., 2007; Abello, 2010; Liang et al., 2016), qui sont rapides et peu couteux tel que le marquage par l'acétylation peptidique sur l'acide aminé N-terminal et/ou sur la lysine de la chaine latérale avec l'acétique anhydride (Che and Fricker, 2002).

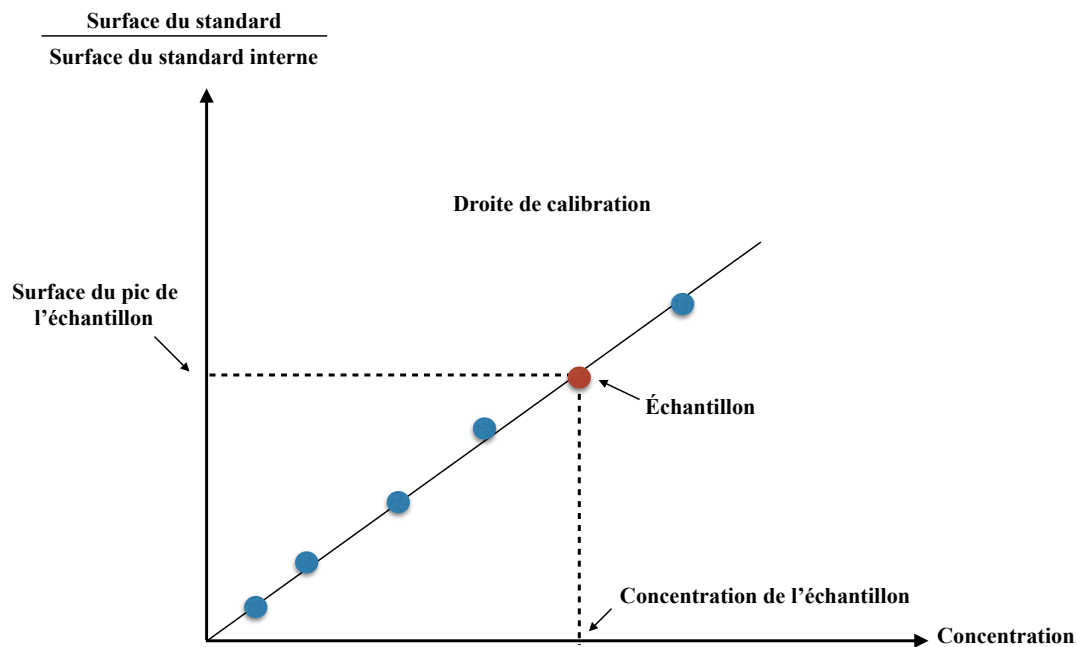


Figure 38. Présentation d'une courbe de calibration et détermination de la concentration d'un échantillon.

5. 6.2. Quantification absolue par la méthode de dilution isotopique

La dilution isotopique est une méthode de référence pour la spectrométrie de masse permettant une quantification absolue des protéines dans des échantillons biologiques (Sargent et al., 2002; Rodríguez-González et al., 2005; Kaiser et al., 2010; Sugiyama, 2012; Lee et al., 2017; Zhang et al., 2017). Cette quantification absolue consiste en une addition de quantités définies de peptides marqués par des isotopes stables, ce marquage est incorporé de façon chimique (Ong and Mann,

2003). Les peptides «légers» et les peptides «lourds» ayant les mêmes propriétés chimiques en tant qu'isotopes peuvent être introduits simultanément mais clairement distingués par leur différence de masse (Gautier, 2012b) (Figure 39). Les valeurs quantitatives sont calculées par rapport au ratio de l'intensité des pics, peptide «léger» et peptide «lourd». Ainsi les spectres obtenus sont intégrés et à partir du ratio des spectres peptides lourd/léger étant proportionnel à la concentration de l'analyte (Pratt et al. 2006; Brun et al., 2007).

Une courbe de calibration peut être effectuée et un domaine de linéarité peut être établi. A l'aide de la courbe de calibration et la concentration du peptide recherché est alors déterminée (Gautier, 2012 a; Breibeck et al., 2014) (Figure 40).

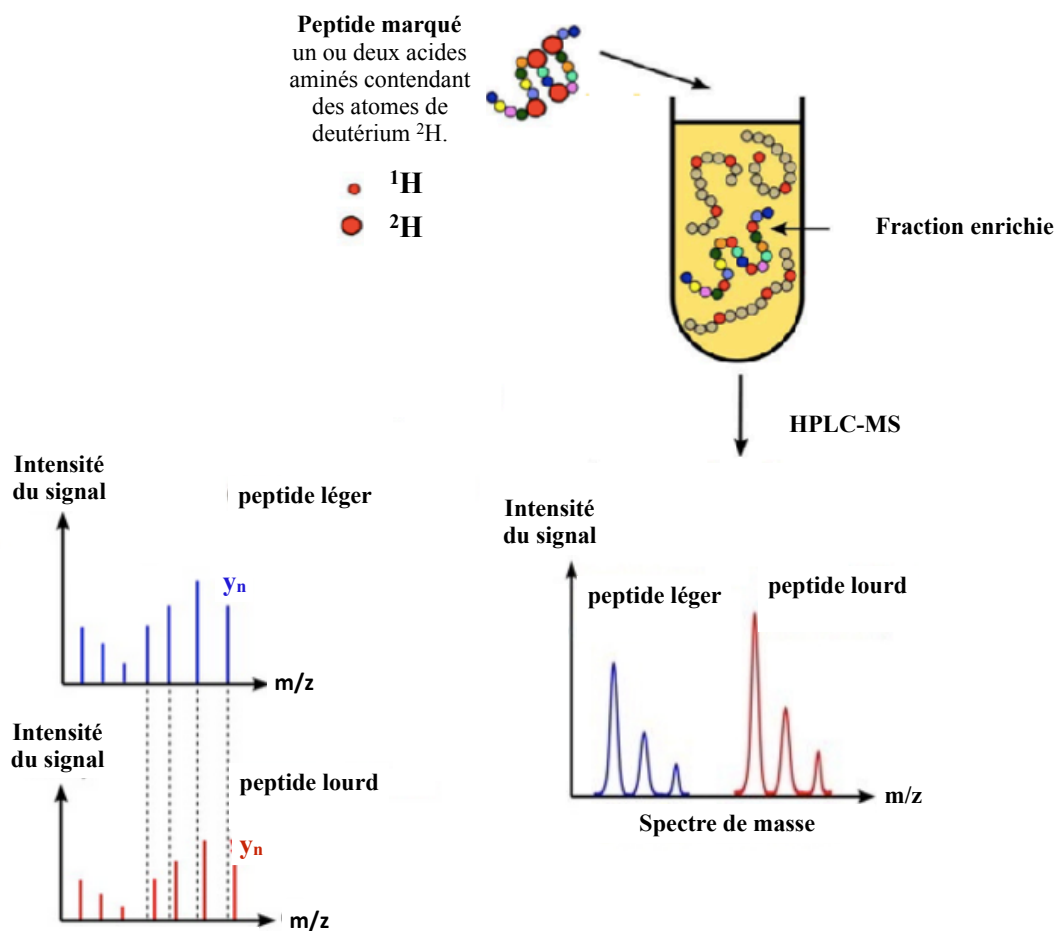


Figure 39. Représentation schématique de la quantification par dilution isotopique. Les peptides «légers» et les peptides «lourds» sont introduits simultanément en HPLC-MS mais clairement distingués par leur différence de masse et avec une séparation fiable des deux échantillons.

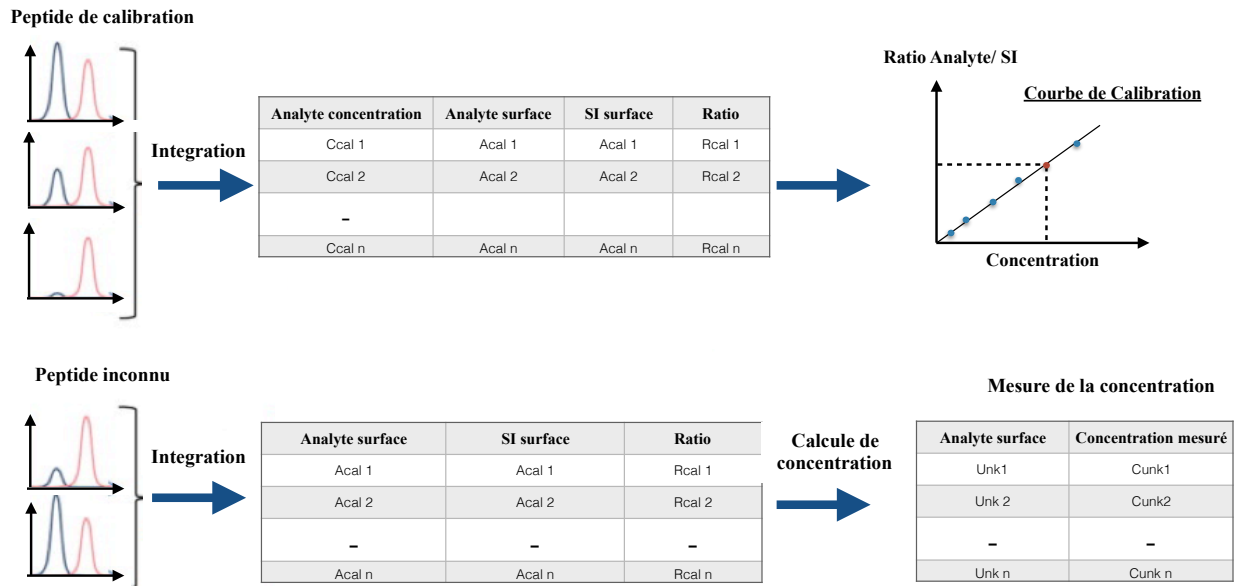


Figure 40. Différentes étapes de la quantification peptidique par la méthode de dilution isotopique.

La quantification des analytes dans un ensemble d'échantillon comprend trois étapes: l'étalonnage du système en utilisant des échantillons d'étalonnage (en haut), et l'analyse de l'échantillon lui-même (en bas). Le calcul de la concentration d'analyte dans les échantillons inconnus est effectué en utilisant la courbe de calibration (Villanueva et al., 2014). Ainsi, les ratios de l'aire des pics des peptides légers et lourds sont effectués. Une courbe de calibration est tracée. Par la suite, à partir de la courbe et en se basant sur les ratios des analytes en fonction de la concentration on peut déterminer la concentration des peptides inconnus.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Le clivage endo-protéolytique est une étape clés pour la libération de peptides bioactifs. Les PCs possédant un rôle physiologique important pour la biosynthèse des neuropeptides (Małuch et al., 2016). Elles clivent sélectivement les protéines dans des sites dibasiques ou monobasique (Benjannet et al., 1991; Hook et al., 2008, 2010). La séquence primaire de la protéine précurseur pro-tachykinine-1 inclut divers sites mono et dibasiques (figure 13). Cependant, le rôle des PCs dans la maturation des tachykinines et dans la formation de la SP reste à prouver. La première hypothèse de ce présent travail suppose que PC1 et PC2 peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme des tachykinines et dans la production de la SP. Conséquemment la modulation de l'activité enzymatique de PC1 et/ou PC2 pourrait jouer un rôle important et central dans le développement de l'allodynie et l'hyperalgésie. Les fragments C-terminaux de la SP jouent un rôle important dans l'effet pro-nociceptif (Skilling et al., 1990). Il en résulte que, non seulement la SP doit être considérée, mais aussi ses métabolites C-terminaux. Ainsi, la deuxième hypothèse de ce présent travail suggère que la protéolyse contrôle les niveaux endogènes de la SP et que les PREP peuvent avoir un rôle majeur dans le clivage de la SP et dans la production des fragments C-terminaux.

Il a été démontré que PC1 et PC2 possèdent un rôle majeur dans la maturation des protéines précurseurs associées aux peptides opioïdes. Ainsi, la troisième hypothèse suppose que les souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+} auraient une réduction significative des concentrations des peptides opioïdes et des tachykinines. L'interdépendance entre le système pro-nociceptifs et le système opioïde, suggère une quatrième hypothèse qui suppose que l'absence totale de la SP (cas des souris Tac1 KO) provoquera une diminution significative des peptides opioïdes (DynA et EM2).

Objectifs

(1) Caractériser le métabolisme des tachykinines et mettre en évidence le rôle des proprotéines convertases dans la maturation de la pro-tachykinine-1 (2) Étudier la stabilité métabolique de la SP et l'implication du PREP (3) Déterminer quantitativement les concentrations des peptides opioïde endogène chez les souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+} (4) Déterminer quantitativement l'effet de l'inactivation de *Tac1* sur le système opioïde endogène.

SECTION 2 : ARTICLES

I. ARTICLE 1 : Tachykinins Processing is Significantly Impaired in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cord S9 Fractions

Neurochemical Reseach. 2015;40(11):2304-2316

Mouna Saidi, Soufiane Kamali, Alberto Orduna Ruiz and Francis Beaudry*

Reprinted from publication, Copyright Owner, Copyright (2015), with permission from Neurochemical Research.

Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

I. 1. Abstract

Substance P (SP) play a central role in nociceptive transmission and it is an agonist of the Neurokinin-1 receptor located in the lamina I of the spinal cord. SP is a major proteolytic product of the protachykinin-1 primarily synthesized in neurons. Proprotein convertases (PCs) are extensively expressed in the central nervous system (CNS) and specifically cleave at C-terminal of either a pair of basic amino acids, or a single basic residue. The proteolysis control of endogenous protachykinins has a profound impact on pain perception and the role of PCs remain unclear. The objective of this study was to decipher the role of PC1 and PC2 in the proteolysis surrogate protachykinins (i.e. Tachykinin 20-68 and Tachykinin 58-78) using cellular fractions of spinal cords from wild type (WT), PC1^{-/+} and PC2^{-/+} animals and mass spectrometry. Full-length Tachykinin 20-68 and Tachykinin 58-78 was incubated for 30 minutes in WT, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions and specific C-terminal peptide fragments were identified and quantified by mass spectrometry. The results clearly demonstrate that both PC1 and PC2 mediate the formation of SP and Tachykinin 58-71, an important SP precursor, with over 50% reduction of the rate of formation in mutant PC1 and PC2 mouse S9 spinal cord fractions. The results obtained revealed that PC1 and PC2 are involved in the C-terminal processing of protachykinin peptides and suggest a major role in the maturation of the protachykinin-1 protein.

I. 2. Introduction

The tachykinin peptide family represents one of the most important neuropeptide family studied in mammals. Tachykinins are initially synthesized as inactive protein precursors, which require various processing enzymatic reactions to generate bioactive peptides. This typically involves endoproteolytic cleavage of precursors at the carboxyl side of specific dibasic residues (i.e. RR, RK, KR, KK), followed by the removal of basic amino acids by endopeptidases E (CPE) [1]. The tachykinin precursor 1 (*Tac1*) gene encodes the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides, including Substance P (SP) and Neurokinin A (NKA) [2]. Besides, the *Tac1* gene also encodes other tachykinins, including neuropeptide K (NPK) and neuropeptide γ (NP γ) [3]. SP is reported to play a critical role in nociceptive transmission in the CNS [4, 5] and it is an agonist of the Neurokinin-1 receptor located in the lamina I of the spinal cord [6, 7]. Protachykinin-1 is primarily synthesized in neurons, and maturation occurred in large core dense vesicles present in primary afferent terminals. More specifically, a significant proportion of primary afferent neurons located in the dorsal root ganglia express high levels of SP and it is transported to both, the peripheral and central terminals. It is important to note that the expression of SP and NK1 correlates with intensity, frequency, and duration of pain [8-10].

As already suggested by previous studies [4], the protachykinin-1 protein is cleaved by the action of specific proteases into active neuropeptides by post-translational proteolytic processing during axonal transport [11]. Although, several enzymes are involved in the metabolism of the protachykinin-1 protein and tachykinin peptides, including neutral endopeptidase [12] and angiotensin converting enzyme [13], the role of proprotein convertases (PCs) remains unclear. It has been widely demonstrated that several neuropeptides are synthesized by the actions of PCs and specific endopeptidases [11, 12, 14, 15]. Comprehensive studies demonstrated that PC1 and PC2 recognize motives composed of either a pair of basic amino acids (KR-, RR-, RK- and KK-),

or a single residue (R or K) [16, 17]. The role of PCs in the protachykinin-1 protein C-terminal processing remains to be demonstrated, but the primary sequence of the protein suggests that PC1 and PC2 could play an important role in the release of SP. Precisely, PC1 and PC2 could be important in the synthesis of SP by cleaving at specific sites illustrated in Figure 1. The regulation of endogenous SP levels by proteolysis of precursor peptides is very important and can help to better understand the cellular and molecular mechanisms of pain.

Our main hypothesis is that PC1 and PC2 are important proteolytic enzymes involved in the processing of protachykinin-1 resulting into SP, an important neuropeptide. Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ will be used as surrogate peptides to demonstrate specific cleavage sites shown in Figure 1. Accordingly, the main objective of this study was to decipher the role of PC1 and PC2 in the proteolysis control of Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ levels using cellular fractions of spinal cords from wild type (WT), PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mice. Major metabolite fragments will be identified by high-resolution mass spectrometry and the quantification of specific fragment peptides (i.e. Tach₅₈₋₇₁, Tach₅₈₋₇₀, SP) will be performed by HPLC-MS/MS.

I. 3. Materials and Methods

I. 3. 1. Chemicals and reagents

β -Preprotachykinin₂₀₋₆₈ (Tach₂₀₋₆₈), β -Tachykinin₅₈₋₇₁ (Tach₅₈₋₇₁), β -Tachykinin₅₈₋₇₀, Substance P (SP) and Substance P₃₋₁₁ (SP₃₋₁₁) were purchased from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). β -Tachykinin₅₈₋₇₈ (Tach₅₈₋₇₈) and deuterium labeled analogue peptides were synthesized (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada). Proteomic grade trypsin, dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), hydrochloric acid (HCl), formic acid, water (LC-MS Optima grade), acetonitrile (LC-MS Optima grade), hexane, trifluoroacetic acid (TFA), sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic were purchased from Fisher Scientific (NJ, USA).

I. 3. 2. Sample Preparation

Spinal cord tissues (n=6 per genotypes) from male wild type (C57BL/6J), male $PC1^{-/+}$ (product #006327) and male $PC2^{-/+}$ mice (product #002963) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and kept frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Heterozygote animals only were used since $PC1^{-/-}$ and $PC2^{-/-}$ exhibit many abnormalities and the survival rate after one week is extremely low. Animal genotyping was performed for each animal by Jackson Laboratory using a standard PCR assay. Only heterozygous and normal animals were selected for this study. All mice were 8 weeks old at time of tissues collection. The animals from all groups (WT, $PC1^{-/+}$ and $PC2^{-/+}$) were euthanized with an overdose of isoflurane followed by a transection of the cervical spine. A flush of saline was performed within the spinal canal to collect the spinal cord lumbar enlargement. Tissue samples were snap-frozen in cold hexane ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) and stored immediately at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pending analyses. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal and it was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

For each animal group, three spinal cords were pooled and homogenized in a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at a ratio of 1:5 (w:v). Samples were sonicated 20 minutes and the homogenates were centrifuged at 9,000 g for 20 minutes. The total amount of protein in each supernatant was determined using the standard Coomassie protein assay (Bradford). This procedure was necessary in order to assure the same amount of protein was used for each experiments. Supernatant aliquots, designated as S9 fractions, were kept à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until usage.

I. 3.3. Metabolism study

The incubations were performed minimally in triplicate. The incubations were performed in a microcentrifuge tube and contained 2 nmol/mL of Tach₂₀₋₆₈ or Tach₅₈₋₇₈, 0.25 mg/mL of S9

fraction proteins diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Spinal cord S9 enzyme suspensions (total volume of 1 mL) were preincubated with 1 mM CaCl₂ in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 37° C for 5 min prior fortification with Tach₂₀₋₆₈ or Tach₅₈₋₇₈. Immediately after fortification of the full-length peptide into the spinal cord S9 fraction suspension containing 1mM CaCl₂, the sampling point for t=0 was taken, and the reaction was quenched after 30 minutes incubation. One hundred microliters of samples were taken and mixed with 100 µL of an aqueous solution containing 1% TFA to stop the reaction. Samples were centrifuged at 12 000 g for 10 min and 150 µL of the supernatant was transferred into an injection vial and spiked with 150 µL of the deuterated internal standard solution (50 pmol/mL labeled peptides in 0.1% TFA) for mass spectrometry analysis. The rate of formation (v_i) was calculated based on the concentration of each metabolite measured after 30 minutes incubation of the full-length peptides using Equation 1.

$$v_i = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[peptide\ fragments]}{30\ min} \quad (1)$$

I. 3. 4. Instrumentation

The HPLC-MS/MS system included a Thermo Accela autosampler, a Thermo Accela pump and a Thermo LTQ-XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA). Linear ion trap instruments typically have unit mass resolution throughout the mass range. The instrument was calibrated and the resolution was set at 0.5-0.7 Da at full width at half maximum (FWHM). Further analyses were performed using a Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) interfaced with a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. Data were acquired and analyzed with Xcalibur (San Jose, CA, USA), and regression analyses were performed with PRISM (version 6.0f) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines

were constructed from the peak-area ratios of targeted neuropeptides and corresponding deuterated labeled peptides used as internal standards.

I. 3. 5. Peptide fragments identification

The identification of Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ C-terminal processing fragments were performed using a hybrid Quadrupole-Orbitrap MS instrument (i.e. Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer). MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution, and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300 °C. The scan range was set to *m/z* 200-2000. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM), resulting to a scanning rate of ≈ 700 msec/scan when using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec. Product ion spectra were acquired a resolving power of 17,500 (FWHM), using automatic gain control target of 1.0×10^6 and maximum ion injection time of 100 msec. The collision energy set to 25 and the isolation window was set to 1.5 Da. Instrument calibration was performed prior all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. All possible C-terminal processing metabolites were simulated in silico using mMass [25] to generate survey accurate masses.

I. 3. 6. Protein extraction from S9 fraction and PC1/PC2 MS analysis

Fifty μL (i.e. precise volume varied to obtain exactly 0.5 mg of proteins) of the S9 suspension was transferred to a microcentrifuge tube. The proteins were denatured by heating at 120°C for 10 min using heated reaction block. The solution was allowed to cool down 15 minutes and proteins were reduced with 20 mM DTT and the reaction was performed at 60°C for 60 minutes. Then proteins were alkylated with 40mM IAA and the reaction was performed at room temperature for 30 min. Two μg of proteomic-grade trypsin was added and the reaction was performed at 40°C for 24h. The protein digestion was quenched by adding 50 μL of a 1% TFA solution. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 75 μL of the supernatants were transferred into injection vials for analysis. The HPLC system was a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system. The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 100×1 mm, with a particle size of 5 μm . The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 2 minute, the ratio was maintained at 5:95. From 2 to 92 minute, a linear gradient was applied up to a ratio of 50:50 and maintained for 2 minutes. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 minutes. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 2 μL of sample were injected. A Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer was interfaced with a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution, and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C . The scan range

was set to m/z 500-1200. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM), resulting to a scanning rate of ≈ 700 msec/scan when using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec. Product ion spectra were acquired a resolving power of 17,500 (FWHM), using automatic gain control target of 1.0×10^6 and maximum ion injection time of 100 msec. The collision energy set to 25 and the isolation window was set to 1.5 Da. Instrument calibration was performed prior all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. All analysis were performed in triplicate. PC1 (P63239) and PC2 (P21661) protein sequences were obtained from the The Universal Protein Resource (UniProt) databases. In silico protein digestions, peptide mass fingerprinting and MS/MS fragment ion fragmentation were performed using mMass [25]. Data analyses were performed using Thermo Scientific SIEVE (ver 2.1) and PINPOINT (ver 1.4) software (San Jose, CA, USA). The quantification of PC1 and PC2 in S9 fraction was performed at the MS level using a label-free approach and specific tryptic peptides [26].

I. 3. 7. Bioanalytical methods

The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 100×1 mm, with a particle size of 5 μm . The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 1 min, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 12 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 45:55 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min for a total run time of 32 min. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 2 μL of sample were injected using full loop mode. All targeted neuropeptides and deuterium labeled peptides eluted between 6.2 to 9.3 min. The mass spectrometer was coupled with the HPLC system using a pneumatically

assisted electrospray ion source (ESI). The sheath gas was set to 25 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300 °C and the ion transfer tube voltage to 46 V. All scan events were acquired with a 100 ms maximum injection time. An activation $q = 0.25$ and activation time of 30 ms were used for all targeted peptides. The mass spectrometer operated for quantitative analyses in full scan MS/MS and the quantification was based on specific post-processing SRM extracted ion chromatograms. Specific analysis details are presented in Table 1. A specific production ion was used to generate post acquisition SRM extracted ion chromatograms for quantification purposes. The method used an isotope dilution mass spectrometry (IDMS) strategy for the quantification of the targeted peptides. The peptide concentrations were determined using the peak area ratio of the light and heavy analog peptide. Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ quantification was performed using d₅-SP as an internal standard and a calibration curve was constructed using Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ standards. The labeled peptides were used at a constant concentration of 50 pmol/mL.

I. 3. 8. Statistical analysis

All data were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test. Significance was set a priori to $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using PRISM (version 6.0f).

I. 4. Results and Discussion

I. 4. 1. Analysis of PC1 and PC2 in mouse spinal cord S9 fractions

Peptide mass fingerprinting (PMF) is an analytical strategy used to identify and quantify proteins by assigning specific proteolytic fragment masses with *in silico* peptide masses generated using protein databases and specific digestion algorithms. The method involves that intact proteins are cleaved with a proteolytic enzyme (e.g. trypsin) to generate specific and predictable peptides.

This method relies on the premise that every unique protein will have a distinctive set of peptides, consequently unique peptide masses can be found. Moreover, the PMF workflow is complemented by matching of MS/MS data for additional peptide sequence characterization. One important objective was to quantify PC1 and PC2 in WT, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions using high-resolution MS. The analytical strategy proposed in this is based on a targeted PMF method that specifically relies on upstream identification of specific PC1 and PC2 proteolytic peptides using in silico digestion to generate a mass list. To avoid false identification, only doubly and triply charged ions were surveyed. The protein analyses were performed using a hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer operating in MS at a resolution of 140,000 (FWHM) and in MS/MS at a resolution of 17,500 (FWHM). Several PC1 and PC2 tryptic peptides were identified but the observed abundances were generally low. However, two specific proteolytic peptides for PC1 and PC2 were observed within 1 ppm of the exact mass. Specific XIC's (exact mass \pm 5 ppm) of each targeted proteotypic peptides was used to perform label-free relative quantification based on observed ion abundance. As shown in Figure 2, PC1 and PC2 are significantly down regulated in PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions respectively. Additionally, these peptides were analyzed by MS/MS and spectra were dominated by y-type fragment ions with low abundance b ions, based on the Roepstorff and Fohlman nomenclature [18]. All collected MS/MS spectra were coherent with the amino acid sequence of each tryptic peptide.

I. 4.2. High-resolution mass spectrometry analysis

Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ were used as surrogate peptides to foster a better understanding of the degradation of the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides, including SP. Degradation pathways of Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ were determined by incubating

mouse spinal cord S9 fractions with full-length Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ for 30 min and then analyzed the quenched reactions using a hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer operating in full-scan mode at high-resolution (i.e. 140 000 FWHM), and accurate-mass (HRAM). The total ion chromatogram (TIC) following experiments with Tach₂₀₋₆₈ and specific extracted ion chromatogram (XIC) shown in Figure 3 reveal that many expected peptide fragments were observed. Moreover, as illustrated in Table 2, mass accuracy observed were between -1.6 to 1.5 ppm for all detected peptide fragments. Interestingly, data clearly demonstrate that SP and SP metabolites are generated from full-length Tach₂₀₋₆₈ in mouse spinal cord S9 fractions. Specifically, SP, SP₈₋₁₁ and SP₁₋₇ were the most abundant peptide fragments observed. As suggested in Figure 1, C-terminal processing of Tach₂₀₋₆₈ by PC1 or PC2 can lead to the formation of SP.

Figure 4 shows the total ion chromatogram (TIC) following experiments with Tach₅₈₋₇₈ and specific extracted ion chromatogram (XIC). Again, many expected peptide fragments were observed, particularly C-terminal fragments. A list of the most abundant peptide fragments was shown in Table 2. The observed mass accuracy observed was between -1.2 - 2.2 ppm for all detected peptide fragments. C-terminal processing of Tach₅₈₋₇₈ in mouse spinal cord S9 fractions lead to the formation of Tach₅₈₋₇₁, an important precursor of SP. It is well know that Tach₅₈₋₇₁ will be cleave by endopeptidases E (CPE) and form Tach₅₈₋₇₀ and Tach₅₈₋₆₉ and then process by peptidylglycine monooxygenase (PAM) or peptidylglycine hydroxylase (PHM) to form SP. These results are very interesting since as suggested in Figure 1, C-terminal processing of Tach₅₈₋₇₈ by PC1 or PC2 can lead to the formation of Tach₅₈₋₇₁ a precursor of SP. Please note that all MS/MS spectra acquired in high-resolution were compatible with the amino acid sequence of the peptide fragments.

I. 4. 3. Quantitative analysis and Isotopic Dilution Method

Full-scan and product ion mass spectra for all peptides and internal standards were obtained in positive ion mode. The full-scan electrospray mass spectrum of targeted peptides displayed the formation of characteristic pseudo molecular ions $[M+nH]^{n+}$ and the fragment ions observed in MS/MS spectra were annotated based on the Roepstorff and Fohlman nomenclature [18]. Details on MS parameters and SRM transitions are reported in Table 3. Full-scan and product ion mass spectra are necessary to identify and characterize each neuropeptide. The full-scan electrospray mass spectra of targeted neuropeptides showed a base peak pseudo molecular ions at m/z 994.6 (6+) for Tach₂₀₋₆₈, 602.5 (+4) for Tach₅₈₋₇₈, 564.0 (+3) for Tach₅₈₋₇₁, 512.0 (+3) for Tach₅₈₋₇₀ and 674.5 (+2) for SP. Corresponding labeled peptides show compatible pseudo molecular ion profiles. All precursor ion masses are listed for each unlabeled and labeled peptide in Table 3. Figure 5 presents product ion spectra (MS/MS) for targeted tachykinin peptides obtained and typical b and y positive ion fragments were observed. The observed collision-induced dissociation spectra were all compatible with the peptide sequences. Additionally, we selected and optimized the most abundant and specific product ion for each peptide to generate post acquisition SRM extracted ion chromatograms in order to achieve the best sensitivity, selectivity and reproducibility. Furthermore, selected SRM transitions were monitored for mouse spinal cord S9 fractions and compared with reference materials. The overlay SRM extracted ion chromatograms display in Figure 5 demonstrate a suitable concordance between peptide reference standards and peptides observed in spinal cord S9 fractions following the degradation of full-length tachykinin peptides. Due to the important dilution factor of spinal cord S9 fraction used during this study, the endogenous levels were below the limit of quantification. The heavy-label versions of Tach₅₈₋₇₁, Tach₅₈₋₇₀ and SP were spiked in spinal cord S9 fractions to quantify specific N-terminal and C-Terminal Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ metabolite fragments. After optimization, the concentration of spiked labeled peptides, it was determined that a final

concentration of 50 pmol/mL would lead to adequate measurements of each targeted peptide using SRM transitions. All labeled peptides are clearly distinguishable from unlabeled version by mass spectrometry, and the ratio of the unlabeled peptides to stable isotope-labeled peptides found in mouse spinal cord S9 fraction supernatants can be used to calculate the absolute concentration of each peptide monitored. The linearity response was tested at concentration ranging from 1 to 500 pmol/mL for each targeted peptide. Correlation assessments between measured peak area ratios and nominal concentrations were performed and results show excellent correlations ($R^2 = 0.9935$ to 0.9986). The precision and accuracy results are shown in Table 4 for all targeted tachykinin peptides. Accordingly, the analytical method provided adequate figures of merit for targeted peptide analysis performed during this study.

I. 4. 4. Metabolic stability of Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ in mouse spinal cord S9 fractions

Tachykinins concentration in mouse spinal cord is regulated by proteolysis generating a series of peptide metabolites. Tissue S9 fractions are commonly used to study metabolism since this fraction contains the cytosol and microsomes [19, 20]. To determine the pathways for Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ degradation in mouse spinal cord S9 fractions, we incubated spinal cord S9 fractions with full-length Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ for 30 min and then analyzed the quenched reactions by HPLC-MS/MS to determine the metabolic stability and identify specific N-terminal and C-terminal fragments produced. The Figure 6 revealed that proteolysis of Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ is occurring in mouse spinal cord S9 fractions. The results show that > 87% of the full-length peptides degraded in 30 minutes. Furthermore, negative control (i.e. no S9 proteins) shows no degradation after a 30 minutes incubation period for both full-length peptides. Results presented in Figure 3, 4 and 6 revealed significant Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ degrading activity in mouse spinal cord S9 fractions.

I. 4. 5. Contribution of PC1 and PC2 in Tach₂₀₋₆₈ C-terminal processing

Neuropeptides are synthesized as larger precursors that undergo endoproteolysis at specific sites. Several neuropeptide-processing enzymes were identified in mammalian cells [1, 21, 22]. Proprotein convertase family including PC1 and PC2 are known to be present in numerous neuroendocrine cells. Specifically, PC1 and PC2 cleaved at the C-terminal side of paired or single basic residue within proneuropeptides [11]. Proteases convertases processing yields neuropeptide intermediates with C-terminal basic residues (R or K) that are removed by carboxypeptidase E [23]. As suggested in Figure 2, we believed that PC1 or PC2 could cleave Tach₂₀₋₆₈ in between R⁵⁷R⁵⁸ to form SP. Full-length Tach₂₀₋₆₈ was incubated for 30 minutes in WT, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions and metabolites quantified by HPLC-MS/MS. The rate of formation (v_i) was determined using Equation 1. Interestingly, as shown in Figure 7A, Tach₂₀₋₆₈ cleavage between R⁵⁷R⁵⁸ to form SP occurred and the rate of formation (v_i) is significantly impeded in PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions. Cleavage after the pair basic amino acid was not observed (R⁵⁷R⁵⁸P⁵⁹) since the arginine (R) residue at position 58 is followed by a proline (P). These results clearly demonstrate that PCs regulate SP concentration through C-terminal processing of protachykinin-1 protein and related propeptides.

I. 4. 6. Contribution of PC1 and PC2 in Tach₅₈₋₇₈ C-terminal processing

Full-length Tach₅₈₋₇₈ was incubated for 30 minutes in WT, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions and specific C-terminal peptide fragments were quantified by HPLC-MS/MS. The rate of formation (v_i) was determined using Equation 1. Figure 7B distinctly demonstrate that PC1 and PC2 are involved in the proteolysis of Tach₅₈₋₇₈ in the spinal cord. The results demonstrate that PC2 mediate the processing of Tach₅₈₋₇₈ to Tach₅₈₋₇₁ cleaving immediately after a pair of basic amino acids (i.e. K⁷⁰R⁷¹D⁷²). Despite not being statistically significant, the rate of formation of Tach₅₈₋₇₁ in PC1^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions was reduced. Furthermore, the

rate of formation (v_i) of downstream metabolites, including Tach₅₈₋₇₀ and SP was significantly hampered in both, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cord S9 fractions. We believe these results shown the importance of PC1 and PC2 in the C-terminal processing of protachykinin-1 protein and related propeptides in the regulation of SP concentration in the spinal cord.

I. 5. Conclusion

The results obtained revealed that PC1 and PC2 are involved in the C-terminal processing of protachykinin peptides and suggest a major role in the maturation of the protachykinin-1 protein. As already presented, the protachykinin-1 protein is cleaved by the action of specific proteases into active neuropeptides during axonal transport. Interestingly, depolarization of a neuron containing proneuropeptides stimulates proprotein convertases processing [24]. As a consequence, the stimulation of proprotein convertases processing will result in the liberation of higher concentration of SP into the intersynaptic space since both PC1 and PC2 are involved in the C-terminal processing of protachykinin peptides. Thus PCs could be a drug targets with the premise of partially inhibiting the release of SP. However, further study is needed since partial inhibition of PC1 or PC2 may also impact the endogenous opioid system.

I. 6. Acknowledgements

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. 386637-2010). The analyses were performed using analytical instruments acquired with a NSERC Research Tools and Instruments grant (F. Beaudry NSERC-RTI grant No. 439748-2013). We would like to thanks Thermo Fisher Scientific for providing a generous access to a Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer. M. Saidi received a Ph.D. scholarship from *Mission Universitaire de Tunisie en Amérique du Nord* (MUTAN).

I. 7. References

- [1] Fricker LD. Neuropeptide-processing enzymes: applications for drug discovery. *AAPS J.* 2005;7: E449–E455.
- [2] Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ and Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature (Lond.)*, 1998;392: 390-394.
- [3] Carter MS, Krause JE. Structure expression and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J. Neurosci.* 1990;10: 2203–2214.
- [4] Pailleux F, Vachon P, Lemoine J, Beurdy F. Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides.* 2013;47(4):261-271.
- [5] Gao Z1, Peet NP. Recent advances in neurokinin receptor antagonists. *Curr Med Chem.* 1999; 6(5):375-88.
- [6] Teodoro FC, Tronco Júnior MF, Zampronio AR, Martini AC, Rae GA, Chichorro JG. 540 Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory 541 and neuropathic orofacial pain models. *Neuropeptides.* 2013;47(3):199–206.
- [7] Yu XH, Zhang ET, Craig R, Shigemoto R, Ribeiro-da-Silva A. NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 1999;19:3545–3555.
- [8] De Biasi S., A. Rustioni A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of the spinal cord, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988; 85:7820–7824.
- [9] Torrealba F, Carrasco MA. A review on electron microscopy and neurotransmitter systems. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;47:5–17.
- [10] Slukaa KA, Bailey K, Bogusha J, Olsona R, Rickettsa A. Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. *Pain* 1998;77:97–102.
- [11] Hook V, Funkelstein V, Lu L, D, Bark S, Wegrzyn, J, Hwang SR. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2008;48:393–423.

- [12] Brakch N, Rist B, Beck-Sickinger AG, Goenaga J, Wittek R, Bürger E, Brunner HR, Grouzmann E. Role of Prohormone Convertases in Pro-Neuropeptide Y Processing: Coexpression and in Vitro Kinetic Investigations, *Biochemistry*, 1997; 36:16309–16320.
- [13] Song Y, Stål PS, Yu JG, Lorentzon R, Backman C, Forsgren S Inhibitors of endopeptidase and angiotensin-converting enzyme lead to an amplification of the morphological changes and an upregulation of the substance P system in a muscle overuse model. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;11:15-26. doi: 10.1186/1471-2474-15-126.
- [14] Zheng M, Streck RD, Scott RE, Seidah NG, Pintar JE. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *Journal of Neuroscience* 1994;14:4656–4673.
- [15] Rouillé Y, Duguay SJ, Lund K, Furuta M, Gong Q, Lipkind G, Oliva A Jr, Chan SJ, Steiner DF. Proteolytic processing mechanism in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases, *Neuroendocrinology*, 1995;16:322–361.
- [16] Seidah NG and Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides, *Brain Research*. 1999; 848:45–62.
- [17] Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R, Prat A. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008;40:1111-1125.
- [18] Roepstorff P and Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*. 1984;11:601.
- [19] Gao SM, Zhang ZP, Karnes HT. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *J Chromatogr B*. [Review]. 2005;825:98-110.
- [20] Zhanga D, Gang L, Xinxin D, Chuang L. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2012;549–561.
- [21] Fricker LD and Devi L. Enzymes involved in the synthesis of opioid peptides, in *Pharmacology of Opioid Peptides (TsengL.F.)*, 1995:87–107. Harwood Academic Press, Amsterdam .
- [22] Berman Y, Mzhavia N, Polonskaia A, Furuta M, Steiner D F, Pintar J E and Devi. LA. Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2. *Journal of Neurochemistry*. 2000;75: 1763-1770.
- [23] Hook V, Bark S, Gupta N, Lortie M, Weiya D Lu, Nuno B, Lydiane F, Jill W, DT O'Connor, and Pavel P. Neuropeptidomic Components Generated by Proteomic Functions in Secretory Vesicles for Cell–Cell Communication. *The AAPS Journal*, 2010;12:635-645. DOI: 10.1208/s12248-010-9223-z.

- [24] Yakovleva T, Bazov I, Cebers G, Marinova Z, Hara Y, Ahmed A, Vlaskovska M, Johansson B, Hochgeschwender U, Singh IN, Bruce-Keller AJ, Hurd YL, Kaneko T, Terenius L, Ekström TJ, Hauser KF, Pickel VM, Bakalkin G. Prodynorphin storage and processing in axon terminals and dendrites. *FASEB J.* 2006;20: 2124–2126.
- [25] Strohalm M, Hassman M, Košata B, Koldíček M. mMass Data Miner: an Open Source Alternative for Mass Spectrometric Data Analysis. *Rapid Commun Mass Spec* 2008;22 (6): 905-908
- [26] Griffin TJ, Lock CM, Li XJ, Patel A, Chervetsova I, Lee H, Wright ME, Ranish JA, Chen SS, Aebersold R, Abundance ratio-dependent proteomic analysis by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 2003;75 :867–874.

I. 8. Table legend

Table 1. Principal peptide fragments observed following the incubation of Tach₂₀₋₆₈ in mouse spinal cord S9 fractions

Peptide	Sequence	Charge state (z)	Theoretical mass	Observed Mass	Relative Error (ppm)
Tach ₂₀₋₆₈	EEIGANDDLNYWSDWYDSDQ	6	994.6548	994.6536	-1.21
	IKEELPEPFEHLLQRIARRPKP				
	QQFFGLM(NH ₂)				
Tach ₃₁₋₆₈	WSDWYDSDQIKEELPEPFEHL	5	946.6813	946.6798	-1.58
	LQRIARRPKPQQFFGLM(NH ₂)				
Tach ₃₅₋₆₈	YDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA	5	831.8378	831.8368	-1.20
	RRPKPQQFFGLM(NH ₂)				
SP	RPKPQQFFGLM(NH ₂)	2	674.3716	674.3713	0.45
SP ₃₋₁₁	KPQQFFGLM(NH ₂)	2	547.7944	547.7951	1.28
SP ₈₋₁₁	FGLM(NH ₂)	1	466.2483	466.2490	1.50
SP ₁₋₇	RPKPQQF	2	450.7561	450.7566	1.11
Tach ₁₋₁₁	EEIGANDDLNY	2	626.7700	626.7705	0.80

Table 2. Principal peptide fragments observed following the incubation of Tach₅₈₋₇₈ in mouse spinal cord S9 fractions

Peptide	Sequence	Charge state (z)	Theoretical mass	Observed Mass	Relative Error (ppm)
Tach ₅₈₋₇₈	RPKPQQFFGLMGKRDADSSI	4	602.5595	602.5601	-1.00
Tach ₅₈₋₇₁	RPKPQQFFGLMGKR	3	563.9838	563.9841	0.53
Tach ₅₈₋₇₀	RPKPQQFFGLMGK	3	511.9501	511.9507	1.17
Tach ₅₈₋₆₉	RPKPQQFFGLMG	2	703.3741	703.3740	-0.14
SP	RPKPQQFFGLM(COOH)	2	674.8634	674.8637	0.45
SP ₁₋₉	RPKPQQFFGL	2	552.8011	552.8020	1.63
SP ₁₋₇	RPKPQQF	2	450.7561	450.7571	2.22

Table 3. Summary of peptide quantification parameters used for HPLC-MS/MS analysis and post processing SRM

Peptide	Precursor ion (m/z)	Charge state (z)	Product ion	Fragment ion	Collision Energy
Tach ₂₀₋₆₈	994.6	6	1137.0	y ₃₇ ⁴⁺	35
Tach ₅₈₋₇₈	602.5	4	716.4	b ₁₉ ³⁺	35
Tach ₅₈₋₇₁	564.0	3	661.1	y ₆	33
d ₅ -Tach ₅₈₋₇₁	565.7	3	666.1	y ₆	33
Tach ₅₈₋₇₀	512.0	3	652.4	y ₆	33
d ₅ -Tach ₅₈₋₇₀	513.7	3	657.4	y ₆	33
SP	674.5	2	600.3	b ₁₀ ²⁺	32
d ₅ -SP	677.0	2	602.8	b ₁₀ ²⁺	32

Table 4. Summary of peptide quantification figure of merits obtain in fortified S9 fractions

Peptides	Spinal cords S9 fractions		R ²
	Accuracy (%NOM)	Precision (%CV)	
Tach ₂₀₋₆₈	95.2 - 110.3	3.2 - 10.7	≥ 0.9954
Tach ₅₈₋₇₈	94.5 - 105.6	1.8 - 6.8	≥ 0.9935
Tach ₅₈₋₇₁	96.4 - 100.9	1.5 - 11.3	≥ 0.9986
Tach ₅₈₋₇₀	95.2 - 100.7	1.1 - 12.2	≥ 0.9954
SP	97.4 - 102.7	0.6 - 4.6	≥ 0.9985

I. 9. Figure legend

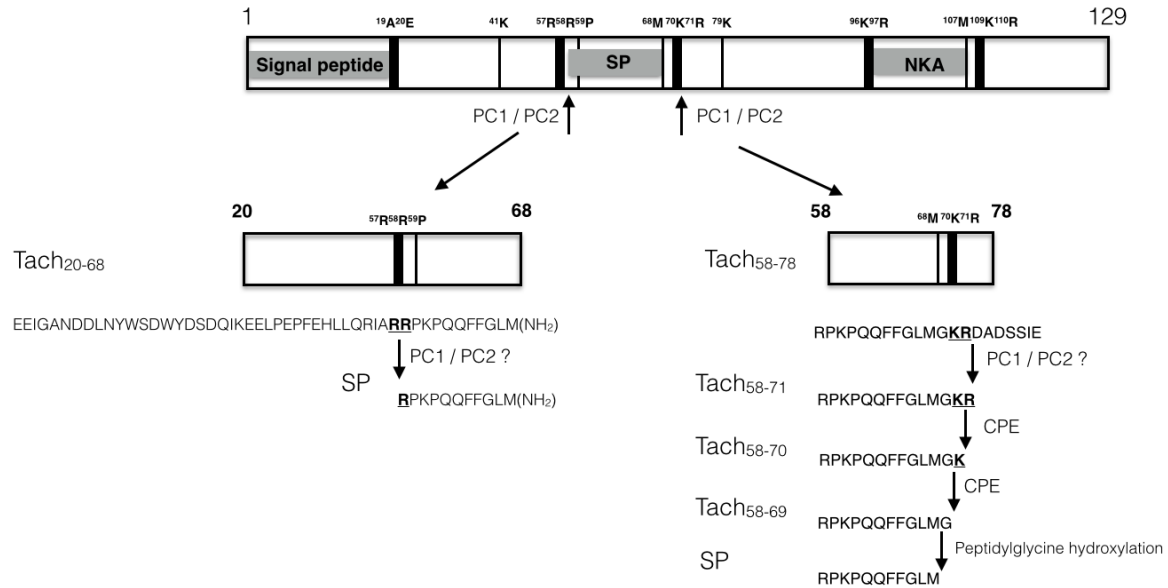
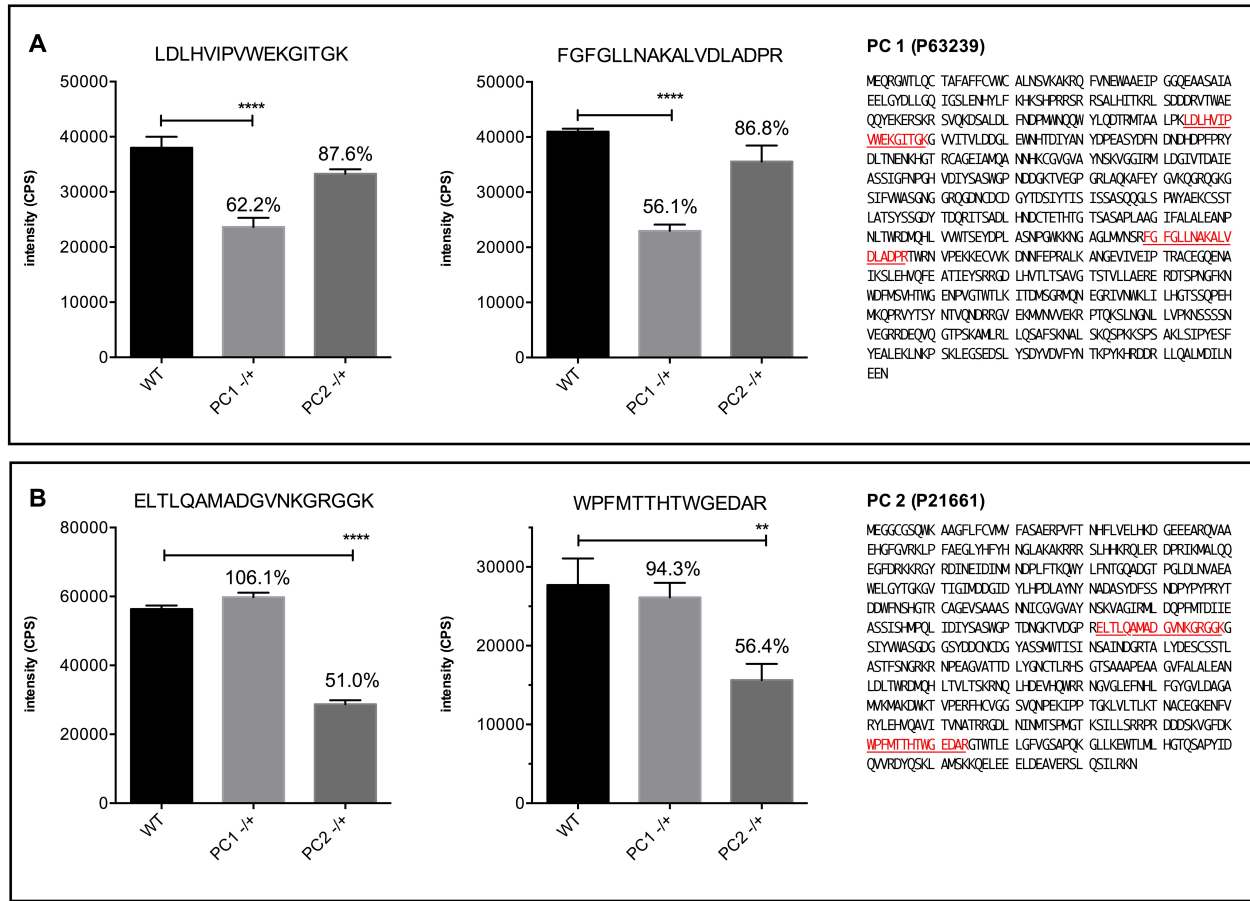


Figure 1. Protachykinin-1 processing by proprotein convertases (PC1 and PC2). Tachykinins have several paired and single basic amino acid cleavage sites and based on the sequence, various processing intermediates can be derived leading to SP and Tach₅₈₋₇₁.



** p < 0.01
 **** p < 0.0001

Figure 2. Determination of the relative abundance of PC1 and PC2 in mouse spinal cord S9 fractions using a bottom-up proteomic based analytical strategy. (A) Two specific PC1 tryptic peptides were identified and peak abundance (m/z 903.0196 \pm 5 ppm; m/z 959.0333 \pm 5 ppm) were significantly down-regulated in PC1^{-/-} but remain unchanged in PC2^{-/-}. (B) Also, two specific PC2 tryptic peptides were identified and peak abundance (m/z 922.9860 \pm 5 ppm; m/z 867.8883 \pm 5 ppm) were significantly down-regulated in PC2^{-/-} but remain unchanged in PC1^{-/-}.

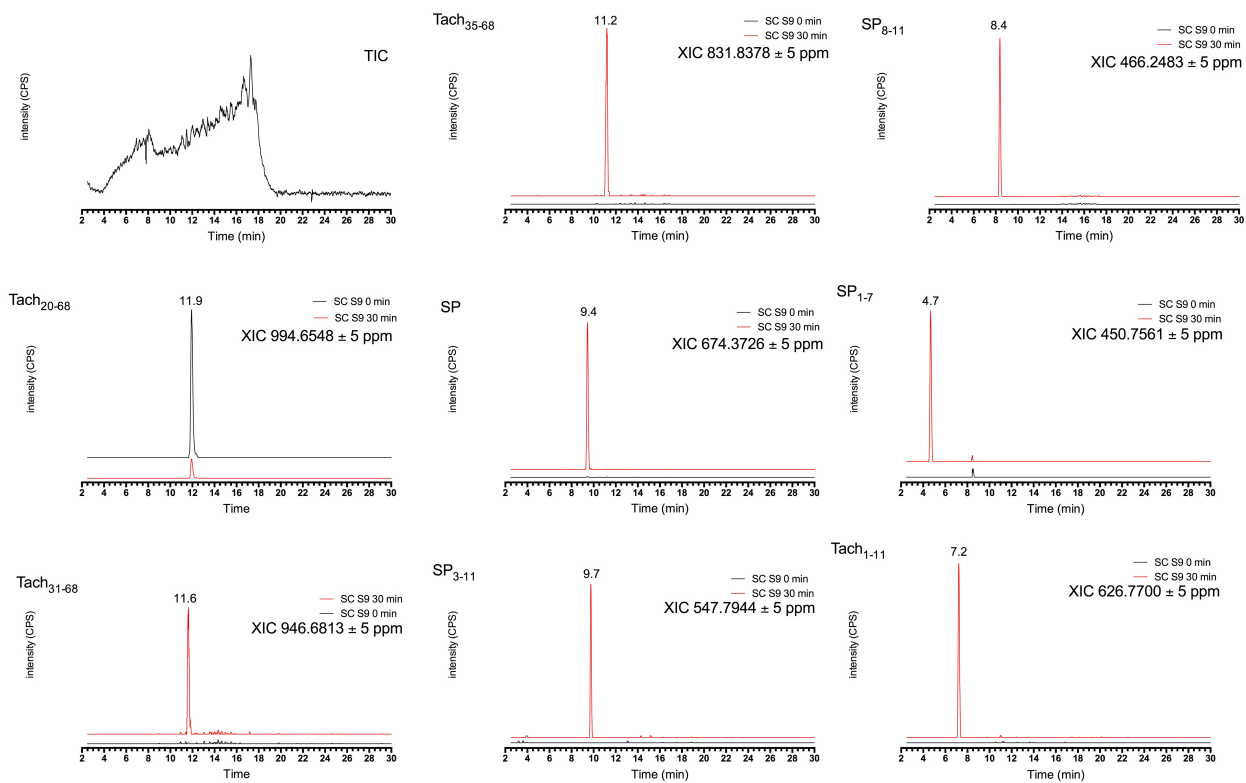


Figure 3. Total Ion Chromatograms (TIC) and specific Extracted-ion chromatograms (XIC) for targeted tachykinin peptides following the incubation of Tach₂₀₋₆₈ in mouse spinal cord S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (black) and time 30 min (red) reveal the apparition of specific peptide fragments.

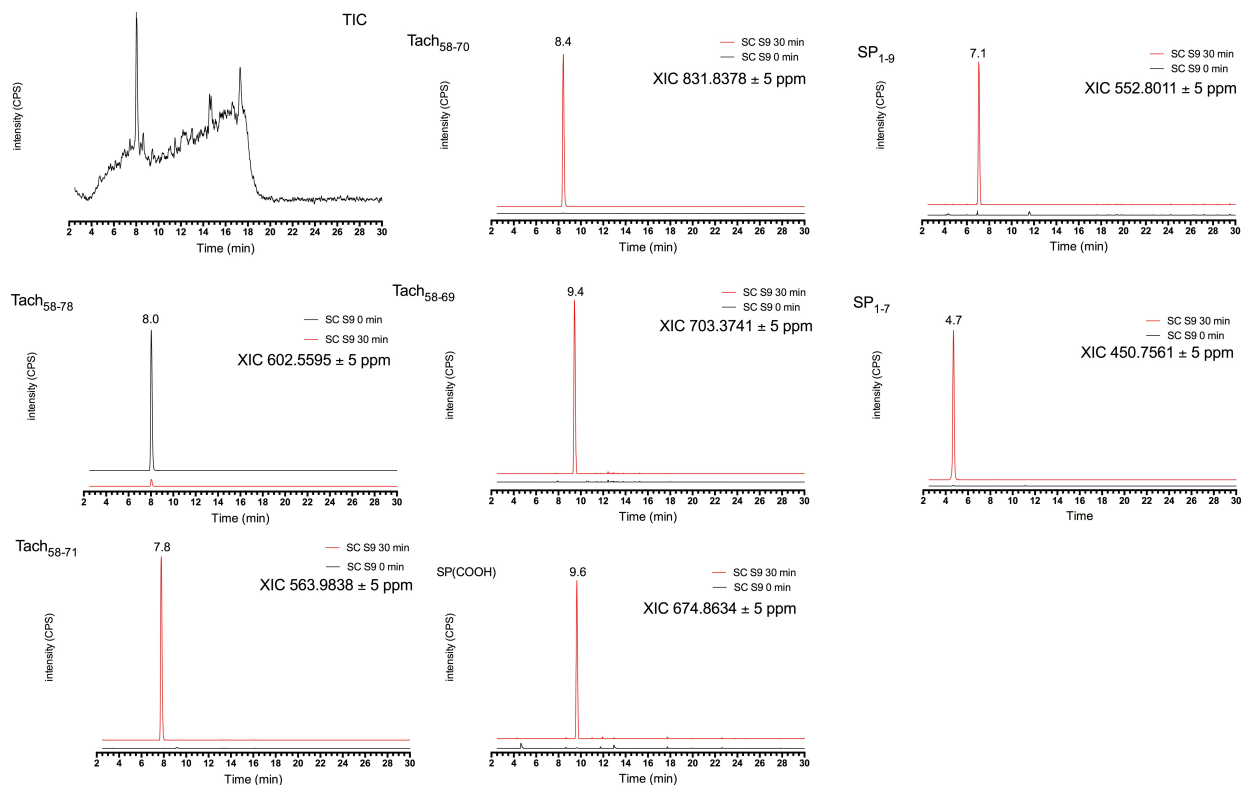


Figure 4. Total Ion Chromatograms (TIC) and specific Extracted-ion chromatograms (XIC) for targeted tachykinin peptides following the incubation of Tach₅₈₋₇₈ in mouse spinal cord S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (black) and time 30 min (red) reveal the apparition of specific peptide fragments.

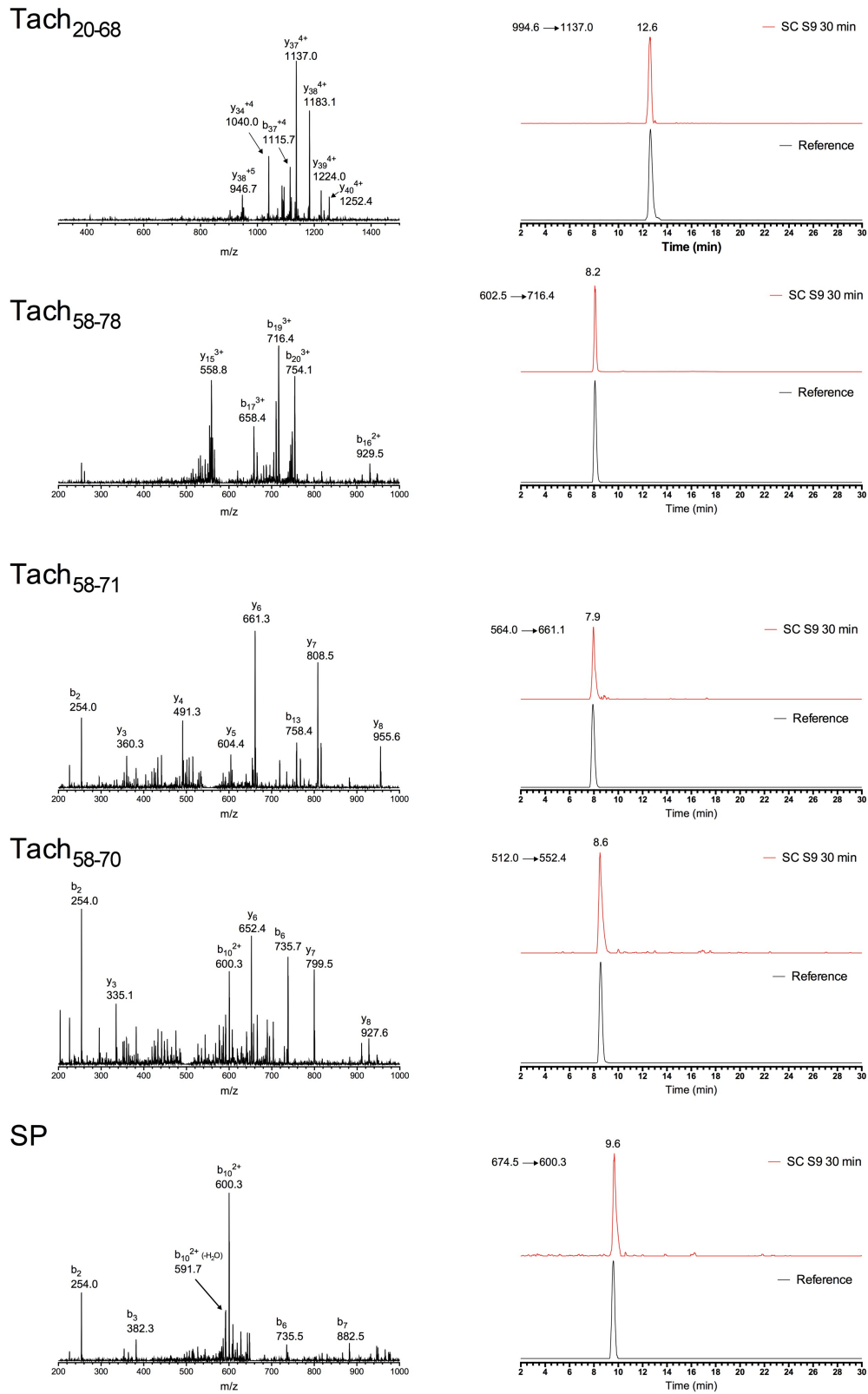


Figure 5. Product ion spectra (MS²) of Tach₂₀₋₆₈, Tach₅₈₋₇₈, Tach₅₈₋₇₁, Tach₅₈₋₇₀ and SP. Overlay SRM extracted ion chromatograms of a reference (black) and S9 spinal cord tissue (red).

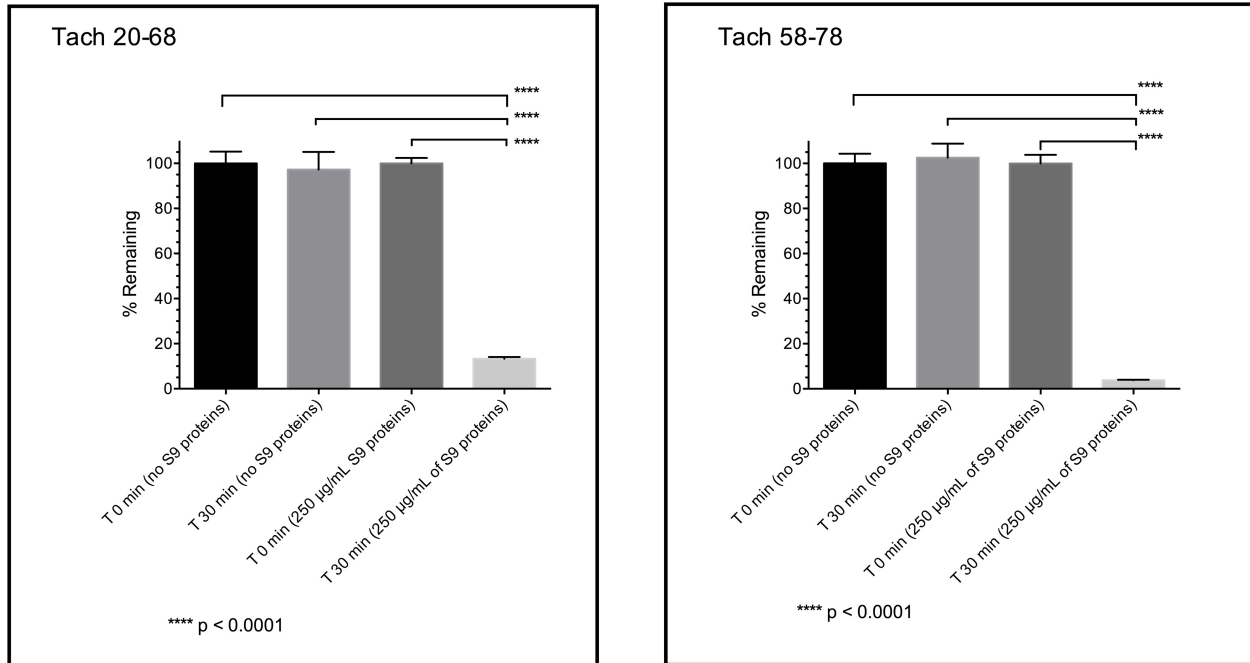


Figure 6. Evaluation of the metabolic stability of Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ in mouse spinal cord S9 fractions. The degradation of full-length peptides occurred only with the presence of S9 proteins and demonstrates that Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ undergoes proteolytic processing in mouse spinal cord S9 fractions.

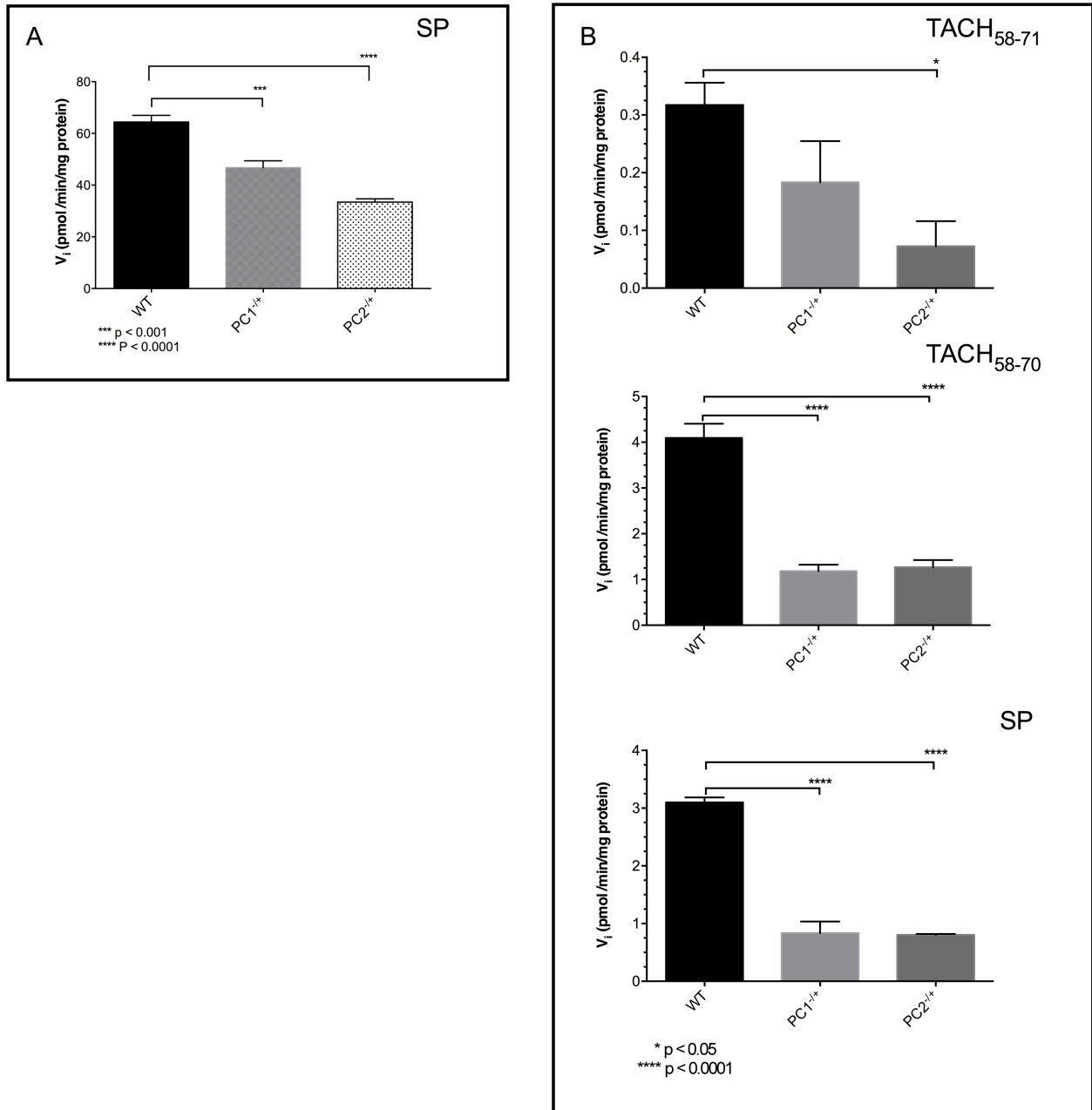


Figure 7. Assessments of PC1 and PC2 involvement in the proteolysis of Tach₂₀₋₆₈ (A) and Tach₅₈₋₇₈ (B). Results suggest that PC1 and PC2 are involved in the proteolytic processing of Tach₂₀₋₆₈ and Tach₅₈₋₇₈ leading to the formation of SP and Tach₅₈₋₇₁ respectively.

II. ARTICLE 2 : Characterization of Substance P Processing in Mouse Spinal Cord S9 Fractions using High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry

Neuropeptides. 2016; 59:47-55.

Mouna Saidi, Soufiane Kamali and Francis Beaudry*

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2015), with permission from Neuropeptide

Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

II. 1. Abstract

Tachykinins are a family of pronociceptive neuropeptides with a specific role in pain and inflammation. Several mechanisms regulate endogenous tachykinins and Substance P (SP) levels, including the differential expression of protachykinin mRNA and the controlled secretion of tachykinins from neurons. Proteolysis is suspected to regulate extracellular SP concentrations but few studies were conducted on the metabolism of proneuropeptides and neuropeptides. Here, we provide evidence that proteolysis controls SP levels in the spinal cord leading to the formation of active C-terminal fragments. Using high-resolution mass spectrometry, specific tachykinins fragments were characterized and quantified. The metabolic stability of β -Tachykinin₅₈₋₇₁ and SP were very short resulting in half-life of 5.7 and 3.5 minutes respectively. Several C-terminal fragments were identified, including SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and SP₈₋₁₁, which conserve affinity for the Neurokinin 1 receptor. Interestingly, the metabolic stability of C-terminal fragments was significantly superior. Two specific Prolyl endopeptidase inhibitors were used and showed a significant reduction in the rate of formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ providing strong evidence that Prolyl endopeptidase is involved into N-terminal processing of SP in the spinal cord.

I. 2. Introduction

The substance P (SP) belongs to the tachykinin family and it is one of the most extensively studied neuropeptides. SP is widely distributed within the central nervous system (CNS) and it is a recognized neurotransmitter and a modulator of pain (Gao and Peet 1999, Ribeiro-da-Silva and Hokfelt, 2000; Pailleux et al., 2013). The tachykinin precursor 1 (*Tac1*) gene encodes the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides, including SP (Cao et al., 1998, Basbaum, 1999). The protachykinin-1 protein is believed to be cleaved by the action of specific proteases into active neuropeptides by post-translational proteolytic processing during axonal transport (Hook et al., 2008). More specifically, recent studies outlined the significant contribution of the prohormone convertases PC1/3 and PC2 in the C-terminal processing of protachykinin peptides (Miller et al., 2003) and suggest a major role in the maturation of the protachykinin-1 protein (Saidi et al., 2015). Specifically, PC1/3 and PC2 are important in the synthesis of β -tachykinin₅₈₋₇₁, a known precursor of SP (Pailleux et al., 2013). The β -tachykinin₅₈₋₇₁ (Tach₅₈₋₇₁) is then processed to SP by the action of specific carboxypeptidases E (CPE) (Fricker, 2005; Hook et al., 2008), following C-terminal amidation by peptidylglycine- α -amidating mono-oxygenase (PAM) leading to the biosynthesis of SP (Fig.1). Several mechanisms regulate endogenous tachykinins and SP levels, including the differential expression of protachykinin mRNA and the controlled secretion of tachykinins from neurons. Proteolysis is suspected to regulate extracellular SP concentrations (Mitchell et al., 2013). It is well known that upon their release, SP can be attacked, cleaved and inactivated by numerous enzymes (Snijdelaar et al., 2000). Several enzymes were suspected to be involved in the conversion of SP to specific N- and C-terminal fragments. Moreover, the action of some of these enzymes will lead to SP fragments preserving noticeable biological activities (Fig.1). In a previous study, we have shown the up-regulation of two major C-terminal SP fragments, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ using a rat model of neuropathic pain (Pailleux et al., 2013). Both fragments can result from the N-terminal

processing of Tach₅₈₋₇₁ or SP by the action of proline-specific endopeptidases prolyl-endopeptidases. As previously shown, the prolyl-endopeptidases (PREP) catalyzed the hydrolysis of Pro-X bond of peptides with primary sequence shorter than 30 amino acids (Polgár, 2002; Nolte et al., 2009). The expression of PREP mRNA in the spinal cord was described and it was suggested that tachykinin peptides can be hydrolyzed by PREP (Nolte et al., 2009). Enzyme catalyzing reaction yield and rate heavily depends on the thermodynamic stability of the enzyme-substrate complex (Berg et al., 2002). The reaction leading to the formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ required the formation of two distinct enzyme-substrate complexes implying that one structure is probably thermodynamically more favorable compared to the other. It is known that C-terminal SP fragments play an important role in the overall SP pronociceptive effect favoring the release of the excitatory amino acids (Skilling et al., 1990). However, SP and C-terminal SP fragments have distinctive binding affinities with the NK1 receptor (Vasiliou et al., 2007, Mistrova et al., 2016) and the resulting effect will depend greatly on the relative abundance of metabolite fragments. Agonists of NK1 receptors affect the postsynaptic membrane and provoke a sustained slow depolarization that significantly contributes to the development of secondary hyperalgesia. The relative expression of Tach₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ will inherently affect pain transmission mechanisms, including pronociceptive and most likely antinociceptive actions. Consequently, not only SP should be considered, but the SP precursor Tach₅₈₋₇₁ and SP metabolites can have important functions during the development of secondary hyperalgesia. Our main hypothesis is that proteolysis controls physiological SP levels in spinal cords leading to the formation of active C-terminal SP fragments. The objectives of this study were initially to develop and validate a HPLC-MS/MS assay to characterize and quantify specific tachykinin peptides. The secondary objective was to assess the metabolic stability of Tach₅₈₋₇₁, SP and peptide fragments. The tertiary objective was to determine the role of PREP in N-terminal

processing of Tach₅₈₋₇₁ and SP in the spinal cord by using two specific Prolyl endopeptidase inhibitors.

II. 3. Materials and Methods

II. 3. 1. Chemicals and reagents

β -Tachykinin₅₈₋₇₁ (Tach₅₈₋₇₁), β -Tachykinin₅₈₋₇₀, Substance P (SP), Substance P₃₋₁₁ (SP₃₋₁₁), Substance P₅₋₁₁ (SP₅₋₁₁), Substance P₈₋₁₁ (SP₈₋₁₁), Substance P₁₋₉ (SP₁₋₉) and Substance P₁₋₇ (SP₁₋₇) were purchased from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). Deuterium labeled analogue peptides were synthesized (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada). Formic acid, water (HPLC-MS Optima grade), acetonitrile (HPLC-MS Optima grade), hexane, trifluoroacetic acid (TFA), sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic were purchased from Fisher Scientific (NJ, USA).

II. 3. 2. Sample Preparation

Spinal cord tissues (n=6 per) from male wild type (C57BL/6J) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and kept frozen at -80 °C until analysis. All mice were 8 weeks old at time of tissues collection. The animals were euthanized with an overdose of isoflurane followed by a transection of the cervical spine. A flush of saline was performed within the spinal canal to collect the spinal cord lumbar enlargement. Tissue samples were snap-frozen in cold hexane (-60 °C) and stored immediately at -80 °C pending analyses. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal and it was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

All six spinal cords were pooled and homogenized in a 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at a ratio of 1:5 (w:v). Samples were sonicated 20 minutes and the homogenates were centrifuged at 9,000

g for 20 minutes. The total amount of protein in each supernatant was determined using the standard Coomassie protein assay (Bradford). This procedure was necessary in order to assure the same amount of protein was used for each experiment. Supernatant aliquots, designated as S9 fractions, were kept à -80 °C until usage. Each aliquot was submitted to only one cycle of freeze and thaw in order to assure maximum enzymatic activities.

II. 3. 3. Metabolism study

The incubations were performed minimally in triplicate. The incubations were performed in a microcentrifuge tube and contained 2 µM of Tach₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₈₋₁₁, SP₁₋₉ or SP₁₋₇, 0.25 mg/mL of S9 fraction proteins diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Spinal cord S9 enzyme suspensions (total volume of 1 mL) were pre-incubated with 1mM CaCl₂ in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 37 °C for 5 min prior fortification with Tachykinin peptides. Immediately after fortification of the full-length peptide into the spinal cord S9 fraction suspension, the sampling point for t=0 was taken, and the reaction was quenched after 5, 10, 15, 20 and 30 minutes incubation for metabolic stability assessments. One hundred microliters of samples were taken and mixed with 100 µL of an aqueous solution containing 1% TFA to stop the reaction. Samples were centrifuged at 12 000 g for 10 min and 150 µL of the supernatant was transferred into an injection vial and spiked with 150 µL of the deuterated internal standard solution (50 pmol/mL labeled peptides in 0.1% TFA) for mass spectrometry analysis. The depletion profile was used to determine the metabolic stability of each peptide in mouse spinal cord S9 fraction suspensions using a first order kinetic model shown in Equation 1.

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

And the peptide half-life was determined using Equation 2.

$$T_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{k} \quad (2)$$

Moreover, the rate of formation (v_i) was calculated based on the concentration of each peptide fragment measured after 10 minutes incubation of the full-length peptides using Equation 3.

$$v_i = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[\text{peptide fragments}]}{10 \text{ min}} \quad (3)$$

II. 3. 4. Proteases inhibitor studies using specific Prolyl Endopeptidase

The incubations were performed minimally in triplicate. N-terminal processing of Tach₅₈₋₇₁ and SP will be specifically investigated with this experiment. Mouse spinal cord S9 fraction suspensions were pre-incubated at 37 °C for 10 minutes separately with each inhibitor (i.e. Z-Pro-Prolinal (Prolyl endopeptidase) and S-17902 (Prolyl endopeptidase) at two specific concentrations, 0.2 and 2 μM. Tach₅₈₋₇₁ or SP were spiked at 2 μM in the mouse spinal cord S9 fraction suspension and the reaction was quenched after 10 minutes reaction. One hundred microliters of samples were taken and mixed with 100 μL of an aqueous solution containing 1% TFA to stop the reaction. Samples were centrifuged at 12 000 g for 10 min and 150 μL of the supernatant was transferred into an injection vial and spiked with 150 μL of the deuterated internal standard solution (500 pmol/mL for precursors and 50 pmol/mL labeled C-terminal peptide fragments in 0.1% TFA) for mass spectrometry analysis. The rate of formation (v_i) was calculated based on the concentration of each specific peptide fragment measured after 10 minutes incubation of the full-length peptides using Equation 3.

II. 3. 5. Chromatographic conditions

The HPLC system was a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system (San Jose, CA, USA). The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 100 × 1 mm, with a particle size of 5 μm. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 1 minute, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 12 minute, a linear gradient was applied up to a ratio of 50:50 and maintained for 2 minutes. The

mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 minutes for a total run time of 29 minutes. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 2 μL of sample were injected.

II. 3. 6. Mass Spectrometry conditions

A Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300 $^{\circ}\text{C}$. The scan range was set to m/z 400-1500. Data was acquired at a resolving power of 140,000 (FWHM), resulting to a scanning rate of ≈ 700 ms/scan when using automatic gain control target of 3.0×10^6 and maximum ion injection time of 200 msec. Product ion spectra were acquired at a resolving power of 17,500 (FWHM), using automatic gain control target of 1.0×10^6 and maximum ion injection time of 100 msec. The collision energy set to 25 (HCD) and the isolation window was set to 1.5 Da. Instrument calibration was performed prior all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. All possible C-terminal and N-terminal processing metabolites were simulated *in silico* using mMass (Strohalm et al., 2008) to generate survey accurate masses. Peptide quantification (MS^1 level) was based on an isotope dilution strategy where heavy-label peptides were spiked and the ratio of light/heavy peptides were used to determine the concentrations and calculate the rate of formation for specific peptide fragments.

II. 3. 7. Statistical analysis

All data were analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test. Significance was set a priori to $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using PRISM (version 6.0h).

II. 4. Results and Discussion

II. 4. 1. High-resolution mass spectrometry analysis

The exhaustive analysis of complex biological samples is an important challenge in peptidomic and proteomic research. Thus, the MS resolution and mass accuracy is a determining factor to improve the accuracy of peptides identification and assignment. The analyses of spinal cord S9 fraction supernatant were performed using a hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer operating in MS at a resolution of 140,000 (FWHM) and in MS/MS at a resolution of 17,500 (FWHM). Based on specific cleavage point identified in Figure 1, we generated an *in silico* mass list and extract specific m/z (± 5 ppm) from the total ion current (TIC) chromatogram. Full-length peptides, Tach₅₈₋₇₁ and SP, were incubated for 10 minutes in mouse spinal cord S9 fractions and following the reaction termination, supernatant were analyzed. The HRAM-MS analysis reveals specifically the presence of several expected Tach₅₈₋₇₁ and SP fragments with mass accuracy within 2 ppm as shown in Table 2 and 3.

The total ion current (TIC) chromatogram following experiments with Tach₅₈₋₇₁ and specific extracted ion chromatogram (XIC) shown in Figure 2 reveal that many expected peptide fragments were observed. Moreover, as illustrated in Table 2, mass accuracy observed were between -1.4 to 0.6 ppm for all detected peptide fragments. Interestingly, data clearly demonstrate that SP and SP fragments are generated from full-length Tach₅₈₋₇₁ in mouse spinal cord S9 fractions. Specifically, SP, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₈₋₁₁, SP₁₋₉ and SP₁₋₇ were the most abundant peptide fragments observed. We have previously established that Tach₅₈₋₇₁ will be cleaved rapidly by endopeptidases E (CPE) and form Tach₅₈₋₇₀ and Tach₅₈₋₆₉ and then process by peptidylglycine

monooxygenase (PAM) or peptidylglycine hydroxylase (PHM) to form SP (Saidi et al. 2015). However, Tach₅₈₋₆₉ was most likely not processed by PAM or PHM in our experiment to form SP (non-amidated form) since peptide amidation catalyzed by PAM or PHM requires copper and ascorbate. Conversely, our results clearly demonstrate that Tach₅₈₋₇₁ is a precursor of SP.

Figure 3 shows the total ion current (TIC) chromatogram following experiments with SP and specific extracted ion chromatogram (XIC). Again, many expected peptide fragments were observed, particularly C-terminal fragments. Specifically, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₈₋₁₁, SP₁₋₉ and SP₁₋₇ were the most abundant peptide fragments observed as listed in Table 3. The mass accuracy observed was between -1.3 - 2.2 ppm for all detected peptide fragments. The data reveal that N- or C-terminal processing of SP in mouse spinal cord S9 fractions can lead to the formation of SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and SP₈₋₁₁. Additionally, targeted high-resolution MS² (tMS²) spectra were collected for Tach₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and fragment ions observed were compatible with the peptide sequence as shown in Figure 4 and annotated based on the Roepstorff and Fohlman nomenclature (Roepstorff and Fohlman, 1984). The mass accuracy of all characteristic a, b and y fragment ions observed were within 3 ppm. These peptide fragments conserve the C-terminal sequence important for the interaction with the NK1 receptor (Jafarian-Dehkordi and Biggs, 2003; Holzer, 2012; Garcia-Recio and Gascón, 2015). C-terminal SP fragments play an important role in the overall SP pronociceptive effect favoring the release of the excitatory amino acids (Skilling *et al.*, 1990; Budai, 2000; Sandweiss and Vanderah, 2015). However, SP and C-terminal SP fragments have distinctive binding affinities with the NK1 receptor and the resulting effect will depend greatly on the relative abundance of metabolite fragments. Agonists of NK1 receptor affect the postsynaptic membrane and provoke a prolonged slow depolarization that notably contributes to the development of secondary hyperalgesia (Woolf and Salter, 2000; Latremoliere and Woolf, 2009; Griffin and Woolf, 2012). The relative expression of Tach₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ will inherently affect pain transmission mechanisms, including pronociceptive and possibly

antinociceptive actions. SP and its C-terminal fragments induced Ca^{2+} mobilization with NK1 receptor activation (Quartara and Maggi, 1997), induction and internalization in the dorsal horn (Sahbaie et al., 2012). The Ca^{2+} influx and NK1 receptor internalization induce an increase of the expression of δ and μ -opioid receptors and their activation by endogenous opioids mediates analgesic effects (Yaksh, 1988; Aimone and Yaksh, 1989). The metabolic fate of Tach₅₈₋₇₁ and SP is therefore an important contributor of the development of secondary hyperalgesia and subsequent activation of endogenous pain relieving mechanisms.

II. 4. 2. Quantitative analysis of targeted peptides

The choice of analytical strategy is critical in order to improve the precision and the accuracy of the data measurements, and consequently enhance the sensitivity of the assay. As demonstrated in a prior publication (Pailleux and Beaudry, 2012), normalization with stable isotope labeled internal standards provided the best approach for sample normalization and can be used for the absolute quantification of peptides. Targeted neuropeptides were labeled on phenylalanine (d_5), glycine (d_2) and/or leucine (d_3) residues by incorporation of deuterium atoms. The Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer was acquiring data at a high-resolution setting (140,000 FWHM) and the resulting scan rate was ≈ 0.75 s/scan, allowing the collection of sufficient data points to obtain reproducible quantitation based on peak area ratios (e.g. ratio light-heavy peptide peak area ratios measured). Each post-acquisition extracted ion chromatogram was generated using the theoretical mass value generated *in silico* with a ± 5 ppm extraction window.

The linearity response was tested at concentration ranging from 1 to 500 pmol/mL for each targeted peptide. Correlation assessments between measured peak area ratios (i.e. light/heavy) and nominal concentrations were performed and results show excellent correlations ($R^2 = 0.992$ – 0.999). The precision and accuracy results are shown in Table 1 for all targeted tachykinin

peptides. Accordingly, the analytical method provided adequate figures of merit to determine the rate of formation for specific Tach₅₈₋₇₁ and SP fragments and the metabolic stability of both peptides in mouse spinal cord S9 fractions.

II. 4. 3. Metabolic stability of Tach₅₈₋₇₁, SP and other N or C-terminal fragments in mouse spinal cord S9 fractions

To determine the metabolic stability of Tach₅₈₋₇₁, SP, and SP fragments, mouse spinal cord S9 fractions were incubated with full-length Tach₅₈₋₇₁, SP, and SP fragments for 10 min and then analyzed the quenched reactions by HPLC/HRAM-MS. Our results indicated that Tachykinin peptide concentrations in mouse spinal cord were regulated by proteolysis and as shown in the previous section, it generates a series of peptide metabolites. Further kinetic experiments were performed using distinct incubation times. The data presented in Figure 5 were fitted with a mono-exponential decay model as described in equation 1. The results indicated that calculated decay times were constant and at 2 μ M substrate concentration, we clearly observed first-order enzymatic kinetics. Please note that the substrate concentration was optimized to obtained first-order enzymatic kinetics but also permit the detection of peptide fragments with sufficient sensitivity. The depletion profiles showed that Tach₅₈₋₇₁ and SP were degraded rapidly when exposed to mouse spinal cord S9 fractions and have a relatively short half-lives (Tach₅₈₋₇₁ $T_{1/2}$ = 5.7 ± 0.2 min, SP $T_{1/2}$ = 3.5 ± 0.3) compared to SP, C- and N-terminal fragments with $T_{1/2}$ values of 20.2 ± 3.9 min, 10.9 ± 1.1 min, 19.9 ± 4.5 min, 20.1 ± 1.8 min and 29.5 ± 1.5 min for SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₈₋₁₁, SP₁₋₉ and SP₁₋₇, respectively. This is a significant observation since it has been already suggested that the relative expression of Tach₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ will influence pain transmission mechanisms, including pronocipetive and antinociceptive actions. Additionally, other C- and N- terminal SP fragments may have significant biological activity, both remains to be thoroughly investigated (Hall et al., 1987; Mitchell et al., 2013; Jonsson, 2015).

The rate of formation of specific C and N-terminal fragments were measured and results are presented in Figure 6. The rate of formation of SP₁₋₇ and SP₈₋₁₁ are clearly higher compared to other abundant fragments suggesting they are the primary metabolic products. These results are coherent with a recent study that concentrate on C-terminal processing of SP (Mitchell et al., 2013). Interestingly, this study almost exclusively focused on N-terminal fragments (SP₁₋₇ and SP₁₋₉) whereas, C-terminal fragments biological activity, specifically pronociceptive actions, are well established (Jonsson; 2015). As reveal in Figure 6, the formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ suggest that N-terminal processing is significant and lead to the formation of biologically active C-terminal fragments that specifically interacts with NK1 receptor (Geraghty and Burcher, 1993; Hallberg and Nyberg, 2003; Datar et al., 2004; Howard et al., 2006). Additional studies also demonstrated that C-terminal SP fragments, SP₈₋₁₁, has a noteworthy affinity with NK1 receptor (Michael-Titus et al., 1999, Valentin-Hansen et al., 2014). Though, SP and C-terminal SP metabolites have distinctive binding affinities with the NK1 receptor and the resulting effect will depend greatly on the relative abundance of each C-terminal fragments. As we previously discussed, C-terminal SP peptide fragments play an important role in the total SP pronociceptive effect, favoring the release of the excitatory amino acids (Skilling et al., 1990; Fransson et al., 2007). Following a peripheral tissue injury, it has been shown that SP and SP C-terminal fragments have an agonist effect on the NK1 receptor and induce the release of the inositol triphosphate (IP₃) (Maggi, 1995; Myöhänen et al., 2008). Furthermore, IP₃ affects specifically the intracellular Ca²⁺ concentration in the CNS (Ferris and Snyder, 1992; Berridge, 1993; Hokin and Dixon, 1993). The increase metabolic stability of C-terminal SP fragments allowed these metabolites to have more sustained access to NK1 receptors and therefore play a significant role into the production of pronociceptive effects. Thus, we believe that SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and with a lesser extent, SP₈₋₁₁ may play a fundamental role in nociception and as we previously shown, might be used as a pain biomarker (Pailleux et al. 2013).

II. 4. 4. Contribution of PREP in Tach₅₈₋₇₁ and SP N-terminal processing

A previous study has shown evidence that SP₁₋₇ and SP₈₋₁₁ were produced by the C-terminal processing of SP by metallopeptidase (Mitchell et al., 2013). As suggested in Figure 1, prolyl endopeptidases (PREP) might be an important contributor of Tach₅₈₋₇₁ and SP N-terminal processing leading specifically to the formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁. We tested this hypothesis by incubating S9 fractions and the full length Tach₅₈₋₇₁ or SP at 37°C for 10 minutes separately with two specific inhibitors (i.e. Z-Pro-Prolinal and S-17902) using two concentrations, 0.2 and 2 μM. The rate of formation was calculated based on the concentration of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ measured after 10 minutes incubation as described in Equation 3. Figure 7A/B showed that Tach₅₈₋₇₁ and SP degraded rapidly in 10 min and no significant differences were noted with or without the presence of PREP inhibitors. Also, the degradation of Tach₅₈₋₇₁ has led to the formation of SP and no significant difference of concentration were observed with or without the presence of PREP inhibitors. This was not unexpected since the primary metabolites are SP₁₋₇ and SP₈₋₁₁ produced by distinct C-terminal processing enzymes. The metabolic stability of Tach₅₈₋₇₁ and SP were not improved with the presence of PREP inhibitors and it might suggest some compensation due to entropic effects from metallopeptidases. However, results shown in Figure 7A/B reveal that PREP inhibitors has significantly reduced the rate of formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ in a concentration-related manner. These results confirmed that PREP, a post-proline cleaving enzyme, are involved in the N-terminal processing of Tach₅₈₋₇₁ and SP to generate bioactive peptide fragments SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁. These results stringent evidence that proteolysis control endogenous SP levels but peptide fragments, specifically C-terminal fragments contribute to the overall pronociceptive effect of SP and also trigger the endogenous opioid system.

II. 5. Conclusion

We provide evidence that proteolysis controls SP levels in the spinal cord and Tach₅₈₋₇₁ is effectively the precursor of SP. Both peptides were degraded rapidly when exposed to mouse spinal cord S9 fractions and had a relatively short half-lives compared to SP C-terminal and N-terminal fragments. The metabolic stability of the C-terminal fragments allowed these metabolites to access to NK1 receptors and play a fundamental role in nociception. Thus fragments SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ could be important pain biomarkers. Additionally, we clearly demonstrated that PREP is involved in the N-terminal processing of Tach₅₈₋₇₁ and SP leading to the formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁. The metabolic turnover of SP and its C-terminal metabolites is central to the neurochemistry of pain and details studies may unveil innovative treatment strategy by favoring the production of inactive peptide fragments. However, it is important to understand inter dependence of the pronociceptive and the endogenous opioid system. The significant reduction of pronociceptive peptide concentrations may impaired the endogenous opioid system response.

II. 6. Acknowledgements

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. RGPIN-2015-05071). We would like to thank Thermo Fisher Scientific for providing a generous access to a Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer. M. Saidi received a Ph.D. scholarship from *Mission Universitaire de Tunisie en Amérique du Nord* (MUTAN).

II. 7. References

Aimone L. D., Yaksh T. L., 1989. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. *Peptides* 10(6), 1127-1131.

Basbaum A. I., 1999. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional Anesthesia and Pain. Medicine* 24(1), 59-67.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., 2002. Enzymes accelerate reactions by facilitating the formation of the transition state. *Biochemistry* 5th edition Section 8.3.

Berridge M. J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling *Nature* 361,315-325.

Budai, D., 2000. Neurotransmitters and receptors in the dorsal horn of the spinal cord. *Acta Biol Szeged* 44(1-4), 21-38.

Cao, Y. Q., Mantyh, P. W., Carlson E. J., Gillespie A. M., Epstein C. J., Basbaum A.I., 1998 Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392(6674), 390-394.

Datar, P., Srivastava, S., Coutinho, E., Govil, G., 2004. Substance P: structure, function, and therapeutics. *Current topics in medicinal chemistry* 4(1), 75-103.

Ferris, C. D., Snyder, S.H., 1992. Inositol phosphate receptors and calcium disposition in the brain. *Journal of Neuroscience* 12, 1567–1574.

Fransson R., Botros M., Nyberg F., Lindeberg G., Sandström A., Hallberg M., 2007. Small peptides mimicking substance P (1–7) and encompassing a C-terminal amide functionality *Neuropeptides* 42(1), 31–37.

Fricke, L. D., 2005. Neuropeptide-processing enzymes: applications for drug discovery. *The AAPS journal* 7(2), E449-E455.

Gao, Z., Peet N. P., 1999. Recent advances in neurokinin receptor antagonists. *Current medicinal chemistry* 6(5), 375-388.

Garcia-Recio, S., Gascón, P., 2015. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *BioMed research international* Article ID 495704, 14 pages.

- Geraghty, D. P., and Burcher E., 1993. Two classes of binding sites for [3H] substance P in rat cerebral cortex. *Brain Research* 601, 34–40.
- Griffin, R. S., and Woolf, C. J., 2012. Pharmacology of analgesia. *Principles of pharmacology the pathophysiologic basis of drug therapy* 110-266.
- Hall, M. E., Miley F. B., and Stewart J. M., 1987. Modulation of blood pressure by substance P: opposite effects of N- and C-terminal fragments on anesthetized rats. *Life Sciences* 40, 1909–1914.
- Hallberg, M., Nyberg, F., 2003. Neuropeptide conversion to bioactive fragments-an important pathway in neuromodulation. *Current Protein and Peptide Science* 4(1), 31-44.
- Hokin, L. E., Dixon J. F., 1993. The phosphoinositide signalling system. I. Historical background. II. Effects of lithium on the accumulation of second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate in brain cortex slices. *Progress in Brain Research* 98, 309-315.
- Holzer, P., 2012. Tachykinins. (Ed.). Springer Science & Business Media 569p.
- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., Hwang, S.R., 2008 Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48, 393–423.
- Howard M. R., Haddley K., Thippeswamy T., Vasiliou S., Quinn J. P., 2006. Substance P and the Tachykinins. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* 427-461
- Jafarian-Dehkordi, A., Biggs, D. F., 2003. Pharmacologic Characterization of Bronchospasm Induced by Substance p (SP) and sp Fragments in Guinea-pig. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 11(4), 129-136.
- Jonsson, A., 2015. The Impact of the Neuropeptide Substance P (SP) Fragment SP1-7 on Chronic Neuropathic Pain. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* 198, 64 pp. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis. ISBN 978-91-554-9206-9.
- Latremoliere, A., Woolf C. J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, 10 (9), 895-926
- Maggi, C.A., 1995. The mammalian tachykinin receptors. *General Pharmacology* 26(5), 911- 944.

Michael-Titus, A. T., Blackburn, D., Connolly, Y., Priestley, J. V., Whelpton R., 1999. N- and C terminal substance P fragments: differential effects on striatal [3H] substance P binding and NK1 receptor internalization. *Neuroreport*; 10(10), 2209–2213.

Miller R., Toneff T, Vishnuvardhan D., Beinfeld M., Vivian Hook Y.H., 2003. Selective roles for the PC2 processing enzyme in the regulation of peptide neurotransmitter levels in brain and peripheral neuroendocrine tissues of PC2 deficient mice. *Neuropeptides* 37(3), 140–148.

Mistrova E., Kruzliak P., Dvorakova M.C., 2016. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides* In Press. Published online: December 8 2015

Mitchell, A. J., Lone A. M., Tinoco A.D., Saghatelian A., 2013. Proteolysis controls endogenous substance P levels, *PLoS One* 8(7), e68638

Myöhänen, T. T., Venäläinen, J. I., Garcia-Horsman, J. A., Männistö, P. T., 2008. Spatial association of prolyl oligopeptidase, inositol 1,4,5-triphosphate type 1 receptor, substance P and its neurokinin-1 receptor in the rat brain: an immunohistochemical colocalization study. *Neuroscience* 153, 1177-1189.

Nolte, W. M., Tagore, D. M., Lane, W. S., Saghatelian, A., 2009. Peptidomics of prolyl endopeptidase in the central nervous system. *Biochemistry* 48 (50), 11971– 11981.

Pailleux, F., Beaudry, F., 2012. Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 26(8), 881-891.

Pailleux, F., Vachon, P., Lemoine J., Beaudry, F., 2013. Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides* 47(4), 261–271.

Polgár, L., 2002. The prolyl oligopeptidase family; *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 59, 349–362

Quartara L, Maggi C.A., 1997. The tachykinin NK1 receptor. Part I: Ligands and mechanisms of cellular activation *Neuropeptides* 31(6), 537–563.

Ribeiro-da-Silva A, Hokfelt T., 2000. Neuroanatomical localisation of substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides* 34, 256–271.

- Roepstorff, P., Fohlman J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 11, 601
- Sahbaie, P., Shi, X., Li, X., Liang, D., Guo, T. Z., Qiao, Y., Yeomans, D. C., Kingery, W. S., David Clark, J., 2012. Preprotachykinin-A gene disruption attenuates nociceptive sensitivity after opioid administration and incision by peripheral and spinal mechanisms in mice. *Journal of Pain* 13(10), 997-1007.
- Saidi, M., Kamali, S., Ruiz, A. O., Beaudry, F., 2015. Tachykinins processing is significantly impaired in PC1 and PC2 mutant mouse spinal cord S9 fractions. *Neurochemical research* 40(11), 2304-2316.
- Sandweiss, A. J., Vanderah, T. W., 2015. The pharmacology of neurokinin receptors in addiction: prospects for therapy. *Substance abuse and rehabilitation* 6, 93–102
- Skilling, S. R., Smullin, D. H., Larson, A.A., 1990. Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of aminoacid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. *Journal of Neuroscience* 10 (4), 1309–1318.
- Snijdelaar, D. G., Dirksen, R., Slappendel, R., Crul, B. J., 2000. Substance P. *European Journal of Pain* 4(2), 121-135.
- Strohalm, M., Hassman, M., Košata, B., Kodíček M., 2008. mMass Data Miner: an Open Source Alternative for Mass Spectrometric Data Analysis. *Rapid Commun Mass Spec* 22 (6), 905-908
- Valentin-Hansen, L., Park, M., Huber, T., Grunbeck, A., Naganathan, S., Schwartz, T. W., Sakmar, T. P., 2014. Mapping substance P binding sites on the neurokinin-1 receptor using genetic incorporation of a photoreactive amino acid. *Journal of Biological Chemistry* 289(26), 18045-18054.
- Vasiliou A.S., MacKenzie A., Morris R., McLaughlin L., Bubb V.J., Haddley K., Quinn J.P., 2007 Generation of a transgenic model to address regulation and function of the human neurokinin 1 receptor (NK1R) *Neuropeptides* 41, 195-205.
- Woolf, C. J., Salter, M. W., 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288(5472), 1765-1768.
- Yaksh, T. L., 1988. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res* 458(2), 319-24.

II. 8. Table legends

Table 1. Summary of peptide quantification figure of merits obtain in fortified S9 fractions

Peptides	Spinal cords S9 fractions		R ²
	Accuracy (%NOM)	Precision (%CV)	
Tach ₅₈₋₇₁	95.0 – 101.9	1.3 – 7.0	≥ 0.9956
SP	98.8 - 103.5	1.3 – 9.4	≥ 0.9981
SP ₃₋₁₁	92.6 - 100.5	2.8 - 6.3	≥ 0.9940
SP ₅₋₁₁	95.9 - 104.2	4.4 – 5.2	≥ 0.9900
SP ₁₋₉	96.3 - 107.7	2.8 - 4.2	≥ 0.9937
SP ₁₋₇	96.8 – 105.3	3.0 – 5.5	≥ 0.9942

Table 2. Principal peptide fragments observed following the incubation of Tach₅₈₋₇₁ in mouse spinal cord S9 fractions

Peptide	Sequence	Charge state (z)	Theoretical mass	Observed Mass	Relative Error (ppm)
Tach ₅₈₋₇₁	RPKPQQFFGLMGKR	3	563.9838	563.9834	-0.71
Tach ₅₈₋₇₀ ¹	RPKPQQFFGLMGK	3	511.9501	511.9504	0.59
SP	RPKPQQFFGLM-COOH	2	674.8634	674.8627	-1.04
SP ₃₋₁₁	KPQQFFGLM-COOH	2	548.2864	548.2857	-1.28
SP ₅₋₁₁	QQFFGLM-COOH	1	870.4178	870.4166	-1.38
SP ₈₋₁₁	FGLM-COOH	1	467.2323	467.2321	-0.43
SP ₁₋₉	RPKPQQFFG	2	552.8011	552.8010	-0.18
SP ₁₋₇	RPKPQQF	2	450.7561	450.7557	-0.89
SP ₁₋₄ ¹	RPKP	1	497.3194	497.3192	-0.40

¹ Peaks were observed but very weak (s/n < 10)

Table 3. Principal peptide fragments observed following the incubation of SP in mouse spinal cord S9 fractions

Peptide	Sequence	Charge state (z)	Theoretical mass	Observed Mass	Relative Error (ppm)
SP	RPKPQQFFGLM-NH ₂	2	674.3713	674.3704	-1.33
SP ₃₋₁₁	KPQQFFGLM-NH ₂	2	547.7944	547.7941	-0.55
SP ₅₋₁₁	QQFFGLM-NH ₂	1	869.4338	869.4327	-1.27
SP ₈₋₁₁	FGLM-NH ₂	1	466.2483	466.2481	-0.43
SP ₁₋₉	RPKPQQFFG	2	552.8011	552.8022	1.99
SP ₁₋₇	RPKPQQF	2	450.7561	450.7571	2.22
SP ₁₋₄ ¹	RPKP	1	497.3194	497.3193	-0.20

¹ Peak were observed but very week (s/n < 10)

II. 9. Figure legends

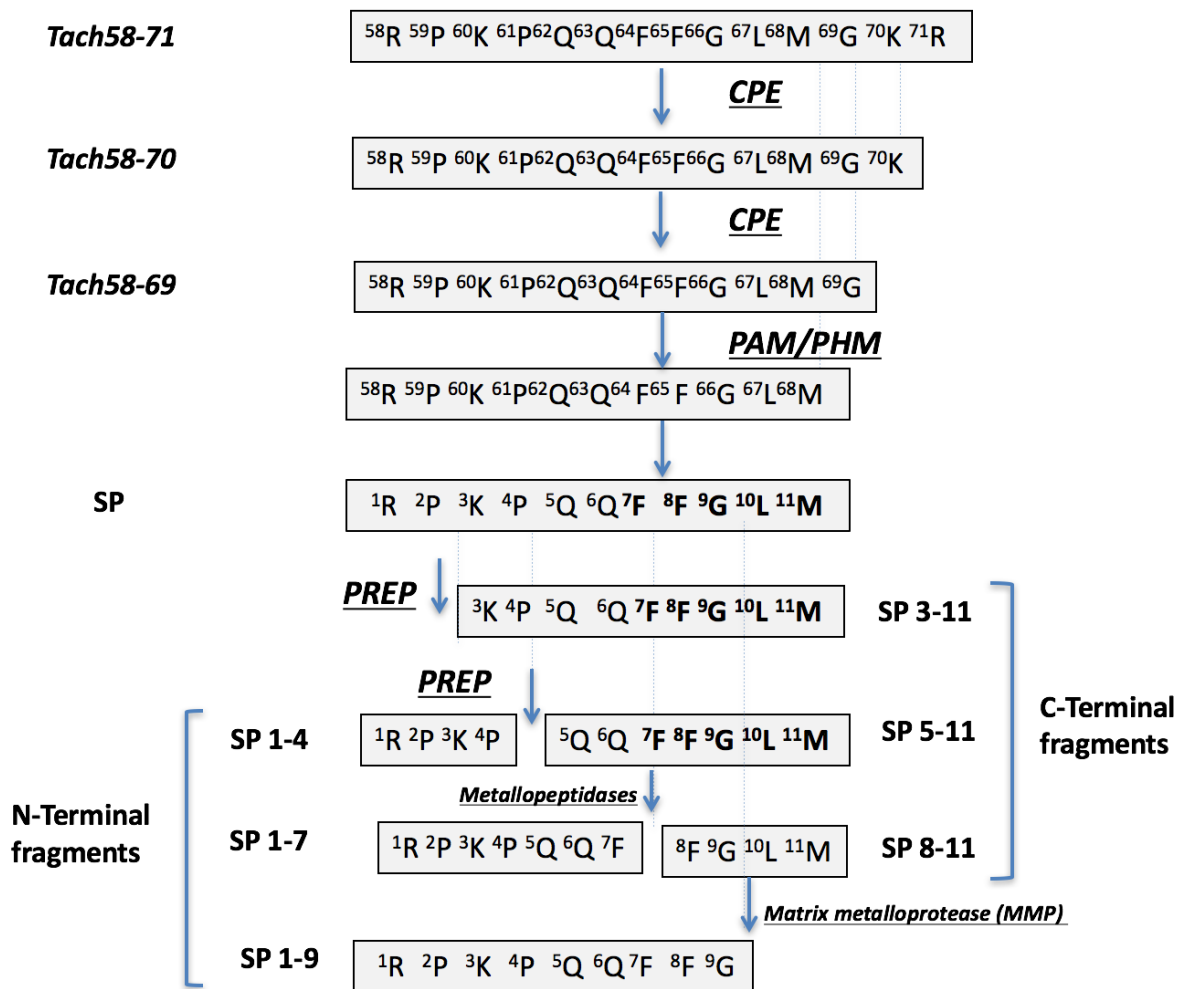


Figure 1. N-terminal and C-Terminal processing of Tach₅₈₋₇₁ and SP.

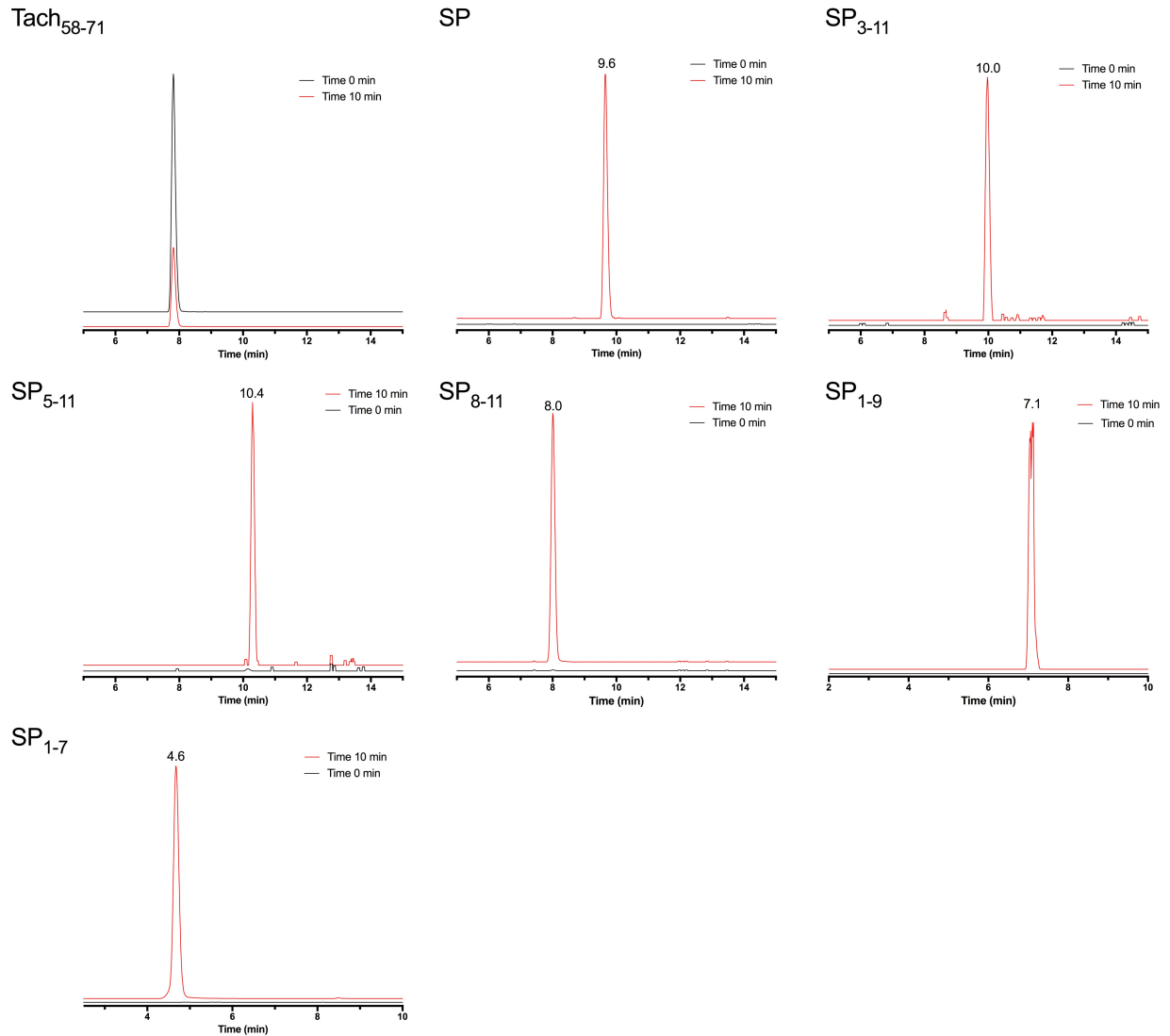


Figure 2. Specific Extracted-ion chromatograms (XIC) for the most abundant SP fragment peptides following the incubation of Tach₅₈₋₇₁ in mouse spinal cord S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (black) and time 10 min (red) reveal the apparition of specific peptide fragments. Please note that SP and SP fragments were non-amidated following the incubation of Tach₅₈₋₇₁ in mouse spinal cord S9 fractions.

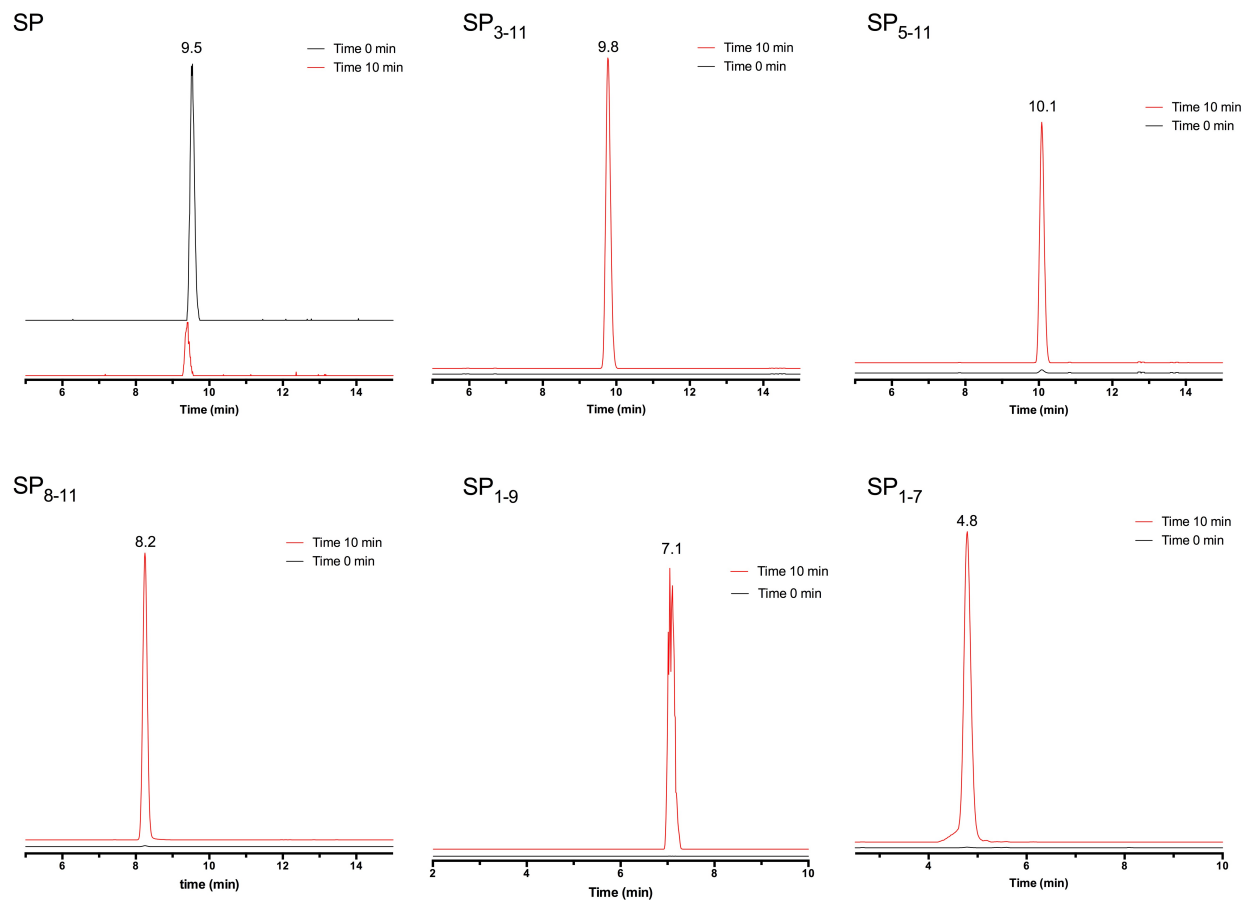


Figure 3. Specific Extracted-ion chromatograms (XIC) for the most abundant SP fragment peptides following the incubation of SP in mouse spinal cord S9 fractions. XIC's were generated using the theoretical mass value with a ± 5 ppm extraction window. Overlay XIC's of time 0 (black) and time 10 min (red) reveal the apparition of specific peptide fragments.

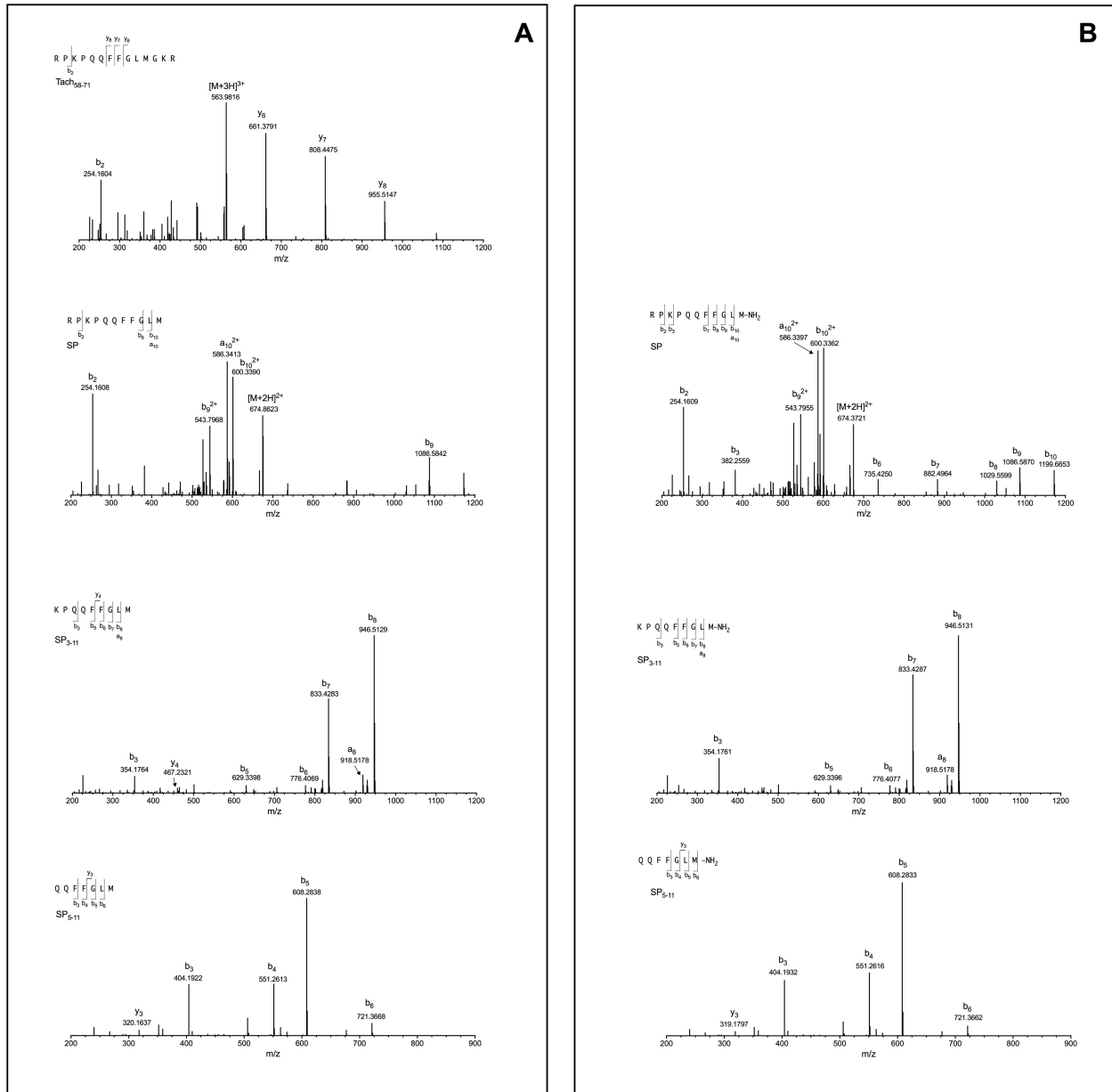
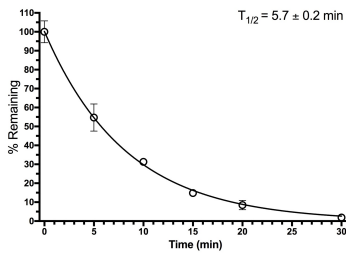


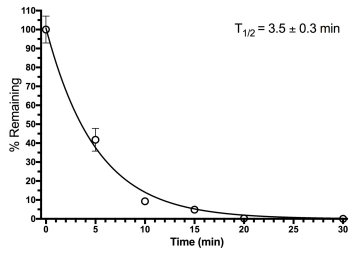
Figure 4. High-Resolution MS² Spectra for Tach₅₈₋₇₁, SP and specific C-terminal fragments following incubation of Tach₅₈₋₇₁ (A) and SP (B) in mouse spinal cord S9 fractions.

Tach₅₈₋₇₁

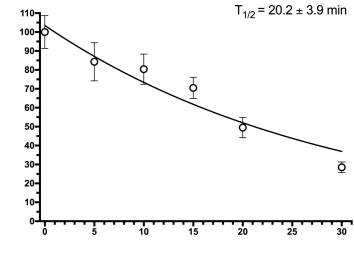
$$C_t = C_0 e^{-kt}$$
$$T_{1/2} = \ln(2)/k$$



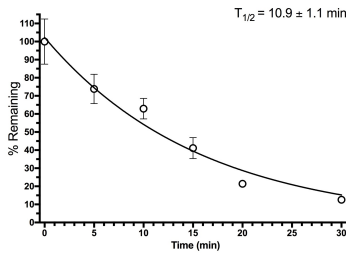
SP



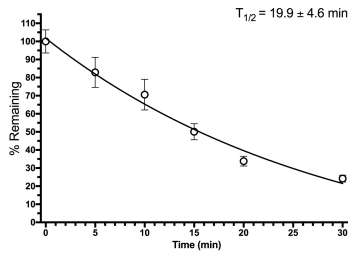
SP₃₋₁₁



SP₅₋₁₁



SP₈₋₁₁



SP₁₋₇

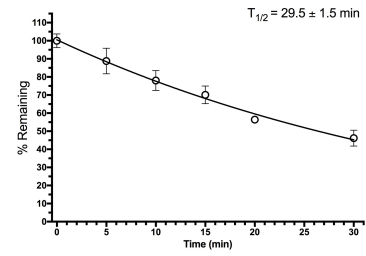


Figure 5. Determination of the metabolic stability of Tach₅₈₋₇₁, SP and specific peptide fragments in mouse spinal cord S9 fractions.

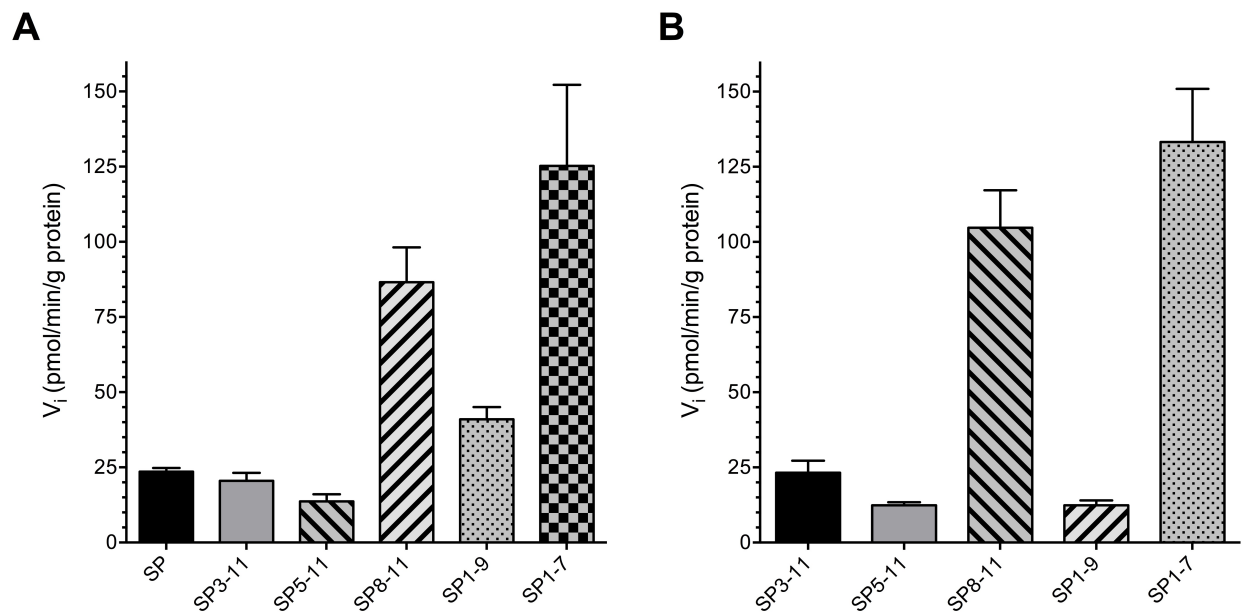
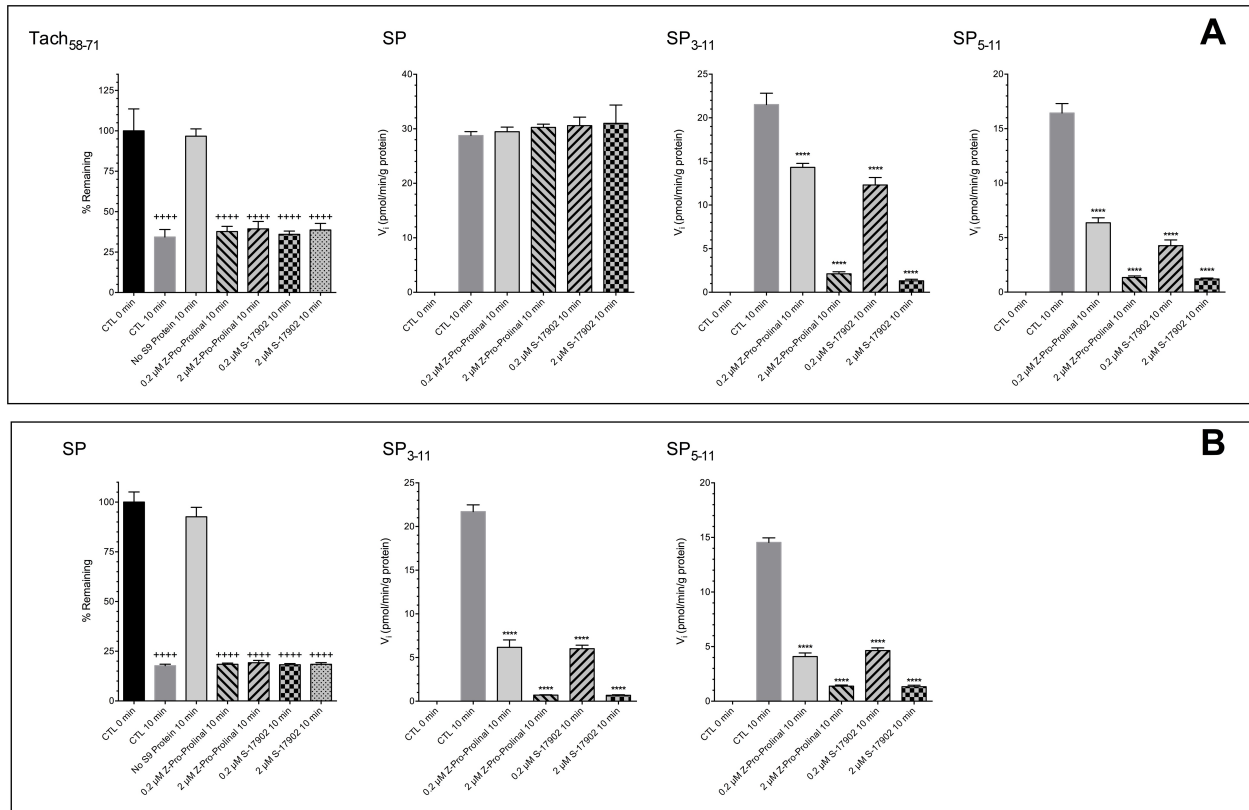


Figure 6. Comparison of the C and N-terminal processing fragment following the incubation of Tach₅₈₋₇₁ (A) and SP (B) in mouse spinal cord S9 fractions. The formation of SP₁₋₇ and SP₈₋₁₁ are the primary metabolites. However, C-terminal fragments SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ are significant products and retain affinity for the NK1 receptor.



**** p < 0.0001 compared with CTL 10 min
 +++++ p < 0.0001 compared with CTL 0 min
 One-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test.

Figure 7. Assessments of PREP involvement in the proteolysis of Tach₅₈₋₇₁ (A) and SP (B) using specific inhibitors. Results suggest that PREP is involved in the proteolytic processing of Tach₅₈₋₇₁ and SP leading to the formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁, two important C-terminal SP fragments with affinity for the NK1 receptor.

III. ARTICLE 3: Targeted High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry Analyses Reveal a Significant Reduction of Tachykinin and Opioid Neuropeptides Level in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cords

Neuropeptides doi: 10.1016/j.npep.2017.04.007.

Mouna Saidi and Francis Beaudry

Reprinted from publication, Copyright Owner, Copyright (2017), with permission from Neuropeptides

Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

III. 1. Abstract

Tachykinin and opioid neuropeptides play a fundamental role in pain transmission, modulation and inhibition. The proteolysis control of endogenous tachykinin and opioid neuropeptides has a significant impact on pain perception. The role of proprotein convertases (PCs) in the proteolysis of proneuropeptides was previously established but very few studies have shown the direct impact of PCs on the regulation of specific tachykinin and opioid peptides in the central nervous system. There is an increasing interest in the therapeutic targeting of PCs for the treatment of pain but it is imperative to assess the impact of PCs on the pronociceptive and the endogenous opioid systems. The objective of this study was to determine the relative concentration of targeted neuropeptides in the spinal cord of WT, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} animals to establish the impact of a restricted PCs activity on the regulation of specific neuropeptides. The analysis of tachykinin and opioid neuropeptides were performed on a HPLC-MS/MS (High-Resolution Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer). The results revealed a significant decrease of Dyn A ($p < 0.01$), Leu-Enk ($p < 0.001$), Met-Enk ($p < 0.001$), Tach₅₈₋₇₁ ($p < 0.05$), SP ($p < 0.01$) and NKA ($p < 0.001$) concentrations in both, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} animals. Therefore, the modulation of PCs activity has an important impact on specific pronociceptive peptides (SP and NKA), but the results also shown that endogenous opioid system is hindered and consequently it will affect

significantly the pain modulatory pathways. These observations may have insightful impact on future analgesic drug developments and therapeutic strategies.

III.2. Introduction

It has been widely demonstrated that dibasic residue cleavage site motifs and single basic residue are essential for the processing of proneuropeptide to active neuropeptide [Eisenmann, 2005; Hook et al., 2008; Funkelstein et al., 2010]. Mainly, these reactions are catalyzed by subtilisin-like proprotein convertases and cysteine cathepsin proteases [Miller et al., 2003; Hook et al., 2015]. Proprotein convertases (PCs) are particularly expressed in the central nervous system (CNS) and it has been widely demonstrated that several neuropeptides are synthesized by the actions of PCs and other specific endopeptidases [Harrison and Geppetti, 2001; Hook et al., 2008]. Comprehensive studies demonstrated that PC1 and PC2 recognize motives composed of either a pair of basic amino acids (KR, RK, RR and KK), or a single residue (R or K) [Zheng et al., 1994; Cui et al., 1998; Jin et al., 2005]. The protease activities of these enzymes are therefore central in the processing of several proneuropeptides but redundant function could counterbalance the down regulation of either one.

Neuropeptides are either neurotransmitters or neuromodulators at various levels in the central nervous system and play an essential role in pain transmission [Levine et al., 1993; Seybold, 2009]. Various members of the tachykinin family (e.g. Substance P, Neurokinin A) are mostly pro-nociceptive neuropeptides and are recognized to play a fundamental role in central sensitization leading to hyperalgesia and allodynia [Lecci et al., 2000]. The tachykinin precursor 1 (*Tac1*) gene encodes the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides, including Substance P (SP) and Neurokinin A (NKA) [Howard et al., 2006]. The role of PCs in the protachykinin-1 protein C-terminal processing was recently demonstrated *in vitro*

[Saidi et al., 2015]. Specifically, PC1 and PC2 may be important in the biosynthesis of SP and NKA by cleaving at specific sites illustrated in Figure 1. Opioid peptides (i.e. enkephalins and dynorphins) have potent analgesic effects in the central nervous system (CNS) and play a fundamental role in endogenous pain inhibition [Machelska, 2007; Wahlert et al., 2013]. They are interacting with μ , κ and δ -opioid receptors expressed widely in the brain and in the spinal cord [Carr and Lovering, 2000; Stanojevic et al., 2008]. Initial endoproteolytic studies of prodynorphin (Pdyn) have shown that PCs play an essential role in Pdyn processing [Day et al., 1998; Berman et al., 2000; Mika et al., 2011; Kastin et al., 2013; Orduna Ruiz, 2016]. Specifically, these initial studies revealed that the action of PC2 is needed for the formation of Big dynorphin (BDyn), Dyn A and dynorphin B (Dyn B) [Day et al., 1998; Miller et al., 2003]. Moreover, our recent results from *in vitro* experiments demonstrate that both PC1 and PC2 are involved in the proteolysis regulation of Dyn B and Dyn A with a more important role for PC1 [Orduna Ruiz and Beaudry, 2016]. Interestingly, the proteolysis of Dyn A generated Leu-enkephalin (Leu-Enk), another important opioid peptide mediating potent painkilling effects [Akil et al., 1997]. Proenkephalin (Penk) is the protein precursor of the enkaphalin peptides, mainly Met-enkephalin (Met-Enk) but also Leu-Enk. Upon cleavages mediated by PC1 and PC2, the proteolysis of Penk will generate four copy of Met-Enk and one copy of Leu-Enk [Vats et al., 2009; Gonzalez-Nunez et al., 2013; Takahashi, 2015]. Both enkaphalin peptides are essential for the regulation of nociception by acting on μ and δ -opioid receptors [Carr and Lovering, 2000; Stanojevic et al., 2008; Orduna Ruiz, 2016].

The regulation of endogenous tachykinin and opioid peptide levels by proteolysis of precursor proteins is very important and can help to better understand the cellular and molecular mechanisms of pain. Our hypothesis is PC1 and PC2 mutant mouse will have significant deficit of endogenous tachykinin and opioid peptides therefore affect significantly the pain modulatory

pathways. We used a state-of-the-art high-resolution accurate mass spectrometry strategy to quantify targeted neuropeptides in mouse spinal cords.

III. 3. Materials and Methods

III. 3.1. Chemicals and reagents

Leu-enkephalin (Leu-Enk), Met-enkephalin (Met-Enk), Dynorphin A (Dyn A), β -Tachykinin₅₈₋₇₁ (Tach₅₈₋₇₁), Substance P (SP) and Neurokinin A (NKA) were purchased from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). Deuterium labeled analogue peptides were synthesized (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada) and used as internal standards. Acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Fisher Scientific (NJ, USA). Hexane and formic acid (FA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Standard solutions were prepared in 0.25% TFA solution as described previously [Beaudry et al., 2009].

III. 3.2. Sample Preparation

Spinal cord tissues (n=6 per genotypes) from male wild type (C57BL/6J) and male $PC2^{+/+}$ mice (product #002963) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and kept frozen at -80 °C until analysis. Heterozygote animals only were used since $PC2^{-/-}$ exhibit many abnormalities and the survival rate is low. Animal genotyping was performed for each animal by Jackson Laboratory using a standard PCR assay. Only heterozygous and normal animals were selected for this study. All mice were 8 weeks old at time of tissues collection. The animals from both groups were euthanized with an overdose of isoflurane followed by a transection of the cervical spine. A flush of saline was performed within the spinal canal to collect the spinal cord lumbar enlargement. Tissue sample was snap-frozen in cold hexane (60°C) and stored immediately at - 80 °C pending analyses. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the

Université de Montréal and it was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

As we described previously [Beaudry, 2010], tissue processing is an important step in preserving neuropeptides from in situ degradation. Mouse tissues were weighed accurately and homogenized using a tissue tearor following the addition of 0.25 % TFA solution at a ratio of 1:5 (w/v). The samples were sonicated for 20 min and 150 μ L of the homogenate were mixed with 150 μ L of acetonitrile to precipitate high molecular weight proteins. The samples were vortexed and centrifuged at 12,000g for 10 min and 200 μ L of the supernatant were mixed with 200 μ L of an internal standard solution containing 50 pg/ μ L of labeled neuropeptides. Peptides were extracted using a standard C18 solid phase extraction protocol. Agilent Bond Elut C18 (100 mg/1mL) were activated with 1 mL of 50% ACN in water. The cartridge was equilibrated twice with 1 mL of a solution of 5% ACN in water containing 0.2% TFA. Four hundred μ L of samples were load by gravity onto the cartridge. The resin was wash with 1 mL of a solution of 5% ACN in water containing 0.2% TFA. Peptides were eluted twice by gravity using 750 μ L of 65% ACN in water containing 0.2% TFA. The resulting residues were dried using a Eppendorf vacuum concentrator and resuspend in 50 μ L of 5% ACN in water containing 0.1% formic acid and transferred into low volume HPLC vials.

III. 3. 3. Chromatographic conditions

The HPLC system was a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system (San Jose, CA, USA). The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 100 \times 1 mm, with a particle size of 5 μ m. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 1 minute, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 12 minute, a linear gradient was applied up to a ratio of 50:50 and maintained for 3 minutes. The

mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 minutes for a total run time of 30 minutes. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 2 μL of sample were injected.

III. 3. 4. Mass spectrometry conditions

A Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation UHPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode and operating in scan mode at high-resolution, and accurate-mass (HRAM). Nitrogen was used for sheath and auxiliary gases and they were set at 10 and 5 arbitrary units. The heated ESI probe was set to 4000 V and the ion transfer tube temperature was set to 300°C. The instrument was operating in targeted MS² mode. Product ion spectra were acquired a resolving power of 17,500 (FWHM), using automatic gain control target of 1.0×10^6 and maximum ion injection time of 100 msec. The isolation window was set to 1.5 Da. Collisions energy, precursor and production ions used for quantification of each neuropeptide are shown in Table 1. Parallel reaction monitoring (PRM) quantification was carried out following data acquisition by extracting specific fragment ions with a 5 ppm mass windows. Instrument calibration was performed prior all analysis and mass accuracy was notably below 1 ppm using Thermo Pierce calibration solution and automated instrument protocol. The analytical method developed and used was derived from previous publications [Ferland et al., 2011; Pailleux and Beaudry, 2012; Pailleux et al., 2013; Saidi et al., 2015; Orduna Ruiz and Beaudry, 2016] and peptide quantification was performed using peak-area ratio of light (unlabeled) and heavy (labeled) isotope.

III. 3.5. Bioanalytical performance Assessments and Statistical analysis

The method linearity was tested using standard solutions ranging from 10 pg/ μ L to 250 pg/ μ L. The labeled peptides were used at a constant concentration of 50 pg/ μ L. Spinal cord homogenates from six donors (C57BL/6J) were pooled and six aliquots were analyzed to determine the method precision and endogenous levels. The endogenous concentrations were determined by interpolating unknowns from the calibration curve.

Targeted neuropeptide analyses in WT, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} spinal cord tissues were analyzed using a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Significance was set a priori to $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using PRISM (version 7.0a).

III. 4. Results and discussion

III. 4.1. Mass spectrometry

Full-scan and product ion mass spectra for all targeted neuropeptides and their corresponding deuterated internal standards were obtained in positive ion mode. The full-scan electrospray mass spectrum of targeted neuropeptides displayed the formation of characteristic pseudo molecular ions $[M+nH]^{n+}$ and the fragment ions observed in MS/MS spectra were annotated based on the Roepstorff and Fohlman nomenclature [Roepstorff and Fohlman, 1984]. Details on MS parameters and PRM transitions are reported in Table 1. Full-scan and product ion mass spectra are necessary to identify and characterize each neuropeptide. The full-scan electrospray mass spectra of targeted neuropeptides showed a base peak pseudo molecular ions at m/z 556.2766 (1+) for Leu-Enk and 561.3077 (1+) for d₅-Leu-Enk; 574.2325 (1+) for Met-Enk and 579.2639 (1+) for d₅-Met-Enk; 716.4036 (3+) for Dyn A and 718.0811 (3+) for d₅-Dyn A; 674.3706 (2+) for SP and 676.8860 (2+) for d₅-SP; 567.2920 (2+) for NKA and 569.8073 (2+) for d₅-NKA. All precursor masses observed were within 5 ppm of the expected monoisotopic masses. Figure 2

presents product ion spectra (MS^2) for targeted neuropeptides obtained and typical a, b, y and z positive ion fragments were observed. The observed collision-induced dissociation spectra were all compatible with the neuropeptide sequences. Additionally, we selected and optimized two of the most abundant and specific product ions for each neuropeptide to generate post acquisition PRM extracted ion chromatograms to obtain the best sensitivity, selectivity and reproducibility. Furthermore, selected PRM transitions were monitored for extracted tissues and compared with the deuterated internal standards. The overlay PRM extracted ion chromatograms display in Figure 3 demonstrate a good concordance between neuropeptide deuterated internal standards and endogenous neuropeptides observed in extracted tissues.

III. 4. 2. Analytical performance

The choice of analytical strategy is important in order to improve the precision and the accuracy of the data measurements, and consequently enhance the sensitivity of the assay. As demonstrated in a prior publication [Pailleux and Beaudry, 2012], normalization with stable isotope labeled internal standards provided the best approach for sample normalization and can be used for the absolute and relative quantification of neuropeptides. Targeted neuropeptides were labeled on phenylalanine (d_5), glycine (d_2) and/or leucine (d_3) residues by incorporation of deuterium atoms. The instrument response linearity was tested using peak area ratio of targeted neuropeptides with corresponding deuterium labeled peptide internal standards. The linearity response was tested with standard solutions (10 $pg/\mu L$ to 250 $pg/\mu L$). As illustrated in Figure 4, the correlations were excellent ($R^2 = 0.9848$ to 0.9955). Additionally, the precision of was tested by analyzing six replicate of a pool mouse spinal cord homogenate. The endogenous concentrations were determined by interpolating unknowns from the calibration curve. As shown in Figure 5, the precision (%CV) was comprised between 2.9% and 8.6% for all targeted neuropeptides. Also, the observed concentrations were all well above the limit of quantification.

Accordingly, the analytical method provided adequate figures of merit for targeted neuropeptide analysis performed during this study.

III. 4. 3. Targeted neuropeptide analysis of mouse spinal cords

In a previous study using a rat model of neuropathic pain, we have demonstrated that Tach₅₈₋₇₁, SP, C-terminal SP fragments and NKA could potentially serve as biomarkers in early drug discovery [Pailleux et al., 2013]. Moreover, we have shown that the expression of SP and Dyn A associated to osteoarthritis pain correlate with articular structure remodeling [Ferland et al., 2011]. Interestingly, these peptides are synthesized from the proteolytic processing of Tac1 or Pdyn and as exhibited in Figure 1, PC1 and PC2 are specifically involved. Therefore, the regulation of tachykinin and opioid peptides (i.e. Tach₅₈₋₇₁, SP, NKA Dyn A, Leu-Enk, Met-Enk) in the CNS fundamentally depends on the C-terminal processing of proneuropeptides associated with the activity of PC1 and PC2. It is important to note that both enzymes can be pharmacologically manipulated [Day et al., 1992] with the premise of partially inhibiting the release of tachykinin peptides which has a critical role in nociceptive transmission [Quartara et Maggi, 1998]. However, partial inhibition of PC1 or PC2 may also impact the opioid systems and therefore hindered patient endogenous pain modulatory systems [Sekizawa et al., 1992; Cesselin, 1995].

We have compared the concentration of PC1 and PC2 in mouse spinal cords using a peptide mass fingerprinting (PMF) analytical strategy and shown that PC1 and PC2 are significantly down-regulated in PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cords respectively [Saidi et al., 2015]. Targeted tachykinin and opioid neuropeptide analyses were performed and as shown in Figure 6, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cords levels were significantly lower compared to WT spinal cords. The results revealed a significant decrease of Dyn A ($p < 0.01$), Leu-Enk ($p < 0.001$), Met-Enk ($p <$

0.001), Tach58-71 ($p < 0.05$), SP ($p < 0.01$) and NKA ($p < 0.001$) concentrations in both, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} animals. Moreover, the results do not suggest compensation due to redundancy in the PCs function. The reduction of PC1 and PC2 activity observed was coherent with the genotype and the measured PC1 and PC2 concentrations in mouse spinal cords.

Following nociceptive stimuli, SP and NKA were released from central terminal fibers into intersynaptic space and activate the NK1 receptor located at the postsynaptic membrane. The induced Ca^{2+} mobilization is correlated with NK1 receptor activation, induction and internalization in the dorsal horn [Sahbaie et al., 2012]. As a consequence, the Ca^{2+} influx and NK1 internalization provoke specifically an increase of the expression of δ and μ -opioid receptors [Yaksh 1988, Aimone and Yaksh 1989]. This is interesting since the activation of δ and μ -opioid receptors by their endogenous ligands (i.e. Leu-Enk and Met-Enk) mediate analgesic effects. Therefore, a significant reduction of SP and NKA levels in PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cords may also result in a reduction of the expression of δ and μ -opioid receptors and potentially impeded the endogenous opioid systems.

The proenkephalin (PENK) gene encodes both Leu-Enk and Met-Enk but Pdyn, the precursor of Dyn A, has two copies of Leu-Enk encoded in its primary sequence. Moreover, the N-terminal sequence of Dyn A encodes specifically Leu-Enk. As we demonstrated previously, the proteolytic processing of Pdyn and Dyn A leads to the formation of Leu-Enk and its processing depends on the proteolytic activity of both, PC1 and PC2 [Orduna Ruiz and Beaudry, 2016]. As shown in Figure 6, the levels observed for Dyn A, Leu-Enk and Met-Enk in PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cords are coherent with the assertion. Even if it is not statistically significant, there is a difference between PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mouse spinal cords levels for Dyn A, Leu-Enk and

Met-Enk and this difference may suggest a more important role of PC1. These results are coherent with our previous *in vitro* results [Orduna Ruiz and Beaudry, 2016].

Recently, the therapeutic targeting of the proprotein convertases were considered to be interesting targets for the development of effective novel therapeutics. However, our results may suggest that despite the pharmacological manipulation of PC1 or PC2 can reduce significantly the levels of pronociceptive peptides like SP and NKA, it can also have a significant impact on the endogenous opioid systems, including the reduction of enkephalin and dynorphin peptide concentrations but also the expression of δ and μ -opioid receptors. Thus, the patient endogenous pain modulatory systems would be hampered.

III. 5. Conclusion

The results revealed a significant decrease of specific pronociceptive neuropeptides (i.e. Tach₅₈₋₇₁, SP and NKA) but also endogenous opioid neuropeptides (i.e. Dyn A, Leu-Enk and Met-Enk) concentrations in the spinal cord of both, PC1^{-/+} and PC2^{-/+} mice. Thus, our results outline that a reduction of PCs activity has an impact on the pronociceptive tachykinin system, but it also show that endogenous opioid system is hindered and consequently it will affect significantly the pain modulatory pathways. Over the last decade, there is a significant increase of interest in the therapeutic targeting of proteases, including PCs for the treatment of several diseases (e.g. viral infections, osteoarthritis, cancer and cardiovascular disease) and symptoms including pain. Though, there are many unanswered questions regarding the adequacy of pharmacologically manipulating PCs in a therapeutic context, specially concerning the probable secondary effects of treatment. It is also important to remind the embryonic lethality of some PC mutant mice. Thus, our observations may have insightful impact on future analgesic drug developments and therapeutic strategies targeting PCs.

III. 6. Acknowledgments

This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry NSERC Discovery grant No. 386637-2010 and RGPIN-2015-05071). We would like to thank Thermo Fisher Scientific for providing a generous access to a Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer. Additionally, some analyses were performed on analytical instruments acquired with a NSERC Research Tools and Instruments grant (F. Beaudry NSERC-RTI grant No. 439748-2013). M. Saidi received PhD scholarships from *La Mission Universitaire de Tunisie à Montréal* and the *Faculté des études supérieures et postdoctorales* of the *Université de Montréal*.

III. 7. References

Aimone, L. D. and Yaksh T. L. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from spinal cord in vivo. *Peptides*. 1989; 10: 1127–1131.

Akil, H., Meng, F., Devine, D. P. Watson, S. J. Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid system: implications for treatment of opiate addiction. *Seminars in neuroscience*. 1997; 9: 70-83.

Beaudry, F., Ferland, C.E., Vachon, P. Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2009; 23: 940–950

Beaudry, F. Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Analytical Biochemistry*. 2010; 407: 290-292.

Berman, Y., Mzhavia, N., Polonskaia, A., Furuta, M., Steiner, D., Pintar, J., Devi, L. Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2. *Journal of neurochemistry*. 2000; 75(4): 1763-1770.

Carr, J.A. Lovering, A.T. Mu and delta opioid receptor regulation of pro opiomelanocortin peptide secretion from the rat neurointermediate pituitary in vitro. *Neuropeptides*. 2000; 34(1): 69–75.

Cesselin, F. Opioid and anti-opioid peptides. *Fundamental & clinical pharmacology*. 1995; 9(5): 409-433.

Cui, Y., Jean, F., Thomas, G., Christian, J. L. BMP 4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *The EMBO Journal*. 1998; 17(16): 4735-4743.

Day, R., Schafer, M. K., Watson, S. J., Chretien, M., Seidah, N. G. Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Molecular Endocrinology*. 1992; 6(3): 485-497.

Day, R., Lazure, C., Basak, A., Boudreault, A., Limperis, P., Dong, W., Lindberg, I. Prodynorphin Processing by Proprotein Convertase 2 Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(2): 829-836.

Eisenmann, D. M. Wnt signaling .WormBook, ed. The C. elegans Research Community. 2005; 25: 1-17

Ferland, C.E., Pailleux, F., Vachon, P., Beaudry F. Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides*. 2011; 45: 423–429

Funkelstein, L., Beinfeld, M., Minokadeh, A., Zadina, J., Hook, V. Unique biological function of cathepsin L in secretory vesicles for biosynthesis of neuropeptides. *Neuropeptides*. 2010; 44(6): 457-466.

Gonzalez-Nunez, V., González, A. J., Barreto-Valer, K., Rodríguez, R. E. In Vivo Regulation of the μ Opioid Receptor: Role of the Endogenous Opioid Agents. *Molecular medicine*. 2013; 9(1): 7.

Harrison, S., Geppetti, P. Substance p. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2001; 33(6): 555-576

Hook, V., Funkelstein, L., Lu D., Bark, S., Wegrzyn J., Hwang S.R. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008; 48: 393-423.

Hook, V., Bandeira, N. Neuropeptidomics Mass Spectrometry Reveals Signaling Networks Generated by Distinct Protease Pathways in Human Systems. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 2015; 26(12): 1970-1980.

Howard, M. R., Haddley, K., Thippeswamy, T., Vasiliou, S., Quinn, J. P. Substance P and the Tachykinins. In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 2006; 427-461. Springer US.

Jin, W., Fuki, I. V., Seidah, N. G., Benjannet, S., Glick, J. M., Rader, D. J. Proprotein convertases are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280(44): 36551-36559.

Kastin, Abba, ed. *Handbook of biologically active peptides*. Academic press, 2013.

Lecci, A., Giuliani, S., Tramontana, M., Carini, F., Maggi C.A. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides*. 2000; 34(5): 303-313.

Levine, J.D., Fields H.L., Basbaum, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. *The Journal of Neuroscience*. 1993; 13(6): 2273-2286.

Machelska, H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides*. 2007; 41(6): 355-363.

Mika, J., Obara, I., Przewlocka, B. The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: Implications of neuro-glial interaction. *Neuropeptides*. 2011; 45(4): 247-261.

Miller, R., Toneff, T., Vishnuvardhan, D., Beinfeld, M., Hook, V. Y. Selective roles for the PC2 processing enzyme in the regulation of peptide neurotransmitter levels in brain and peripheral neuroendocrine tissues of PC2 deficient mice. *Neuropeptides*. 2003; 37(3): 140-148.

Orduna, Ruiz A and Beaudry, F. Characterization of endoproteolytic processing of dynorphins by proprotein convertases using mouse spinal cord S9 fractions and mass spectrometry. *Neuropeptides*. 2016; 57: 85-94

Pailleux, F and Beaudry, F. Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 2012; 26: 881-891

Pailleux, F., Vachon, P., Lemoine, J., Beaudry F. Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides.* 2013; 47(4): 261-271.

Quartara, L., Maggi, C. A. The tachykinin NK 1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides.* 1998; 32(1): 1-49.

Sahbaie, P., Shi, X., Li, X., Liang D, Guo T.Z., Qiao, Y., Yeomans, D.C., Kingery, W.S., David Clark, J. Preprotachykinin-A gene disruption attenuates nociceptive sensitivity after opioid administration and incision by peripheral and spinal mechanisms in mice. *Journal of Pain.* 2012; 13(10): 997-1007.

Saidi, M., Kamali, S., Orduna, Ruiz, A., Beaudry, F. Tachykinins Processing is Significantly Impaired in PC1 and PC2 Mutant Mouse Spinal Cord S9 Fractions, *Neurochemical Research.* 2015; 40(11): 2304-2316

Sekizawa, K., Ujiie, Y., Sasaki, H., Takishima, T. Substance P: An endogenous cough inducer. *Neuropeptides.* 1992; 22(1): 60-61.

Seybold, V.S. The role of peptides in central sensitization. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2009; 194: 451-491.

Stanojevic, S., Vujic, V., Mitic, K., Kustrimovic, N., Kovacevic-Jovanovic, V., Miletic, T., Dimitrijevic, M. Methionine-enkephalin modulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) release by rat peritoneal macrophages involves different types of opioid receptors. *Neuropeptides.* 2008; 42(2): 147-158.

Takahashi, A. Dynorphin/ α -Neo-endorphin. *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research.* 2015; 58.

Vats, I.D., Chaudhary, S., Karar, J., Nath, M, Pasha, Q., Pasha, S. Endogenous peptide: Met-enkephalin Arg-Phe differently regulate expression of opioid receptors on chronic treatment. *Neuropeptides.* 2009; 43: 355-62.

Wahlert, A., Funkelstein, L., Fitzsimmons, B., Yaksh, T., Hook, V. Spinal astrocytes produce and secrete dynorphin neuropeptides. *Neuropeptides.* 2013; 47(2): 109-115

Yaksh, T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res.* 1988; 458: 319-324.

Zheng, M., Streck, R., Scott, R., Seidah, N., Pintar, J. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *The Journal of neuroscience.* 1994; 14(8): 4656-4673.

III. 8. Table legends

Table 1. Summary of peptide quantification parameters used for HPLC-QqOrbitrap PRM analysis

Peptides	Sequences	Precursor ions	Product ions	Collision energy (%)
Leu-Enk	YGGFL	556.2 (z = 1)	425.1819 (b ₄) 397.1870 (a ₄)	23
d ₅ -Leu-Enk	YGG <u>F</u> (d ₅)L	561.3 (z = 1)	430.2211 (b ₄) 402.2262 (a ₄)	23
Met-Enk	YGGFM	574.2 (z = 1)	425.1819 (b ₄) 397.1870 (a ₄)	23
d ₅ -Met-Enk	YGG <u>F</u> (d ₅)M	579.3 (z = 1)	430.2211 (b ₄) 402.2262 (a ₄)	23
Dyn A	YGGFLRRIRPKLKWDNQ	716.4 (z = 3)	629.7003 (b ₁₅ ³⁺) 667.7146 (b ₁₆ ³⁺)	30
d ₅ -Dyn A	YGG <u>F</u> (d ₅) LRRIRPKLKWDNQ	718.1 (z = 3)	631.3800 (b ₁₅ ³⁺) 669.3943 (b ₁₆ ³⁺)	30
Tach ₅₈₋₇₁	RPKPQQFFGLMGKR	564.0 (z = 3)	661.3814 (y ₆) 808.4498 (y ₇)	27
d ₅ -Tach ₅₈₋₇₁	RPKPQQFF <u>G</u> (d ₂) <u>L</u> (d ₃)MGKR	565.7 (z = 3)	666.4205 (y ₆) 813.4889 (y ₇)	27
SP	RPKPQQFFGLM-NH ₂	674.4 (z = 2)	600.3378 (b ₁₀ ²⁺) 254.1612 (b ₂)	25
d ₅ -SP	RPKPQQFF <u>G</u> (d ₂) <u>L</u> (d ₃) M-NH ₂	677.0 (z = 2)	602.8574 (b ₁₀ ²⁺) 254.1612 (b ₂)	25
NKA	HKTDSFVGLM-NH ₂	567.3 (z = 2)	985.5102 (b ₉) 872.4261 (b ₈)	25
d ₅ -NKA	HKTDSFV <u>G</u> (d ₂) <u>L</u> (d ₃) M-NH ₂	569.8 (z = 2)	990.5493 (b ₉) 874.4417 (b ₈)	25

III. 8. Figures legends

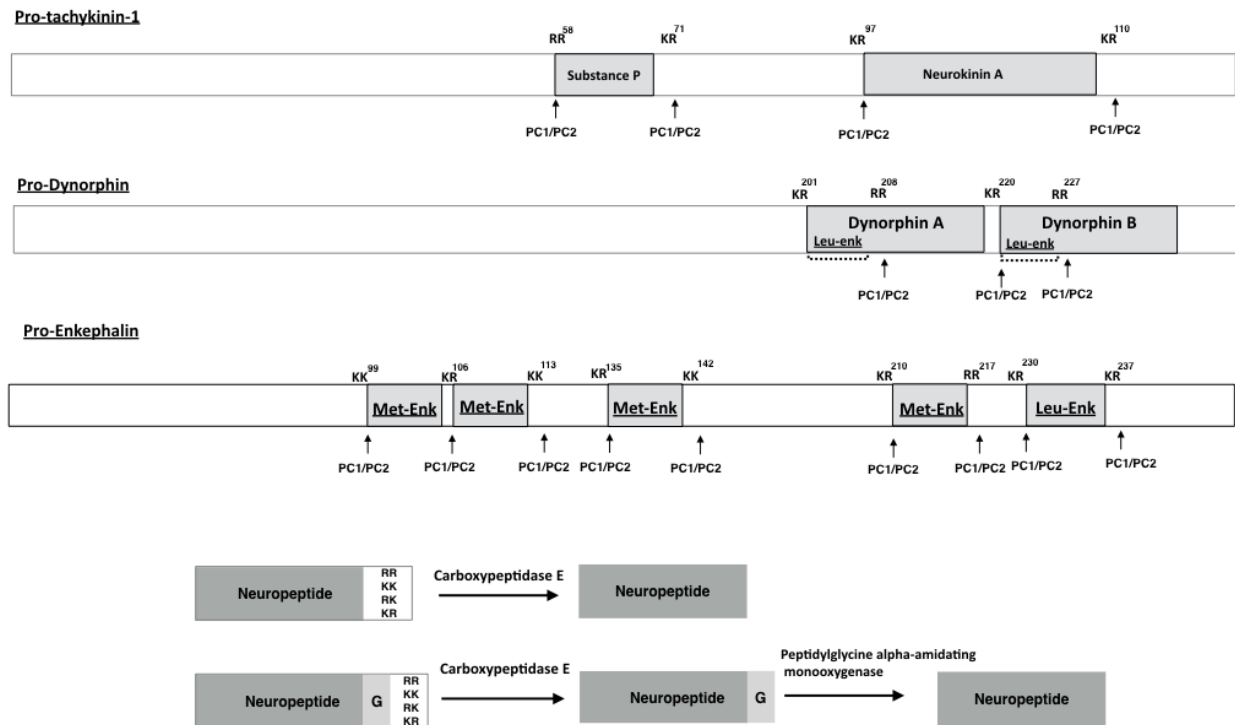
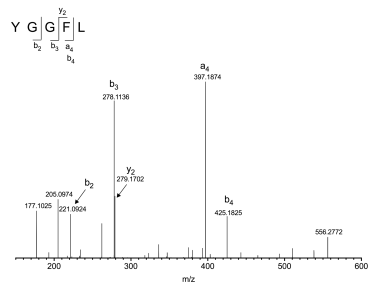
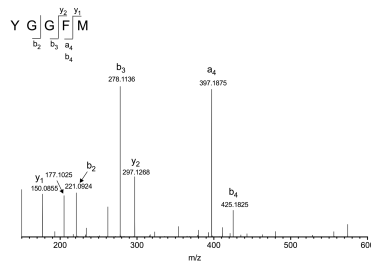


Figure 1. Prodynorphin, Proenkephalin and Protachykinin-1 processing by proprotein convertases (PC1 and PC2). Dynorphins, enkephalins and tachykinins have several paired and single basic amino acid cleavage sites and based on the sequence, various processing intermediates can be derived leading to specific neuropeptides. Carboxypeptidase E catalyze the sequential removal of basic amino acids and peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase will catalyze the C-terminal alpha-amidation of peptides following the elimination of the glycine residue.

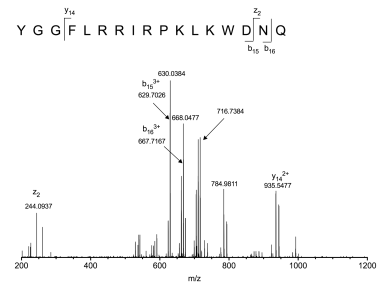
Leu-Enk



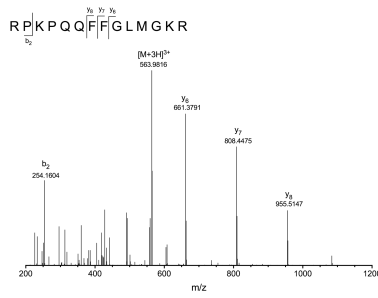
Met-Enk



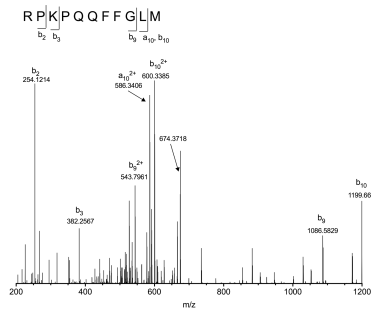
Dyn A



Tach₅₈₋₇₁



SP



NKA

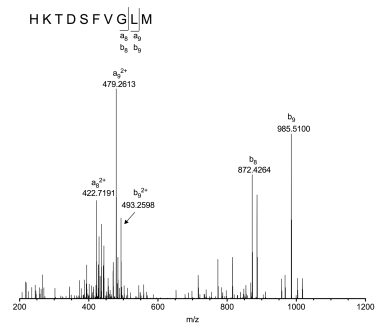


Figure 2. Product ion spectra (MS²) of Leu-Enk, Met-Enk, Dyn A, Tach₅₈₋₇₁, SP and NKA

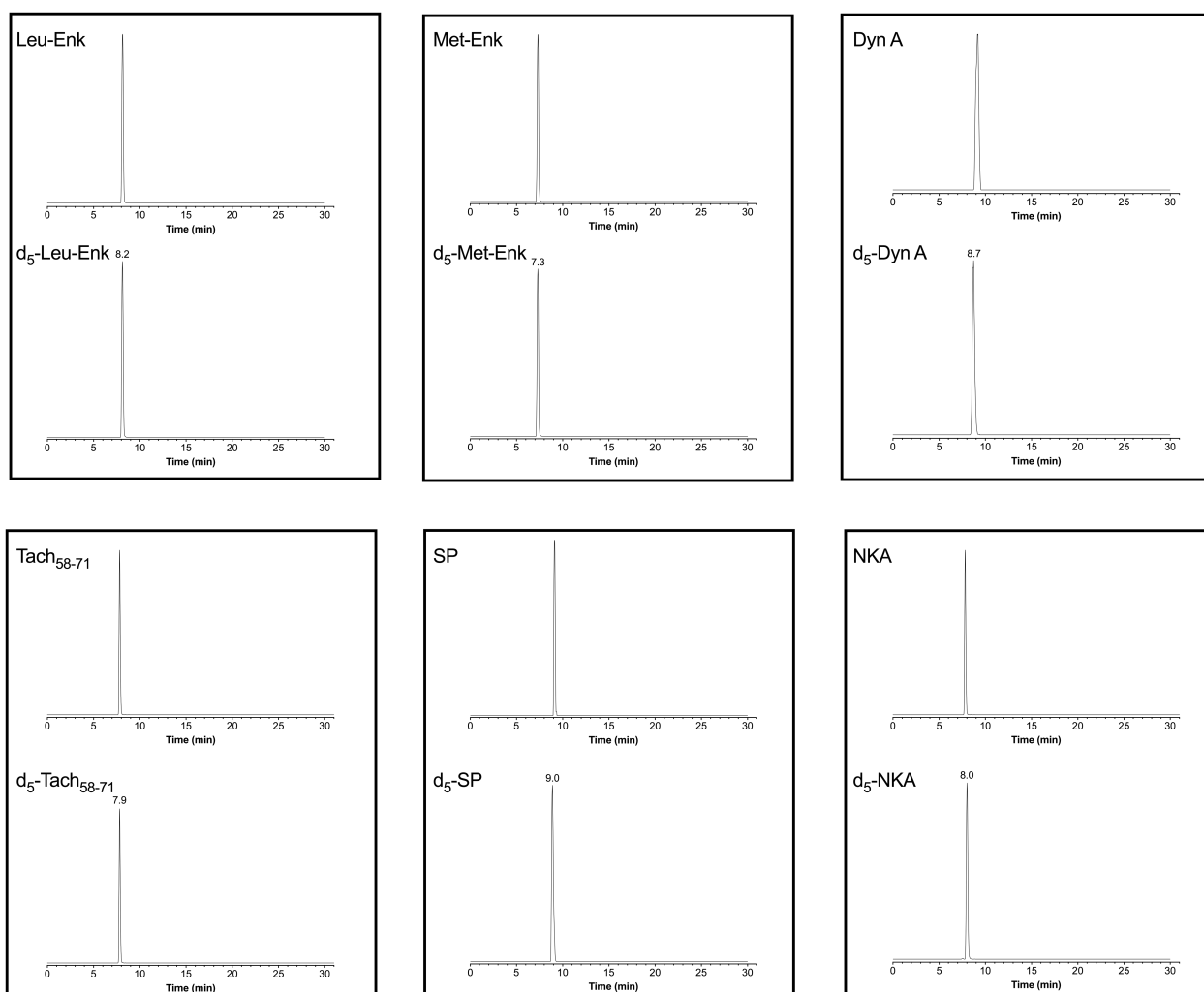


Figure 3. Analysis of targeted neuropeptides in mouse spinal cord tissues. Overlay PRM extracted ion chromatograms of deuterated internal standards and targeted peptides extracted from a spinal cord tissue.

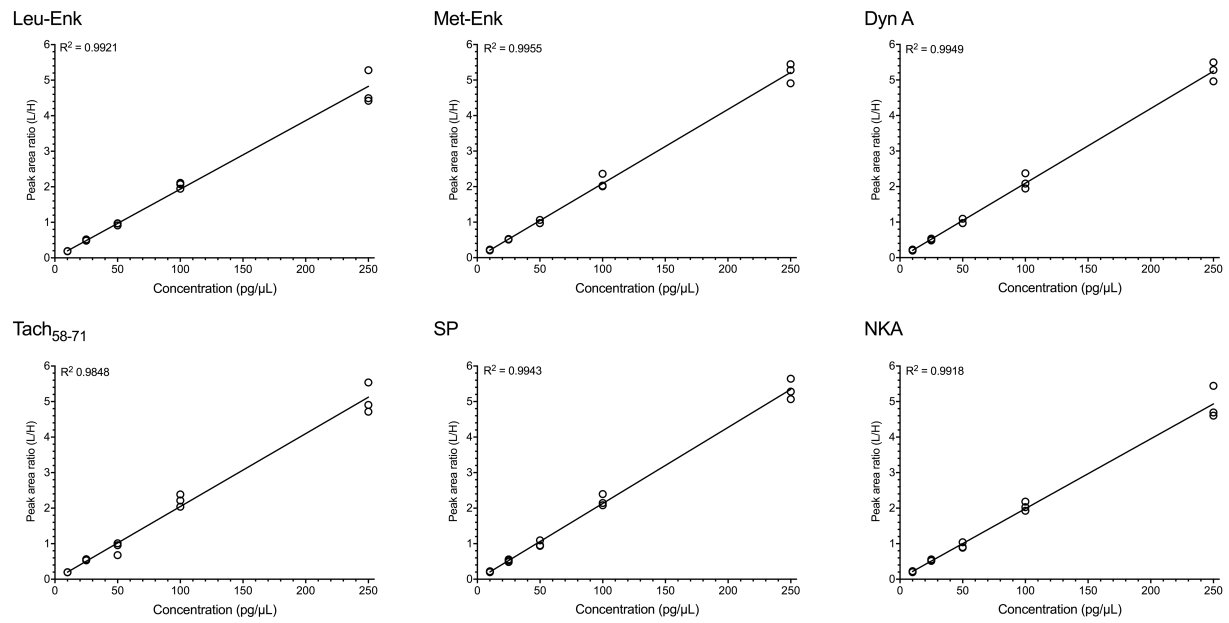


Figure 4. Calibration curve for targeted peptides. The peak area ratio between endogenous neuropeptides and deuterium labeled neuropeptides are display against five specific standards ranging from 10 to 250 pg/ μ L. Deuterium labeled peptides were used at a constant concentration of 50 pg/ μ L.

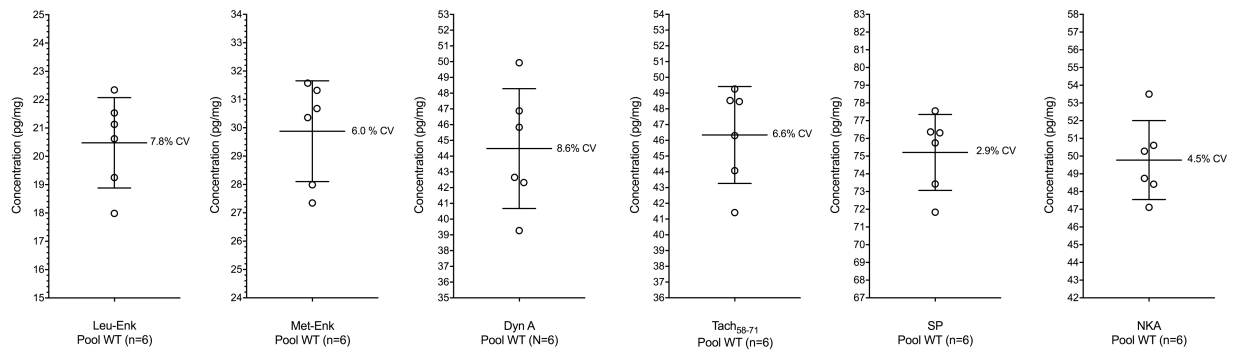


Figure 5. Vertical scatter chart representing targeted neuropeptides method precision evaluation. The precision observed is well below 10%.

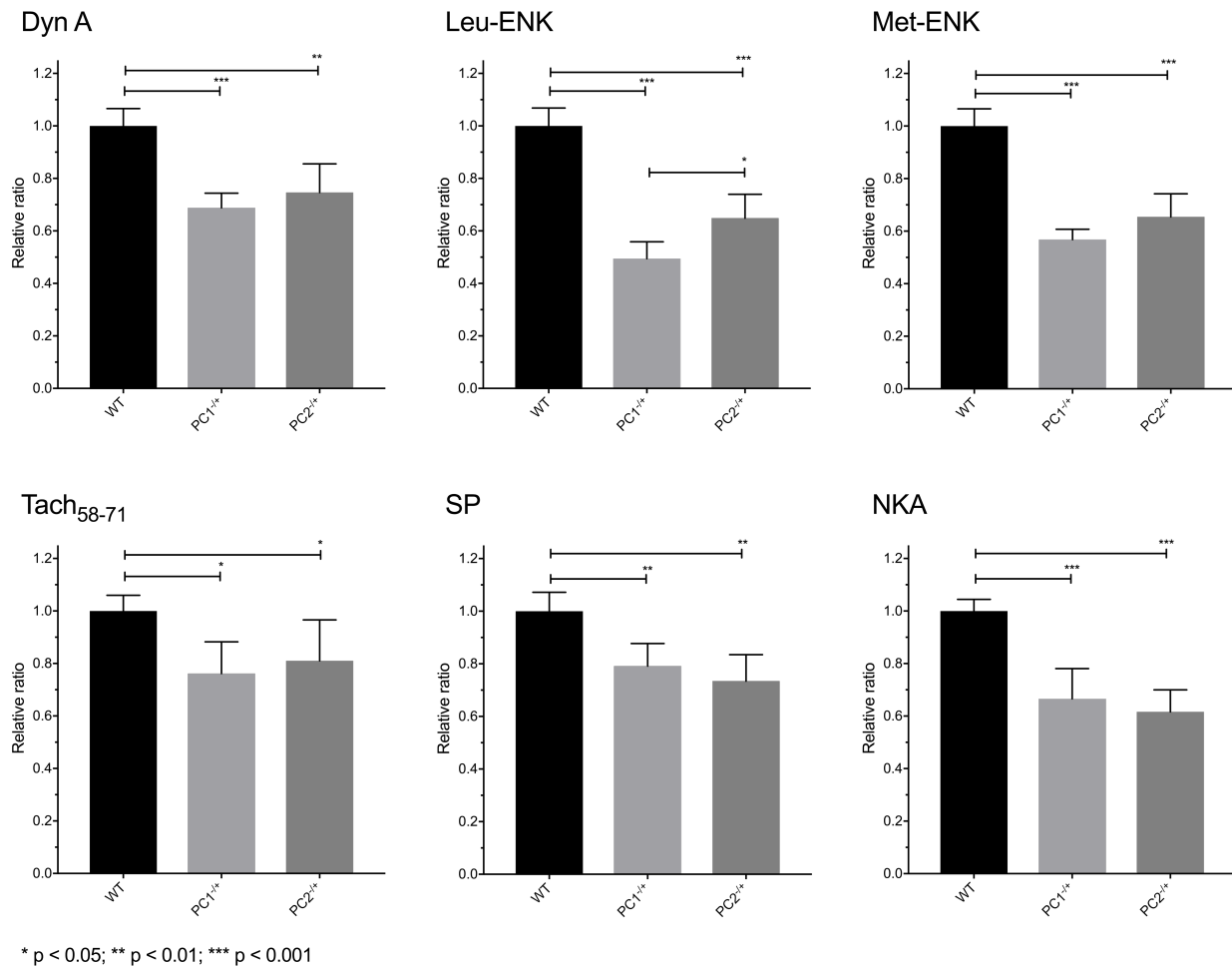


Figure 6. Histograms of neuropeptide concentrations observed in WT (n = 6), PC1^{-/-} (n = 6) and PC2^{-/-} (n = 6) mouse spinal cords (Mean ± SE). Peptide concentrations were determined using an isotope ratio mass spectrometry method. Concentrations observed in WT, PC1^{-/-} and PC2^{-/-} mouse spinal cords for targeted neuropeptide Leu-Enk, Met-Enk, Dyn A, Tach₅₈₋₇₁, SP and NKA respectively.

IV. ARTICLE 4: Liquid Chromatography-Electrospray Linear Ion Trap Mass Spectrometry Analysis of Targeted Neuropeptides in *Tac1*^{-/-} Mouse Spinal Cords Reveal Significant Lower Concentration of Opioid Peptides.

Neuropeptides. 2015; 52:79-87

Mouna Saidi and Francis Beaudry

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2015), with permission from Neuroptide Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

IV. 1. Abstract

Tachykinin and opioid peptides play a central role in pain transmission, modulation and inhibition. The treatment of pain is very important in medicine and many studies using NK1 receptor antagonists failed to show significant analgesic effects in humans. Recent investigations suggest that both pronociceptive tachykinins and the analgesic opioid systems are important for normal pain sensation. The analysis of opioid peptides in *Tac1*^{-/-} spinal cord tissues offers a great opportunity to verify the influence of the tachykinin system on specific opioid peptides. The objectives of this study were to develop a HPLC–MS/MRM assay to quantify targeted peptides in spinal cord tissues. Secondly, we wanted to verify if the *Tac1*^{-/-} mouse endogenous opioid system is hampered and therefore affect significantly the pain modulatory pathways. Targeted neuropeptides were analyzed by high performance liquid chromatography linear ion trap mass spectrometry. Our results reveal that EM-2, Leu-Enk and Dyn A were down-regulated in *Tac1*^{-/-} spinal cord tissues. Interestingly, Dyn A was almost 3 fold down-regulated ($p < 0.0001$). No significant concentration differences were observed in mouse *Tac1*^{-/-} spinal cords for Met-Enk and CGRP. The analysis of *Tac1*^{-/-} mouse spinal cords revealed noteworthy decreases of EM-2, Leu-Enk and DynA concentrations which strongly suggest a significant impact on the

endogenous pain-relieving mechanisms. These observations may have insightful impact on future analgesic drug developments and therapeutic strategies.

IV. 2. Introduction

The sensation of pain produced by a noxious stimulus is not always consistent and depends on multiple factors influencing the neurophysiology of pain transmission. The nervous system has developed very complex mechanisms that control the way noxious sensory information is perceived by the organism [Basbaum *et al.*, 2009]. It has been shown that considerable modulation of sensory information happens in the dorsal horn of the spinal cord [Honore *et al.*, 2000, Levine *et al.*, 1993]. There are various molecular events contributing to the transmission of the sensory information during the first synapse and several key neuropeptides were identified including tachykinin and opioid peptides [Kuner 2010, Mika *et al.* 2011, Felippotti *et al.* 2012].

Neuropeptides are either neurotransmitters or neuromodulators at various levels in the central nervous system and play a fundamental role in pain transmission [Levine *et al.*, 1993; Seybold, 2009]. Recent studies described the central role of tachykinin and opioid related peptides [Pailleux *et al.*, 2013; Felippotti *et al.*, 2012; Ferland *et al.*, 2011; Mika *et al.*, 2011]. Many members of the tachykinin family (e.g. Substance P) are mostly pro-nociceptive neuropeptides and have been known to play an essential role in central sensitization leading to hyperalgesia and allodynia [Lecci *et al.*, 2000]. Opioid peptides (i.e. endomorphins, enkephalins and dynorphins) have potent analgesic effects in the central nervous system (CNS) and play an important role in endogenous pain inhibition [Machelska, 2007, Wahlert *et al.* 2013, Bali *et al.*, 2014]. They are interacting with μ , κ and δ opioid receptors expressed widely in the brain and in the spinal cord [Carr and Lovering, 2000; Stanojevic *et al.*, 2008]. Tachykinin and opioid neuropeptides were extensively studied in the spinal cord, since they are major players in the synaptic processing of

pain-related signals but research has been limited by several shortcomings inherent to *in vivo* neuropeptide studies.

Recently, it has been suggested that endogenous endomorphin-2 (EM-2) play an important role in the early stage of pain sensation, transmission, and modulation [Fichna *et al.*, 2007; Greco *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2013]. Immunohistochemistry and Immunocytochemistry analyses shown that endomorphins are largely distributed in the CNS. Endomorphins are abundant in areas such as the stria terminalis, the periaqueductal gray, the locus coeruleus, the parabrachial nucleus, and the nucleus of the solitary tract, but there are noteworthy distinctions in the neuroanatomical localization of these peptides [Pierce and Wessendorf, 2000]. Endomorphin-2 (EM-2) is primarily found in the spinal cord and lower brainstem [Martin-Schild *et al.*, 1999; Pierce and Wessendorf, 2000]. It is largely observed in the hypothalamus, the nucleus of the solitary tract, the substantia gelatinosa of the medulla and the spinal cord dorsal horn. The participation of EM-2 in the modulation of pain transmission is important since EM-2 decreases excitability of postsynaptic receptors such as neurokinin 1 receptor (NK1) [Fichna *et al.*, 2007]. Moreover, the interaction of EM-2 with μ -opioid receptors is key to the modulation of the pain transmission [Wu *et al.*, 2015]. It regulates the release of dynorphin A (Dyn A) by stimulation of the descending dynorphinergic neurons resulting in the liberation of Dyn A. Thus, the interaction of Dyn A and κ -opioid receptors located on the presynaptic membrane inhibit the release of pronociceptive neuropeptides including Substance P (SP) [Fichna *et al.*, 2007; Zachariou and Goldstein, 1997].

Substance P is reported to play a critical role in nociceptive transmission in the CNS [Pailleux *et al.*, 2013 Gao and Peet, 1999]. Substance P is a pronociceptive peptide and agonist of NK1 located in the lamina I of the spinal cord [Teodoro *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 1999]. Substance P is primarily synthesized in neurons and has a widespread distribution in both the central and peripheral nervous systems. More specifically, a significant proportion of primary afferent

neurons located in the dorsal root ganglia express high levels of SP and it is transported to both, the peripheral and central terminals. The expression of SP and NK1 correlates with intensity, frequency, and duration of pain [Sluka *et al.*, 1997]. Agonists of NK1 receptors provoke a sustained slow depolarization that significantly contributes to the development of secondary hyperalgesia [Levine *et al.*, 1993; Baumbauer *et al.*, 2009; Dickenson, 1995]. Neuropeptides are derived from larger protein precursors recognized as proneuropeptides. The tachykinin precursor 1 gene (*Tac1*) encodes the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides, including SP [Basbaum *et al.*, 1999]. The protachykinin-1 protein is cleaved by the action of specific proteases into active neuropeptides by post-translational proteolytic processing during axonal transport [Hook *et al.*, 2008]. Interestingly, depolarization of a neuron containing proneuropeptides stimulates proprotein convertases processing, which occurs within synaptic vesicles in the presynaptic terminal [Yakovleva *et al.* 2006]. The stimulation of proprotein convertases processing will result in the liberation of higher concentration of neuropeptides into the intersynaptic space. Thus proprotein convertases are currently explored as a potential drug targets with the premise of partially inhibiting the release of pronociceptive peptides such as SP [Vivoli *et al.*, 2012]. *Tac1*^{-/-} mice showed significant decrease of nociceptive pain responses to moderate to intense stimuli [Cao *et al.*, 1998]. Conversely, *Tac1*^{-/-} mice exhibited similar behavior following light or non-painful stimuli [Zimmer *et al.*, 1998]. It is believe that pain perception is necessary to trigger the release of endomorphins. Endomorphin-2 is co-expressed with SP and both are found in dense core vesicles located in spinal cord primary afferent terminals suggesting concomitance release of excitatory and inhibitory neuropeptides [Sanderson *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2015]. Thus, we believe that *Tac1*^{-/-} mice may also exhibit a significant deficit of inhibitory neuropeptides, including EM-2 and Dyn A. The objectives of this study were initially to develop and validate a HPLC–MS/MRM assay to quantify targeted peptides in spinal cord tissues. Secondly, we wanted to verify if the *Tac1*^{-/-} mouse endogenous opioid system is hampered and

therefore affect significantly the pain modulatory pathways. This is an important consideration if new medicines are developed to specifically impede the release of SP.

IV. 3. Materials and Methods

IV. 3. 1 Chemicals and reagents

Endomorphin 2 (EM-2), Leu-enkephalin (Leu-Enk), Met-enkephalin (Met-Enk), Dynorphin A (Dyn A), Substance P (SP) and Calcitonin gene related peptide (CGRP) were purchased from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). Deuterium labeled analogue peptides were synthesized (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada) and used as internal standards. Acetonitrile was purchased from Fisher Scientific (NJ, USA) and trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from BDH Laboratory supplies (Poole, England, UK). Hexane and formic acid (FA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Standard solutions were prepared in 0.25% TFA solution as described previously [Beaudry *et al.*, 2009].

IV. 3. 2 Sample Preparation

Spinal cord tissues (n=6 per genotypes) from male wild type (C57BL/6J) and male *Tac1*^{-/-} mice (product # 004103) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and kept frozen at -80 °C until analysis. All mice were 8 weeks old at time of tissues collection. The animals from both groups were euthanized with an overdose of isoflurane followed by a transection of the cervical spine. A flush of saline was performed within the spinal canal to collect the spinal cord lumbar enlargement. Tissue sample was snap-frozen in cold hexane (-60 °C) and stored immediately at -80 °C pending analyses. The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal and it was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

As we described previously [Beaudry, 2010], tissue processing is an important step in preserving neuropeptides from *in situ* degradation. Mouse tissues were weighed accurately and homogenized using a tissue tearor following the addition of 0.25 % TFA solution at a ratio of 1:5 (w/v) resulting in a pH < 3. At this pH, residual enzymatic activity is considerably reduced and peptides are stable under these conditions. The samples were sonicated for 20 min and 150 μ L of the homogenate were mixed with 150 μ L of acetonitrile to precipitate high molecular weight proteins. The samples were vortexed and centrifuged at 12,000 g for 10 min and 150 μ L of the supernatant were transferred into an injection vial then spiked with 150 μ L of the internal standard solution. Vials were capped and vortexed vigorously prior to analysis. All samples were analyzed in triplicates.

IV. 3. 3. Instrumentation

The HPLC-MS/MS system included a Thermo Accela autosampler, a Thermo Accela pump and a Thermo LTQ-XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA). Linear ion trap instruments typically have unit mass resolution throughout the mass range. The instrument was calibrated and the resolution was set at 0.5-0.7 Da at full width at half maximum (FWHM). Data were acquired and analyzed with Xcalibur 2.2 (San Jose, CA, USA), and regression analyses were performed with PRISM (version 6.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines were constructed from the peak-area ratios of targeted neuropeptides and corresponding deuterated labeled peptides used as internal standards.

IV. 3. 4. Bioanalytical methods

The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C8 100 \times 1 mm, with a particle size of 5 μ m. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a ratio of 5:95.

From 0 to 1 min, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 12 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 60:40 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min for a total run time of 30 min. The flow rate was fixed at 75 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 2 μL of sample were injected using full loop mode. All targeted neuropeptides and deuterium labeled peptides eluted between 8.0 to 11.0 min. The mass spectrometer was coupled with the HPLC system using a pneumatically assisted electrospray ion source (ESI). The sheath gas was set to 25 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300°C and the ion transfer tube voltage to 46 V. All scan events were acquired with a 100 ms maximum injection time. An activation $q = 0.25$ and activation time of 30 ms were used for all targeted peptides. The mass spectrometer operated for quantitative analyses in full scan MS/MS and the quantification was based on specific post-processing MRM extracted ion chromatograms. Specific analysis details are presented in Table 1. Two specific production ions were used to generate post acquisition MRM extracted ion chromatograms for quantification purposes. The method used an isotope dilution mass spectrometry (IDMS) strategy for the quantification of the targeted peptides. Due to synthesis yield issues related to label CGRP, a 37 amino acids peptide, deuterated SP was used as an internal standard for CGRP quantification along with the CGRP reference standard. The precision and accuracy was evaluated using dilution ratios of spinal cord homogenates with a solution of deuterium labeled peptide (i.e. 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1). The labeled peptides were used at a constant concentration of 50 pmol/mL. Absolute peptide quantification was performed using peak-area ratio of light (unlabeled) and heavy (labeled) isotope.

IV. 3. 5. Statistical analysis

All data were analyzed using Student's t-test to compare mean WT and *Tac1*^{-/-} mouse values. Significance was set a priori to $p < 0.05$. The statistical analyses were performed using PRISM (version 6.0d).

IV. 4. Results

IV.4. 1 Mass spectrometry

Full-scan and product ion mass spectra for all peptides and internal standards were obtained in positive ion mode. The full-scan electrospray mass spectrum of targeted peptides displayed the formation of characteristic pseudo molecular ions $[M+nH]^{n+}$ and the fragment ions observed in MS/MS spectra were annotated based on the Roepstorff and Fohlman nomenclature [Roepstorff and Fohlman, 1984]. Details on MS parameters and MRM transitions are reported in Table 1. Full-scan and product ion mass spectra are necessary to identify and characterize each neuropeptide. The full-scan electrospray mass spectra of targeted neuropeptides showed a base peak pseudo molecular ions at m/z 572.2 (1+) for EM-2 and 577.3 (1+) for d₅-EM-2; 556.2 (1+) for Leu-Enk and 561.3 (1+) for d₅-Leu-Enk; 574.2 (1+) for Met-Enk and 579.3 (2+) for d₅-Met-Enk; 716.4 (3+) for Dyn A and 718.1 (3+) for d₅-Dyn A; 674.4 (2+) for SP and 677.0 (2+) for d₅-SP; 952 (4+) for CGRP. Figure 1 presents product ion spectra (MS/MS) for targeted neuropeptides obtained and typical a, b, y and z positive ion fragments were observed. The observed collision-induced dissociation spectra were all compatible with the neuropeptide sequences. Additionally, we selected and optimized two of the most abundant and specific product ions for each neuropeptide to generate post acquisition MRM extracted ion chromatograms to obtain the best sensitivity, selectivity and reproducibility. Furthermore, selected MRM transitions were monitored for extracted tissues and compared with reference

materials. The overlay MRM extracted ion chromatograms display in Figure 2 demonstrate a good concordance between peptide reference standards and endogenous peptides observed in extracted tissues.

IV. 4. 2. Analytical performance

The choice of analytical strategy is important in order to improve the precision and the accuracy of the data measurements, and consequently enhance the sensitivity of the assay. As demonstrated in a prior publication [Pailleux and Beaudry, 2012], normalization with stable isotope labeled internal standards provided the best approach for sample normalization and can be used for the absolute and relative quantification of peptides. Targeted neuropeptides were labeled on phenylalanine (d_5), glycine (d_2) and/or leucine (d_3) residues by incorporation of deuterium atoms. The instrument response linearity was tested using peak area ratio of targeted neuropeptides with corresponding deuterium labeled peptides. The linearity response was tested with dilution ratios (i.e Light/Heavy ratios) of spinal cord homogenates with a solution of deuterium labeled peptides at 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 to test the precision and accuracy of the isotopic dilution technique. Correlation assessments between measured peak area ratios and nominal dilution ratios were performed. As illustrated in Figure 3, the correlations were excellent ($R^2 = 0.9909$ to 0.9994). The precision (%CV) was comprised between 2.0% and 14.1% and the accuracy (%NOM) was contained between 86.6% and 111.4% for all targeted neuropeptides. Accordingly, the analytical method provided adequate figures of merit for targeted peptide analysis performed during this study.

IV.4. 3. LC-MS/MS analysis of mouse spinal cords

Following the analysis of EM-2, Dyn A, Leu-Enk, Met-Enk and CGRP in mouse spinal cords significantly altered concentrations were observed between *Tac1*^{-/-} and WT groups for specific opioid peptides. Peptide concentrations were determined by IDMS and statistical comparisons

between both groups were performed. As illustrated in Figure 4, EM-2, Leu-Enk and Dyn A were significantly down-regulated in *Tac1*^{-/-} spinal cord tissues. EM-2 concentrations were 15.3% lower ($p < 0.05$), Leu-Enk were 20.7% lower ($p < 0.05$) and Dyn A concentrations were 62.3% lower ($p < 0.0001$) in *Tac1*^{-/-} mice. However, concentrations for Met-Enk and CGRP were not statistically different. Also, as expected, SP was not detected in *Tac1*^{-/-}. These results clearly demonstrated that *Tac1*^{-/-} mice exhibited significantly inferior EM-2, Leu-Enk and Dyn A concentrations in the spinal cord.

IV. 5. Discussion

Noxious sensory information is perceived by the nervous system following a cascade of complex physiological and biochemical processes [Basbaum, 1999; Basbaum *et al.*, 2009]. Considerable deciphering and modulation of sensory information occurs in the spinal cord as it is relayed by peripheral sensory neurons [Moreira *et al.*, 2009; Honore *et al.*, 2000]. As discussed previously, neuropeptides are either neurotransmitters or neuromodulators at various levels in the CNS and play a fundamental role in pain transmission [Levine *et al.*, 1993; Seybold, 2009]. Numerous neuropeptides were depicted, principally, tachykinin and opioid related peptides [Felippotti *et al.*, 2012; Ferland *et al.*, 2011; Mika *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2014]. Members of the tachykinin family are generally pronociceptive neuropeptides and have been known to play an important role in central sensitization leading to hyperalgesia and allodynia [Lecci *et al.*, 2000]. Opioid peptides (i.e. endomorphins and enkephalins) have potent analgesic effects in the CNS and play an essential role in endogenous pain inhibition [Machelska, 2007; Wang *et al.*, 2013]. As illustrated in Figure 4, *Tac1*^{-/-} mice showed a significant decrease of EM-2 and Leu-Enk concentrations in the spinal cord, but more importantly, an almost 3 fold decrease of Dyn A concentration. Interestingly, we have not observed any difference in CGRP concentration despite being coexpressed with SP. Likewise, we did not observed any significant differences for Met-Enk.

Endomorphin-2 is an endogenous opioid broadly distributed in the central nervous system playing an important role in the earliest stage of pain sensation, transmission and modulation. Additionally, the expression of EM-2 is closely linked with the expression of pronociceptive peptides (i.e. SP, CGRP) [Martin-Schild *et al.*, 1999; Sanderson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015]. It has been demonstrated that EM-2 is co-localized with SP in large core dense vesicles (LCDV) present in primary afferent terminals suggesting concomitant release of excitatory and inhibitory neurotransmitters into the intersynaptic space. This may suggest that noxious stimulus evoke EM-2 release and regulate nociceptive processing by presynaptic and postsynaptic inhibitory actions [Sanderson *et al.*, 2004]. Also, it is believed that pain perception is necessary to trigger the release of EM-2 into the intersynaptic space acting on opioid receptors [Williams, *et al.*, 1999]. The nociceptive response of *Tac1*^{-/-} mice is somehow hampered and could explain the lower EM-2 concentration found in the spinal cords.

Following nociceptive stimuli, SP is released from central terminal fibers into intersynaptic space and activates the NK1 receptor located at the postsynaptic membrane. SP induced Ca²⁺ mobilization is highly correlated with NK1 receptor activation, induction and internalization in the dorsal horn [Sahbaie *et al.*, 2012]. The Ca²⁺ influx and NK1 internalization induces an increase of the expression of δ and μ -opioid receptors but not κ -opioid receptor [Aimone and Yaksh 1989, Yaksh 1988]. The activation of δ and μ -opioid receptors mediate analgesic effects. It has been demonstrated that EM-2 has an affinity and selectivity for μ -opioid receptors [Zadina *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2015]. Therefore, the significant decrease of EM-2 concentration in the spinal cord of *Tac1*^{-/-} mice may have an impact on the endogenous pain-relieving mechanisms.

Also, protachykinin precursors of SP and δ -opioid receptors are co-localized in the LCDV and trafficking of δ -opioid receptors depends mainly on its interaction with SP domain of the protachykinin precursor [Guan *et al.*, 2005]. The direct interaction between protachykinins and δ -opioid receptors is responsible for sorting δ -opioid receptors into LCDV, inducing stimulus

surface insertion of δ -opioid receptors [Ueda *et al.*, 1995; Zachariou and Goldstein, 1996]. However, SP is not considered to be a ligand for δ -opioid receptors, which is activated by endogenous opioid peptides such as Leu-Enk and Met-Enk. As previously established, Leu-Enk is principally localized in the spinal cord and Met-Enk in the brain [Anupama *et al.*, 2009]. Proenkephalin encode both Leu-Enk and Met-Enk but prodynorphin, the precursor of Dyn A, has two copies of Leu-Enk encoded in its primary sequence. Moreover, the N-terminal sequence of Dyn A encodes specifically Leu-Enk. Proteolytic processing of prodynorphin and Dyn A can lead to the formation of Leu-Enk contributing to the observed endogenous levels. Proprotein convertase 1/3 and 2 can cleave Dyn A to form Dyn A₁₋₇ and basic amino acid residues can be removed by the action of carboxypeptidase E (CPE) to form Leu-Enk [Hook *et al.*, 2008]. As shown in Figure 4, the concentration of Dyn A is severely reduced in *Tac1*^{-/-} mouse spinal cords. This result may explain the reason we observed a decrease concentration of Leu-Enk and not for Met-Enk. The interaction of EM-2 with μ -opioid receptors located on the interneurons in the dorsal horn play a central role in the release of Dyn A [Iadarola *et al.*, 1988, Dubner and Ruda 1992, Bian *et al.*, 1999, Malan *et al.*, 2000, Bao *et al.*, 2003; Bali *et al.* 2014; Wu *et al.*, 2015]. The combined interaction of EM-2 with μ opioid receptors and Dyn A with κ -opioid receptors inhibits the release of SP, therefore contributing to alleviate pain [Li *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2000, Sanderson *et al.*, 2004; Zadina *et al.*, 1997; Przewlocka *et al.*, 1999]. Morphine is a μ -opioid receptor agonist and it has been recently demonstrated that tolerance to morphine is not observed in *Tac1*^{-/-} mice [Guan *et al.*, 2005]. Tolerance and addiction are intimately related to μ -opioid receptors expression in the brain and spinal cord [Contet *et al.*, 2004] and these results suggest impaired μ -opioid receptor activities in *Tac1*^{-/-} mice. Dynorphin A release might be significantly reduced since it is intimately related with the interaction of EM-2 and μ -opioid receptors located on the interneurons.

The *Tac1*^{-/-} mice presented similar pain sensitivity compared with WT mice using mild thermal pain models, supporting the hypothesis that SP may not play an important role in the sensitivity to low and moderate pain. However, our results suggest that the absence of SP appears to have an impact on the endogenous pain-relieving mechanisms. This is important information since impairment of the endogenous opioid system, may have a significant impact on patients suffering of persistent low to moderate pain and on their well-being. The development of NK1 receptor antagonists did not produce clear analgesic effect for a variety of pain states during clinical trials [Hill, 2000]. The intimacy between the tachykinin and opioid systems may explain the lack of clinical efficacy of NK1 receptor antagonists. Additionally, new strategies targeting the processing of protachykinins are being developed [Vivoli *et al.*, 2012; Yongye *et al.*, 2013], but may face similar limitations particularly for chronic treatments.

IV. 6. Conclusion

Tachykinin and opioid neuropeptides play a central role in pain transmission, modulation and inhibition. The treatment of pain is very important in medicine and studies using NK1 receptor antagonists failed to show significant analgesic effects in humans (e.g. post-operative and osteoarthritis pain, diabetic neuropathy and migraine). Thus, recent investigations suggest that both pronociceptive tachykinin system (SP-NK1) and the analgesic opioid system are important for normal pain sensation. The analysis of *Tac1*^{-/-} mouse spinal cords revealed noteworthy decreases of EM-2, Leu-Enk and Dyn A concentrations which strongly suggest a significant impact on the endogenous pain-relieving mechanisms. These observations may have insightful impact on future analgesic drug developments and therapeutic strategies.

IV. 7. Acknowledgments

This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry NSERC Discovery grant No. 386637-2010). Additionally, the analyses were performed

on analytical instruments acquired with a NSERC Research Tools and Instruments grant (F.Beaudry NSERC-RTI grant No. 439748-2013). M. Saidi received a PhD scholarship from *La Mission Universitaire de Tunisie à Montréal*.

IV. 8. References

Aimone L. D. and Yaksh T. L. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from spinal cord in vivo. *Peptides*. 1989; 10: 1127–1131.

Anupama K., Sreemantula S., Shaik R. Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors. *Global Journal of Pharmacology*. 2009; 3(3): 149-153.

Bali A, Randhawa PK, Jaggi AS, Interplay between RAS and opioids: Opening the Pandora of complexities, *Neuropeptides*, 2014;48(4):249-256

Bao L, Jin SX, Zhang C, Wang LH, Xu ZZ, Zhang FX, Wang LC, Ning FS, Cai HJ, Guan JS, Xiao HS, Xu ZQ, He C, Hökfelt T, Zhou Z, Zhang X. Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron*. 2003 ; 37:121–133.

Basbaum AI. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional Anesthesia and Pain. Medicine*. 1999; 24(1): 59-67.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D, Cellular and Molecular Mechanisms of Pain, *Cell*, 2009;139(2):267-284

Baumbauer KM, Young EE, Joynes RL. Pain and learning in a spinal system: contradictory outcomes from common origins. *Brain Research Reviews*. 2009 ; 61:124-143.

Beaudry F, Ferland CE, Vachon P. Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2009 ; 23:940–950

Beaudry F. Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Analytical Biochemistry*. 2010 ; 407:290-292.

Bian, D., Ossipov, M.H., Ibrahim, M., Raffa, R.B., Tallarida, R.J., Malan Jr., T.P., Lai, J., Porreca, F. Loss of antiallodynic and antinociceptive spinal/supraspinal morphine synergy in nerve-injured rats: Restoration by mk-801 or dynorphin antiserum. *Brain Res*. 1999 ; 831 (1-2): 55–63.

Cao YQ; Mantyh PW; Carlson EJ; Gillespie AM; Epstein CJ; Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*. 1998 ; 392:390-394.

Carr, J.A., Lovering, A.T. Mu and delta opioid receptor regulation of pro opiomelanocortin peptide secretion from the rat neurointermediate pituitary in vitro. *Neuropeptides*. 2000 ; 34 (1) :69–75.

Contet, B.L. Kieffer, K. Befort. Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol*. 2004 ; 14 : 1–9

- Dickenson AH. Spinal cord pharmacology of pain. *British Journal of Anaesthesia*. 1995 ; 75:193-200.
- Dubner, R., Ruda, M.A. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci*. 1992; 15 : 96–103.
- Felippotti, T.T., de Freitas, R.L., Coimbra, N.C. Endogenous opioid peptidemediated neurotransmission in central and pericentral nuclei of the inferior colliculus recruits 11-opioid receptor to modulate post-ictal antinociception. *Neuropeptides*. 2012 ; 46 (1) : 39–47.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, Beaudry F. Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides*. 2011 ; 45:423–429
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacological Reviews*. 2007; 59: 88-123.
- Gao Z., Peet NP Recent advances in neurokinin receptor antagonists. *Current Medicinal Chemistry*. 1999 ; 6 (5) : 375–388.
- Greco MA, Fuller PM, Jhou TC, Martin-Schild S, Zadina JE, Hu Z, Shiromani P, Lu J. Opioidergic projections to sleep-active neurons in the ventrolateral preoptic nucleus, *Brain Research*, 2008;1245: 96–107.
- Guan JS, Xu ZZ, Gao H, He SQ, Ma GQ, Sun T, Wang LH, Zhang ZN, Lena I, Kitchen I, Elde R, Zimmer A, He C, Pei G, Bao L, Zhang X. Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell*. 2005 ;122: 619-631.
- Hill, R. NK1 (substance P) receptor antagonists—why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol. Sci*. 2000 ; 21: 244–246.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*. 2000; 98(3):585-598.
- Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J, Hwang SR. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008; 48:393-423.
- Iadarola, M.J., Brady, L.S., Draisci, G., Dubner, R. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain*. 1988 ; 35 : 313– 326.
- Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nature Medicine*. 2010;16(11):1258-1266

- Lecci A, Giuliani S, Tramontana M, Carini F, Maggi CA. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides*. 2000; 34(5):303-313.
- Levine JD, Fields HL, Basbaum AI. Peptides and the primary afferent nociceptor. *The Journal of Neuroscience*. 1993; 13(6):2273-2286.
- Li JL, Ding YQ, Li YQ, Li JS, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain Res*. 1998; 794(2): 347–352
- Machelska, H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides*. 2007 ; 41 (6) : 355–363.
- Malan, T.P., Ossipov, M.H., Gardell, L.R., Ibrahim, M., Bian, D., Lai Porreca, J.F. Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain*. 2000 ; 86 : 185–194.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol*. 1999; 405(4): 450–471
- Mika, J., Obara, I., Przewlocka, B. The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: implications of neuro-glial interaction. *Neuropeptides*. 2011 ; 45 (4) : 247–261.
- Moreira TH, Cruz JS, Weinreich D. Angiotensin II increases excitability and inhibits a transient potassium current in vagal primary sensory neurons. *Neuropeptides*. 2009; 43(3):193-199.
- Pailleux F and Beaudry F. Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012; 26(8):881-891.
- Pailleux F, Vachon P, Lemoine J, Beaudry F. Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides*. 2013; 47(4):261-271.
- Pierce TL and Wessendorf MW. Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *J Chem Neuroanat* 2000; 18:181–207.
- Przewlocka B, Mika J, Labuz D, Toth G, Przewlocki R. Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*. 1999; 367:189–196.
- Roepstorff P and Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*. 1984; 11(11):601.
- Sahbaie P, Shi X, Li X, Liang D, Guo TZ, Qiao Y, Yeomans DC, Kingery WS, David Clark J. Preprotachykinin-A gene disruption attenuates nociceptive sensitivity after opioid

administration and incision by peripheral and spinal mechanisms in mice. *Journal of Pain*. 2012;13(10):997-1007.

Sanderson N.K, Skinner K, Julius D, Basbaum AI. Co-localization of endomorphin-2 and substance P in primary afferent nociceptors and effects of injury: a light and electron microscopic study in the rat. *Eur J Neurosci*. 2004; 19(7): 1789–1799.

Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2009;194: 451-491.

Sluka, K.A., Milton, M.A., Willis, W.D., Westlund, K.N. Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 1997 ; 120 (7) :1263–1273.

Stanojevic, S., Vujic, V., Mitic, K., Kustrimovic, N., Kovacevic-Jovanovic, V., Miletic, T., Dimitrijevic, M. Methionine-enkephalin modulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) release by rat peritoneal macrophages involves different types of opioid receptors. *Neuropeptides*. 2008 ; 42 (2) : 147–158.

Teodoro FC1, Tronco Júnior MF, Zampronio AR, Martini AC, Rae GA, Chichorro JG. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. *Neuropeptides*, 2013; 47(3):199-206

Ueda H, Miyamae T, Hayashi C, Watanabe S, Fukushima N, Sasaki Y, Iwamura T, Misu Y. Protein kinase C involvement in homologous desensitization of δ -opioid receptor coupled to Gi1-phospholipase C activation in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci*. 1995 ; 15:7485–7499.

Vivoli M, Caulfield TR, Martínez-Mayorga K, Johnson AT, Jiao GS, Lindberg I. Inhibition of prohormone convertases PC1/3 and PC2 by 2,5-dideoxystreptamine derivatives. *Molecular Pharmacology*. 2012;81(3):440-454.

Wahlert A1, Funkelstein L, Fitzsimmons B, Yaksh T, Hook V. Spinal astrocytes produce and secrete dynorphin neuropeptides. *Neuropeptides*. 2013;47(2):109-115

Wang CL, Ren YK, Xiang Q, Wang Y, Gu N, Lu C, Wang R. Characterization of opioid activities of endomorphin analogs with C-terminal amide to hydrazide conversion. *Neuropeptides*, 2013; 47(5):297-304

Wang D, Li YQ, Li JL, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N. gamma-aminobutyric acid- and glycine-immunoreactive neurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of the rat medullary dorsal horn. *Neurosci Lett*. 2000; 288(3): 187–190.

Williams CA, Wu SY, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ. Release of endomorphin-2 like substances from the rat spinal cord. *Neuroscience Letter*. 1999;273(1):25-28.

Wu XN, Zhang T, Qian NS, Guo XD, Yang HJ, Huang KB, Luo GQ, Xiang W, Deng WT, Dai GH, Peng KR, Pan SY. Antinociceptive effects of endomorphin-2: suppression of substance P release in the inflammatory pain model rat. *Neurochemistry International*, 2015;82:1-9.

Yakovleva T, Bazov I, Cebers G, Marinova Z, Hara Y, Ahmed A, Vlaskovska M, Johansson B, Hochgeschwender U, Singh IN, Bruce-Keller AJ, Hurd YL, Kaneko T, Terenius L, Ekström TJ, Hauser KF, Pickel VM, Bakalkin G. Prodynorphin storage and processing in axon terminals and dendrites. *FASEB J.* 2006; 20 (12): 2124–2126

Yaksh T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res.* 1988; 458: 319–324.

Yongye AB, Vivoli M, Lindberg I, Appel JR, Houghten RA, Martinez-Mayorga K. Identification of a small molecule that selectively inhibits mouse PC2 over mouse PC1/3: a computational and experimental study. *PLoS One.* 2013;8(2):e56957

Yu XH, Zhang ET, Craig R, Shigemoto R, Ribeiro-da-Silva A. NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *The Journal of Neuroscience.* 1999; 19(9):3545-3555.

Zachariou V and Goldstein BD. Dynorphin-(1–8) inhibits the release of substance P-like immunoreactivity in the spinal cord of rats following a noxious mechanical stimulus. *European Journal of Pharmacology.* 1997; 323:159-165.

Zachariou V and Goldstein BD. Kappa-opioid receptor modulation of the release of substance P in the dorsal horn. *Brain Res.* 1996 ; 706 :80-88.

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J. and Kastin, A.J. A potent and selective endogenous agonist for the m-opiate receptor. *Nature.*1997; 368: 499-502.

Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, König M, Palkovits M, Mezey E. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 ; 95(5):2630–2635

IV. 8. Table legends

Table 1. Summary of peptide quantification parameters used for HPLC-MS/MS analysis and post processing MRM

Peptides	Sequences	Precursor ions	Product ions	Collision energy (%)
EM-2	YPPF-NH ₂	572.2 (z = 1)	408.3 (b ₃) 392.2 (z ₃)	30
(d ₅)EM-2	YPPF(d ₅)-NH ₂	577.3 (z = 1)	408.3 (b ₃) 397.2 (z ₃)	30
Leu-Enk	YGGFL	556.2 (z = 1)	425.2 (b ₄) 397.3 (a ₄)	30
(d ₅)Leu-Enk	YGGF(d ₅)L	561.3 (z = 1)	430.2 (b ₄) 402.2 (a ₄)	30
Met-Enk	YGGFM	574.2 (z = 1)	425.2 (b ₄) 397.3 (a ₄)	30
(d ₅)Met-Enk	YGGF(d ₅)M	579.3 (z = 1)	430.2 (b ₄) 402.2 (a ₄)	30
Dyn A	YGGFLRRIRPKLKWDNQ	716.4 (z = 3)	944.3 (b ₁₅ ²⁺) 629.8 (b ₁₅ ³⁺)	30
(d ₅)Dyn A	YGGF(d ₅) LRRIRPKLKWDNQ	718.1 (z = 3)	946.6 (b ₁₅ ²⁺) 631.4 (b ₁₅ ³⁺)	30
SP	RPKPQQFFGLM-NH ₂	674.4 (z = 2)	600.4 (b ₁₀ ²⁺) 254.0 (b ₂)	30
(d ₅)SP	RPKPQQFFG(d ₂)L(d ₃) M- NH ₂	677.0 (z = 2)	602.9 (b ₁₀ ²⁺) 254.0 (b ₂)	30
CGRP	SCNTATCVTH RLAGLLSRSG GVVKDNFVPT NVGSEAF- NH ₂	952.0 (z = 4)	1214.4 (b ₃₆ ³⁺) 962.6 (b ₂₈ ³⁺)	30

IV. 9. Figures

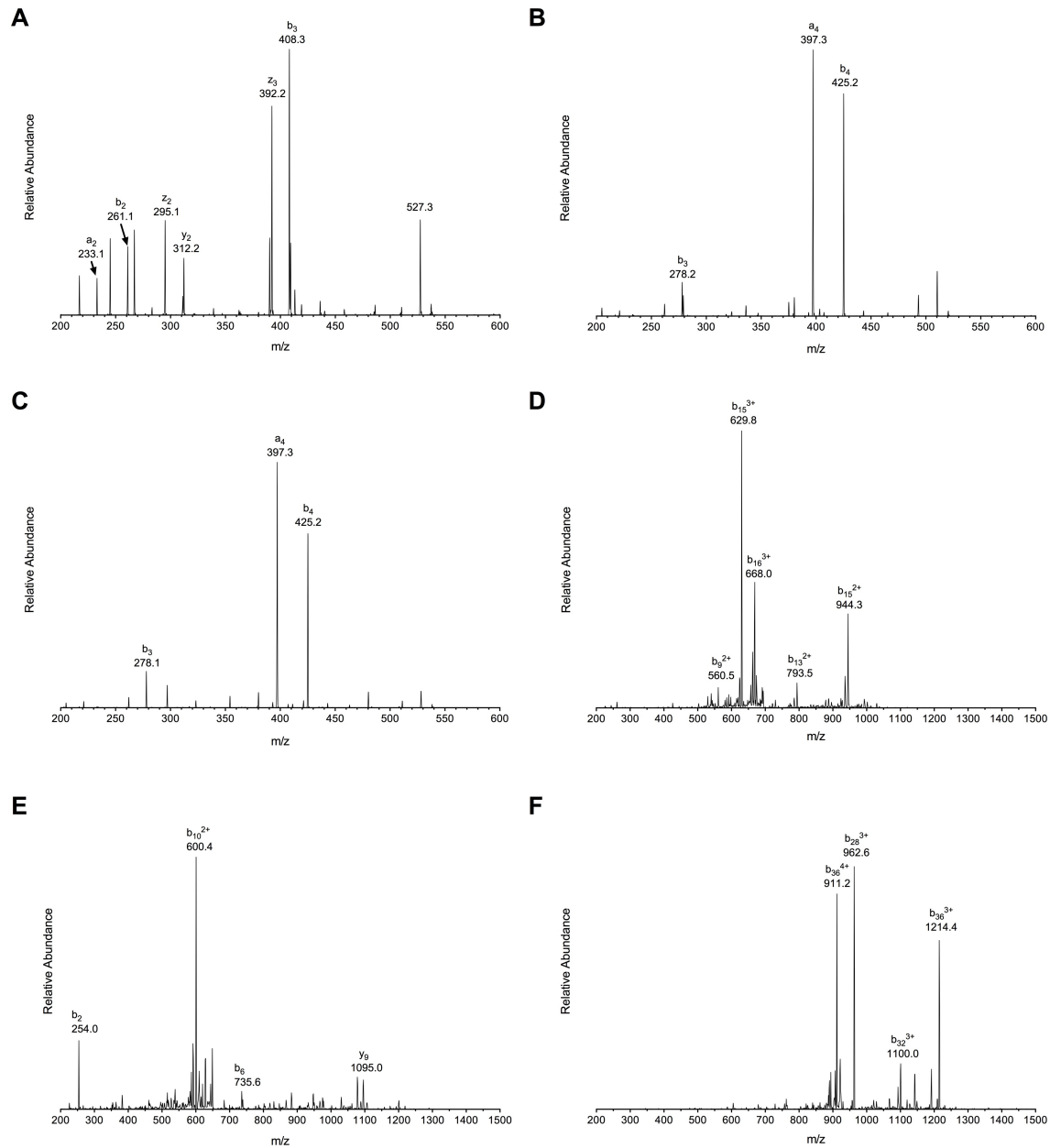


Figure 1. Product ion spectra (MS²) of EM-2 (A), Leu-Enk (B), Met-Enk (C), Dyn A (D), SP (E) and CGRP (F).

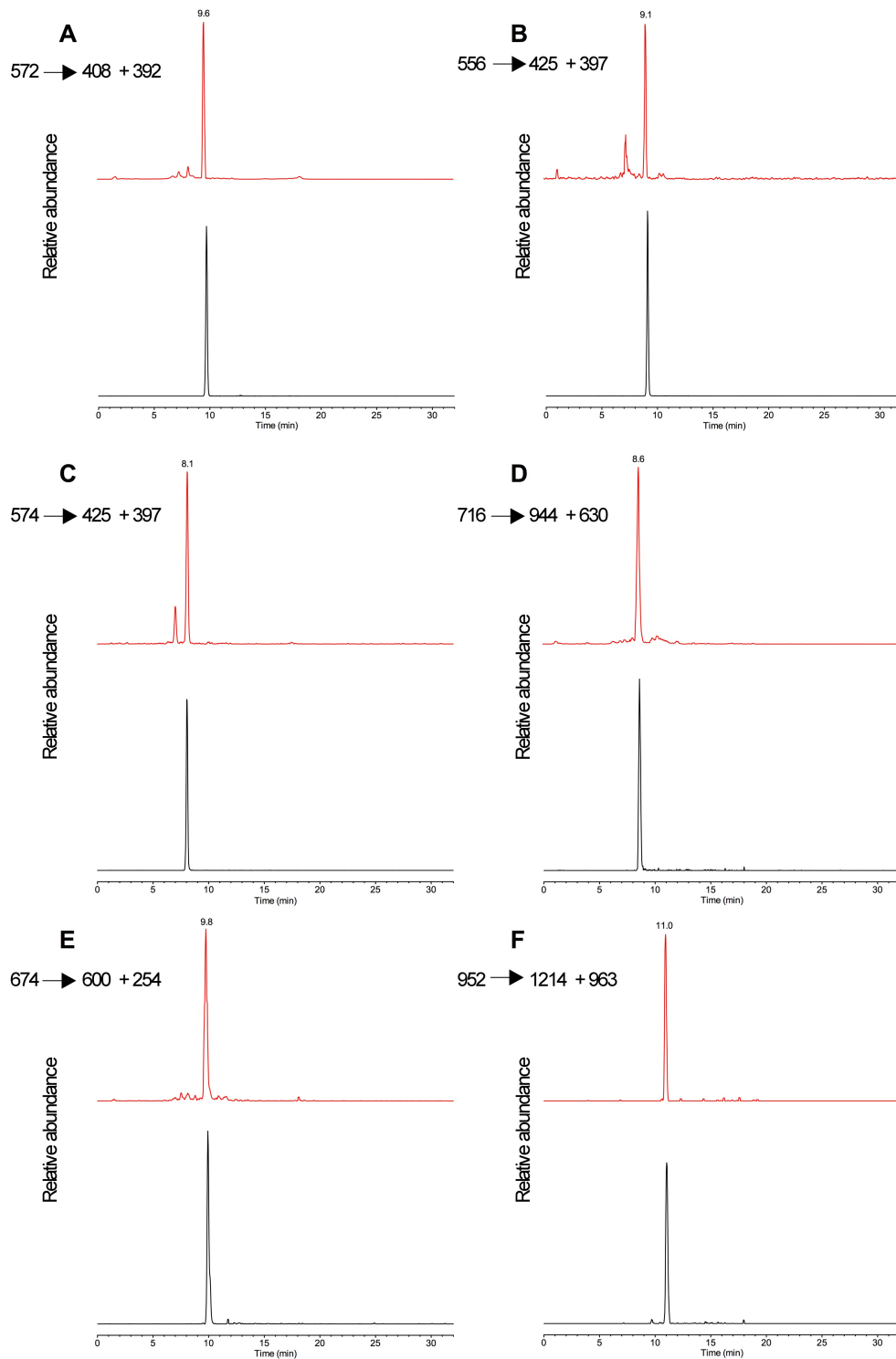


Figure 2. Analysis of targeted peptides in mouse spinal cord tissues. EM-2 overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (black) and a spinal cord tissue (red) (A). Leu-Enk overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (black) and a spinal cord tissue (red) (B). Met-Enk overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (black) and a spinal cord tissue (red) (C). Dyn A overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (black) and a spinal cord tissue (red) (D). SP overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (black) and a spinal cord tissue (red) (E). CGRP overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (black) and a spinal cord tissue (red).

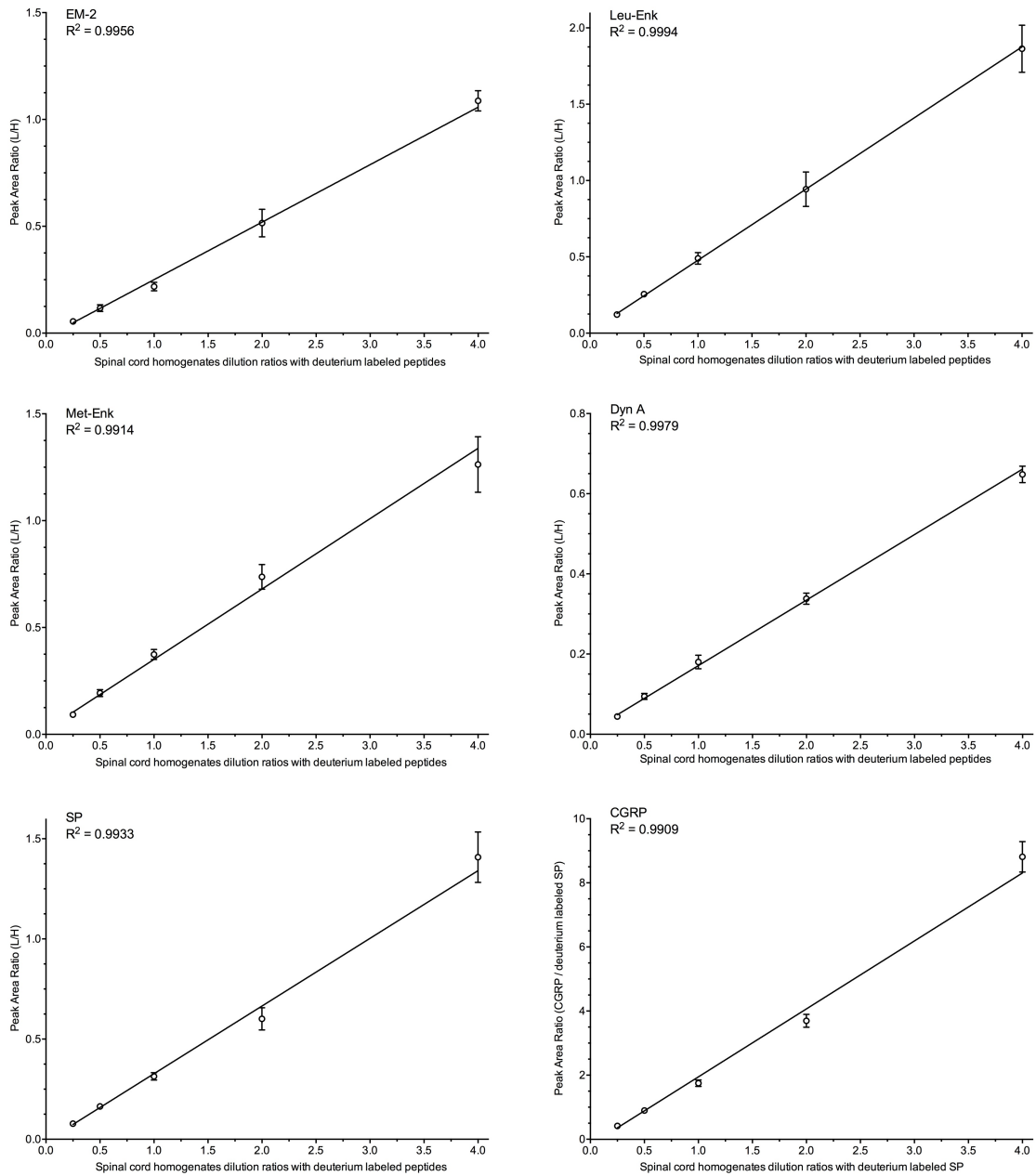


Figure 3. Calibration curve for targeted peptides. The peak area ratio between endogenous peptides and deuterium labeled peptides are display against five specific dilution ratios (e.g. 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 and 4:1). Deuterium labeled peptides were used at a constant concentration of 50 pmol/mL.

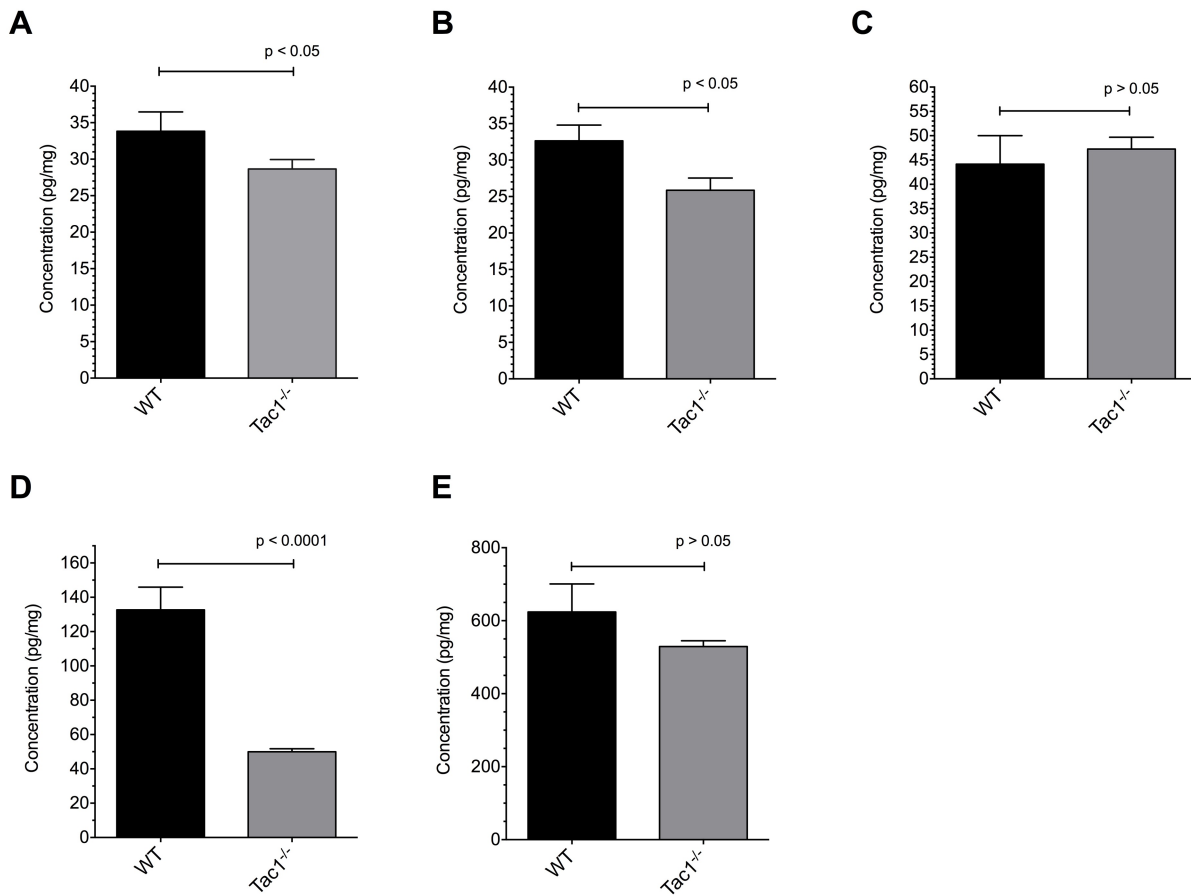


Figure 4. Histograms of neuropeptide concentrations observed in WT (n = 6) and *Tac1*^{-/-} (n = 6) mouse spinal cords (Mean ± SE). Peptide concentrations were determined using an isotope ratio mass spectrometry method. Concentrations observed in WT and *Tac1*^{-/-} mouse spinal cords for EM-2 (A), Leu-Enk (B), Met-Enk (C), Dyn A (D) and CGRP (E) respectively.

SECTION 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Les peptides appartenant à la famille des tachykinines sont largement exprimés au niveau du SNC et périphérique où ils contribuent d'une manière significative à l'hyperalgésie primaire et secondaire (Schröder et al., 2014). Particulièrement, la compréhension des mécanismes de la maturation enzymatique des précurseurs des tachykinines, ainsi que l'étude de la stabilité métabolique de la SP; permettrait certainement d'étayer des stratégies de traitement innovateur en inhibant la formation des neuropeptides pro-nociceptifs ou en favorisant la production de fragments peptidiques inactifs. Cependant, il est important de comprendre, l'interdépendance entre le système pro-nociceptif et le système opioïde endogène. La réduction significative des concentrations de peptides pro-nociceptifs pouvant altérer la réponse endogène du système opioïde.

I. Implication des PCs dans le métabolisme des tachykinines

Cette étude a supposé que PC1 et PC2 peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme des tachykinines et dans la production de la SP. Afin de confirmer cette première hypothèse, des fractions S9 de la moelle épinière des souris WT, PC1 et PC2 knockdown ont été isolées. En effet, les fractions tissulaires S9 sont couramment utilisées pour étudier le métabolisme puisque ces fractions contiennent le cytosol et les microsomes (Gao et al., 2005; Zhanga et al., 2012). En premier lieu, une analyse quantitative de PC1 et de PC2 dans les fractions S9 de la moelle épinière des souris WT, PC1^{-/+} et PC2^{-/+} était nécessaire. Deux peptides tryptiques spécifiques pour PC1 et PC2 ont été ciblés pour effectuer une quantification relative sur la base de l'abondance d'ions observée. Les résultats attendus liés à cette première partie de travail suggèrent que l'expression d'un seul allèle du gène *PCSK1* et *PCSK2* chez les souris PC1 et PC2

Knockdown provoquera une diminution d'expression de PC1 et de PC2. Comme attendu, les résultats obtenus étaient cohérents avec le génotype et les concentrations mesurées montrent une diminution significative de l'expression de PC1 et de PC2 dans les fractions S9 de la moelle épinière des souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+} comparativement à celle du WT.

En second lieu et afin de valider la présence d'une activité enzymatique dans la fraction S9 de la moelle épinière des souris, la Tach₂₀₋₆₈ et la Tach₅₈₋₇₈ ont été incubées pendant 30 min avec ou sans (contrôle négatif) les fractions S9 de la moelle épinière puis elles sont analysées par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont montré qu'en présence des fractions S9 de la moelle épinière, plus que 87% des peptides précurseurs se dégradent en 30 min. Cependant, le contrôle négatif ne présente aucune dégradation après une période d'incubation de 30 min pour les deux peptides complets. Ainsi, les résultats obtenus ont révélé une activité enzymatique dans les fractions S9 de la moelle épinière des souris PC1, PC2 Knockdown et WT.

Suite à la validation de l'activité de la fraction S9, le suivi de la cinétique de dégradation des pro-tachykinines a été réalisé. La Tach₂₀₋₆₈ et la Tach₅₈₋₇₈ ont été utilisées comme peptides substitués pour favoriser une meilleure compréhension de la dégradation de la protachykinine-1 contenant la séquence de quatre peptides de tachykinine, y compris la SP. La Tach₂₀₋₆₈ et la Tach₅₈₋₇₈ ont été incubées pendant 30 min avec les fractions S9 des moelles épinières. Ensuite, les réactions ont été analysées en utilisant la spectrométrie de masse. Les résultats attendus au niveau de cette partie de travail supposent que PC1 et/ou PC2 clivent la séquence de la Tach₂₀₋₆₈ du côté C-terminal au niveau du couple d'acide aminée basique ⁵⁷R⁵⁸R⁵⁹P pour produire la SP et le

clivage se réalisera entre la paire d'acide aminé basique ($^{57}\text{R}^{58}\text{R}$) vu qu'elle est suivie d'une proline ^{59}P .

De même, PC1 et/ou PC2 sont supposées cliver la Tach₅₈₋₇₈ du côté C-terminal conduisant ainsi à la formation de la Tach₅₈₋₇₁. Par la suite, les CPE, la peptidylglycine mono-oxygénase (PAM) et la peptidylglycine hydroxylase (PHM) interviennent pour former la SP.

Comme présumé, les résultats des analyses par spectrométrie de masse valident bien notre hypothèse et révèlent que de nombreux fragments peptidiques attendus ont été effectivement observés à partir de la Tach₂₀₋₆₈ avec une bonne précision de masse comprise entre -1,6 et 1,5 ppm pour tous les fragments peptidiques détectés. Les données obtenues démontrent clairement que la SP et ses métabolites sont générés à partir de la séquence de la Tach₂₀₋₆₈. Spécifiquement, la SP, la SP₈₋₁₁ et la SP₁₋₇ étaient les fragments peptidiques les plus abondants. Ainsi, les résultats observés montrent que PC1 et PC2 sont impliquées dans le clivage C-terminal de la Tach₂₀₋₆₈, ce qui suggère une diminution d'expression de la SP et de ses métabolites chez les souris PC1 et PC2 Knockdown. Comme attendu, les résultats démontrent que la vitesse de formation de la SP et de ses métabolites C-terminaux est significativement réduite au niveau des fractions S9 de la moelle épinière des souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}.

Également, la dégradation de la Tach₅₈₋₇₈ dans les fractions S9 montre que de nombreux fragments peptidiques attendus ont été observés, en particulier les fragments C-terminaux notamment la Tach₅₈₋₇₁ et la SP avec une bonne précision de masse comprise entre -1,2 et 2,2 ppm pour tous les fragments peptidiques détectés. Ainsi, les résultats obtenus montrent que PC1 et PC2 sont impliquées dans le clivage C-terminal de la Tach₅₈₋₇₈, et dans la formation de Tach₅₈₋₇₁, le précurseur de la SP. Également, la

vitesse de formation (v_i) de la Tach₅₈₋₇₁, de la Tach₅₈₋₇₀ et de la SP a été significativement réduit dans les fractions S9 de la moelle épinière des souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}.

L'ensemble des résultats démontre que PC1 et PC2 s'avèrent d'une importance majeure dans le traitement C-terminal de la protachykinine-1 et dans la régulation des concentrations de la SP. Une diminution significative de la vitesse de formation peut indiquer une réduction de la concentration de la tach₅₈₋₇₁ et de la SP dans les moelles épinières des souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. Ceci peut être associé au fait que PC1 et PC2 sont impliquées dans le clivage enzymatique de la plupart des neuropeptides nociceptifs, telle que la SP comme démontrée et des peptides opioïdes comme les enképhalines, les nociceptines et les dynorphines (Podvin, 2016).

Il est important de rappeler que PC1 et PC2 peuvent être manipulées de manière pharmacologique (Day et al., 1992; Lutfy et al., 2016) avec éventualité d'inhibition partielle afin de réduire la libération de peptides tachykinines qui jouent un rôle critique dans la transmission nociceptive (Quartara and Maggi, 1998). Cependant, l'inhibition partielle de PC1 ou PC2 peut également avoir un impact sur les systèmes opioïdes et probablement entraver les systèmes endogènes de modulation de douleur (Sekizawa et al., 1992; Cesselin, 1995).

II. Mécanisme de régulation de la SP

Plusieurs mécanismes régulent les niveaux de la SP, y compris l'expression différentielle de l'ARN_m de la pro-tachykinine et la sécrétion contrôlée des tachykinines à partir des neurones. La protéolyse est soupçonnée de réguler les concentrations de la SP extracellulaire (Mitchell et al., 2013). En effet, la stabilité métabolique de la Tach₅₈₋₇₁

et de la SP ainsi que de ses métabolites C-terminaux s'avère d'une importance majeure au niveau du développement de l'hyperalgésie secondaire et de l'activation des mécanismes endogènes anti-nociceptifs. Afin de déterminer la stabilité métabolique de la Tach₅₈₋₇₁ et de la SP ainsi que de ses métabolites C-terminaux, en premier lieu la Tach₅₈₋₇₁, la SP, et les fragments de la SP ont été incubés avec les fractions S9 de la moelle épinière des souris pendant 10 min, puis analysées par HPLC-MS. Les résultats obtenus indiquent que les concentrations en tachykinine dans la moelle épinière des souris PC1^{-/+}, PC2^{-/+} et WT sont régulées par la protéolyse avec génération d'une série de métabolites de peptides. De nombreux fragments peptidiques attendus ont été observés avec une précision de masse comprise entre -1,4 et 0,6 ppm pour tous les fragments peptidiques détectés. Plus précisément, la SP, la SP₃₋₁₁, la SP₅₋₁₁, la SP₈₋₁₁, la SP₁₋₉ et la SP₁₋₇ étaient les fragments peptidiques les plus abondants. Cependant, la présente étude a détecté uniquement la SP non amidée ceci est probablement dû au fait que l'amidation peptidique est catalysée par la PAM ou la PHM, nécessitant du cuivre et de l'ascorbate absent dans les milieux réactionnels. Tout de même, les résultats obtenus ont confirmés clairement que la Tach₅₈₋₇₁ est un précurseur de la SP.

Par la suite, d'autres expériences consacrées à l'étude de la cinétique de dégradation de la Tach₅₈₋₇₁, des fragments C- et N- terminaux et de la SP ont été effectuées pendant des temps distincts. Les profils de dégradation ont montré que la Tach₅₈₋₇₁ et la SP se dégradent rapidement lorsqu'ils sont exposés à la fraction S9 de la moelle épinière des souris, avec un temps de demi-vie relativement court (Tach₅₈₋₇₁ T_{1/2} = 5,7 ± 0,2 min, SP T_{1/2} = 3,5 ± 0,3) par rapport aux fragments C- et N- terminaux de la SP (T_{1/2} valeurs de 20,2 ± 3,9 min, 10,9 ± 1,1 min, 19,9 ± 4,5 min, 20,1 ± 1,8 min et 29,5 ± 0,5 min 1 pour SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₈₋₁₁, SP₁₋₉ et SP₁₋₇, respectivement). La vitesse de

formation de la SP₁₋₇ et de la SP₈₋₁₁ a été nettement plus élevée par rapport à celles des autres fragments abondants, ce qui suggère que la SP₁₋₇ et la SP₈₋₁₁ sont les produits métaboliques primaires. Ces résultats sont cohérents avec une étude récente qui se concentre sur le traitement C-terminal de la SP produisant spécifiquement les fragments SP₁₋₇ et SP₁₋₉ (Mitchell et al., 2013), tandis que l'activité biologique des fragments C-terminaux s'avèrent d'une importance capitale dans les mécanismes pro-nociceptifs (Jonsson, 2015). Ce présent travail a démontré nettement que les fragments C-terminaux sont plus stables métaboliquement que la SP. La formation des métabolites SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ et SP₈₋₁₁ semble être d'une importance majeure vu qu'ils interagissent spécifiquement avec les récepteurs NKR (Geraghty and Burcher, 1993; Michael-Titus et al., 1999; Hallberg and Nyberg, 2003; Datar et al., 2004; Howard et al, 2006; Valentin-Hansen et al, 2014). En effet, des études antérieures ont également démontré que la SP et ses métabolites C-terminaux détiennent des affinités de liaisons distinctes avec les récepteurs NKR (Michael-Titus et al., 1999; Vasiliou et al., 2007; Valentin-Hansen et al., 2014; Mistrova et al., 2016) et l'effet résultant dépendra fortement de l'abondance relative des métabolites. La stabilité métabolique des fragments C-terminaux, permet à ces métabolites d'avoir plus d'accès aux récepteurs NKR et d'avoir moins d'encombrement stérique ce qui facilite l'interaction substrat-récepteur donc de jouer un rôle fondamental dans la nociception. D'ailleurs, cette interaction induit la libération de l'inositol triphosphate (IP₃) (Maggi, 1995; Myöhänen et al, 2008). L'IP₃ affecte spécifiquement la concentration intracellulaire du Ca²⁺ dans le SNC (Ferris and Snyder, 1992; Berridge, 1993; Hokin and Dixon, 1993). En conséquence, la mobilisation du Ca²⁺ favorise l'activation, l'induction et l'internalisation du récepteur NK1 dans la corne dorsale (Quartara and Maggi, 1997; Sahbaie et al., 2012). L'influx du Ca²⁺ et l'internalisation du récepteur NK1 induisent une augmentation de l'expression des

récepteurs opioïdes δ et μ et leur activation par les opioïdes endogènes sert d'intermédiaire aux effets analgésiques (Yaksh, 1988; Aimone and Yaksh, 1989). Ainsi, l'expression relative de la SP₃₋₁₁ et de la SP₅₋₁₁ est un facteur important dans le développement de l'hyperalgésie secondaire et affecte de façon significative les mécanismes de transmission de la douleur, y compris les actions pro-nociceptives et même les actions anti-nociceptives (Yaksh, 1988; Aimone and Yaksh, 1989). Par conséquent, non seulement la SP doit être considérée, mais aussi la Tach₅₈₋₇₁ précurseur de la SP et les métabolites C-terminaux de la SP qui peuvent avoir des fonctions importantes lors du développement de l'hyperalgésie secondaire. Ainsi, les fragments SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ pourraient être des bio-marqueurs importants de la douleur (Pailleux et al., 2013).

Le prolyl-endopeptidase (PREP) peut être une enzyme importante dans le traitement endo-proteolytique de la Tach₅₈₋₇₁ et de la SP conduisant à la formation de la SP₃₋₁₁ et de la SP₅₋₁₁. En effet, il a été déterminé que le PREP catalyse l'hydrolyse de la liaison Pro-X de peptides avec une séquence primaire inférieure à 30 acides aminés (Polgár, 2002; Nolte et al., 2009). De même, l'expression de l'ARN_m du PREP dans la moelle épinière a été décrite et il a été suggéré que les peptides des tachykinines peuvent être hydrolysés par le PREP (Nolte et al., 2009). Pour valider cette hypothèse, des fractions S9 ont été incubées avec la Tach₅₈₋₇₁ ou la SP à 37 °C pendant 10 minutes avec deux inhibiteurs spécifiques aux PREP (Z-Pro-prolinal et S-17902). Les résultats attendus suggèrent que l'inhibition du PREP aurait un impact significatif sur la formation des fragments SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁. Comme attendu, les résultats ont montré que la Tach₅₈₋₇₁ et la SP se dégradent rapidement en 10 min et qu'aucune différence significative n'a été observée avec ou sans la présence d'inhibiteurs de PREP car les métabolites les plus abondants sont SP₁₋₇ et

SP₈₋₁₁. Cependant, les inhibiteurs de PREP ont considérablement réduit le taux de formation de la SP₃₋₁₁ et de la SP₅₋₁₁. Ces résultats confirment l'implication du PREP dans le traitement N-terminal de la Tach₅₈₋₇₁ et de la SP pour générer des fragments de peptides bioactifs SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁.

Ces résultats pourraient suggérer que l'inhibition de PREP pourrait favoriser la biosynthèse de fragments inactifs ou significativement moins actifs comparé à SP, SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁. Cependant, il est important de comprendre, l'interdépendance entre le système pro-nociceptif et le système opioïde endogène. La réduction significative des concentrations de peptides pro-nociceptifs peut altérer la réponse du système opioïde endogène.

III. Détermination des concentrations en peptides endogènes chez les souris PC1^{+/-} et PC2^{+/-}

Étant donné que la régulation des niveaux endogènes de peptides opioïdes (DynA, Leu-Enk, Met-Enk) et des tachykinines (Tach₅₈₋₇₁, SP) dépend fondamentalement de l'activité de PC1 et de celle de PC2. Cette étude suppose que les moelles épinières de souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+} auront un déficit significatif en tachykinines et en peptides opioïdes ce qui peut affecter de manière significative les voies de modulation de la douleur. Les résultats obtenus révèlent une diminution significative non seulement des neuropeptides pro-nociceptifs (tels que la Tach₅₈₋₇₁ (p <0,05), la SP (p <0,01) et le NKA (P <0,001)), mais également des neuropeptides opioïdes endogènes telles que (la Dyn A (p <0,01), la Leu-Enk (p <0,001) et la Met-Enk (p <0,001)) dans la moelle épinière des souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. De plus, les résultats ne suggèrent pas de compensation due à la redondance dans la fonction de PC1 et de PC2, et aux fonctions de la cathepsine L

comme présenté au niveau de la Figure 14. Par conséquent, la modulation de l'activité des PCs a un impact important aussi bien sur les peptides pro-nociceptifs (SP et NKA), que sur le système opioïde endogène, ce qui peut affecter significativement les voies modulatrices de la douleur.

La diminution des concentrations de la SP et du NKA est cohérente avec les résultats de la première hypothèse de ce présent travail. De même, la diminution des concentrations de la DynA et de la Leu-Enk est en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par Orduna Ruiz et Beaudry (2016) qui ont démontré que le traitement protéolytique de la Pdyn et de la Dyn A conduit à la formation de la Leu-Enk sous l'effet protéolytique de PC1 et de PC2. Tout de même, les résultats obtenus montrent qu'il existe une différence entre les niveaux de la DynA, Leu-Enk et Met-Enk dans la moelle épinière des souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. Même si elle n'est pas statistiquement significative, cette différence peut suggérer un rôle plus important de PC1 que celui de PC2.

Mis à part l'effet de PC1 et de PC2 dans le métabolisme des tachykinines et des peptides opioïdes, il est intéressant de noter que suite à une stimulation nociceptive, la SP et la NKA se libèrent dans l'espace inter-synaptique et activent le récepteur NKR (NK1 et NK2) situé au niveau de la membrane post-synaptique. La mobilisation de Ca²⁺ induit l'activation, l'induction et l'internalisation des récepteurs NKR dans la corne dorsale (Sahbaie et al., 2012). L'influx de Ca²⁺ et l'internalisation des NKR provoquent spécifiquement une augmentation de l'expression des récepteurs opioïdes δ et μ (Yaksh 1988; Aimone and Yaksh, 1989). Donc, l'activation des récepteurs opioïdes δ et μ par leurs ligands endogènes (c'est-à-dire Leu-Enk et Met-Enk) joue le rôle d'analgésique. Par conséquent, une réduction significative des niveaux de la SP et de la NKA dans la

moelle épinière de souris $PC1^{-/+}$ et $PC2^{-/+}$ peut affecter l'expression des récepteurs opioïdes δ et μ et entraver relativement les systèmes opioïdes endogènes.

Les résultats énoncés peuvent avoir un impact sur les stratégies de développement des médicaments analgésiques. Au cours de la dernière décennie, une augmentation significative de l'intérêt pour le ciblage thérapeutique des protéases a été notée. Par exemple, les inhibiteurs des PCs sont depuis longtemps utilisés pour le traitement de plusieurs maladies comme les infections virales, l'arthrose, le cancer et les maladies cardiovasculaires (Konoshita et al., 1994; Bassi et al., 2005 ; Artenstein and Opal 2011; Ramos-Molina et al, 2015; Xu, 2016). Cependant, nombreuses sont les questions concernant l'adéquation de la manipulation pharmacologique des PCs dans un contexte thérapeutique, en particulier concernant les effets secondaires probables du traitement. Ainsi, les résultats obtenus peuvent avoir un impact perspicace sur les futurs développements de médicaments analgésiques et sur les stratégies thérapeutiques ciblant les PCs.

Cette étude peut suggérer que même si la manipulation pharmacologique de PC1 ou de PC2 peut réduire significativement les niveaux de peptides pro-nociceptifs comme la SP et la NKA, elle peut également avoir un impact significatif sur les systèmes opioïdes endogènes, y compris la réduction des concentrations d'enképhalines et de peptides dynorphines, mais aussi sur l'expression des récepteurs δ et μ -opioïdes. En conséquence, le système endogène de modulation de douleur serait entravé et possiblement contre-productif, en particulier pour un traitement chronique. L'utilisation d'un opioïde synthétique et d'un inhibiteur pourrait être une solution à envisager, et peut-être que les doses d'opioïde nécessaire seraient réduites et ainsi cela diminuerait les effets secondaires notables.

Notamment, l'ensemble des résultats obtenus dans ce présent travail n'était pas effectué dans un contexte précis de douleur ou de modélisation de douleur. Probablement, lors d'un état de douleur ou même de stress les concentrations des peptides tachykinines et celles des opioïdes seront réduites d'une façon plus ou moins significative relativement à nos résultats. Il serait pertinent de faire des études plus poussées en particulier refaire les analyses de peptides opioïdes et de tachykinines dans un contexte de douleur chez les souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. Il est fort possible qu'une douleur modifierait la synthèse des peptides endogènes. Il faut noter aussi que l'organisme vivant demeure d'une complexité majeure avec les différents neurotransmetteurs et neuro-modulateurs, les différentes voies de signalisation de remodelage synaptique, l'impact du système nerveux autonome et même avec les conditions environnementales possédant tous un impact direct sur l'état physiologique (Vachon et al., 2013; Tajerian et al., 2013; Bai et al., 2015). En effet, les conditions environnantes, ont un impact significatif sur les concentrations des peptides endogènes. L'article de Croissandeau conclut que les souris PC2 knockout n'ont pas une sensibilité à la douleur différente de celles wild-type. Par contre, les souris PC2 knockout ont montré significativement moins de sensibilité à la douleur suite à une stimulation nociceptive intense suite à un stress (Croissandeau et al., 2006). Croissandeau et al., concluent que la diminution de sensibilité à la douleur était due à l'augmentation de la libération des peptides opioïdes suite à un stress. De même, plusieurs études effectuées sur des animaux ont montré que les mécanismes de régulation de douleur par le stress implique une libération d'opioïdes endogènes (Willer et al., 1981; Akil et al., 1986) qui modulent la réponse nociceptive des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Cependant, à long terme, la réponse au stress peut devenir inadaptée et induire une série de modifications physiopathologiques (McEwen, 1998b). En présence de douleur

neurophatique ou chronique, l'interaction entre le stress et la douleur se traduit par une augmentation de la sensibilité douloureuse contribuant au déclenchement, l'amplification et à la persistance de la douleur chronique (Turk, 2002; Andre et al., 2003; Gatchel et al., 2007; Borsook et al., 2012).

De même, lors d'une étude comportementale ou de modélisation de douleur, la différence génétique des lignées de souris utilisées peut être d'une importance majeure. Le choix du génotype, de la lignée, de l'environnement (l'expérimentateur, la saison, l'humidité, la densité de la cage, le temps de la journée, le sexe et l'ordre des tests au sein de cage) peuvent avoir un impact significatif sur les résultats. Bien que, la génétique a un impact non négligeable (20%), les conditions environnementales s'avèrent d'une importance majeure (40%) étant donnée la complexité du vivant et sa capacité de modulation et d'adaptation (Chesler et al., 2002).

IV. Détermination des concentrations des peptides endogènes chez les souris *Tac1*

KO

Il est important de comprendre l'interdépendance entre le système pro-nociceptif et le système opioïde endogène. Une réduction significative des concentrations des peptides pro-nociceptifs notamment de la SP pourrait altérer la réponse du système opioïde endogène. En effet, il a été confirmé que les souris *Tac1*^{-/-} ont montré une diminution significative des réponses à la douleur suite aux stimuli d'intensités modérés à intenses (Cao et al., 1998). Cependant, les souris *Tac1*^{-/-} présentaient un phénotype de douleur similaire aux souris WT suite à des stimuli d'intensité faible ou non douloureux (Zimmer et al., 1998). Ainsi, cette partie d'étude suppose que les souris *Tac1*^{-/-} peuvent

également présenter un déficit significatif de neuropeptides opioïdes, y compris l'EM2 et la Dyn A, ce qui affectera les voies modulatrices de la douleur.

Confirmant notre hypothèse, les résultats des analyses ont montré une diminution significative de l'EM2, de la Leu-Enk et de la Dyn A dans les tissus de la moelle épinière chez les souris *Tac1*^{-/-} comparées à celles mesurées chez les souris WT. En effet, les concentrations en EM2 étaient 15,3% inférieures ($p < 0,05$), Leu-Enk étaient inférieures de 20,7% ($p < 0,05$) et les concentrations de Dyn A étaient 62,3% inférieures ($p < 0,0001$) chez les souris *Tac1*^{-/-} par rapport à celle WT. Cependant, les concentrations de la Met-Enk et du CGRP ne sont pas statistiquement différentes. En outre, comme prévu, la SP n'a pas été détectée chez les souris *Tac1*^{-/-}.

La diminution des concentrations de l'EM2 au niveau de la moelle épinière des souris *Tac1*^{-/-} pourrait être due au fait que l'expression de l'EM2 est étroitement liée à l'expression des peptides pro-nociceptifs telle que la SP (Martin-Schild et al., 1999; Sanderson et al., 2004; Wang et al., 2015). En effet, il a été démontré que l'EM2 est co-localisée avec la SP dans les vésicules à cœur denses (LCDV) présentes dans les terminaisons afférentes primaires suggérant la libération concomitante de neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs dans l'espace inter-synaptique. Cela peut suggérer que le stimulus nociceptif évoque la libération de l'EM2 (Sanderson et al., 2004). De plus, la perception de la douleur est nécessaire pour déclencher la libération de l'EM2 dans l'espace inter-synaptique agissant sur les récepteurs opioïdes (Williams et al., 1999). La réponse nociceptive des souris *Tac1*^{-/-} est en quelque sorte entravée et pourrait expliquer la diminution des concentrations d'EM2 au niveau de la moelle épinière.

Il est intéressant de rappeler que chez les souris WT, la SP est libérée dans l'espace inter-synaptique à la suite de stimuli nociceptifs et active le récepteur NK1 au niveau post-synaptique. L'interaction de la SP-NK1 est fortement corrélée avec l'activation, l'induction et l'internalisation du récepteur NK1 (Sahbaie et al., 2012) ce qui augmente l'expression des récepteurs opioïdes δ et μ mais pas les récepteurs opioïde κ (Yaksh, 1988 ; Aimone and Yaksh, 1989). L'interaction combinée de l'EM2 avec son récepteur μ et de la Dyn A avec son récepteur κ , inhibe la libération de la SP, contribuant ainsi à une réduction de la douleur (Zadina et al., 1997 ; Li et al., 1998; Wang et al., 2000 ; Sanderson et al., 2004; Wu et al., 2015).

Par conséquent, la diminution significative de la concentration de l'EM2 dans la moelle épinière des souris *Tac1*^{-/-} peut avoir un impact sur les mécanismes endogènes de la douleur. De même, le trafic des récepteurs opioïdes δ dépend principalement de son interaction avec la pro-tachykinine (Guan et al., 2005). L'interaction directe entre les pro-tachykinines et les récepteurs opioïdes δ est responsable du tri de ces récepteurs dans le LCDV, induisant leurs expressions membranaires lors d'un stimuli (Ueda et al., 1995; Zachariou and Goldstein, 1996).

Plusieurs recherches ont confirmé que les concentrations endogènes d'EM2 peuvent affecter directement la libération de la Dyn A. En effet, l'interaction de l'EM2 avec les récepteurs opioïdes μ situés sur les inter-neurones dans la corne dorsale joue un rôle central dans la libération de la Dyn A (Iadarola et al., 1988; Dubner and Ruda, 1992; Bian et al., 1999; Malan et al., 2000; Bao et al., 2003; Bali et al., 2014; Wu et al., 2015). De même, la libération de la Dyn A pourrait être considérablement réduite étant donné son lien intime avec l'EM2 et les récepteurs opioïdes μ situés au niveau des inter-

neurones. Au fait, Guan et al., (2005) ont démontré que la tolérance à la morphine n'est pas observée chez les souris *Tac1^{-/-}*. La morphine est un agoniste des récepteurs opioïdes μ . La tolérance et la dépendance à la morphine sont intimement liées à l'expression du récepteur opioïde μ dans le cerveau et dans la moelle épinière (Contet et al., 2004). Ceci suggère que l'activité des récepteurs μ est altéré chez les souris *Tac1^{-/-}*. Ainsi, l'activité des récepteurs μ et les concentrations endogènes en EM2 sont sous exprimées chez les souris *Tac1^{-/-}* ceci peut affecter directement les concentrations de Dyn A dans l'espace inter-synaptique au niveau de la moelle épinière. Des études récentes ont démontré que le traitement protéolytique de la pro-dynorphine et de la Dyn A conduit à la formation de la Leu-Enk (Orduna and Beaudry; 2016). En conséquence, étant donné que les concentrations de la Dyn A sont fortement réduites, une diminution de la concentration de la Leu-Enk est observée. Par contre, la Leu-Enk est aussi produite suite à la maturation de Penk.

L'interdépendance entre le système pro-nociceptif associé aux tachykinines et le système opioïde peut expliquer l'absence d'efficacité clinique des antagonistes des récepteurs NK1 pour divers états de douleur (Hill, 2000). En outre, de nouvelles stratégies ciblant le traitement des pro-tachykinines sont en cours de développement (Vivoli et al., 2012; Yongye et al., 2013). Ces nouvelles stratégies peuvent faire face à des limitations similaires, en particulier pour les traitements chroniques. L'utilisation d'un opioïde synthétique et d'un inhibiteur pourrait être une solution à envisager, et peut-être que les doses d'opioïde nécessaires seraient réduites et ainsi cela diminuerait les effets secondaires notables.

Perspectives

Des études complémentaires s'avèrent nécessaires afin de mieux cibler les mécanismes centraux et périphériques impliqués dans la douleur. Par exemple, il serait pertinent de refaire les analyses de peptides opioïdes et de tachykinines dans un contexte de douleur chez les souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. Il est fort possible qu'une douleur modifierait la synthèse des peptides endogènes.

De même, des analyses du contenu des synaptosomes chez les souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+} pourraient être intéressantes à envisager. En effet, la modulation de l'activité enzymatique de PC1 et/ou PC2 pourrait jouer un rôle important et central dans le développement de l'allodynie et de l'hyperalgésie. Ainsi, chez les souris PC1 et PC2 knockdown le contenu des synaptosomes et probablement l'expression des récepteurs pré- et post-synaptiques vont être modifiées, ce qui aurait un impact significatif sur les mécanismes de la neurotransmission et de remodelage synaptique et sur la transmission du message nociceptif. Pareillement, il a été démontré que les souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+} et les souris Tac1 KO présentent des aspects phénotypiques semblables suite à un stimulus douloureux vs WT donc il serait pertinent d'étudier la modulation des voies métaboliques chez les souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+} et les souris Tac1 KO.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans ce présent travail ont révélé que PC1 et PC2 sont impliquées dans le traitement C-terminal de la pro-tachykinine-1 et suggèrent un rôle majeur dans sa maturation et dans la biosynthèse de la SP. Ainsi, les PCs pourraient être des cibles pharmacologiques afin d'inhiber partiellement la libération de la SP.

De même, cette étude a démontré que la protéolyse contrôle les niveaux de la SP dans la moelle épinière et que la Tach₅₈₋₇₁ est effectivement le précurseur de la SP. La SP et la Tach₅₈₋₇₁ ont été dégradées rapidement avec des temps de demi-vies relativement courts comparativement aux fragments C-terminaux et N-terminaux de la SP. La stabilité métabolique des fragments C-terminaux permettrait à ces métabolites d'avoir un accès prolongé aux récepteurs NKR et potentiellement jouer un rôle fondamental dans la nociception. Ainsi, les fragments SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ pourraient être des bio-marqueurs importants de douleur. En outre, il a été démontré clairement que le PREP est impliqué dans le traitement N-terminal de la Tach₅₈₋₇₁ et de la SP menant à la formation de la SP₃₋₁₁ et de la SP₅₋₁₁. Le métabolisme de la SP et de ses métabolites C-terminaux est central à la neurochimie de la douleur et la présente étude peut dévoiler des stratégies de traitement innovateur en inhibant la formation des neuropeptides pro-nociceptifs ou en favorisant la production de fragments peptidiques inactifs. Cependant, il est important de comprendre l'interdépendance du système pro-nociceptif et du système opioïde endogène. La réduction significative des concentrations de peptides pro-nociceptifs peut altérer la réponse endogène du système opioïde.

Également, les résultats obtenus montrent une diminution significative des neuropeptides pro-nociceptifs spécifiques (Tach₅₈₋₇₁, SP et NKA), mais aussi des

neuropeptides opioïdes endogènes (Dyn A, Leu-Enk et Met-Enk) dans la moelle épinière des souris PC1^{-/+} et PC2^{-/+}. Ainsi, la réduction de l'activité des PCs possède un impact sur le système pro-nociceptif, mais aussi sur le système opioïde endogène, ce qui affectera significativement les voies modulatrices de la douleur. Au cours de la dernière décennie, il y a eu une augmentation significative de l'intérêt pour le ciblage thérapeutique des protéases, y compris les PCs pour le traitement de plusieurs maladies et les symptômes associés à la douleur. Cependant, il existe de nombreuses questions sans réponse concernant l'adéquation de la manipulation pharmacologique des PCs dans un contexte thérapeutique, en particulier concernant les effets secondaires probables du traitement. Il est également important de rappeler la létalité embryonnaire de certaines souris mutantes PCs.

Le traitement de la douleur est très important en médecine et les études utilisant des antagonistes des récepteurs NK1 n'ont pas montré d'effets analgésiques significatifs chez l'homme (ex., douleur post-opératoire et arthrose, neuropathie diabétique et migraine). Ainsi, des études récentes suggèrent que le système pro-nociceptif de tachykinine (SP-NK1) et le système analgésique opioïde sont importants pour la sensation de douleur.

Au cours du présent travail, l'analyse de la moelle épinière de souris *Tac1*^{-/-} a révélé des diminutions significatives des concentrations EM2, Leu-Enk et Dyn A qui suggèrent fortement un impact significatif sur les mécanismes endogènes de la douleur. Ces observations peuvent avoir un impact significatif sur les futurs développements de médicaments analgésiques et sur les stratégies thérapeutiques.

Liste des références

A

- Abello, N., Barroso, B., Kerstjens, H. A., Postma, D. S., and Bischoff, R. (2010) Chemical labeling and enrichment of nitrotyrosine-containing peptides. *Talanta*, 80 (4), 1503-1512.
- Adams, M.N., Ramachandran, R., Yau, M.K., Suen, J.Y., Fairlie, D.P., Hollenberg, M.D. and Hooper, J.D. (2011) Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacology and therapeutics*, 130 (3), 248-282.
- Adamson, J.T. (2008) Structural characterization of crotein glycosylation utilizing fragmentation from gas phase ion-electron reactions and vibrational excitation. thesis in philosophy (chemistry). University of Michigan. 186p.
- Adler, G, Gattaz WF. (1993) Pain perception threshold in major depression. *Biol Psychiatry*;34:687-9.
- Aebersold, R., Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198-207.
- Aimone, L.D., and Yaksh, T.L. (1989) Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. *Peptides*, 10 (6), 1127–1131.
- Akil, H., Young, E., Walker, J. M., & Watson, S. J. (1986). The Many Possible Roles of Opioids and Related Peptides in Stress - Induced Analgesia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 467(1), 140-153.
- Alayi, T.D. (2013). Un ensemble d'outils protéomiques pour la caractérisation de protéines d'organismes très divers: plantes, champignons et parasites (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., and Roberts, K. (2002) *Molecular Biology of the Cell* 4th Edition: International Student Edition.
- Allegrand, J. (2012) Des génomes aux organismes. (Doctoral dissertation, Université d'Evry Val d'Essonne).
- Allen, R.G., Peng, B., Pellegrino, M.J., Miller, E.D., Grandy, D.K., Lundblad, J.R., Washburn, C.L., Pintar, J.E. (2001) Altered processing of pro-orphanin FQ/nociceptin and pro-opiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2. *J. Neurosci*, 21, 5864-5870.
- Almeida, T.F., Roizenblatt, S., and Tufik, S. (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain research*, 1000(1), 40-56.
- Anderson, E.D., Van Slyke, J.K., Thulin C.D., Jean, F., Thomas G. (1997) Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage *EMBO J.*, 16, 1508–1518.
- Anderson, R.A., Cambray, N., Hartley, P.S., and McNeilly, A.S. (2002) Expression and localization of inhibin alpha, inhibin/activin betaA and betaB and the activin type II and inhibin in beta-glycan receptors in the developing human testis. *Reproduction*, 123, 779–788.
- Andre, J, Becker C, Zeau B, et al. Relations entre pathologies psychiatriques et douleur : une approche chez l'animal ? *Doul Analg* 2003;1:29-36.

- Andriamanana, I. (2009). Analyse métabolomique: mise au point et validation d'une méthode d'analyse du métabolome plasmatique humain par UPLC-LTQ/Orbitrappe (Doctoral dissertation, University Paris-Est Créteil, Créteil, France).
- Ansel, J., Brown, R.J, Payan D.G, Brown, M.A. (1993) Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cell. *J. Immunol*, 150, 4478–4485.
- Arai, H., and Emson, P.C. (1986) Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance PI in rat central nervous system. *Brain Res*, 399240-249.
- Artenstein, A.W., and Opal, S.M. (2011). Proprotein convertases in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 365(26), 2507-2518.
- Arvidsson, U., Riedl, M., Chakrabarti, S., Lee, J. H., Nakano, A. H., Dado, R. J., Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, and Elde, R. (1995). Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *The Journal of neuroscience*, 15(5), 3328-3341.
- Attal, N. (2010). Douleurs neuropathiques. *Neurologie. Com.* 2(8), 202-205. doi:10.1684/nro.2010.0218
- Austin, D.E., Wang, M., Tolley, S.E., Maas, J.D., Hawkins, A.R., Rockwood, A., Dennis Tolley H., Edgar D., Lee E.D. and Lee, M. L. (2007). Halo ion trap mass spectrometer. *Analytical chemistry*, 79(7), 2927-2932.
- Ayoub, D. (2012). Vers une étude approfondie des protéomes: caractérisation des extrémités N-terminales des protéines (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- Azaryan, A.V., Krieger T. J., Hook V. Y. (1995) Purification and characteristics of the candidate prohormone processing proteases PC2 and PC1/3 from bovine adrenal medulla chromaffin granules. *J. Biol. Chem.*, 270, 8201–8208. [PubMed: 7713926].

B

- Babinet, C., and Cohen-Tannoudji, M. (2000) Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris : une révolution dans l'approche génétique de la biologie des mammifères. *médecine/sciences* 2000 ; 16 : 31-42
- Bagheri, H. (2015) L'inhibition de la production d'AMPc est modulée différemment à court et long terme par l'internalisation du récepteur opioïde delta. (Doctoral dissertation, Université de Montréal 172p).
- Baldwin, M.A., and McLafferty, F.W. (1973) Liquid chromatography mass spectrometry interface–I: The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer. *Organic Mass Spectrometry*, 7 (9), 1111-1112.
- Bali, A., Randhawa, P.K., Jaggi, A.S. (2014) Interplay between RAS and opioids: Opening the Pandora of complexities, *Neuropeptides*, 48(4): 249-256.
- Baliki, M.N., Apkarian, A.V. (2015) Nociception, pain, negative moods, and behavior selection. *Neuron*, 87 (3), 474-491.
- Baltatz, M., Hatzitolios, A., Tziomalos, K., Iliadis, F. and Zamboulis, C.H. (2008) Neuropeptide Y and alpha-melanocyte-stimulating hormone: interaction in obesity and possible role in the development of hypertension. *International journal of clinical practice*, 62 (9), 1432-1440.
- Bancila, V. (2004). Contrôle présynaptique de la libération du glutamate par les fibres moussues de l'hippocampe de rat: zinc, canaux K [ATP] et neuroprotection (Doctoral dissertation, University of Geneva).

- Banerjee, S., Mazumdar, S. (2012) Electrospray Ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte *International Journal of Analytical Chemistry*, Article ID 282574, 40 pages.
- Bantscheff, M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389: 1017-1031.
- Bai, G., Ren, K., & Dubner, R. (2015). Epigenetic regulation of persistent pain. *Translational Research*, 165(1), 177-199.
- Bao, B.H., Kang, A., Zhao, Y., Shen, Q., Li, J.S., Di, L.D., Li, J.X. (2017) A selective HPLC–MS/MS method for quantification of SND-117 in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*.
- Bao, L., Jin, S.X., Zhang, C., Wang, L.H., Xu, Z.Z., Zhang, F.X., Wang, L.C., Ning, F.S., Cai, H.J., Guan, J.S., Xiao, H.S., Xu, Z.Q., He, C., Hokfelt, T., Zhou, Z., and Zhang, X. (2003) Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide sécrétion. *Neuron*, 37, 121-133.
- Baron, R. (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective. *Nature clinical practice Neurology*, 2 (2), 95-106.
- Basbaum, A.I. (1999) Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 24(1): 59-67.
- Basbaum, A.I., Fields, H.L. (1978) Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. *Ann. Neurol.*, 4, 451-462.
- Basbaum, A.I., Fields, H.L. (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 7, 309-338.
- Bassi, D.E., Fu, J., de Cicco, R.L., Klein-Szanto, A.J.P. (2005) Proprotein convertases: “master switches” in the regulation of tumorgrowth and progression. *Mol Carcinog*, 44, 151-161.
- Bateson, P. (1991). Assessment of pain in animals. *Animal Behaviour*, 42, 827e839
- Baudin, B. (2015) Spectrométrie de masse et protéomique clinique. In *Annales de Biologie Clinique*, 73(1), 39-48.
- Baumbauer, K.M., Young, E.E., Joynes, R.L. (2009) Pain and learning in a spinal system: contradictory outcomes from common origins. *Brain Research Reviews*, 61, 124-143.
- Beaudry, F., Ferland-Legault, C. and Vachon, P. (2009) Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 23(9), 940-950.
- Beaudry, F., Guénette, S.A., and Vachon, P. (2006) Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography–quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity. *Biomedical Chromatography*, 20(11), 1216-1222.
- Beaudry, F., Proulx, D., and Furtado, M. (2004) Quantitative analysis of bucillamine in blood using high performance liquid chromatography–mass spectrometry technique. *Biomedical Chromatography*, 18(10), 805-812.
- Beaulieu, L.M., Lin, E., Mick, E., Koupenova, M., Weinberg, E.O., Kramer, C.D., Caroline, A.G., Tanriverdi, K., Larson M.G., Benjamin, E.J., Freedman J. E. (2014) Interleukin 1 receptor 1 and interleukin 1beta regulate megakaryocyte maturation, platelet activation, and transcript profile during inflammation in mice and humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 552–564. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302700 PMID: 24458711.

- Beaulieu, P. (2005) Pharmacologie de la douleur. Press Université de Montréal.
- Beaulieu, P. (2013) La douleur: guide pharmacologique et thérapeutique. Quebec Canada Edition Maloine.
- Becker, J. (2013) Étude et développement d'un spectromètre de masse et énergie: modélisation et optimisation de l'optique, réalisation du prototype (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, France).
- Bellamy N (1985) Variance in NSAID studies: contribution of patient variance. Agents Actions Suppl 17:21–28.
- Ben-Tovim DI, Schwartz MS. Hypoalgesia in depressive illness. Br J Psychiatry 1981;138:37-9.
- Benjannet, S., Mamarbachi, M., Hamelin, J., Savaria, D., Munzer, J.S., Chrétien, M., Seidah, N.G. (1998) Residues unique to the prohormone convertase PC2 modulate its autoactivation, binding to 7B2 and enzymatic activity FEBS Lett, 428, 37–42.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chrétien, M., Seidah, N.G. (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelan on corticotropin distinct pairs of basic residues. Proc Natl Acad Sci USA, 88, 3564-8.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, C., Chrétien, M., Seidah, N.G. (1993) Comparative biosynthesis, post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the pro-hormone convertases PC1 and PC2: Glycosylation, sulfation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2 Biochem. J., 294, 735–743.
- Benjannet, S., Savaria, D., Chrétien, M., Seidah, N.G. (1995) 7B2 is a specific intracellular binding protein of the prohormone convertase PC2. J. Neurochem., 64, 2303–2311.
- Berman, Y., Mzhavia, N., Polonskaia, A., Furuta, M., Steiner, D. F., Pintar, J. E., Devi, L. A. (2000) Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2. J. Neurochem. 75,1763-1770
- Bernard, J.F., Villanueva, L. (2009) Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs. Douleur: physiologie, physiopathologie et pharmacologie Rueil-Malmaison, France, Arnette, Wolters Kluwer France.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature, 361, 315–325.
- Bertaccini, D. (2014) Advances in analytical methodologies for the characterization and quantification in proteomic analysis (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- Bertherat, J. (1992) Interactions intrahypothalamiques entre les neurones à somatostatine et à growth hormone-releasing hormone (GHRH) dans le contrôle de l'hormone de croissance (GH) chez le rat (Doctoral dissertation, Paris 11).
- Berthier, A. (2008) Développement d'outils «biocapteurs/modèle cellulaire» pour l'identification de ligands et l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines (Doctoral dissertation, Université de Franche-Comté).
- Besse, D., Lombard, M. C., Zajac, J. M., Roques, B. P., and Besson, J. M. (1990) Pre- and postsynaptic distribution of μ , δ and κ opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. Brain research, 521(1), 15-22.
- Besson, J. M. (1999) The neurobiology of pain. The Lancet, 353(9164), 1610-1615.

- Besson, J.M., Guilbaud, G., Abdelmoumene, M., Chaouch, A. (1982) Physiologie de la nociception. *J.Physiol.*, 78, 7-107.
- Bhalla, U.S., Prahlad, Ram P.T., Iyengar, R. (2002) MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science*, 297, 1018–1023
- Bian, D., Ossipov, M.H., Ibrahim, M., Raffa, R.B., Tallarida, R.J., Malan Jr., T.P., Lai, J., Porreca, F., (1999) Loss of antiallodynic and antinociceptive spinal/supraspinal morphine synergy in nerve-injured rats: restoration by mk-801 or dynorphin antiserum. *Brain Res.* 831 (1-2), 55–63.
- Biemann, K. (1990a). Peptides and proteins. *Methods Enzymol* 193, 351-60.
- Biemann, K. (1990b) Appendix 5. nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods. Enzymol.* 193, 886–887.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Michel, K., and Zimmer, A. (2002) Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the *Tac1* gene. *Journal of Neuroscience*, 22(22), 10046-10052.
- Blesson, S., (2002) Etude bibliographique de l'angiogenèse réactionnelle dysfonctionnements et perspectives thérapeutiques (Doctoral Dissertation, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort 102p).
- Blomhoff, S, Spetalen S, Jacobsen MB, Malt UF. Phobic anxiety changes the function of brain-gut axis in irritable bowel syndrome. *Psychosom Med* 2001;63:959-65.
- Bloom, F.E., Rossier, J., Battenberg, E.L.F., Bayon, A., French, E., Henriksen, S.J., Siggins, G.R., Ling, N., Guillemin R. (1979) beta-endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioral effects. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 18, 89-109.
- Blumberg, S., Teichberg, V., Charli, J., Hersh, L., McKelvy, J. (1980) Cleavage of substance P to an N-terminal tetrapeptide and a C-terminal heptapeptide by a post-proline cleaving enzyme from bovine brain. *Brain research*, 192, 477–486.
- Bodnar, R.J. (2008) Endogenous opiates and behavior. *Peptides*, 29(12), 2292-2375.
- Bodnar, R.J., Kramer, E., Simone, D. A., Kirchgessner, A. L., Scalisi, J. (1983). Dissociation of analgesic and hyperphagic responses following 2-deoxy-D-glucose. *International journal of neuroscience*, 21(3-4), 225-236.
- Bogdanoff, W.A., Morgenstern, D., Bern, M., Ueberheide, B.M., Sanchez-Fauquier, A., and DuBois, R.M. (2016) De novo sequencing and resurrection of a human astrovirus-neutralizing antibody. *ACS infectious diseases*, 2(5), 313-321.
- Bohnenberger, H., Ströbel, P., Mohr, S., Corso, J., Berg, T., Urlaub, H., Lenz C., Serve H., and Oellerich, T. (2015). Spectrométrie de masse quantitative de profilage Protéomes Cancer-cellulaires dérivées de liquide et de tumeurs solides. *Journal of Visualized Experiments.* (96), e52435, DOI: doi:10.3791/52435.
- Bonvini, S.J., Birrell, M.A., Grace, M.S., Maher, S.A., Adcock, J. J., Wortley, M. A., Dubuis E., Ching Y.M., Ford A. P., Shala F., Miralpeix M., Tarrason G, Smith J.A. (2016) Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 and airway sensory afferent activation: Role of adenosine triphosphate. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 138(1), 249-261.
- Borsook D, Becerra L, Carlezon WA, Jr., Shaw M, Renshaw P, Elman I, Levine J. Reward-aversion circuitry in analgesia and pain: implications for psychiatric disorders. *European journal of pain.* 2007;11:7–20
- Botter, R., and Bouchoux, G. (1995) Spectrométrie de masse. *Technique de l'ingénieur P*, 2615, 41.

- Bouchonnet, S., and Libong, D. (2004) Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Actualité chimique*, 7-14.
- Bouhassira, D. (2008) Définition et classification des douleurs neuropathiques. *La Presse Medicale*, 37(2), 311-314.
- Bouhassira, D. (2009) Douleurs : Physiologie, Psychopathologie et pharmacologie. Chapitre I : Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs. Nocicepteurs et fibres afférentes primaires. Editions Arnette. France.
- Burnstock, G. and Sawynok, J. (2010) Adenosine triphosphate and adenosine receptors and pain. *Pharmacology of Pain*. IASP, Seattle, 303-326.
- Brain, S., and Moore, P.K. (2013) Pain and neurogenic inflammation. Springer (Eds.).
- Breibeck, J., Serafin, A., Reichert, A., Maier, S., Küster, B., and Skerra, A. (2014) PAS-cal: a Generic Recombinant Peptide Calibration Standard for Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 25(8), 1489-1497.
- Breslin, M.B., Lindberg, I., Benjannet, S., Mathis, J.P., Lazure, C., Seidah, N.G. (1993) Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 27084-27093.
- Brooks, J., and Tracey, I. (2005) From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *Journal of Anatomy*, 207(1), 19-33.
- Brownstein, M.J. (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5391-5393.
- Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Vandenesch, F., and Garin, J. (2007) Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(12), 2139-2149.
- Bulgari, D., Zhou, C., Hewes, R.S., Deitcher, D.L., and Levitan, E.S. (2014) Vesicle capture, not delivery, scales up neuropeptide storage in neuroendocrine terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3597-3601.
- Burbach, J.P.H., Seidah, N.G., Chrétien, M. (1986) Isolation and primary structure of novel neurointermediate pituitary peptides derived from the C-terminal of the rat vasopressin neurophysin precursor (propressophysin) *Eur. J. Biochem.*, 156, 137-142.
- Buridon, V. (2013) Application de la spectrométrie de masse COINTOF à l'étude de la dissociation de petits agrégats d'eau protonés par collision sur un atome d'argon. Développement d'une cible de nano-gouttes de gaz rare (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- Burrell, B.D. (2017) Comparative Biology of Pain: What Invertebrates Can Tell Us about How Nociception Works? *Journal of Neurophysiology*, jn-00600.
- Butler, R.K., Finn, D.P. (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in neurobiology*, 88(3), 184-202.

C

- Calvino, B. (1998) Substance P et douleur: ne pas céder au réductionnisme pharmacologique. *Médecine/Sciences*, 14 : 805-7.
- Calvino, B. (2006) Les bases neurales de la douleur. *Psychologie and NeuroPsychiatrie du vieillissement*, 4(1), 7-20.
- Calvino, B., Grilo, R.M. (2006) Le contrôle central de la douleur. *Revue du Rhumatisme*, 73(1), 10-18.

- Cameron, A., Apletalina, E.V., and Lindberg, I. (2001) The Enzymology of PCI. Co-and Posttranslational Proteolysis of Proteins, 22, 291.
- Campbell, J.N., and Meyer, R.A. (2006) Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, 52(1), 77-92.
- Cao, Y.Q., Mantyh, P.W., Carlson, E.J., Gillespie, A.M., Epstein, C.J., and Basbaum, A.I. (1998) Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, 392, 390-394.
- Carapito, C. (2006) Vers une meilleure utilisation des données de spectrométrie de masse en analyse protéomique (Doctoral dissertation, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien).
- Carniglia, L., Ramírez, D., Durand, D., Saba, J., Turati, J., Caruso, C., Scimonelli T.N. and Lasaga, M. (2017). Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation*. *Mediators of Inflammation Vol (2017)*, 5048616, 5048639.
- Carson, M., and Kerrigan, S. (2017) Quantification of suvorexant in urine using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1040, 289-294.
- Carter, D.C., and Ho, J.X. (1994) Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45, 153-203.
- Carter, M.S. and Krause, J.E. (1990). Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *The Journal of Neuroscience*, 10(7), 2203-2214.
- Castel, A. (2009). L'hyperalgésie induite par les morphiniques: une synthèse des connaissances actuelles (Doctoral dissertation).
- Castel, A., Hélie, P., Beaudry, F., & Vachon, P. (2013). Bilateral central pain sensitization in rats following a unilateral thalamic lesion may be treated with high doses of ketamine. *BMC veterinary research*, 9(1), 59.
- Catterall, W.A, Striessnig, J., Snutch, T.P., Perez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 55 (4), 579-581.
- Cavaillon, J.M. (2005) Médiateurs de l'inflammation. *Sepsis sévère et choc septique*, 23-49.
- Cesselin, F. (1995) Opioid and anti-opioid peptides. *Fundamental & clinical pharmacology*.; 9(5): 409-433.
- Cesselin, F. (2002). Un nouveau mécanisme de contrôle de la douleur: DREAM ou réalité? *Médecine/Sciences*, 18(8-9), 799-801.
- Chaimbault, P. (2000). Analyse d'acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- Chakraborty, S., Nepiyushchikh, Z., Davis, M.J., Zawieja, D.C., Muthuchamy, M. (2011) Substance P activates both contractile and inflammatory pathways in lymphatics through the neurokinin receptors NK1R and NK3R. *Microcirculation*., 18, 24-35. [PubMed: 21166923]
- Chaurand, P., Sanders, M.E., Jensen, R.A., and Caprioli, R.M. (2004). Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *The American Journal of Pathology*, 165(4), 1057-1068.
- Chauvin, M. (2011). Hyperalgésie: quelle est la prévention, et quel est son impact clinique?. In 53e Congrès national d'anesthésie et de réanimation.

- Chauvin, M., and Beaulieu, P. (2005) Pharmacologie des opioïdes. Dans P. Beaulieu (dir.), *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal, 39-77.
- Che, F.Y., and Fricker, L.D. (2002) Quantitation of Neuropeptides in Cpe f at/Cpe f at Mice Using Differential Isotopic Tags and Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(13), 3190-3198.
- Cheng, D., Espenshade, P.J., Slaughter, C.A., Jaen, J.C., Brown, M. S. and Goldstein J.L. (1999) Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem*, 274, 22805-12.
- Chesler, E. J., Wilson, S. G., Lariviere, W. R., Rodriguez-Zas, S. L., & Mogil, J. S. (2002). Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(8), 907-923.
- Chrétien, M., and Mbikay, M. (2016). 60 Years of POMC: From the prohormone theory to pro-opiomelanocortin and to proprotein convertases (PCSK1 to PCSK9). *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(4), T49-T62.
- Chughtai, K., and Heeren, R.M. (2010) Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chemical Reviews*, 110(5), 3237-3277.
- Ciccimaro, E., Blair, I.A. (2010) Stable-isotope dilution LC-MS for quantitative biomarker analysis. *Bioanalysis*, 2, 311-41.
- Coates, L.C., and Birch, N.P. (1998) Differential cleavage of provasopressin by the major molecular forms of SPC3. *Journal of neurochemistry*, 70(4), 1670-1678.
- Cocchiara, R., Lampiasi, N., Albeggiani, G., Bongiovanni, A., Azzolina, A., Geraci D. (1999) Mast cell production of TNF- α induced by substance P evidence for a modulatory role of substance P-antagonists. *J. Neuroimmunol*, 101, 128–136.
- Commare, B. (2014). *Conception et synthèse de nouveaux agonistes de récepteurs métabotropiques du glutamate* (Doctoral dissertation, Université René Descartes-Paris V).
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37(1), 205-237.
- Contet, B., Kieffer L., Befort, K. (2004) Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol*, 14 : 1–9.
- Coon, J.J., Ueberheide B., Syka, J.E.P., Dryhurst, D.D., Ausio, J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. (2005) Protein identification using sequential ion/ion reactions and tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 9463–9468.
- Costigan, M., and Woolf, C.J. (2000) Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain*, 1(3), 35-44.
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J.C., and Le Bars, D. (2005) Hyperalgésie et allodynie: les mécanismes périphériques. *Revue du rhumatisme*, 72(9), 770-783.
- Couture, R., Cuello, A.C., Pelletier, G., Quirion, R., and Regoli, D. (2012). Substance P and Neurokinins: Proceedings of “substance P and Neurokinins—Montréal '86” A Satellite Symposium of the XXX International Congress of The International Union of Physiological Sciences. J. L. Henry (Ed.). Springer Science and Business Media.
- Cox, J., Hein, M. Y., Luber, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(9), 2513-2526.

- Crabbe J.C, Wahlsten D, Dudek B.C (1999) Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment *Science*, 284 pp. 1670-1672
- Cravello, L. (2005) Etudes structurales des protéines par spectrométrie de masse couplée aux échanges hydrogène/deuterium et à la réticulation chimique (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- Creemers, J. W., Vey, M., Schafer, W., Ayoubi, T. A., Roebroek, A. J., Klenk, H. D., Garten, W., Van de Ven, W. J. (1995) Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 270, 2695-2702.
- Creemers, J.W., and Khatib, A.M. (2007) Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy?. *Frontiers in bioscience, Journal and Virtual Library*, 13, 4960-4971.
- Crochet, V., Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradzky, K. F., Troutner, K., Toneff, T., Bunday, R., Logvinova, A., Reinheckel, T., Peters, C., Bogyo, M., (2004) Cathepsine L et Arg/Lys aminopeptidase: une voie distincte de traitement de prohormone pour la biosynthèse des neurotransmetteurs peptidiques et les hormones. *Biol. Chem.* 385, 473-480.
- Croissandeau, G., Wahnou, F., Yasphal, K., Seidah, N.G., Coderre, T.J., Chrétien, M., Mbikay, M. (2006) Increase stress-induced analgesia the proneuropeptide convertase PC2. *J. Neuroscience Letters*, 406, 71-75.
- Cromlish, J.A., Seidah, N.G., and Chrétien, M. (1985) Isolation and characterization of four proteases from porcine pituitary neurointermediate lobes: relationship to the maturation enzyme of prohormones. *Neuropeptides*, 5(4), 493-496.
- D**
- Dahlhaus, A., Ruscheweyh, R. and Sandkühler, J. (2005) Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, 566(2), 355-368.
- Daly, N.R. (1960) Scintillation type mass spectrometer ion detector. *Review of Scientific Instruments*, 31(3), 264-267.
- Datar, P., Srivastava, S., Coutinho, E., Govil, G., 2004. Substance P: structure, function, and therapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(1), 75-103.
- Day RO, Graham GG, Williams KM, and Brooks PM (1988) Variability in response to NSAIDs: fact or fiction? *Drugs* 36:643–651.
- Day, R., Benjannet, S., Matsuuchi, L., Kelly, R., Marcinkiewicz, M., Chretien, M., Seidah, N. G. (1995) Maintained expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in variant AtT-20 cell lacking a regulated secretory pathway. *DNA Cell Biol*, 14, 175-188.
- Day, R., Schäfer, M.K.-H., Cullinan, W.E. Watson, S.J., Chrétien, M., Seidah, N.G. (1993) Region specific expression of furin mRNA in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, 149, 27-30.
- Day, R., Schafer, M.K., Watson, S. J., Chretien, M., Seidah, N.G. (1992) Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Molecular Endocrinology*, 6(3), 485-497.
- De Hoffmann, E., and Stroobant, V. (2002) *Mass spectrometry: Principles and applications*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd.
- Deeb, S.J. (2014) *MS-based quantitative proteomics for molecular cancer diagnostics* (Doctoral dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München).
- DeGrazia, D., & Rowan, A. (1991). Pain, suffering, and anxiety in animals and humans. *Theoretical Medicine and Bioethics*, 12(3), 193-211.

- Demuth, H.U., Schlenzig, D., Schierhorn, A., Grosche, G., Chapot-Chartier, M.P., and Gripon, J.C. (1993) Design of (ω -N-(O-acyl) hydroxy amid) aminodicarboxylic acid pyrrolidides as potent inhibitors of proline-specific peptidases. *FEBS letters*, 320(1), 23-27.
- Denisov, E., Damoc, E., Lange, O., and Makarov, A. (2012) Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. *International Journal of Mass Spectrometry*, 325, 80-85.
- Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S. and Lingueglia, E. (2010) Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacology and Therapeutics*, 128(3), 549-558.
- Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006) Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 135-161.
- Di Lernia, D., Serino, S., and Riva, G. (2016) Pain in the body. Altered interoception in chronic pain conditions: A systematic review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 71, 328-341.
- Dickenson, A.H. (1995) Central acute pain mechanisms. *Annals of Medicine*, 27(2), 223-227.
- Djoughri, L., and Lawson, S.N. (2004) A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research Reviews*, 46(2), 131-145.
- Docherty, K., Steiner D.F. (1982) Post-translational proteolysis in polv- peptide hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 44:625-638.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., and Alice M.B. (1968) Molecularbeams of macroions. *J. Chem. Phys.*, 49, 2240-2247.
- Douglas, D. J., Frank, A.J., and Mao, D. (2005) Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(1), 1-29.
- Douglas, S.D., and Leeman, S.E. (2011) Neurokinin-1 receptor: functional significance in the immune system in reference to selected infections and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217(1), 83-95.
- Draisci, G., Kajander, K.C., Dubner, R., Bennett, G. J., and Iadarola, M.J. (1991) Up-regulation of opioid gene expression in spinal cord evoked by experimental nerve injuries and inflammation. *Brain Research*, 560(1), 186-192.
- Dray, A., and Bevan, S. (1993) Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *Trends in Pharmacological Sciences*. 14(8), 287-290.
- Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760-3772.
- Dubner, R., Ruda, M.A. (1992) Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci.* 15, 96–103.
- Dubois, D. (2010) Rôle de la substance P dans la régulation du récepteur opioïdérique delta. (Doctoral Dissertation, Université de Sherbrook).
- Dubuc, G. (2010). La PCSK9 humaine, une molécule aux multiples facettes métaboliques et une cible thérapeutique prometteuse: études de régulation in vitro et in vivo.(Doctoral Dissertation, U Montréal).
- Duckert, P., Brunak, S., and Blom, N. (2004) Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(1), 107-112.

- Dugourd, M.P. (2013) Nouvel outil de quantification de biomarqueurs couplant la spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, la Photo-SRM (Doctoral dissertation, Université de Claude Bernard Lyon1).
- Dunham, W.H., Mullin, M., and Gingras, A.C. (2012) Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies. *Proteomics*, 12(10), 1576-1590.
- Duparc, T. (2012) Communication inter-organes dans le contrôle du métabolisme glucidique: mise en évidence de l'implication du monoxyde d'azote et de l'apeline dans l'hypothalamus (Doctoral dissertation, Université de Toulouse)

E

- Elbitar, S., Khoury, P.E., Ghaleb, Y., Rabès, J.P., Varret, M., Seidah, N.G., Boileau C. and Abifadel, M. (2016) Proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) inhibitors and the future of dyslipidemia therapy: an updated patent review (2011-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(12), 1377-1392.
- Ennemann, E.C., Radhakrishnan, K., Mariappan, M., Wachs, M., Pringle, T.H., Schmidt, B., and Dierks, T. (2013). Proprotein convertases process and thereby inactivate formylglycine-generating enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5828-5839.
- Espenshade, P.J., Cheng D., Goldstein, J.L. Brown M.S. (1999) Autocatalytic Processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins *J. Biol. Chem.*, 274, 22795-22804.
- Evans, A.M., DeHaven, C.D., Barrett, T., Mitchell, M., and Milgram, E. (2009) Integrated nontargeted ultrahigh performance liquid Chromatography/ElectrosprayIonization Tandem Mass Spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems, *Anal. Chem.*, 81(16), 6656–6667.
- Evans, C.J., Keith, D.E., Morrison, H., Magendzo, K., and Edwards, R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science -New York Washington*, 258, 1952.

F

- Fantuzzi, G., and Dinarello, C.A. (1996) The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(4), 489-493.
- Farthing MJ. Irritable bowel syndrome. *QJM* 1995;88:451-4.
- Faure, M., Paulmier, V., Des Roches, A. D. B., Boissy, A., Terlouw, E. M. C., Guatteo, R., Cognié J., Courteix C. and Durand, D. (2015) Douleurs animales. Evaluation et traitement de la douleur chez les ruminants. *INRA Productions Animales*, 28(3), 231-242.
- Fay, L.B., and Kussmann, M. (2010) Mass spectrometry and nutrition research (No. 9). Royal Society of Chemistry Publishing.
- Fein, A. (2012) Nociceptors and the perception of pain. *University of Connecticut Health Center*, 4, 61-67.
- Fekete, S., Veuthey, J.L., Beck, A., and Guillaume, D. (2016) Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 3-18.
- Felippotti, T.T., de Freitas, R.L., Coimbra, N.C. (2012) Endogenous opioid peptidemediated neurotransmission in central and pericentral nuclei of the inferior colliculus recruits 11-opioid receptor to modulate post-ictal antinociception. *Neuropeptides*. 46 (1), 9–47.

- Fenn J.B., Mann, M. Meng, C.K. Wong, S. F., and Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry 9(1), 37-70.
- Fenselau, C., and Yao, X. (2009) 18 O₂-labeling in quantitative proteomic strategies: a status report. *Journal of Proteome Research*, 8(5), 2140-2143.
- Ferris, C.D., Snyder, S.H. (1992) Inositol phosphate receptors and calcium disposition in the brain. *J. Neurosci.* 12, 1567–1574.
- Fichna, J., Janecka, A., Costentin, J., Do Rego, J.C. (2007) The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacological Reviews*, 59(1), 88-123.
- Fields, H. (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews Neuroscience*. 5(7), 565-575.
- Fields, H. L., and Basbaum, A.I. (1999) Central nervous mechanisms of pain modulation. In: *Textbook of Pain*, 4th ed., edited by Wall PD and Melzack R. Edinburgh: Churchill Livingstone, 309–329.
- Fields, H.L. (1987) *Pain*. New York, Mc Graw-Hill Book Company.
- Fields, H.L., Heinricher, M. (1985) Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Phil. Trans.R.Soc.Lond.*, 308, 361-374.
- Finehout, E.J., and Lee, K.H. (2004) An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem Mol Biol Educ.*, 32, 93-100.
- Finley-Jones, H.J., Molloy, J.L., and Holcombe, J.A. (2008) Choosing internal standards based on a multivariate analysis approach with ICP (TOF) MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23(9), 1214-1222.
- Fischer, M.J., Mak, S. W., and McNaughton, P.A. (2010) Sensitisation of nociceptors—what are ion channels doing. *Open Pain J*, 3, 82-96.
- Fortenberry, Y., Hwang, J. R., Apletalina, E.V., and Lindberg, I. (2002) Functional Characterization of ProSAAS Similarities and differences with 7B2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5175-5186.
- Fratuzzi, C., Seyhan, A., and Carini, C. (2017) Chapter 3. Immunogenicity of biological products. In *Biosimilar Clinical Development: Scientific Considerations and New Methodologies* CRC Press (51-64).
- Fricker, L.D. (2016) Proteolytic processing of neuropeptides. *Analysis of Post-Translational Modifications and Proteolysis in Neuroscience*, 209-220.
- Friedrichs, B., Tepel, C., Reinheckel, T., Deussing, J., Von Figura, K., Herzog, V., Peters, C., Saftig, P., Brix, K. (2003) Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J. Clin. Invest.*, 111 (11), 1733–45.
- Froehlich, J.C. (1997) Opioid peptides. *Alcohol Research and Health*, 21(2), 132.
- Furuta, A., Rothstein, J. D., and Martin, L.J. (1997b) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *Journal of Neuroscience*, 17(21), 8363-8375.
- Furuta, G.T., Turner, J. R., Taylor, C. T., Hershberg, R. M., Comerford, K., Narravula, S., Podolsky D. K. and Colgan, S. P. (2001) Hypoxia-inducible factor 1–dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *Journal of Experimental Medicine*, 193(9), 1027-1034.
- Furuta, M., Yano H., Zhou A., Rouille Y., Holst, J.J., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L., Furuta, H., Steiner, D. F. (1997a) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6646-6651

G

- Gallien, S., Duriez, E., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T., and Domon, B. (2012) Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(12), 1709-1723.

- Ganem B., Li, Y.T., Henion, J.D. (1991) Detection of non-covalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 6294-9296.
- Gang, H., Yi, C., Fei, T., Li-Tao, L., and Xiaohao, W. (2015) Optimization and simulation of MEMS rectilinear ion trap. *AIP Advances*, 5(4), 041303.
- Gao, S.M., Zhang, Z.P., Karnes, H.T. (2005) Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *J. Chromatogr B*, 825:98–110.
- Gao, Z., Peet, N.P. (1999) Recent advances in neurokinin receptor antagonists. *Curr. Med. Chem.* 6 (5), 375–388.
- Garcia, B.A., Mollah, S., Ueberheide, B.M., Busby, S.A., Muratore, T. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. (2007). Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(4), 933-938.
- Gatchel RJ, Peng YB, Peters ML, Fuchs PN, Turk DC. The biopsychosocial approach to chronic pain: Scientific advances and future directions. *Psychological Bulletin* 2007;133:581–624. [PubMed: 17592957]
- Gautier, V. (2012b). Développement de méthodes quantitatives sans marquage pour l'étude protéomique des cellules endothéliales (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Gautier, V., Mouton-Barbosa, E., Bouyssié, D., Delcourt, N., Beau, M., Girard, J.P., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., and Peredo, A.G. (2012a). Label-free quantification and shotgun analysis of complex proteomes by one-dimensional SDS-PAGE/nanoLC-MS evaluation for the large scale analysis of inflammatory human endothelial cells. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(8), 527-539.
- Garcia-Anoveros, J., and Corey, D.P. (1997) The molecules of mechanosensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 567-594.
- Gawlik, K., Shiryaev, S.A., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Desjardins, R., Day, R., Cayrol C., Burlet-Schiltz O., Bernard Monsarrat B., and Strongin, A.Y. (2009). Autocatalytic activation of the furin zymogen requires removal of the emerging enzyme's N-terminus from the active site. *PLoS One*, 4(4), e5031.
- Gaylinn, B.D., Dealmeida, V.I., Lyons, C.E., Wu, K.C., Mayo, K.E. and Thorner, M.O. (1999) The mutant growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor of the little mouse does not bind GHRH. *Endocrinology*, 140, 5066-5074.
- Gazerani, S., Zaringhalam, J., Manaheji, H., and Golabi, S. (2016) The role of C fibers in spinal microglia induction and possible relation with TRPV3 expression during chronic inflammatory Arthritis in rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, 7(3), 231.
- Geer, L.Y., Markey, S.P., Kowalak, J.A, Wagner L, Xu, M., Maynard, D.M, Yang, X., Shi, W., Bryant, S.H. (2004) Open mass spectrometry search algorithm. *Journal of Proteome Research* 3, 958–964.
- Geppetti, P. (1993) Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regulatory Peptides*, 47(1), 1-23.
- Geraciotti, T.D., Carpenter, L.L., Owens, M. J., Baker, D.G., Ekhaton, N. N., Horn, P.S., Strawn, J.R., Sanacora, G., Kinkead, B., Price, L.H., and Nemeroff, C.B. (2006) Elevated cerebrospinal fluid substance P concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression *Psychiatry*, *American Journal of Psychiatry*, 163(4), 637-643.

- Geraghty, D.P., and Burcher, E., (1993) Two classes of binding sites for [3H] substance P in rat cerebral cortex. *Brain Res.* 601, 34–40.
- Germain, D., Crine, P., Boileau, G., and Thomas, D.Y. (1991) Protéolyse différentielle des prohormones : identification de convertases. *Médecine/Sciences*, 7, 895-9.
- Gfeller, D., Bassani-Sternberg, M., Schmidt, J., and Luescher, I. F. (2016) Current tools for predicting cancer-specific T cell immunity. *OncoImmunology*, 5(7), e1177691.
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*. 81(2), 629-683.
- Glaser, S., Gaudio, E., Renzi, A., Mancinelli, R., Ueno, Y., Venter, J., White M., Kopriva S., Chiasson, V., DeMorrow, S., Francis, H. Meng, F., Marzioni, M., Franchitto, A., Alvaro, D., Supowit, S., DiPette, D. J., Onori, P., and Alpini, G. (2011) Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(2), G297-G305.
- Godin, J.P., and Schierbeek, H. (2017) Mass spectrometry techniques for in vivo stable isotope approaches. *Mass Spectrometry and Stable Isotopes in Nutritional and Pediatric Research*.
- Gokhale, A., Larimore, J., Werner, E., So, L., Moreno-De-Luca, A., Lese-Martin, C., Lupashin, V.V., Smith, Y., and Faundez, V. (2012) Quantitative proteomic and genetic analyses of the schizophrenia susceptibility factor dysbindin identify novel roles of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1. *The Journal of Neuroscience*, 32(11), 3697-3711.
- Gottardo, R., Bortolotti, F., De Paoli, G., Pascali, J. P., Mikšík, I., and Tagliaro, F. (2007) Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1159(1), 185-189.
- Goubillon, M.L., Forsdike, R. A., Robinson, J. E., Ciofi, P., Caraty, A., and Herbison, A. E. (2000) Identification of Neurokinin B-Expressing Neurons as an Highly Estrogen-Receptive, Sexually Dimorphic Cell Group in the Ovine Arcuate Nucleus I. *Endocrinology*, 141(11), 4218-4225.
- Grady, E.F., Baluk, P., Böhm, S., Gamp, P.D., Wong, H., Payan, D.G., Ansel, J., Portbury, A.L., Furness, J.B., McDonald, D.M., and Bunnett, N.W. (1996) Characterization of antisera specific to NK1, NK2, and NK3 neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract. *Journal of Neuroscience*, 16(21), 6975-6986.
- Greiner, V. (2012). Epigénétique et méthylation de l'ADN: étude des mécanismes d'interaction du domaine SRA de UHRF1 avec l'ADN hémi-méthylé (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- Griffiths, W.J. and Wang, Y. (2009) Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society Reviews*., 38(7), 1882-1896.
- Gross, J.H. (2006) *Mass spectrometry*: Book Springer Science and Business Media.
- Grouzmann, E., Monod, M., Landis, B., Wilk, S., Brakch, N., Nicoucar, K., Gigerá, R., Malisá, D., Szalay-Quinodoz, I., Cavadas, C., Denis, R. M., and Lacroix, J.S. (2002) Loss of dipeptidylpeptidase IV activity in chronic rhinosinusitis contributes to the neurogenic inflammation induced by substance P in the nasal mucosa. *The FASEB journal*, 16(9), 1132-1134.
- Guan, J.S, Xu, Z.Z., Gao, H., He, S.Q, Ma, G.Q, Sun, T., Wang, L.H., Zhang, Z.N, Lena, I., Kitchen, I., Elde, R., Zimmer, A., He, C., Pei, G., Bao, L., Zhang, X. (2005) Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell.* , 122, 619-631.

- Guan, J.S., Xiao, H.S., Xu, Z.Q., He, C., Hökfelt, T., Zhou, Z., Zhang, X., (2003) Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron*. 37, 121–133.
- Guan, X., Brownstein, N.C., Young, N.L., and Marshall, A.G. (2017) Ultrahigh-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and tandem mass spectrometry for peptide de novo amino acid sequencing for a seven-protein mixture by paired single-residue transposed Lys-N and Lys-C digestion. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31(2), 207-217.
- Guichou, E. (2015). Le génotypage par spectrométrie de masse MALDI-TOF: principe et applications biologiques. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(3), 218.
- Guirimand, F. (2003) Physiologie de la douleur: données récentes. *Néphrologie*, 24(7), 401-410.
- Guo, D., Hillger, J.M., IJzerman, A. P. and Heitman, L.H. (2014) Drug-target residence time-A case for G Protein-coupled receptors. *Medicinal Research Reviews*, 34(4), 856-892.
- Gupta, S.K., Hassel, T., Singh, J.P. (1995) A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7799-7803.
- Gutierrez-Mecinas, M., Bell, A.M., Marin, A., Taylor, R., Boyle, K. A., Furuta, T., Watanabe M., Furuta T., Watanabe M., Polgár, E., and Todd, A.J. (2016) Preprotachykinin A (PPTA) is expressed by a distinct population of excitatory neurons in the mouse superficial spinal dorsal horn including cells that respond to noxious and pruritic stimuli. *PAIN* Publish Ahead of Print.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. and Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. 17(10), 994-999.

H

- Hafsa, N.E. (2016) Protein structure characterization from NMR chemical shifts (Doctoral dissertation, University of Alberta).
- Hagemann, S., Günther, T., Dennemärker, J., Lohmüller, T., Brömme, D., Schüle, R., Petersa, C. and Reinheckel, T. (2004) The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles. *European Journal of cell Biology*, 83(11-12), 775-780.
- Hager, J.W., and Le Blanc, J.C. (2003) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020(1), 3-9.
- Hajebrahimi, Z., Mowla, S.J., Movahedin, M., and Tavallaei, M. (2008) Gene expression alterations of neurotrophins, their receptors and prohormone convertases in a rat model of spinal cord contusion. *Neuroscience letters*, 441(3), 261-266.
- Hall, KR, Stride E. (1954) The varying response to pain in psychiatric disorders: a study in abnormal psychology. *Br J Med Psychol*;27:48-60.
- Hall, M.E., Miledy, F., and Stewart J.M. (1989) The role of enzymatic processing in the biological actions of substance P. *Peptides*, 10, 895-901.
- Hall, T.G., McKearn, D., Smukste, I., Bresciano, K.R., Savage, R.E. and Wang, Y. (2012) Identifying and overcoming matrix effects in drug discovery and development. *Intech Open Access Publisher*.
- Hallberg, M., Nyberg, F. (2003) Neuropeptide conversion to bioactive fragments-an important pathway in neuromodulation. *Current Protein and Peptide Science* 4(1), 31-44.

- Ham, B.M. (2011) Proteomics of biological systems: protein phosphorylation using mass spectrometry techniques. John Wiley and Sons.
- Hao, C., Sousou, N., Eikel, D. and Henion, J. (2015) Thin-layer chromatography/mass spectrometry analysis of sample mixtures using a compact mass spectrometer. *American Laboratory*, 47(4), 24-27.
- Harakat, D. (2011) Etudes mécanistiques par ESI-MS de réactions palladocatalysées (Doctoral dissertation, Université de Reims).
- Harris, F.M., Trott, G. W., Morgan, T. G., Brenton, A. G., Kingston, E. E., Beynon J. H. (1984) S/N in electron multipliers at low ion currents. *Mass Spectrometry Reviews*, 3, 209-229.
- Harrison, S. and Geppetti, P. (2001) Substance P. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33(6), 555-576.
- Hauser, K.F., Foldes, J.K., Turbek, C.S. (1999) Dynorphin A (1-13) neurotoxicity in vitro: opioid and non-opioid mechanisms in mouse spinal cord neurons. *Experimental Neurology*, 160(2), 361-375.
- Haynes, P.A., Gygi, S.P., Figeys, D., and Aebersold, R. (1998) Proteome analysis: biological assay or data archive. *Electrophoresis*, 19(11), 1862-1871.
- Heintz, D.W.V., High, A.A., Van Dorselaer, A., Reski, R., Sarnighausen, E. (2004) An efficient protocol for the identification of protein phosphorylation in a seedless plant, sensitive enough to detect members of signalling cascades." *Electrophoresis*, 25(7-8), 1149-59.
- Helke, C.J., Charlton, C.G., and Wiley, R.G. (1986) Studies on the cellular localization of spinal cord substance P receptors. *Neuroscience*, 19, 523-533.
- Hellyer, P.W., Robertson, S. A., and Fails, A.D. (2007) Pain and its management. *Lumbard Jones' Veterinary anesthesia and analgesia*. 4th ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 31-57.
- Hemström, P., and Irgum, K. (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*, 29(12), 1784-1821.
- Hendy, G.N., Bennett, H.P., Gibbs, B.F., Lazure, C., Day, R., Seidah, N.G. (1995) Parathyroid hormone is preferentially cleaved to parathyroid hormone by the prohormone convertase furin: a mass spectrometric study. *J. Biol. Chem.*, 270, 9517-9525.
- Henry, J.L. (2004) Future basic science directions into mechanisms of neuropathic pain. *Journal of Orofacial Pain*, 18(4).
- Hersh, L.B. (1984) Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase (enkephalinas). *J Neurochem*, 43(2), 487-493.
- Hill, R., 2000. NK1 (substance P) receptor antagonists-why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 244-246.
- Hokin, L.E., and Dixon, J. F. (1993) The phosphoinositide signalling system. I. Historical background. II. Effects of lithium on the accumulation of second messenger inositol 1, 4, 5-trisphosphate in brain cortex slices. *Progress in Brain Research*, 98, 309-315.
- Hook, V., Bark, S., Gupta N., Lortie, M., Lu, W.D., Nuno, B., Lydiane, F., Jill, W., O'Connor, D.T., Pavel, P. (2010) Neuropeptidomic components generated by proteomic functions in secretory vesicles for cell-cell communication. *AAPS J.*, 12, 635-645.
- Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., Hwang, S. R. (2008) Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48(1):393-423.

- Hook, V., Funkelstein, L., Toneff, T., Mosier, C., and Hwang, S.R. (2009) Human pituitary contains dual cathepsin L and prohormone convertase processing pathway components involved in converting POMC into the peptide hormones ACTH, α -MSH, and β -endorphin. *Endocrine*, 35(3), 429-437.
- Hook, V., Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradzsky, K. F., Troutner, K., Toneff, T., Bunday, R., Logvinova, A., Reinheckel, T., Peters, C., Bogyo, M. (2004) Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones. *Biol. Chem*, 385, 473–480.
- Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschäppät, V., Grivet, C., Bourgoigne, E. and Leuthold, L.A. (2004) Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(8), 845-855.
- Hoshino, A., and Lindberg, I. (2012) Peptide biosynthesis: prohormone convertases 1/3 and 2. In *Colloquium series on neuropeptides 1(1)*, 1-112.
- Hovasse, A. (2010) *Protéomique, maîtrise de l'instrumentation, applications et étude des glycosylations* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- Howard, M.R., Haddley, K., Thippeswamy, T., Vasiliou, S., Quinn, J.P. (2006) Substance P and the tachykinins. *Handbook of Neuro Chemistry and Molecular Neurobiology*, pp. 427–461.
- Hu, Q., Noll, R.J. Li, H. Makarov, A., Hardman, M., and Cooks, G. (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.*, 40, 430
- Huang, M., and Chalfie, M. (1994) Gene interactions affecting mechano sensory transduction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 367, 467-470.
- Hubbard, S.J. (1998) The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1382(2), 191-206.
- Hübschmann, H. J. (2015) *Handbook of GC-MS: fundamentals and applications*. John Wiley and Sons.
- Hudson, P., Haley, J., Cronk, M., Shine, J., Niall, H. (1981) Molecular cloning and characterization of cDNA sequences coding for rat relaxin, *Nature*, 291, 127–131.
- Hunt, D.F., Yates, J. R., Shabanowitz, J., Winston, S. and Hauer, C. R. (1986) Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(17), 6233-6237.
- Hunter, C., and Simons, B. (2008) The Scheduled MRM™ Algorithm Enables Intelligent Use of Retention Time During Multiple Reaction Monitoring. *Technical Note. Biomarkers and OMIC*.
- Huskisson E, Woolfe D, Balme H, Scott J, and Franklyn S (1976) Four new anti- inflammatory drugs: responses and variations. *Br Med J* 1:1048–1049.
- Husson, S.J., Reumer, A., Temmerman, L., De Haes, W., Schoofs, L., Mertens, I., and Baggerman, G. (2014). Worm peptidomics. *EuPA Open Proteomics*, 3, 280-290.

I

- Iadarola, M.J., Brady, L.S., Draisci, G., Dubner, R., (1988) Enhancement of dynorphin geneexpression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain* 35, 313–326.
- IASP. International Association for the Study of Pain: Pain terms (1979) A list with definitions and notes on usage. *Pain* 6, 249.

- Im, H., Shao, H., Park, Y. I., Peterson, V. M., Castro, C. M., Weissleder, R., and Lee, H. (2014) Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nature Biotechnology*, 32(5), 490-495.
- Improta, G., and Broccardo, M. (2006) Tachykinins: role in human gastrointestinal tract physiology and pathology. *Current drug targets*, 7(8), 1021-1029.
- Irazusta, J., Larrinaga, G., Agirregoitia, N., Varona, A., and Casis, L. (2003) Effects of morphine administration and its withdrawal on rat brain aminopeptidase activities. *Regulatory Peptides*, 110(3), 225-230.
- Iribarne, J. V., and Thomson, B.A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* 64, 2287.

J

- Jaaks, P., D'Alessandro, V., Grob, N., Büel, S., Hajdin, K., Schäfer, B. W., and Bernasconi, M. (2016) The Proprotein Convertase Furin contributes to rhabdomyosarcoma malignancy by promoting vascularization, migration and invasion. *PloS one*, 11(8), e0161396.
- Jacob, V. (2010) *Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse; Génie Analytique* Edition V. Jacob Grenoble 47p.
- Jadaun, G.P.S., Dixit, S., Saklani, V., Mendiratta, S., Jain, R., and Singh, S. (2017) HPLC for peptides and proteins: principles, methods and applications. *Pharmaceutical Methods*, 8(1).
- Janecka, A., Fichna, J., and Janecki, T. (2004) Opioid receptors and their ligands. *Current topics in medicinal chemistry*, 4(1), 1-17.
- Janin, M. (2009). *Sensibilité et motricité podales : leur influence sur le contrôle des activités posturocinétiques de sujets sains et pathologiques* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Jardino, M., Plumelle, F. and Desaintfuscien, M. (1983) Experimental determination of the energy of ions stored in a quadrupole trap from their microwave doppler spectrum. *Laser Spectroscopy*, 43, 173.
- Jayer, R. (2010) *Intérêt d'un mélange équimolaire protoxyde d'azote/oxygène chez les carnivores domestiques: synthèse clinique* (Doctoral dissertation, Université Paul-Sabatier de Toulouse).
- Ji, R.R., and Woolf, C.J. (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiology of Disease*, 8(1), 1-10.
- Johanning, K., Mathis, J. P., Lindberg, I. (1996) Role of PC2 in proenkephalin processing: antisense and overexpression studies. *Journal of Neurochemistry*, 66(3), 898-907.
- Jonscher, K.R., and Yates, J. R. (1997) The quadrupole ion trap mass spectrometer a small solution to a big challenge. *Analytical Biochemistry*, 244(1), 1-15.
- Jonsson, A. (2015) *The Impact of the neuropeptide substance P (SP) fragment SP₁₋₇ on chronic neuropathic pain.* (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis, 64 p).
- Joos, G.F., Germonpre, P. R., Pauwels, R. A. (2000) Role of Tachykinins in asthma. *Allergy* 55, 321-337.
- Jordt, S.E., McKemy, D. D., Julius, D. (2003) Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr Opin Neurobiol* 13, 487-492.
- Julius, D., and Basbaum, A. I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.

K

- Kaiser, P., Akerboom, T., Ohlendorf, R., & Reinauer, H. (2010) Liquid chromatography–isotope dilution–mass spectrometry as a new basis for the reference measurement procedure for hemoglobin A1c determination. *Clinical Chemistry*, 56(5), 750-754.
- Kalbaugh, G.E. (2009) ESI Handbook 2010: Sources, technology, and process. Aspen Publishers Online.
- Kang, J.S. (2012) Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. *Tandem Mass Spectrometry–Applications and Principles*, 441-492.
- Kangawa, K., Minamino, N., Fukida, A., Matsuo, H. (1983) Neuromedin K: a novel mammalian tachykinins identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 533-540.
- Kapitzke, D., Vetter, I. and Cabot, P. J. (2005) Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 1(4), 279-297.
- Kappelmann, J., Klein, B., Geilenkirchen, P., and Noack, S. (2017) Comprehensive and accurate tracking of carbon origin of LC-tandem mass spectrometry collisional fragments for ¹³C-MFA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-18.
- Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, A., Hillenkamp, F. (1989) Laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins of mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, 760-762.
- Karlsson, K. (2004) Substance P endopeptidase: purification and characterization of enzyme activity and evaluation of its function during stressful condition. (Doctoral dissertation Acta Universitatis Upsaliensis) 56 pp.
- Karlsson, K., Eriksson, U., Andren, P., Nyberg, F. (1997) Purification and characterization of substance P endopeptidase activities in the rat spinal cord. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 27, 59-78.
- Karp, G., and Pruitt, N. L. (1999) *Cell and molecular biology: concepts and experiments* (pp. 323-337). Wiley Edition.
- Kebarle, P. (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35, 804-817.
- Khawaja, A. M., Duncan F., Rogers, D.F. (1996) Tachykinins: receptor to effector In/. *J. Biochem. Cdl Bid*, 28(7), 721-738.
- Kidd, B.L., Urban, L.A. (2001) Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, 87(1), 3-11.
- Kieffer, B.L. and Gavériaux-Ruff, C. (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology*, 66(5), 285-306.
- Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
- Kiguchi, N., Maeda, T., Tsuruga, M., Yamamoto, A., Yamamoto, C., Ozaki, M., Kishioka, S. (2008) Involvement of spinal Met–enkephalin in nicotine-induced antinociception in mice. *Brain Research*, 1189, 70-77.
- Kim, P.S., and Arvan, P. (1998) Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocrine Reviews*, 19(2), 173-202.

- Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanazawa, I., Munekata, E. (1983) Novel neuropeptides: neurokinin α and β isolated from porcine spinal cord. *Proc Jpn Acad*, 59, 101-104.
- Kitamura, H., Kobayashi, M., Wakita, D. and Nishimura, T. (2012) Neuropeptide signaling activates dendritic cell-mediated type 1 immune responses through neurokinin-2 receptor. *The Journal of Immunology*, 188(9), 4200-4208.
- Klassert, T. E., Patel, S. A., and Rameshwar, P. (2010) Tachykinins and neurokinin receptors in bone marrow functions: neural-hematopoietic link. *Journal of receptor, Ligand and Channel Research*, 2010(3), 51.
- Klippenstein, V., Hoppmann, C., Ye, S., Wang, L., & Paoletti, P. (2017). Optocontrol of glutamate receptor activity by single side-chain photoisomerization. *eLife*, 6, e25808.
- Komurov, K. and White, M. (2007) Revealing static and dynamic modular architecture of the eukaryotic protein interaction network. *Molecular Systems Biology*, 3(1), 110.
- Konoshita, T., Gasc, E. Villard, Takeda, R., Seidah, N. G., Corvola, P., Pinet, F. (1994) Expression of PC2 and PC1/PC3 in human pheochromocytomas. *Mol Cell Endocrinol*, 99, 307-14.
- Kosak, S.T., and Groudine, M. (2004) Gene order and dynamic domains. *Science*, 306(5696), 644- 647.
- Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H. and Nakanishi S. (1986) Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 83, 7074-7078.
- Krause, J. E., Chirgwin, J. M., Carter, M., Xu, Z. S., and Hershey, A. D. (1987) Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(3), 881-885.
- Krishnan, A., and Schiöth, H.B. (2015) The role of G protein-coupled receptors in the early evolution of neurotransmission and the nervous system. *Journal of Experimental Biology*, 218(4), 562-571.
- Kromidas, S. (2017) *The HPLC-Expert II: Optimizing the Benefits of HPLC/UHPLC*. (Ed.). John Wiley and Sons.
- Kuner, R. (2010) Central mechanisms of pathological pain. *Nature medicine*, 16(11), 1258-1266.
- Kuzmin, A., Madjid, N., Terenius, L., Ogren, S.O., and Bakalkin, G. (2006) Big dynorphin, a prodynorphin-derived peptide produces NMDA receptor-mediated effects on memory, anxiolytic-like and locomotor behavior in mice. *Neuro psychopharmacology*, 31(9), 1928-1937.
- Kweon, H.J., Kim, D.I., Bae, Y., Park, J.Y., and Suh, B.C. (2016) Acid-sensing ion channel 2a (ASIC2a) Promotes surface trafficking of ASIC2b via heteromeric assembly. *Scientific Reports*, 6.

L

- Labat, J.J., Riant, T., Delavierre, D., Sibert, L., Watier, A., and Rigaud, J. (2010) Approche globale des douleurs pelvipérinéales chroniques: du concept de douleur d'organe à celui de dysfonctionnement des systèmes de régulation de la douleur viscérale. *Progrès en Urologie*, 20(12), 1027-1034.
- Labombarda, F., Coronel, M.F., Villar, M. J., Nicola, A. F., Gonzalez, S.L. (2008) Neuropathic pain and temporal expression of prodynorphin, protein kinase C and N-methyl-D-aspartatereceptor subunits after spinal cord injury. *Neuroscience Letters*. 447(2-3), 115-119.
- Lai, J., Luo, M. C., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L.R., Ossipov, M. H., Porreca, F. (2006) Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nature Neuroscience*. 9(12), 1534-1540.

- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., and Aebersold, R. (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology*, 4(1), 222.
- Lantz, I., Glamsta, E.L., Talback, L., and Nyberg, F. (1991) Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Lett.* 287, 39 – 41.
- Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9), 895-926.
- Laurent, O. (2002) Etude de la polarisation en logique (Doctoral dissertation, Université de la Méditerranée-Aix-Marseille II).
- Lavoie, D.S.G., Pailleux, F., Vachon, P., and Beaudry, F. (2013) Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography–hybrid triple quadrupole–linear ion trap–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 27(7), 882-888.
- Le Bars, D. (2010) Human pains and animal pains. *Bull. Acad. Vét. France*, 317-334.
- Le Bars, D., and Adam, F. (2002). Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aiguë inflammatoire. In *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation*, 21(4), 315-335.
- Le Bars, D., Dickenson A.H., Besson, J.M. (1979 b) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). 1. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain*, 6, 283-304
- Le Bars, D., Dickenson, A.H., Besson, J.M. (1979 a) Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non convergent neurones, supraspinal involvement and theoretical implications. *Pain*, 6, 305-327.
- Le Bihan, T., Goh, T., Stewart, I. I., Salter, A. M., Bukhman, Y. V., Dharsee, M., Ewing, R., Wisniewski, J. R. (2006) Differential analysis of membrane proteins in mouse fore- and hindbrain using a label-free approach. *Journal of Proteome Research*, 5, 2701-2710.
- Le Gac, S. (2004) Développement de systèmes microfluidiques pour l'analyse protéomique par ESI-SM et MALDI-SM (Doctoral dissertation, Lille 1).
- Lecci, A., and Maggi, C.A. (2003) Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*, 7(3), 343-362.
- Lee, C.M., Sandberg B. E., Hanley M. R. and Iversen L. L. (1981) Purification and characterisation of a membrane- bound substance P degrading enzyme from human brain. *Eur. J. Biochem.*, 114, 315-327.
- Lee, H., Lee, J., Choi, K., and Kim, B. (2017). Development of isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the accurate determination of trans-and cis-vitamin K 1 isomers in infant formula. *Food Chemistry*, 221, 729-736.
- Lee, M.S., and Kerns, E.H. (1999) LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews*, 18, 187-279.
- Lescuyer, P., Chevallet, M., and Rabilloud, T. (2004) L'analyse protéomique: concepts, réalités et perspectives en thérapeutique. *Médecine/Sciences*, 20(5), 587-592.
- Levine, J.D., Fields, H.L., Basbaum, A.I. (1993) Peptides and the primary afferent nociceptor. *The Journal of Neuroscience*. 13(6), 2273-2286.
- Li, M., Shang, Y. X., Wei, B., & Yang, Y. G. (2011) The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro. *Journal of Inflammation*, 8(1), 18

- Liang, B. C., Shi, X. L., Li, C. W., Shi, Z. Y., He, W. T., Yao, J. L., Li, X. Y. (2016) Identification of human serum protein targets of Qianggu Decoction in primary type I osteoporosis based on tandem mass tag labeling and liquid chromatography-tandem mass spectrometry technology. *Chinese journal of Integrative Medicine*, 1-8.
- Lin, C. C. J., Chen, W. N., Chen, C. J., Lin, Y. W., Zimmer, A., and Chen, C. C. (2012) An antinociceptive role for substance P in acid-induced chronic muscle pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), E76-E83.
- Ling, N., Burgus, R., Guillemin, R. (1976) Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3042-3046.
- Lippert, W. (2016) Further development and application of a mobile multiple-reflection time-of-flight mass spectrometer for analytical high-resolution tandem mass spectrometry. Dissertation Maitrise, Physikalisches Institut Justus-Liebig-Universität Gießen
- Liu, F. J., Fan, M., Wei, X.Y., and Zong, Z.M. (2016) Application of mass spectrometry in the characterization of chemicals in coal - derived liquids. *Mass Spectrometry Reviews*. DOI: 10.1002/mas.21504.
- Liu, L., Ikeda, T.M., Branlard, G., Peña, R. J., Rogers, W. J., Lerner, S. E. and Appels, R. (2010) Comparison of low molecular weight glutenin subunits identified by SDS-PAGE, 2-DE, MALDI-TOF-MS and PCR in common wheat. *BMC plant biology*, 10(1), 124.
- Lodge, Jr., J.P. (1988) *Methods of air sampling and analysis*. CRC Press
- Lopez-Otin, C., Overall, C.M. (2002) Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.*, 3, 509-519
- Lopez, A., and Salomé, L. (2009) Membrane functional organisation and dynamic of μ -opioid receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(13), 2093-2108.
- Lottspeich, F. (1999) Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 38(17), 2476-2492.
- Luiz, A.P., Kopach, O., Santana-Varela, S., and Wood, J. N. (2015) The role of Na v 1.9 channel in the development of neuropathic orofacial pain associated with trigeminal neuralgia. *Molecular Pain*, 11(1), 1.
- Lutfy, K., Parikh, D., Lee, D.L., Liu, Y., Ferrini, M. G., Hamid, A., and Friedman, T.C. (2016) Prohormone convertase 2 (PC2) null mice have increased mu opioid receptor levels accompanied by altered morphine-induced antinociception, tolerance and dependence. *Neuroscience*, 329, 318-325.

M

- Maarawi, S.K. (2013) Effets électrophysiologiques de la stimulation du cortex moteur sur les noyaux somatosensoriels latéraux du thalamus: étude expérimentale sur un modèle de stimulation du cortex moteur chez le chat (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- Maarawi, J., and Garcia-Larrea, L. (2014) Neuro-imagerie du système opioïde encéphalique chez l'Homme. *Douleur et analgésie*, 27(1), 19-31.
- MacCoss, M.J., and Matthews, D.E. (2005) Quantitative MS for proteomics: teaching a new dog old tricks.
- Machelska, H. (2007) Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides*, 41 (6), 355-363.

- Maggi C. (1997) Tachykinins as peripheral modulators of primary afferent nerves and visceral sensitivity. *Pharmacol Res*, 36, 153-69.
- Maggi, C.A., (1995) The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol.* 26 (5), 911–944.
- Mague S.D., Blendy J.A. (2010) OPRM1 SNP (A118G): involvement in disease development, treatment response, and animal models. *Drug Alcohol Depend.* 108(3), 172-82.
- Malan, T. P., Ossipov, M. H., Gardell, L. R., Ibrahim, M., Bian, D., Lai Porreca, J. F. (2000) Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain*, 86, 185–194.
- Malcolm, A., Wright, S., Syms, R. R., Dash, N., Schwab, M. A., and Finlay, A. (2010) Miniature mass spectrometer systems based on a microengineered quadrupole filter. *Analytical Chemistry*, 82(5), 1751-1758.
- Malmstrom, J., Larsen, K., Malmstrom, L., Tufvesson, E., Parker, K., Marchese, J., Williamson, B., Hattan, S., Patterson, D., Martin, S., Graber, A., Juhasz, H. P., Westergren-Thorsson, G. and Marko-Varga, G. (2004) Proteome annotations and identifications of the human pulmonary fibroblast. *J. Proteome Res.*, 3(3), 525-37.
- Małuch, I., Walewska, A., Sikorska, E., and Prahl, A. (2016) Proprotein convertases-family of serine proteases with a broad spectrum of physiological functions. *Postepy Biochemii*, 62(4), 472.
- Man, K.F., Tang, K.S., and Kwong, S. (2012) *Genetic Algorithms: Concepts and Designs*. Springer Science and Business Media. Books Edition, Springer.
- Manes, N.P., Mann, J.M., and Nita-Lazar, A. (2015) Selected reaction monitoring mass spectrometry for absolute protein quantification. *Journal of Visualized Experiments*, (102), e52959-e52959.
- Mann, M. and Jensen, O. N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 21(3), 255-61.
- Mamet, J., and Voilley, N. (2002) Les canaux sodiques activés par l'acidification extracellulaire et la douleur inflammatoire. *Med Sci (Paris)*. 18(8-9), 889-895.
- Mao, G., Qu, F., St. Croix, C.M., Tyurina, Y.Y., Planas-Iglesias, J., Jiang, J. and Cheikhi, A. (2016) Mitochondrial redox opto-lipidomics reveals mono-oxygenated cardiolipins as pro-apoptotic death signals. *ACS Chemical Biology*, 11(2), 530-540.
- March, R.E. (2009) Quadrupole ion traps, *Mass Spectrometry Reviews*, 28(6), 961-989.
- March, R.E., and Todd, J.F. (2005) *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry* John Wiley and Sons (Volume 165).
- Marchand, S. (2005) Neurophysiologie de la douleur. Dans Beaulieu P, (éd) *Pharmacologie de la douleur*. Montréal, Les Presses de l'Université de Montréal, 3-37.
- Marchand, S. (2008) The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 34(2), 285-309.
- Marchand, S. (2009) Neurophysiologie de la douleur. Dans : Marchand S, (éd). *Le phénomène de la douleur*. Montréal, Chenelière Éducation inc: 65-108.
- Marcinkiewicz, M., Seidah, N. G. and Chretien, M. (1993) Les convertases des prohormones et le système nerveux. *Médecine/Sciences*, 9, 553-61.

- Marinach-Patrice, C., Pionneau, C., and Mazier, D. (2011) Spectrométrie de masse en biologie médicale: principes et applications. *Bio Tribune Magazine*, 40(1), 4-12.
- Martin-Schild S., Gerall A. A., Kastin A. J., Zadina J. E. (1999) Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin-2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *Journal of Comparative Neurology*. 405, 450-471.
- Martinac, B. (2004) Mechano-sensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *Journal of Cell Science*, 117(12), 2449-2460.
- Martling, C.R., Theodorsson-Norheim, E., and Lundberg, J.M. (1987) Occurrence and effects of multiple tachykinins; Substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life Sciences*, 40(16), 1633-1643.
- Mashaghi, A., Marmalidou, A., Tehrani, M., Grace, P. M., Pothoulakis, C., and Dana, R. (2016) Neuropeptide substance P and the immune response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(22), 4249-4264.
- Matamala, N., Aggarwal, N., Iadarola, P., Fumagalli, M., Gomez-Mariano, G., Lara, B. and Martinez-Delgado, B. (2017) Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human SERPINA1 Gene. *PLoS one*, 12(1), e0170533.
- Mathias CJB, R. *Autonomic failure* New York: Oxford - University press, 1999. Berge, O. G. (2011). Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1195-1206.
- Matsas, R., Fulcher, I.S., Kenny, A.J., and Turner, A.J. (1983). Substance P and [Leu] enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(10), 3111-3115.
- Mattera, C.J. (1998) Spinal trauma: new guidelines for assessment and management in the out-of-hospital environment. *Journal of Emergency Nursing*, 24(6), 523-538.
- Mazzuca, M., (2007) Canaux ioniques, douleur et analgésie - Effets analgésiques du blocage d'ASIC1a par la Psalmotoxine 1. *Neurosciences [q-bio.NC]*. Université Nice Sophia Antipolis, (Doctoral dissertation, Université de Nice-Sophia Antipolis).
- Matthews, G., Shennan, K. I., Seal, A.J., Taylor, N.A., Colman, A., and Docherty, K. (1994) Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 588-592.
- McCleskey, E.W., and Gold, M.S. (1999) Ion channels of nociception. *Annual Review of Physiology*, 61(1), 835-856.
- McCue, J.T. (2009) Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods in enzymology*, 463, 405-414.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840(1), 33-44.
- McFadden, W.H. (1973) *Techniques of GC/MS*. Wiley-Interscience. New-York.
- McGregor, E., and Dunn, M. J. (2006) Proteomics of the heart: unraveling disease. *Circ. Res.* 98(3), 309-21.
- McLuckey, S.A., Van Berkel, G. J., Goeringer, D. E., and Glish, G.L. (1994) Ion trap mass spectrometry of externally generated ions. *Analytical Chemistry*, 66(13), 689A-696A.

- McMahon, S.B., Koltzenburg, M. (2008) Inflammatory mediators and modulators of pain (Eds.), Wall and Melzack's textbook of Pain, Elsevier, Philadelphia, 49–72.
- McNamee, H.P., Ingber, D.E., and Schwartz, M.A. (1993) Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *The Journal of Cell Biology*, 121(3), 673-678.
- Mechref, Y., and Novotny, M.V. (2002) Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. *Chem Rev* 102, 321-369.
- Meija, J. (2006) Understanding isotopic distributions in mass spectrometry. *J. Chem. Educ*, 83(12), 1761.
- Melzack, R., Wall P.D. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(699):971-979.
- Menet, M.C. (2011) Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*, 437, 41-53.
- Merg, F., Filliol, D., Usynin, I., Bazov, I., Bark, N., Hurd, Y. L., Yakovleva, T., Kieffer, B.L., Bakalkin, G. (2006). Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the κ - opioid receptor. *Journal of neurochemistry*, 97(1), 292-301.
- Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., and Mazarguil, H. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, 377(6549), 532.
- Michael-Titus, A.T., Blackburn, D., Connolly, Y., Priestley, J.V., Whelpton, R., (1999) N- and C terminal substance P fragments: differential effects on striatal [3H] substance P binding and NK1 receptor internalization. *Neuroreport* 10 (10), 2209–2213.
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J. P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., and Horning, S. (2011) Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(9), M111-011015.
- Miczek, KA. Tolerance to the analgesic, but not discriminative stimulus effects of morphine after brief social defeat in rats. *Psychopharmacol* 1991;104:181-6.
- Mika, J., Obara, I. and Przewlocka, B. (2011) The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: Implications of neuro–glial interaction. *Neuropeptides*, 45(4), 247-261.
- Millan, M.J. (2002) Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66, 355- 474.
- Mirabeau, O. (2008) Searching for novel peptide hormones in the human genome (Doctoral dissertation, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc).
- Mistrova, E., Kruzliak, P., Dvorakova, M.C. (2016) Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides* 58, 41–51.
- Mitchell, A.J., Lone, A.M., Tinoco, A.D. and Saghatelian, A. (2013) Proteolysis controls endogenous substance P levels. *PloS one*, 8(7), e68638.
- Mizoguchi, H., Watanabe, H., Hayashi, T., Sakurada, W., Sawai, T., Fujimura, T., Sakurada, T., Sakurada, S. (2006) Possible involvement of Dynorphin A-(1–17) release via μ 1- opioid receptors in spinal antinociception by endomorphin-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(1), 362-368.
- Moisset, X., de Andrade, D. C. et Bouhassira, D. (2016) From pulses to pain relief : an update on the mechanisms of rTMS-induced analgesic effects. *Eur. J. Pain*, 20(5), 689-700.

- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., Meunier, J. C. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Letters*, 341(1), 33-38.
- Molloy, S.S., Thomas, L., Van Slyke, J.K., Stenberg, P.E. and Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furine proprotein convertase: localization of TGN and recycling of the cell surface. *EMBO. J.* 13, 18-33.
- Mommen, G.P., Marino, F., Meiring, H. D., Poelen, M. C., Mohamed, S., Heck, A. J. and Van Els, C. A. (2016) Sampling from the Proteome to the Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) Ligandome Proceeds Via High Specificity. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(4), 1412-1423.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008) Mapping and quantify in mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), 621-628.
- Moruz, L., and Käll, L. (2016) Peptide retention time prediction. *Mass Spectrometry Reviews*. 9999, 1-9.
- Moussaoui, S. M., Le Prado N., Bonici B., Faucher D.C., Cuine F., Laduron P. M. and Garret C. (1992) Distribution of neurokinin B in ratspinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaican treatment. *Neuroscience*, 48, 969–978.
- Mouton-Barbosa, E., Roux-Dalvai, F., Bouyssié, D., Berger, F., Schmidt, E., Righetti, P. G., Guerrier, L., Boschetti, E., Burllet-Schiltz, O., Monsarrat, B., and Gonzalezde Peredo, A. (2010) In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1006–1021
- Mueller, L.N., Brusniak, M.Y., Mani, D. R., Aebersold, R. (2008) An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J. Proteome Res.* 7, 51-61.
- Munro, G. (2007) Dopamine D(1) and D(2) receptor agonism enhances antinociception mediated by the serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine in the rat formalin test. *European Journal of Pharmacology*, 57, 66-74.
- Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, M., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Benjannet, S., Chrétien, M., Seidah, N.G. (1997) In Vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J. Biol. Chem.*, 272, 19672–19681.
- Murphy, D., and Gainer, H. (2016) *Molecular Neuroendocrinology: From Genome to Physiology*. John Wiley and Sons.
- Muthuraman, A., Singh, N., Singh Jaggi, A., and Ramesh, M. (2014) Drug of neuropathic pain: current developments and future perspectives. *Current Drug Targets*, 15(2), 210-253.
- Myöhänen, T.T., Venäläinen, J.I., Garcia-Horsman, J.A., Männistö, .P.T. (2008) Spatial association of prolyloligopeptidase, inositol 1,4,5-triphosphate type 1 receptor, substance P and its neurokinin in the rat brain: an immune histochemical colocalization study. *Neuroscience*, 153, 1177 1189.
- N**
- Nadel, A. (1991) Neutral endopeptidase modulates neurogenic inflammation. *Eur. Respir J.*, 4, 745-754.
- Nakanishi, S., Ohkubo, H., Kakizuka, A. and Takumi, T. (2013) Molecular characterization of mammalian tachykinin receptors and possible epithelial potassium channel. In *Recent Progress in Hormone Research: Proceedings of the 1989 Laurentian Hormone Conference* (p. 59). Academic Press.
- Nakamura, F., Strittmatter S. M. (1996) P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (19), 10465-10470.

- Nalini Sehgal, M. D., Howard Smith, M. D., and Laxmaiah Manchikanti, M. D. (2011) Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control. *Pain Physician*, 14, 249-258.
- Naureckiene, S., Sreekumar, K., Ma, L., Purandare, U., Lo, C. F., Huang, Y., Chiang, L. W., Grenier, J. M., Ozenberger, B. A., Jacobsen, J. S., Kennedy, J. D, DiStefano, P. S., Wood, A., and Bingham B. (2003) Functional characterization of Narx 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*. 420(1), 55-67.
- Ness, T.J., and Gebhart, G.F. (1990) Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*, 41(2), 167-234.
- Nimmrich, V., Gross, G., (2012) P/Q-type calcium channel modulators. *British J. Pharmacol*. 167(4), 741–759.
- Nishio, M., Nakahara, M., Yuo, A., and Saeki, K. (2016) Human pluripotent stem cells: Towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases. *World Journal of Stem Cells*, 8(2), 56.
- Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diochot, S., Deval, E., and Lingueglia, E. (2010) Current perspectives on acid-sensing ion channels: new advances and therapeutic implications. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 3(3), 331-346.
- Nolte, W.M., Tagore, D.M., Lane, W.S., Saghatelian, A., (2009) Peptidomics of prolyl endopeptidase in the central nervous system. *Biochemistry*, 48 (50), 11971–11981.
- Nour, N., Mayer, G., Mort, J. S., Salvas, A., Mbikay, M., Morrison, C. J., Overall, C. M., Seidah N. G. (2005) The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol. Biol. Cell*, 16(11), 5215–5226.
- Nouschi, A. (2015) Identification des protéines de liaison à l'ARN contrôlant la traduction des ARNm 5'TOP et caractérisation de leur régulation par la voie mTOR (Doctoral dissertation, Sorbonne Paris Cité).
- Nyberg, F, Le Greves, P, Sundqvist, C., Terenius, L. (1984) Characterization of substance P(1-7) and (1-8) generating enzyme in human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun.*, 125, 244 250.

O

- Ohsawa, M., Mizoguchi, H., Narita, M., Nagase, H., Kampine, J.P., and Tseng, L.F. (2001) Differential antinociception induced by spinally administered endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(2), 592-597.
- Olson, T. H., Riedl, M.S., Vulchanova, L., Ortiz-Gonzalez X. R., Elde, R. (1998) An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats. *Neuroreport*, 9(6), 1109-1113.
- Ong SE, Foster, L, Mann, M. (2003) Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*. 29 (2), 124-130.
- Orduna, A. R. and Beaudry, F. (2016) Characterization of endoproteolytic processing of dynorphins by proprotein convertases using mouse spinal cord S9 fractions and mass spectrometry. *Neuropeptides*, 57, 85-94.
- Orsal, D. (2011) Étude comparative de trois modèles de douleurs neuropathiques chez le rat: étude comportementale, pharmacologique et analyse transcriptomique (Doctoral dissertation, Université Paris VI (Paris)).
- Ossipov, M.H., Dussor, G.O., and Porreca, F. (2010) Central modulation of pain. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3779-3787.

- Ossipov, M.H., Morimura, K., and Porreca, F. (2014) Descending pain modulation and chronification of pain. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 8(2), 143.
- Otsuka, M., and Yoshioka, K. (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Reviews* 73, 229-305.
- Otto, M., Dougher, M.J., Yeo, R.A. Depression, pain, and hemispheric activation. *J Nerv Ment Dis* 1989;177:210-8.
- Ouedraogo, R. (2013) La spectrométrie de masse: application à l'étude des cellules immunitaires (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).

P

- Page, N.M., Woods, R.J., Gardiner, S.M., Lomthaisong, K., Gladwell, R. T., Butlin, D.J. and Lowry, P.J. (2000) Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*, 405(6788), 797-800.
- Pailleux, F., and Beaudry, F. (2012) Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, 26.8 881-891.
- Pailleux, F., Vachon, P., Lemoine, J., and Beaudry, F. (2013) Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides*, 47(4), 261-271.
- Pandey, A., and Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788), 837-46.
- Pang, B., Zhu, Y., Lu, L., Gu, F., and Chen, H. (2016) The applications and features of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of traditional chinese medicine. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. Vol 2016, 7 pages.
- Parchman, M. L., Von Korff, M., Baldwin, L.M., Stephens, M., Ike, B., Crompton, D. and Wagner, E.H. (2017) Primary care clinic re-design for prescription opioid management. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 30(1), 44-51.
- Pasero, C., and McCaffery, M. (2010) Pain assessment and pharmacologic management. Elsevier Health Sciences.
- Pasquato, A., Pullikotil P., Asselin, M.C., Vacatello, M., Paolillo, L., Ghezzi, F., Basso, F., C. Di Bello, Dettin, M., Seidah N.G. (2006) The proprotein convertase SKI-1/S1P. In vitro analysis of Lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 281, 23471-23481.
- Patacchini, R., Giuliani, S., Turini, A., Navarra, G., and Maggi, C.A. (2000) Effect of nepadutant at tachykinin NK2 receptors in human intestine and urinary bladder. *European Journal of Pharmacology*, 398(3), 389-397.
- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., & Viswanath, V. (2003) ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(7), 529-539.
- Patterson, S.D. and Aebersold, R.H. (2003) Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*, 33, 311-323.
- Paul, W. and Steinwedel H. (1953) Ein neues Mass enspektrometer ohne Magnet feld. *RZeitschrift für Naturforschung A.*, 8(7), 448-450.

- Pauling, L., Corey R. B., Branson H. R. (1951) The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*; 37:205-211.
- Payen, J.F. (2002) *Bases Physiopathologiques et Evaluation de la Douleur* (65).
- Pejaver, V., Hsu, W.L., Xin, F., Dunker, A. K., Uversky, V.N., and Radivojac, P. (2014) The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification. *Protein Science*, 23 (8), 1077-1093.
- Peng, J., Elias, J. E., Thoreen, C.C., Licklider, L.J., and Gygi, S.P. (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC- MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *Journal of Proteome Research*, 2(1), 43-50.
- Pennefather, J.N., Lecci, A., Candenas, M.L., Patak, E., Pinto, F.M., and Maggi, C.A. (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences*, 74 (12), 1445-1463.
- Perone, M.J., and Castro M.G. (1997) Prohormone and proneuropeptide synthesis and secretion. *Histology and Histopathology*, 12(4), 1179-1188.
- Perry, R.H., Cooks, R. G. and Noll, R.J. (2008) Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 27 (6), 661-699.
- Persson, S, Le Greves, P., Thornwall, M., Eriksson, U., Silberring, J., Nyberg, F. (1995) Neuropeptide converting and processing enzymes in the spinal cord and cerebrospinal fluid. *Prog Brain Res.*, 104: 111-130.
- Pethő, G., and Reeh, P.W. (2012) Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiological Reviews*, 92(4), 1699-1775.
- Phinney, C.S., Murphy K.E., Welch, M.J., Ellerbe P.M., Long, S.E., Pratt, K.W., Schiller, S.B. · Sniegoski, L.T., ·Rearick, M.S. Vetter, T.W. Vocke, R.D. (1998) Definitive method certification of clinical analytes in lyophilized human serum: NIST Standard reference material (SRM) 909b. *Fresenius J Anal Chem*, 361, 71–80.
- Pierce, T.L. and Wessendorf, M.W. (2000) Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 18, 181-207.
- Plumel, M. (2015) *Optimisations des stratégies analytiques quantitatives en protéomique: application à l'étude des réponses adaptatives du métabolisme chez divers organismes* (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- Podvin, S., Yaksh, T., and Hook, V. (2016) The emerging role of spinal dynorphin in chronic pain: a therapeutic perspective. *Annual review of pharmacology and Toxicology*, 56, 511-533.
- Pogorzala, L.A., Mishra, S.K., and Hoon, M.A. (2013) The cellular code for mammalian thermosensation. *The Journal of Neuroscience*, 33(13), 5533-5541.
- Polettini, A. (2006) Applications of LC-MS/MS in toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 31, 1, 55-61.
- Polgár, L. (2002) The prolyl oligopeptidase family. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 349–362.
- Pomares, F.B. (2012) *Caractérisation de la réponse cérébrale à la douleur et ses modulations* (Doctoral dissertation, Université Lyon 1).
- Portenoy, R.K. (1996) Basic mechanisms, in Portenoy RK, Kan- ner RM (eds): *Pain Management: Theory and Practice*. Philadelphia, PA, Davis, pp 19-39.

- Pratt, J.M., Simpson, D.M., Doherty, M.K., Rivers, J., Gaskell, S.J., and Beynon, R.J. (2006) Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes." *Nat Protoc* 1(2): 1029-1043.
- Price, J. (2001) Investigations into central mechanisms of pain transmission (Doctoral dissertation, University of Glasgow).
- Puente, X.S., Gutiérrez-Fernández, A., Velasco, G. and López-Otín, C. (2005) A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 331–334.
- Pullikotil, P., S., Benjan, J., Mayne, Seidah NG (2007) The proprotein convertase SKI-1/S1P alternate translation and subcellular localization. *J. Biol. Chem.*, 282, 27402-27413.
- Pullikotil, P., Vincent, M., Nichol, S. T., and Seidah, N. G. (2004). Development of Protein-based Inhibitors of the Proprotein of Convertase SKI-1/S1P processing of SREBP-2, ATF6, and a viral glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17338-17347.

Q

- Quartara, L., Maggi, C.A., (1997) The tachykinin NK1 receptor. Part I: Ligands and mechanisms of cellular activation *Neuropeptides*, 31(6), 537–563.
- Quesada, V., Ordóñez, G. R., Sanchez, L. M., Puente, X. S., and López-Otín, C. (2009) The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1), D239-D243.

R

- Rabbani, S.N. and Patel Y.C. (1990) Peptides derived by processing rat prosomatostatin near the amino terminus: characterization, tissue distribution, and release, *Endocrinology* 126, 2054–2061.
- Raffin-Sanson, M. L., Mbikay, M., Chrétien, M. and Bertagna, X. (1997) Les cliniciens se convertissent aux convertases. *iPubli-Inserm Revue Médecine/Sciences*. Numéro 12.
- Raj, D. A., Fiume, I., Capasso, G., and Pocsfalvi, G. (2012) A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney International*, 81 (12), 1263-1272.
- Ramalho, R, Almeida, J, Beltrao M, Pirraco, A, Costa, R, Sokhatska, O., Moreira, A. (2013) Substance Pantagonist improves both obesity and asthma in a mouse model. *Allergy*, 68, 48–54.
- Ramos-Molina, B., Lick, A. N., Shirazi, A. N., Oh, D., Tiwari, R., El-Sayed, N. S. and Lindberg, I. (2015) Cationic cell-penetrating peptides are potent furin inhibitors. *PloS one*, 10(6), e0130417.
- Ranade, S. S., Syeda, R., and Patapoutian, A. (2015) Mechanically activated ion channels. *Neuron*, 87(6), 1162-1179.
- Ravelomanantsoa, S. H. (2016) Biologie des populations du complexe d'espèces *Ralstoniasolanacearum* appliquée à l'épidémiologie de la bactériose vasculaire de la pomme de terre à Madagascar (Doctoral dissertation, Ile La Réunion).
- Référent, G. (2017) Mise au point: prise en charge des douleurs de l'adulte modérées à intenses. Copyright © 2017 John Libbey Eurotext.
- Regragui, S. (2012) Caractérisation psychophysiques de la douleur dans une population de patients souffrant de symptômes douloureux chroniques (Doctoral dissertation, Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue).

- Rehfeld, J.F., Lindberg, I., Friis-Hansen, L. (2002) Increased synthesis but decreased processing of neuronal proCCK in prohormone convertase 2 and 7B2 knockout animals. *J. Neurochem.* 83,1329-1337.
- Rezaï, X. (2011) Activation et internalisation du récepteur aux opiodés delta en tranche aiguë hippocampique de souris (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- Rholam, M., and Fahy, C. (2009) Processing of peptide and hormone precursors at the dibasic cleavage sites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(13), 2075-2091.
- Ribeiro-da-Silva, A., Hokfelt, T., (2000) Neuroanatomical localisation of substance P in the CNS and sensoryneurons. *Neuropeptides*, 34, 256–271.
- Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J. M., Alonso, J. I. G., & Sanz-Medel, A. (2005) Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(2), 151-207.
- Roepstorff P, and Fohlman J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.* 11(11):601.
- Rösch, D., Gao, H., Kilaj, A. and Willitsch, S. (2016) Design and characterization of a linear quadrupole ion trap for high-resolution Coulomb-crystal time-of-flight mass spectrometry. *EPJ Techniques and Instrumentation*, 3(1), 1-14.
- Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A., Kohno, T., Lyons, D., Lichenstein, H.S. (1997) Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases, *J. Biol. Chem.* 272, 24588–24593.
- Rossier, J. (1988). Biosynthesis of opioid peptides, *Ann Endocrinol (Paris)*, 49(4-5), 371-373.
- Rouille, Y., Westermark, G., Martin, S. K., Steiner, D. F. (1994) Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1–6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3242-3246.
- Ruda, M. A., Bennett, G. J., Dubner R. (1986) Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. *Progress in Brain Research*, 66, 219-268.
- Rusconi, F. (2011) Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes. Lavoisier.
- Rusconi, F., Schmitter, J. M., Rossier, J., and le Maire, M. (1998) Chromatographic separation and sample preparation in one step for MALDI mass spectrometric analysis of subpicomole amounts of heterogeneous protein samples. *Analytical Chemistry*, 70(14), 3046-3052.
- S**
- Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Besseyre, J., Bergström, L., and Glowinski, J. (1987) Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain. *Peptides*, 9, 227–241.
- Sagan, S., and Bolbach, G. (2009) Analyse des protéines membranaires par spectrométrie de masse: toujours un amour impossible. *Spectra Anal*, 270, 19-21.
- Sahbaie, P., Shi, X., Li, X, Liang, D., Guo. T. Z., Qiao, Y., Yeomans, D. C., Kingery, W. S., David, Clark, J. (2012) Preprotachykinin-A gene disruption attenuates nociceptive sensitivity after opioid administration and incision by peripheral and spinal mechanisms in mice. *Journal of Pain.*;13(10):997-1007.
- Sakr, C. (2007) La proprotéine convertase PCSK9: est-ce une protéase en trans? Mémoire Université de Montréal Mémoire d'obtention du grade de Maître ès Sciences en Biochimie. 87p.

- Sakurada, S., Hayashi, T., Yuhki, M., Orito, T., Zadina, J. E., Kastin, A. J. and Tseng, L. F. (2001) Differential antinociceptive effects induced by intrathecally administered endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *European Journal of Pharmacology*, 427(3), 203-210.
- Salio, C., Lossi, L., Ferrini, F., and Merighi, A. (2006) Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 583-598.
- Salvas, A. (2004) Inhibition cellulaire de la proprotéine convertase 1 et activité des proprotéines convertases dans le réticulum endoplasmique (Mémoire Maître ès sciences en biochimie, UM).
- Sanderson, N. K., Skinner, K., Julius, D., Basbaum, A.I., (2004) Co-localization of endomorphin-2 and substance P in primary afferent nociceptors and effects of injury: a light and electron microscopic study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 19 (7), 1789–1799.
- Sandkühler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological reviews*, 89(2), 707-758.
- Sargent, M, Harrington C, Harte R. (2002) Guidelines for achieving high accuracy in isotope dilution mass spectrometry (IDMS). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Sauliere, A. (2007) Etapes membranaires de la transduction du signal par les récepteurs couplés aux protéines G: organisation dynamique du récepteur mu aux opioïdes humain à la surface de neuroblastomes (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Scamuffa, N., Calvo, F., Chrétien, M., Seidah, N. G., and Khatib, A. M. (2006). Proprotein convertases: lessons from knockouts. *The FASEB Journal*, 20(12), 1954-1963.
- Schäfer, M., Carter, L., and Stein, C. (1994) Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4219-4223.
- Schäfer, M.K-H, Day, R., Cullinan, W.E, Chrétien, M., Seidah N.G, Watson S.J. (1993) Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS : a comparative in situ hybridization analysis. *J. Neurosci*; 1(3), 258-79.
- Schaible, H.G. (2006) Peripheral and central mechanisms of pain generation. In *Analgesia* (pp. 3-28). Springer Berlin Heidelberg.
- Schierhorn, K., Hanf, G., Fischer, A., Umland, B., Olze, H., Kunkel, G. (2002) Ozone induced release of neuropeptides from human nasal mucosa cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 129, 145-151.
- Scholz, J., and Woolf, C. J. (2002) Can we conquer pain?. *Nature neuroscience*, 5, 1062-1067.
- Schrader, M., and Schulz-Knappe, P. (2001) Peptidomics technologies for human body fluids. *Trends in Biotechnology*, 19(10) S55-60.
- Schreff, M., Schulz, S., Wiborny, D., Holtt, V. (1998) Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport*, 9, 1031-1034.
- Schröder, W., Lambert, D.G., Ko, M.C., and Koch, T. (2014) Functional plasticity of the N/OFQ-NOP receptor system determines analgesic properties of NOP receptor agonists. *British Journal of Pharmacology*, 171(16), 3777-3800.
- Schlichter, R. (2007) CS03 Les récepteurs P2X de l'ATP dans le système nociceptif spinal : rôle dans les douleurs neuropathiques. *Canaux Ioniques et Douleurs Neuropathiques*. 8, 13–14.
- Schulte, J., Bohm, M. C. and Ramirez, R. (1998) The isotope effect in electronic expectation values: an all-quantum study of C6 H6 and C6 D6. *Molecular Physics*, 93(5), 801-807.

- Schulz-Knappe, P., Zucht, H.D., Heine, G., Jürgens, M., Hess, R., Schrader, M. (2001) Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*; 4(2), 207-217.
- Schwartz, J. C., Wade, A. P., Enke, C. G., Cooks, G. R. (1990) Systematic delineation of scan modes in multidimensional mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 62, 1809-1818.
- Scigelova, M., and Makarov A. (2006) Orbitrap mass analyzer-overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6(Suppl 2), 16-21.
- Scott DL, Roden S, Marshall T, and Kendall MJ (1982) Variations in responses to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Clin Pharmacol* 14:691–694
- Seidah, N. G. (2011 b) The proprotein convertases, 20 years later. *Proprotein Convertases*, 23-57.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S. and Chrétien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 928-933.
- Seidah, N.G. (2011 a). What lies ahead for the proprotein convertases?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220(1), 149-161.
- Seidah, N.G. and Prat, A. (2007) The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J. Mol. Med.* 85, 685-696.
- Seidah, N.G., Abifadel, M., Prost, S., Boileau, C., and Prat, A. (2017) The proprotein convertases in hypercholesterolemia and cardiovascular diseases: emphasis on proprotein convertase subtilisin/kexin 9. *Pharmacological Reviews*, 69(1), 33-52.
- Seidah, N.G., Chrétien, M. (1999) Proprotéines et prohormone convertases: une famille de subtilases générant divers polypeptides bioactifs. *Brain Res.*, 848, 45-62.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong W., Tadros, H., Mbikay, M., Chretien, M. and Day, R. (1996) cDNA structure, tissue distribution and chromosomal localization of rat PC7: a novel mammalian convertase closest to yeast kexinlike proteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 3388-3393.
- Seidah, N.G., Khatib, A. M, and Prat A. (2006) The Proprotein Convertases and their Implication In Sterol and/or Lipid Metabolism. *Biol. Chem.* 387, 871-877.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C., Murphy R.A., Chretien M., Marcinkiewicz M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96, 1321–1326.
- Seizinger, B.R., Grimm, C., Höllt, V., and Herz, A. (1984). Evidence for a selective processing of proenkephalin B into different opioid peptide forms in particular regions of rat brain and pituitary. *Journal of neurochemistry*, 42(2), 447-457.
- Sekizawa, K., Ujiiie, Y., Sasaki, H., Takishima, T. (1992) Substance P: An endogenous cough inducer. *Neuropeptides*, 22(1): 60-61.
- Sendur, P., Ceranowicz, P., Sendur, R., Cieszkowski, J., Warzecha, Z., Dembiński, A. (2013) Involvement of endogenous tachykinins in the development of jejunal mucosa injury induced by on-steroidal anti-inflammatory drugs. *Przegląd Lekarski*, 70(2), 48-52.

- Senko, M.W., Remes, P.M., Canterbury, J.D., Mathur, R., Song, Q., Eliuk, S.M., and Bui, H. (2013). Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates. *Analytical Chemistry*, 85(24), 11710-11714.
- Serra, M.C., Calzetti, F., Ceska, M., Cassetella, M.A. (1994) Effect of substance P on superoxyde anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology*, 82, 63-69.
- Severini, C., Improta, G., Falconieri-Ersparmer, G., Salvadori, S., and Ersparmer, V. (2002).The tachykinin peptide family. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 285-322.
- Shah, L., Bansal, V., Rye, P. L., Mumtaz, N., Taherian, A., and Fisher, T. E. (2014) Osmotic activation of phospholipase C triggers structural adaptation in osmosensitive rat supraoptic neurons. *The Journal of Physiology*, 592(19), 4165-4175.
- Sherrington, C.S. (1906) *The Integrative Action of the Nervous System*. Scribner, New York.
- Shimizu, Y., Matsuyama H., Shiina, T., Takewaki, T., Furness, J.B. (2008) Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci.*, 65, 295–311.
- Siebenhuener, K., Eschmann, E., Kienast, A., Schneider, D., Minder, C. E., Saller, R., (2017) Chronic Pain: How Challenging Are DDIs in the Analgesic Treatment of Inpatients with Multiple Chronic Conditions? *PLoS ONE* 12(1): e0168987. doi:10.1371/journal.pone.0168987.
- Siezen, R.J. and Leunissen, J.A.M. (1997) The superfamily of subtilisin-like serine proteases *Protein Sci.*, 6, 501–523.
- Simon, R. (2012) *La quantification ciblée de protéines et peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem: développements analytiques et applications (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I)*.
- Simons, C.T, Dessirier J.M, Jinks S.L, Carstens E. (2001) An animal model to access to intra-oral capsaicin: Increased threshold in mice lacking substance P. *Chem. Senses*, 26, 491-497.
- Skidgel, R.A., and Erdös, E. G. (1987) The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme. *clinical and experimental hypertension. Part A: Theory and Practice*, 9(2-3), 243-259.
- Skilling, S.R., Smullin, D. H., and Larson, A. A. (1990) Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of amino acid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. *The Journal of Neuroscience*, 10(4), 1309-1318.
- Sluka, K.A., Milton, M.A., Willis, W. .D., Westlund, K.N. (1997) Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 120 (7), 1263–1273.
- Smith, J.C., Lambert, J. P., Elisma, F., Figeys, D. (2007) Proteomics in 2005/2006: developments, applications and challenges. *Annal. Chem.*, 79, 4325-4343.
- Smith, R.D., Loo, J.A., Barinaga, C.J., Edmonds, C.D., and Udseth, H.R. (1989) Capillary zone electrophoresis and isotachopheresis—mass spectrometry of polypeptides and proteins based upon an electrospray ionization interface. *Journal of Chromatography A*, 480, 211-232.
- Smith, R.D., Loo, J.A., Edmonds, C.G., Barinaga, C.J., and Udseth, H.R. (1990) New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, 62(9), 882-899.
- Snijdelaar, D.G., Dirksen, R., Slappendel, R., and Crul, B.J. (2000) Substance P. *European Journal of Pain*, 4(2), 121-135.

- Snyder, L.R., Kirkland, J., Glach, L. (1997) Practical HPLC Method Development, Wiley, New York, 439-478.
- Snyder, S. H., and Pasternak, G.W. (2003) Historical review: opioid receptors. Trends in pharmacological sciences, 24(4), 198-205.
- Soares, S., Franco, C., Pires, E., Ventosa, M., Plhinhas, R., Koci, K., de Almeida A. M., Coelho, A. V. (2012) Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. Journal of Proteomics, 75, 4190-4206.
- Sojo, L.E., Lum, G., and Chee, P. (2003) Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS. Analyst, 128(1), 51-54.
- Sossin, W.S., Fisher, J.M., and Scheller, R.H. (1989). Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. Neuron, 2(5), 1407-1417.
- Southey, B.R., Amare, A., Zimmerman, T.A., Rodriguez-Zas, S.L., and Sweedler, J.V. (2006) NeuroPred: a tool to predict cleavage sites in neuropeptide precursors and provide the masses of the resulting peptides. Nucleic Acids Research, 34(2), W267-W272.
- Souza, A.P., Sobrinho, D. B., Almeida, J. F., Alves, G. M., Macedo, L.M., Porto, J.E., Vêncio, E.F., Colugnati, D. B., Santos, R.A., Ferreira, A.J., Mendes, E.P., Castro, C.H., (2013) Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. Clinical Science. 125(9):449-459.
- Spitznagel, H., Baulmann, J., Blume, A., Unger, T., and Culman, J. (2001) C-FOS expression in the rat brain in response to substance P and neurokinin B. Brain Research, 916(1), 11-21.
- Srebalus Barnes, C.A., and Lim, A. (2007) Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. Mass Spectrom. Rev. 26, 370-388.
- Stein, C., Machelska, H., Schäfer, M. (2001) Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. Zeitschrift für Rheumatologie.;60(6):416-424.
- Steinhoff, M.S., Von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., and Bunnett, N.W. (2014) Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. Physiological Reviews, 94(1), 265-301.
- Stengel E, Oldham AJ, Ehrenberg AS. Reactions to pain in various abnormal mental states. J Ment Sci 1955;101:52-69.
- Steyn, F. J., Tolle, V., Chen, C., and Epelbaum, J. (2016) Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. Comprehensive Physiology.
- Stokvis, E., Rosing, H., and Beijnen, J. H. (2005) Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 19(3), 401-407.
- Studer, R.O., Trzeciak, A., Lergier, W. (1973) Isolierung und aminos uresequenz von substanz P aus Pferdedarm. Helv Chim Acta 56, 860-866.
- Sun, H.L., Tsai, W.C., Li, B.Y., Tao, W., Chen, P.S, Rubart, M. (2016) Voltage-Induced Ca²⁺ Release in Postganglionic Sympathetic Neurons in Adult Mice. Guerrero-Hernandez A, ed. PLoS ONE. 11(2), e0148962.
- Suzuki, R., Rygh, L. J., and Dickenson, A. H. (2004). Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. Trends in Pharmacological Sciences, 25(12), 613-617.

Suzuki, M., Sato, J., Kutsuwada, K., Ooki, G., Imai, M. (1999) Cloning of a stretch-inhibitable nonselective cation channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6330- 6335.

Szallasi, A., and Blumberg, P. M. (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 51(2), 159-212.

T

Tadros, H., Chrétien, M., and Mbikay, M. (2001). The testicular germ-cell protease PC4 is also expressed in macrophage-like cells of the ovary. *Journal of Reproductive Immunology*, 49(2), 133-152.

Tajerian M, Alvarado S, Millicamps M, Vachon P, Crosby C, Bushnell MC, et al. Peripheral Nerve Injury Is Associated with Chronic, Reversible Changes in Global DNA Methylation in the Mouse Prefrontal Cortex. *PLoS ONE*. 2013; 8:e55259. [PubMed: 23383129]

Takeda, Y., and Krause, J. E. (1989). Neuropeptide K potently stimulates salivary gland secretion and potentiates substance P-induced salivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 392-396.

Talbot, J.D., Duncan, G.H., Bushnell, M.C. (1989) Effects of diffuse noxious inhibitory controls (DNICs) on the sensory-discriminative dimension of pain perception. *Pain*, 36, 231-238.

Tan-No, K., Takahashi, H., Nakagawasai, O., Nijima, F., Sato, T., Satoh, S., Sakuradac S., Marinovad Z., Yakovlevad,T., Bakalkind G.,and Terenius, L. (2005) Pronociceptive role of dynorphins in uninjured animals: N-ethylmaleimide-induced nociceptive behavior mediated through inhibition of dynorphin degradation. *Pain*, 113(3), 301-309.

Tang, C.M., Dichter, M., Morad, M. (1989). Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons. *Science*, 243(4897), 1474.

Tatemoto, K., Lundberg, J. M., Jörnvall, H., and Mutt, V. (1985). Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 128(2), 947-953.

Teixeira, D., Prudêncio, C., and Vieira, M. (2017) Development of a new HPLC-based method for 3-nitrotyrosine quantification in different biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 1046, 48-57.

Teodoro, F.C., Tronco Júnior, M. F., Zampronio A. R., Martini, A. C., Rae, G. A., Chichorro, J. G. (2013) Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. *Neuropeptides*, 47(3), 199-206

Terman, G.W., and Bonica, J.J. (2001) Spinal mechanisms and their modulation. Dans J.D. Loeser (Dir.), *Bonica's , Management of Pain* (p. 73-152). Philadelphie: Lippincott Williams and Watkins.

Thalhamer, B., Himmelsbach, M., and Buchberger, W. (2017) Trace level determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in a perfume using liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 32(1), 46-53.

Thébault, S., Machour, N., Perrot, F., Jouenne, T., Lange, C., Hubert, M., Fontaine, M; Tron, F. and Charlionet, R. (2001) Objet et évolution méthodologique de l'analyse protéomique. *iPubli-Inserm , Revue Médecine /Sciences*. NUM. 05.

Thibault, K. (2009) Étude comparative de trois modèles de douleurs neuropathiques chez le rat: étude comportementale, pharmacologique et analyse transcriptomique (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting EDGE: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev Mol. Cell Biol.*, 3, 753-766.
- Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A. S., Kotan, L. D., Porter, K. M., Serin, A., Mungan, N. O., Cook, J. R, Ozbek. M. N, Imamoglu S., Akalin4 N. S., Yuksel B., O'Rahilly S. and Semple R. K (2009) TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature Genetics*, 41(3), 354-358.
- Träbert, E. (2016) Guest Editor's Notes on the "Atoms" Special Issue on "Perspectives of Atomic Physics with Trapped Highly Charged Ions. *Atoms*, 4(1), 7.
- Trussell, L. O., & Fischbach, G. D. (1989). Glutamate receptor desensitization and its role in synaptic transmission. *Neuron*, 3(2), 209-218.
- Tsaprailis, G., Somogyi, A., Nikolaev, E.N., Wysocki, V.H. (2000) Refining the model for selective cleavage at acidic residues in arginine-containing protonated peptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, 95(196), 467-479.
- Tsui, S.L., Chen, P.P. and Ng, K.F.J. (Eds.) (2010) *Pain Medicine: A Multidisciplinary Approach (Vol. 1)*. Hong Kong University Press.
- Turk, D.C., and Okifuji, A. (2001) Pain terms and taxonomies. Dans Loeser D., Butler S. H., Chapman J. J., Turk D. C., Bonica's management of pain (3e édition). New York: Lippincott Williams and Wilkins. 18-25.
- Tyteca, E., Veuthey, J.L., Desmet, G., Guillarme, D., and Fekete, S. (2016) Computer assisted liquid chromatographic method development for the separation of therapeutic proteins. *Analyst*, 141(19), 5488-5501.
- U**
- Ueda, H., Miyamae, T., Hayashi C., Watanabe S., Fukushima, N., Sasaki, Y., Iwamura, T., Misu, Y. (1995) Protein kinase C involvement in homologous desensitization of δ -opioid receptor coupled to Gi1-phospholipase C activation in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 15,7485–7499.
- V**
- Vachon, P., Millecamps, M., Low, L., Thompson, S. J., Pailleux, F., Beaudry, F., ... & Stone, L. S. (2013). Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. *Behavioral and brain functions*, 9(1), 22.
- Valentin-Hansen, L., Park, M., Huber, T., Grunbeck, A., Naganathan, S., Schwartz, T.W., Sakmar, T.P. (2014) Mapping substance P binding sites on the neurokinin-1 receptor using genetic incorporation of a photoreactive amino acid. *J. Biol. Chem.* 289 (26), 18045–18054.
- Valentino, K.L., Tatemoto, K., Hunter, J. and Barchas, J. D. (1986) Distribution of neuropeptide K-immunoreactivity in the rat central nervous system, *Peptides* 7,1043-1059.
- Valkenburg, D., Mertens, I., Lemiere, F., Witters, E., and Burzykowski, T. (2012) The isotopic distribution conundrum. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(1), 96-109.
- Vallejo, R., de Leon-Casasola, O., and Benyamin, R. (2004) Opioid therapy and immunosuppression: a review. *American Journal of Therapeutics*, 11(5), 354-365.
- Van de Loo, J.W., Creemers, J.W., Bright, N. A., Young, B. D., Roebroek, A. J., Van de Ven, W.J. (1997) Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase. *J. Biol. Chem.* 272, 27116–27123.
- Van Loef, E.V.D., Dorenbos, P., Van Eijk, C. W. E., Krämer, K., and Güdel, H. U. (2001) High-energy-resolution scintillator: Ce 3+ activated La Br 3. *Applied Physics Letters*, 79(10), 1573-1575.

- Vasiliou, A.S., MacKenzie, A., Morris, R., McLaughlin, L., Bubb, V. J., Haddley, K., and Quinn, J.P. (2007) Generation of a transgenic model to address regulation and function of the human neurokinin 1 receptor (NK1R). *Neuropeptides*, 41(4), 195-205.
- Vatansever, B., Lahrichi, S. L., Thiocone, A., Salluce, N., Mathieu, M., Grouzmann, E., Rochat, B. (2010) Comparison between a linear ion trap and a triple quadrupole MS in the sensitive detection of large peptides at femtomole amounts on column. *Journal of Separation Science*. 33, 2478-2488.
- Vey, M, Schäfer, W, Berghöfer, S, Klenk, H. D., Garten, W. (1994) Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J. Cell. Biol*, 127(6 Pt 2), 1829–1842.
- Vidova, V., and Spacil, Z. (2017) A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta*. In press.
- Villanueva, J., Carrascal, M., and Abian, J. (2014) Isotope dilution mass spectrometry for absolute quantification in proteomics: concepts and strategies. *Journal of Proteomics*, 96, 184-199.
- Villeneuve, P., Feliciangeli, S., Croissandeau, G., Seidah, N. G., Mbikay, M., Kitabgi, P., Beaudet, A. (2002) Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J. Neurochem*. 82,783-793.
- Vivoli, M., Caulfield, T.R., Martínez-Mayorga, K., Johnson, A.T., Jiao, G.S., Lindberg, I., (2012) Inhibition of prohormone convertases PC1/3 and PC2 by 2,5-dideoxystreptaminederivatives. *Mol. Pharmacol*. 81 (3), 440–454.
- Vogel, C., and Marcotte, E.M. (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227-232.
- Volkow, N.D. and Morales, M. (2015) The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell*, 162(4), 712-725.
- Vuillet-A-Ciles, H. and Billet, F. (2013) L'essentiel pour comprendre la douleur. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(527), 18-20.

W

- Wahlert, A.1., Funkelstein L, Fitzsimmons, B., Yaksh, T., Hook, V. (2013) Spinal astrocytes produce and secrete dynorphin neuropeptides. *Neuropeptides*. 47(2),109-115.
- Walker JS, Nguyen TV, and Day RO (1994) Clinical response to non-steroidal anti-inflammatory drugs in urate-crystal induced inflammation: a simultaneous study of intersubject and intrasubject variability. *Br J Clin Pharmacol* 38:341– 347.
- Walker, J. S. (2003) Anti-inflammatory effects of opioids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 521, 148-155.
- Walther, T. C. and Mann, M. (2010) Mass spectrometry–based proteomics in cell biology. *The Journal of cell biology*, 190(4), 491-500.
- Wang, D., Li, Y.Q., Li, J.L., Kaneko, T., Nomura, S., Mizuno, N. (2000) Gammaaminobutyricacid- and glycine-immunoreactive neurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of the ratmedullary dorsalthorn. *Neurosci. Lett.* , 288 (3), 187–190.
- Wang, H., and Woolf, C. J. (2005) Pain TRPs. *Neuron*, 46(1), 9-12.
- Wang, J., Zhang, H., Gao, S., and Wang, J. (2015) Review on bioactive peptides and pharmacological activities of *buthus martensii karsch*. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, 4(166), 2167-0501.

- Wang, P. X., Li, Y.H., Li Y. J., GengTing, L.M.L., Ding, G., Wang, Z.Z., Xiao, W. (2014) Determination of protopine in rat brain tissues by RRLC-ESI/Q-TOF-MS Method. *Chinese Herbal Medicines*, 6(2), 125-130.
- Wang, X., Jia, S., Meyer, L., Xiang, B., Chen, L.Y., Jiang, N., Moreno, C., Jacob, H. J., Ghosh, S., Hessner, M.J. (2006) Comprehensive quality control utilizing the prehybridization third-dye image leads to accurate gene expression measurements by cDNA microarrays. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 1.
- Washburn, M.P., Wolters, D., and Yates, J.R. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*, 19(3), 242-247.
- Watanabe, Y., Kojima-Kumatsu, T., Iwaki-Egawa, A. and Fujimoto, Y. (1993) Increased excretion of proline-containing peptides in dipeptidyl peptidase IV-deficient rats, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 81, 323–350.
- Waxman, D.J. (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369(1), 11-23.
- Weinstock, J.V., Blum, A., Metwali, A., Elliott, D., Bunnett, N., and Arsenescu, R. (2003) Substance P regulates Th1-type colitis in IL-10 knockout mice. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3762-3767.
- Werle M and Bernkop-Schnürch A. (2006) Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*. 30, 351-367.
- Westman-Brinkmalm, A., and Brinkmalm, G. (2008) A mass spectrometer's building blocks. *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, 15-87.
- Wilaöcher, D. (2002). L'avenir nous apprendra peut-être. *Psychothérapie et chimiothérapie: quels rapports?*. *Revue Française de Psychanalyse*, 66(2), 361-369.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 14(1):61-5.
- Wilkinson, C.W. (2006) Roles of acetylation and other post-translational modification in melanocortin function and interactions with endorphins. *Peptides* 27, 453–471.
- Williams, C.A., Wu, S.Y., Dun, S.L., Kwok, E.H., Dun, N.J. (1999); Release of endomorphin-2 like substances from the rat spinal cord. *Neuroscience Letter*. 273(1): 25-28.
- Willis, Jr. W. D. and Coggeshall, R.E. (2012) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord: Volume 1 Primary Afferent Neurons and the Spinal Dorsal Horn*. Springer Science and Business Media.
- Willis, Jr.W.D. (1986) Central nervous system mechanisms for pain modulation. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 48(1-6), 153-165.
- Winchester, B. (2005) Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology*, 15(6), 1R-15R.
- Winsky-Sommerer, R., Benjannet, S., Rovere, C., Barbero, P., Seidah, N. G., Epelbaum, J., and Dournaud, P. (2000) Regional and cellular localization of the neuroendocrine prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 424(3), 439-460.
- Woda, A., and Pionchon, P. (2008) Nociception et douleur chronique orale et cervicofaciale. *Douleurs: Evaluation-Diagnostic-Traitement*, 9(3), 134-143.

- Wood, J.N., Boorman, J. P., Okuse, K., and Baker, M. D. (2004) Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *Journal of Neurobiology*, 61(1), 55-71.
- Woolf, C. J. (2010) What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3742-3744.
- Woolf, C.J. (2011) Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3), S2-S15.
- Woolf, C.J., and Mannion, R. J. (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet*, 353(9168), 1959-1964.
- Woolf, C.J., Salter, M.W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472), 1765-1768.
- Wouters, S., Decroly, E., Vandenbranden, M., Shober, D., Fuchs, R., Morel, V., Leruth, M., Seidah, N. G., Courtoy, P. J., Ruyschaert, J. M. (1999) Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS. Lett.* 456, 97-102
- Wu, L., Mashego, M. R., Van Dam, J. C., Proell, A. M., Vinke, J. L., Ras, C., Van Winden W. A., Van Gulikand W. M. Heijnen, J. J. (2005) Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ¹³ C-labeled cell extracts as internal standards. *Analytical Biochemistry*, 336(2), 164-171.
- Wu, X.N., Zhang, T., Qian, N.S., Guo, X.D., Yang, H.J., Huang, K.B., Luo, G.Q., Xiang, W., Deng, W.T., Dai, G.H., Peng, K.R., Pan, S.Y. (2015) Antinociceptive effects of endomorphin-2: suppression of substance P release in the inflammatory pain model rat. *Neurochem. Int.* 82, 1–9.

X

- Xu, W. (2016) Proprotein ConvertaseSubtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9): A PromisingTherapeutic Target for Cardiovascular diseases. *Enz. Eng.* 5, 155.
- Xu, X., Mei, H., Wang, S., Zhou, Q., Wang, G., Broske, L., Pena, A., and Korfmacher, W.A. (2005) A study of common discovery dosing formulation components and their potential for causing time-dependent matrix effects in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assays. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19, 2643-2650.

Y

- Yaksh, T.L., (1988) Substance P release fromknee joint afferentterminals: modulation by opioids. *Brain Res.* 458 (2), 319–324.
- Yamashita, M., and Fenn, J.B. (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme.*The Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451-4459.
- Yankner, B.A., Duffy, L. K. and Kirschner, D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid b protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 250(4978), 279-282.
- Yarmolinsky, D. A., Peng, Y., Pogorzala, L.A., Rutlin, M., Hoon, M.A., and Zuker, C.S. (2016) Coding and plasticity in the mammalian thermosensory system. *Neuron*. 92, 1079-1092.
- Yaron, A, and Naider, F (1993) Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 28, 160–186.
- Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradzky, K.F., Toneff, T., Bunday, R., Miller, R., Schilling, B., Petermann, I., Dehnert, J., Logvinova, A., Goldsmith, P., Neveu, J.M., Lane, W.S., Gibson, B.,

- Reinheckel, T., Peters, C., Bogyo, M., Hook, V. (2003) Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (16), 9590–5.
- Yin, P., Hou, X., Romanova, E.V., and Sweedler, J.V. (2011) Neuropeptidomics: mass spectrometry-based qualitative and quantitative analysis. *Neuropeptides: Methods and Protocols*, 223-236.
- Yin, R., Liu, D., Chhoa, M., Li, C. M., Luo, Y., Zhang, M. and Moyer, B. D. (2016) Voltage-gated sodium channel function and expression in injured and uninjured rat dorsal root ganglia neurons. *International Journal of Neuroscience*, 126(2), 182-192.
- Yongye, A. B., Vivoli, M., Lindberg, I., Appel, J. R., Houghten, R. A., Martinez-Mayorga, K. (2013) Identification of a small molecule that selectively inhibits mouse PC2 overmouse PC1/3: a computational and experimental study. *PLoS One* 8 (2), e56957.
- Yost, R.A., Enke, C. G., McGilvery, D. C., Smith, D. and Morrison, J.D. (1979) High efficiency collision-induced dissociation in an RF-only quadrupole. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 30(2), 127-136.
- Yu, X. H., Zhang, E.T, Craig, R., Shigemoto, R., Ribeiro-da-Silva A. (1999) NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *The Journal of Neuroscience*. 19(9), 3545-3555.
- Z**
- Zachariou, V. and Goldstein, B. D (1996) Kappa-opioid receptor modulation of the release of substance P in the dorsal horn. *Brain Res.*; 706, 80-88.
- Zadina, J. E., Hackler, L., Ge, L. J. and Kastin, A.J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the m-opiate receptor. *Nature*, 368, 499–502.
- Zeeuwen, P.L., Cheng, T., and Schalkwijk, J. (2009) The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(6), 1327-1338.
- Zhang, D., Li, S., Hu, L., Sheng, L. and Chen, L. (2015) Modulation of protease-activated receptor expression by *Porphyromonas gingivalis* in human gingival epithelial cells. *BMC oral Health*, 15(1), 128.
- Zhang, K., Schaab, M.R., Southwood, G., Tor, E.R., Aston, L.S., Song, W., and Tran, K. (2017) A collaborative study: determination of mycotoxins in corn, peanut butter, and wheat flour using stable isotope dilution assay (SIDA) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04872.
- Zhanga, D., Gang, L., Xinxin D., and Chuang, L. (2012) Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharm Sin B*, 2, 549–561.
- Zhou, A., Webb, G., Zhu, X., Steiner, D.F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 20745–20748.
- Zhu, X., and Lindberg, I. (1995) 7B2 facilitates the maturation of proPC2 in neuroendocrine cells and is required for the expression of enzymatic activity. *Journal of Cell Biology*, 129(6), 1641-1650.
- Zhu, X., Orci, L., Carroll, R., Norrbom, C., Ravazzola, M., and Steiner, D. F. (2002b) Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10299-10304.
- Zhu, X., Zhou, A., Dey, A., Norrbom, C., Carroll, R., Zhang, C., Laurent, V., Lindberg, I., Ugleholdt, R., Holst, J. J., Steiner, D.F. (2002a) Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and

- multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99,10293-10298.
- Zhu, Z. J., Schultz, A. W., Wang, J., Johnson, C. H., Yannone, S. M., Patti, G. J., and Siuzdak, G. (2013). Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature protocols*, 8(3), 451-460.
- Zimmer, A., Zimmer, A.M., Baffi, J., Usdin, T., Reynolds, K., König, M., and Mezey, É. (1998) Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2630-2635.
- Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 729-740.
- Zollner, C, Stein C. (2007) Opioids. *Handb. Exp. Pharmacol.* 177, 31–63.
- Zubieta, J. K., Heitzeg M. M., Smith Y. R., Bueller J. A., Xu K., Xu Y., Koeppe R. A., Stohler C. S., et Goldman D. (2003) COMT val58met genotype affects muopioidneurotransmitter responses to a pain stressor. *Science*, 299, 1240-1243.