

Université de Montréal

**À la recherche de meilleurs traitements analgésiques :
Interactions entre le récepteur opioïde δ et ses différents
agonistes.**

Par Alexandre LAGREOU

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Pharmacologie, option Neuropharmacologie

Septembre 2016

© Alexandre LAGREOU, 2016

Résumé :

Les opioïdes restent encore à l'heure actuelle les composés pharmacologiques les plus efficaces pour traiter les différentes formes de douleurs, et donc fournir une analgésie thérapeutique. Cependant, l'administration répétée de ces composés entraîne des effets secondaires majeurs comme la dépression respiratoire, la tolérance, mais également, il a été montré que certains de ces opioïdes pouvaient engendrer des états proépileptiques. D'un point de vue thérapeutique, il existe donc un réel besoin pour de nouveaux et meilleurs traitements analgésiques, n'élicitant pas ces effets secondaires. Notre laboratoire étudie la signalétique des récepteurs couplés aux protéines G comme les récepteurs opioïdes et leur capacité de sélectivité fonctionnelle depuis des années, et en particulier celle du récepteur delta opioïde (DOP). En effet, celui-ci présenterait moins d'effets indésirables que le récepteur mu opioïde (MOP) qui est la cible principale des opioïdes classiques comme la morphine. Cependant, il semblerait que le DOP justement soit à l'origine des états proépileptiques précédemment décrits. Ainsi malgré la promesse initiale des agonistes delta par rapport à la diminution des effets secondaires, les effets proépileptiques de certains ont notamment contribué à une baisse d'intérêt vers le DOP et aucun de ses agonistes n'a pu passer les phases de tests cliniques. Cependant, il a été démontré que certains agonistes delta n'entraînaient pas d'effet proépileptique; tandis que d'autres oui. Comment expliquer un tel phénomène ? Ceci est la question que pose la présente recherche. Ainsi notre objectif sera d'obtenir et de comparer les signatures pharmacologiques des agonistes connus pour être proépileptiques versus ceux qui ne le sont pas ; par rapport à la transduction de signal via le récepteur delta opioïde et sa protéine G hétérotrimérique ; et par rapport à un de ses effecteurs principaux pour l'analgésie, un canal potassique rectifiant entrant. Cette comparaison se fera selon les paramètres du modèle classique de la pharmacologie, comme l'efficacité et la puissance ; mais également avec un outil plus récent appelé modèle opérationnel, utilisant des paramètres comme l'affinité et le coefficient de transduction. Pour se faire, le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence ou BRET sera utilisé afin de caractériser les différentes voies signalétiques impliquées. Cette recherche s'inscrit dans un vaste contexte de collaboration entre différents laboratoires, et au sein de chacun d'entre eux, dans l'espoir de pouvoir synthétiser un jour, de meilleurs composés pharmacologiques, capables de cibler uniquement les voies médiatrices des effets thérapeutiques voulus, ici l'analgésie ; sans éliciter celles entraînant les effets secondaires associés, ici, les états proconvulsifs. L'aboutissement de cette recherche permettrait donc d'impacter la vie de millions de gens en souffrance, et c'est pourquoi il nous semble plus qu'important de continuer à l'entreprendre.

Mots-clés : Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET), Récepteur opioïde delta (DOP), Analgésie, Sélectivité fonctionnelle, Biais, Convulsions, Modèle opérationnel.

Abstract :

Opioids are still nowadays the most efficacious pharmacological compounds available to treat the different types of pain, and therefore provide a therapeutic analgesia. However, repeated administration of those compounds lead to major secondary effects like respiratory depression, tolerance, but also it was shown that some opioid compounds could induce seizures. From a therapeutical point of view, there is a serious need for new and better analgesic treatments that do not elicit such adverse effects. Our lab has been studying for years the signaletics of G-protein coupled receptors like the opioid receptors, and their capacity for functional selectivity, especially more recently the one of the delta opioid receptor (DOP). Indeed, this receptor elicits fewer adverse effects compared to the mu opioid receptor (MOP) that is the main target of all clinically used opioids such as morphine. However, it seems like the DOP itself would be responsible for the pro-epileptic states previously described. Thus, despite initial promises of the delta agonists towards reducing adverse effects whilst providing analgesia, the pro-convulsive effects that some seem to elicit have induced a loss of interest towards the DOP, and so far none of its agonists have gone further than pre-clinical trials. However, it has been shown that not all of those DOP agonists had those pro-convulsive adverse effects. How to explain such a phenomenon? This is the question which the present research will be asking. Thus our goal is to obtain and compare pharmacological signatures of the agonists known for being pro-convulsive versus those that are not ; regarding the transduction of signals through the delta opioid receptor and its heterotrimeric G-Protein ; and also regarding one of its main effectors to induce analgesia, an inwardly rectifying potassium channel. This comparison will be done according to the classical parameters of pharmacology, such as efficacy and potency ; but also according to the newest operational model, with parameters such as affinity and transduction coefficients. In order to do so, bioluminescence resonance energy transfer or BRET, will be used in order to characterize and quantify the signalling pathways there implicated. This research is embedded in a vast collaboration context, in between laboratories around the world, and within those laboratories as well, in hope to be able to one day synthesize, better pharmacological compounds, capable of targeting only the pathways responsible for the desired effects, here analgesia ; without triggering the associated adverse effects, here pro-convulsive states. The culmination of this research could allow to impact the lives of millions of people throughout the world, and this is why it is more than important for us to keep on pursuing it.

Keywords : G Protein-Coupled Receptor (GPCR), Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), delta opioid receptor (DOP), Analgesia, functional selectivity, biased agonism, seizures, operational model.

Table des matières :

Résumé :.....	1
Mots-Clés :.....	2
Abstract :.....	3
Keywords :.....	4
Table des matières :	5
Liste des tableaux :.....	8
Liste des figures :.....	10
Liste des sigles :.....	12
Liste des abréviations :.....	13
Remerciements :.....	17
1. Introduction :.....	18
1.1 Mise en contexte, la nociception, l’analgésie et les opioïdes :	18
1.1.1 Mise en contexte :	18
1.1.2 La nociception :	18
1.1.3 L’analgésie et les opioïdes :	21
1.2 Le récepteur opioïde δ : ses promesses, et ses inconvénients :	23
1.2.1 Le récepteur opioïde δ et ses promesses :	23
1.2.2 Le récepteur opioïde δ et ses inconvénients :	25
1.3 Convulsions liées à l'agonisme δ : contexte, pathophysiologie, et bilan actuel	26

1.3.1 Les convulsions liées à l'agonisme delta, mise en contexte :	26
1.3.2 Les convulsions liées à l'agonisme delta, pathophysiologie :	28
1.3.3 Les convulsions liées à l'agonisme delta, bilan actuel :	30
1.4 Hypothèse de travail, et objectifs de la thèse	31
1.4.1 Hypothèse de travail	31
1.4.2 Objectifs de la thèse	32
2. Matériels & Méthodes :	33
2.1 Réactifs	33
2.2 Culture cellulaire	34
2.3 Plasmides	34
2.4 Transfection	35
2.5 Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence (BRET)	36
2.6 Analyse des données	38
3. Résultats :	40
3.1 Biosenseurs des sous-unités des protéines G	40
3.1.1 [G- α 1.RlucII versus G- γ 2.GFP10]	40
3.1.2 [G- α oa.RlucII versus G- γ 2.GFP10]	43
3.1.3 [G- α ob.RlucII versus G- γ 2.GFP10]	46
3.2 Biosenseur du canal potassique Kir3	49
3.3 Analyse des données grâce au modèle opérationnel	52
4. Discussion :	65
5. Conclusion	77
Bibliographie.....	79

Annexe n°1	93
Annexe n°2	97
Annexe n°3	101
Annexe n°4	102

Liste des tableaux :

- **Tableau I** : Identification et classification des agonistes étudiés en fonction de leur nature (peptidique ou non), de leurs potentiels effets proconvulsivants, selon les doses et méthodes d'administration, tels que décrits dans la littérature existante sur le sujet **p.26**
- **Tableau II** : Exemple d'une grille de transfection réalisée en fonction de chaque biosenseur étudié, référençant les plasmides respectivement nécessaires pour les exprimer, en fonction de leurs concentrations respectives, et des ratios / quantité en μg de plasmide nécessaire par Petri transfecté **p.36**
- **Tableau III** : Données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- $\alpha 1$.RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] par activation du rat DOP, soit la pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal **p.42**
- **Tableau IV** : Données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- $\alpha 0$ A.RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] par activation du rat DOP, soit la pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal **p.45**
- **Tableau V** : Données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- $\alpha 0$ B.RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] par activation du rat DOP, soit le pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal **p.48**
- **Tableau VI** : Tableau des données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- $\gamma 2$.RlucII versus Kir3.2-GFP10] par activation du rat DOP, soit la pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal **p.51**
- **Tableau VII** : Compilation pour chaque biosenseur des coefficients de transduction ($\text{Log } \tau / K_a$) et de leur erreur type respective, obtenue grâce à l'équation du modèle opérationnel **Annexe n°2 page 97**
- **Tableau VIII** : Compilation pour chaque biosenseur des coefficients de transduction normalisés / relatifs à ceux du ligand de référence (met-enképhaline) : $\Delta \text{Log } \tau / K_a$, et de leur erreur type respective **p.54**

- **Tableau IX** : Mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs à ceux du ligand de référence (met-enképhaline) du biosenseur Kir, en fonction de ceux des biosenseurs alphas : $\Delta \Delta \text{Log } \tau / K_a$ ou facteur de polarisation, et leur erreur type respective **p.59**

- **Tableau X** : Mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs à ceux du ligand de référence (met-enképhaline) du biosenseur α_{i1} , en fonction de ceux des biosenseurs α_{oa} et α_{ob} : $\Delta \Delta \text{Log } \tau / K_a$ ou facteur de polarisation, et leur erreur type respective **p.62**

Liste des figures :

- **Figure n°1 :** Schéma général des voies de la douleur présentant les étapes de la nociception **p.20**
- **Figure n°2 :** Mode d'action des opioïdes : 2.a au niveau du système nerveux central ; et 2.b au niveau de la moelle épinière **p.21-22**
- **Figure n°3 :** Distribution anatomique des récepteurs opioïdes mu, delta et kappa, en fonction des zones du cerveau du rongeur (rat et souris) **p.24**
- **Figure n°4 :** Diagramme schématique représentant le circuit général axonal et dendritique, entre les cellules glutamatergiques pyramidales, et les principales populations d'interneurones GABAergiques dans la corne d'Ammon de l'hippocampe, en fonction de ses strates **p.29**
- **Figure n°5 :** Diagramme schématique représentant le fonctionnement du transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET) **p.37**
- **Figure n°6 :** Données obtenues grâce au biosenseur [G- α 1.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse **6a.** des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant ; **6b.** des agonistes connus pour être proconvulsivant et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu **p.40**
- **Figure n°7 :** Données obtenues grâce au biosenseur [G- α 0a.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse **6a.** des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant ; **6b.** des agonistes connus pour être proconvulsivant et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu **p.43**
- **Figure n°8 :** Données obtenues grâce au biosenseur [G- α 0b.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse **6a.** des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant ; **6b.** des agonistes connus pour être proconvulsivant et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu **p.46**
- **Figure n°9 :** Données obtenues grâce au biosenseur [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse **6a.** des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant ; **6b.** des agonistes connus pour être proconvulsivant et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu **p.49**

- **Figure n°10** : Diagramme de Kiviat obtenu à partir des $\Delta \log \tau / K_a$ ou coefficients de transductions normalisés / relatifs au ligand de référence pour chaque biosenseur et agonistes décrit **p.57**
- **Figure n°11** : Diagramme de Kiviat obtenu à partir de la mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs ($\Delta \text{Log } \tau / K_a$) : $\Delta \Delta \text{Log } \tau / K_a$ du biosenseur Kir3.2, en fonction des trois biosenseurs alpha **p.61**
- **Figure n°12** : Diagramme de Kiviat obtenu à partir de la mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs ($\Delta \text{Log } \tau / K_a$) : $\Delta \Delta \text{Log } \tau / K_a$ du biosenseur $\alpha i1$ en fonction des biosenseurs αoA et αoB **p.64**
- **Figure n°13** : Compilation de toutes les données obtenues grâce au biosenseur [G- $\alpha i1$.RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] **p.93**
- **Figure n°14** : Compilation de toutes les données obtenues grâce au biosenseur [G- αoA .RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] **p.94**
- **Figure n°15** : Compilation de toutes les données obtenues grâce au biosenseur [G- αoB .RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] **p.95**
- **Figure n°16** : Compilation de toutes les données obtenues grâce au biosenseur [G- $\gamma 2$.RlucII versus Kir3.2-GFP10] **p.96**
- **Figure n°17** : Données obtenues à partir des agonistes du Dr Gendron grâce au biosenseur [G- $\alpha i1$.RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] **p.99**
- **Figure n°18** : Données obtenues à partir des agonistes du Dr Gendron grâce au biosenseur [G- αoB .RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10] **p.100**
- **Figure n°19** : Données obtenues à partir des agonistes du Dr Gendron grâce au biosenseur [G- $\gamma 2$.RlucII versus Kir3.2-GFP10] **p.101**
- **Figure n°20** : Données obtenues grâce au biosenseur [G- $\gamma 2$.RlucII versus Cav2.2-GFP10] à partir d'agonistes proconvulsivants ou non **p.103**
- **Figure n°21** : Données obtenues grâce au biosenseur [G- $\gamma 2$.RlucII versus Cav2.2-GFP10] à partir des agonistes du Dr Gendron **p.104**

Liste des sigles :

- I.A.S.P : Association Internationale pour l'Étude de la Douleur
- IRIC : Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
- OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

Liste des abréviations :

- AC : Adénylyl cyclase
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- ADL5747 : N,N-diethyl-3-hydroxy-4-(spiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide
- ADL5859 : N,N-Diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide
- ARM390 / AR-M100390 : N,N-diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidene-methyl)-benzamide
- ATP : Adénosine triphosphate
- ATV : Aire tegmentaire ventrale
- β -arr : β -arrestine
- β -Funaltrexamine : (E)-4-[[[(5 α ,6 β)-17-(Cyclopropylmethyl)-4,5-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-yl]amino]-4-oxo-2-butenoic acid methyl ester hydrochloride
- BRET : Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence
- BW373U86 : 4-[(R)-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-prop-2-enylpiperazin-1-yl]-(3-hydroxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide
- Ca²⁺ : Ion calcique
- DADLE : [D-Ala², D-Leu⁵]-Enképhaline
- Deltorphine B / Deltorphine II : [D-Ala²]-Deltorphine II
- DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
- DOP ou DOPR : Récepteur opioïde δ
- DPDPE : [D-pénicillamine², D-pénicillamine⁵]-enképhaline
- DPLPE : [D-pénicillamine², L-pénicillamine⁵]-enképhaline
- EEG : Électroencéphalogramme
- Emax : Effet maximal

- ERK : Kinases régulées par signaux extracellulaires
- GABA : Acide- γ -amino-butyrique
- GDP : Guanosine diphosphate
- GFP : Protéine fluorescente verte
- GPCR / RPCG : Récepteur couplé aux protéines G hétérotrimériques
- GRK : Kinase des GPCR
- GTP : Guanosine triphosphate
- GTPase : Enzyme hydrolysant le GTP
- HEK-293 : Cellules embryonnaires de rein humain 293
- ICI 174,864 : [allyl]2-Tyr-alpha-amino-isobutyric acid (Aib)-Aib-Phe-Leu-OH
- I.C.V. : Intracérébroventriculaire
- K^+ : Ion potassique
- KNT-127 : 14-hydroxy-SN-28
- KO (« Knocked out ») : Invalidation génique
- KOR : Récepteur opioïde κ
- McpTIPP : Mcp-Tic-Phe-Phe-OH [Mcp, 4-(methyl-carboxamido) phenylalanine ; Tic, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid]
- Mg^{2+} : Ion magnésium
- μM : Micromolaire
- mM : Millimolaire
- MOP ou MOPR : récepteur opioïde μ
- Na^+ : Ion sodique
- nm : Nanomètre

- nM : Nanomolaire
- PAG : Substance grise périaqueducule
- PBS : Tampon phosphate salin
- PEI : Polyéthylènimine
- PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc
- PKC : Protéine kinase dépendante du Ca²⁺
- PKG : Protéine kinase dépendante du GMPc
- PLA2, PLC, PLD : Phospholipase de type A2, C, ou D
- R. Luc / R. LucII : Renilla luciférase / Renilla luciférase de type II
- SAR : Relation structure-activité
- SB-235863 : [8*R*-(4*bS*^{*},8*aa*,8*ab*,12*bb*)]-7,10-diméthyl-1-méthoxy-1-(2-méthylpropyl)-oxycarbonyl-5,6,7,8,12,12*b*-hexahydro-(9*h*)-4,8-methanobenzofuro[3,2*e*]pyrrolo[2,3-*g*]-isoquinoline hydrochloride
- SNC : Système nerveux central
- SNC-80 : (+)-4-[(α R)- α -((2*S*,5*R*)-4-allyl-2,5-diméthyl-1-piperaziny)-3-méthoxy-benzyl]-N,N-diéthyl-benzamide
- TRPA : « Transient Receptor Potential Ankyrin »
- TRPM : « Transient Receptor Potential Melastatin »
- TRPV : « Transient Receptor Potential Vanilloid »

« The scientific man does not aim at an immediate result. He does not expect that his advanced ideas will be readily taken up. His work is like that of the planter - for the future. His duty is to lay the foundation for those who are to come, and point the way. »

- Nikola Tesla

« If I have seen further, it is only by standing on the shoulders of giants. »

- Isaac Newton

Remerciements :

Avant tout, je tiens à sincèrement remercier ma famille et mes proches pour leur soutien et leur support à travers les années.

Je tiens à remercier la Dre Graciela PIÑEYRO ma directrice de recherche au Centre Hospitalier Universitaire Sainte Justine, ainsi que mon codirecteur Dr Louis GENDRON de l'Université de Sherbrooke, pour leur incroyable expertise, leur soutien, et leur supervision.

Je tiens également à remercier et l'ensemble de l'équipe de notre laboratoire, Karim NAGI, Derek ROBERTSON, Ahmed MANSOUR, Iness CHARFI, Hanieh BAGHERI, et Johanie CHARBONEAU, sans qui le travail expérimental quotidien ne serait pas le même.

Je tiens encore à remercier l'ensemble du Département de Recherche au Centre Hospitalier Universitaire Sainte Justine, rattaché à l'Université de Montréal, et l'ensemble de ses professeurs, particulièrement la Dre Audrey CLAING et le Dr Pierre BEAULIEU, membres de mon comité de parrainage.

Je tiens également à remercier nos collaborateurs, le Dr Hiroshi NAGASE, le Dr Peter SCHILLER, le Dr Terry HÉBERT, et enfin le Dr Terry KENAKIN, pour leurs contributions respectives.

Enfin, je tiens à remercier d'avance les correcteurs de ce mémoire, pour leur soutien et leur perspective afin de parachever mes travaux de rédaction.

Je dédie cet ouvrage à la mémoire de mon grand-père, Bernard, qui nous a quitté pour un monde meilleur lors de mes travaux pour la présente recherche ...

1. Introduction

1.1 Mise en contexte, la nociception, l'analgésie et les opioïdes.

1.1.1 La douleur est définie selon l'IASP et l'OMS comme étant : « Une expérience subjective sensorielle et émotionnelle désagréable en réponse à une atteinte tissulaire réelle, potentielle, ou décrite en ces termes ». À l'échelle mondiale, il est estimé que 20% des adultes souffrent d'une forme de douleur, et 10% d'entre eux sont diagnostiqués de douleur chronique chaque année (Goldberg & McGee, 2011).

1.1.2 La nociception est définie comme la capacité de percevoir la douleur. Elle est considérée comme étant un de nos sens, au même titre que la proprioception, la vision, l'odorat, le toucher, etc. Cette nociception permet donc à un organisme de détecter dans son environnement un stimulus qui lui est néfaste, comme marcher sur une épine. En effet lorsque cette hypothétique épine pénètre le derme de la voûte plantaire d'un être vivant comme *Homo sapiens*, l'intégrité de celle-ci est compromise, et de plus grandes atteintes tissulaires notamment, pourraient être entraînées si la douleur ne permettait pas de signaler la présence de cette épine.

Ainsi il est dit que la douleur est protectrice, car la nociception en plus des autres perceptions sensorielles nous informe de ces dangers potentiels, présent dans l'environnement dans lequel nous évoluons (Woolf & Ma, 2007). En effet, sous le derme humain se trouvent de nombreux récepteurs capables de nous informer sur notre environnement afin de pouvoir s'adapter à celui-ci. Il existe des récepteurs sensibles à la pression (barorécepteurs), des récepteurs à la température (TRPV pour la chaleur, et TRPM ou TRPA pour le froid), qui permettent donc d'adapter le comportement d'un individu en fonction des conditions environnementales dans lesquelles celui-ci évolue (Roosterman et al., 2006).

En effet afin de préserver l'intégrité physiologique de l'organisme, celui-ci a intérêt à réagir dans le cas éventuel où sa main se trouvait sur une surface brûlante, ou son pied sur des

épines. Et ici, tout est question de seuil, en effet si un individu plonge sa main temporairement dans de l'eau glacée, celui-ci percevra le froid grâce à ses TRPA et TRPM, mais si l'individu y maintient sa main pendant quelques minutes, le stimulus perçu comme froid, deviendra petit à petit un stimulus de douleur par stimulation des nocicepteurs présents sous le derme (Jordt et al., 2003).

Il existe deux grandes classes de nocicepteurs : les fibres A δ et les fibres C, qui sont donc tous deux responsables de la transduction du signal nociceptif (voir figure n°1 ; Fields, 2004). Les fibres A δ sont myélinisées, de diamètre moyen, et sont responsable de la douleur primaire : aiguë, rapide, et localisée. Les fibres C quant à elles sont non myélinisées, de petit diamètre, et celles-ci véhiculent la douleur secondaire : lente et moins bien localisée (Beaulieu et al., 2010). Ces fibres primaires afférentes se projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière, qui est organisée en couches distinctes anatomiquement. En effet, les fibres A δ se projettent aux lamina I et V ; alors que les nocicepteurs C projettent vers les lamina I et II (Basbaum et al., 2009).

Les neurones des lamina I et V constituent la principale efférence de la corne dorsale vers le cerveau, et sont donc à l'origine de multiples voies ascendantes, y compris les voies spinothalamique et spinoreticulothalamique, qui sont donc responsables de la transmission du signal nociceptif vers thalamus et le tronc cérébral respectivement (voir figure n°1 ; Fields, 2004). La voie spinothalamique est particulièrement impliquée par rapport à la localisation de la douleur (d'où provient le stimulus nociceptif, et quelle est son intensité) ; tandis que la voie spinoreticulothalamique est impliquée dans la signalisation des douleurs viscérales, moins localisable (Marchand, 2008).

À partir du tronc cérébral et du thalamus, l'information atteint ensuite les structures corticales, où il n'y a d'ailleurs pas réellement de région spécifique qui soit à part entière responsable de l'expérience douloureuse (Beaulieu, 2013). En effet, la perception de la douleur résulte de l'activation de multiples zones du cortex, notamment les zones S1 et S2 du cortex somato-sensoriel ; mais aussi le cortex cingulaire antérieur et le cortex insulaire, responsables de l'affect émotionnel lié à la douleur (Basbaum et al., 2009).

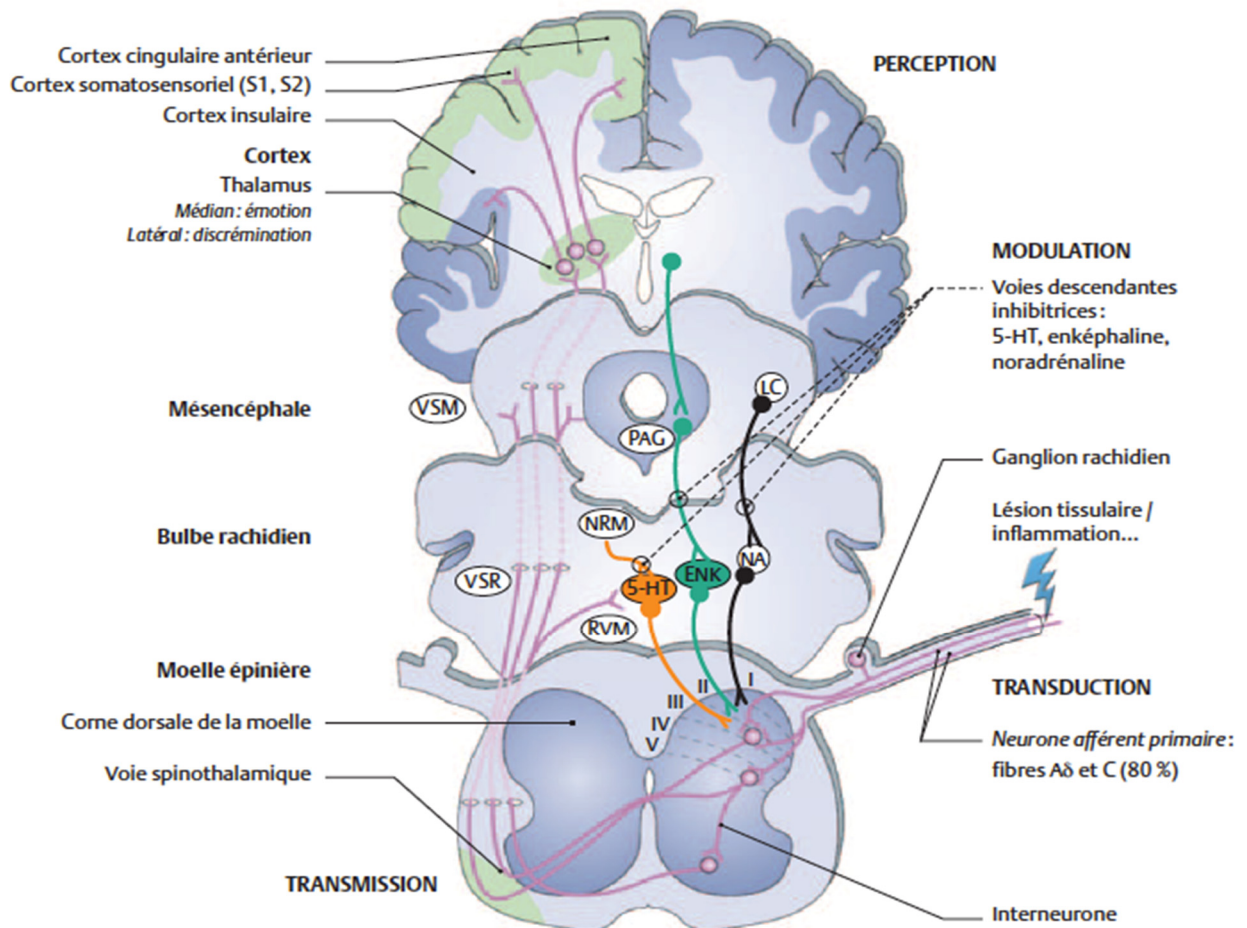
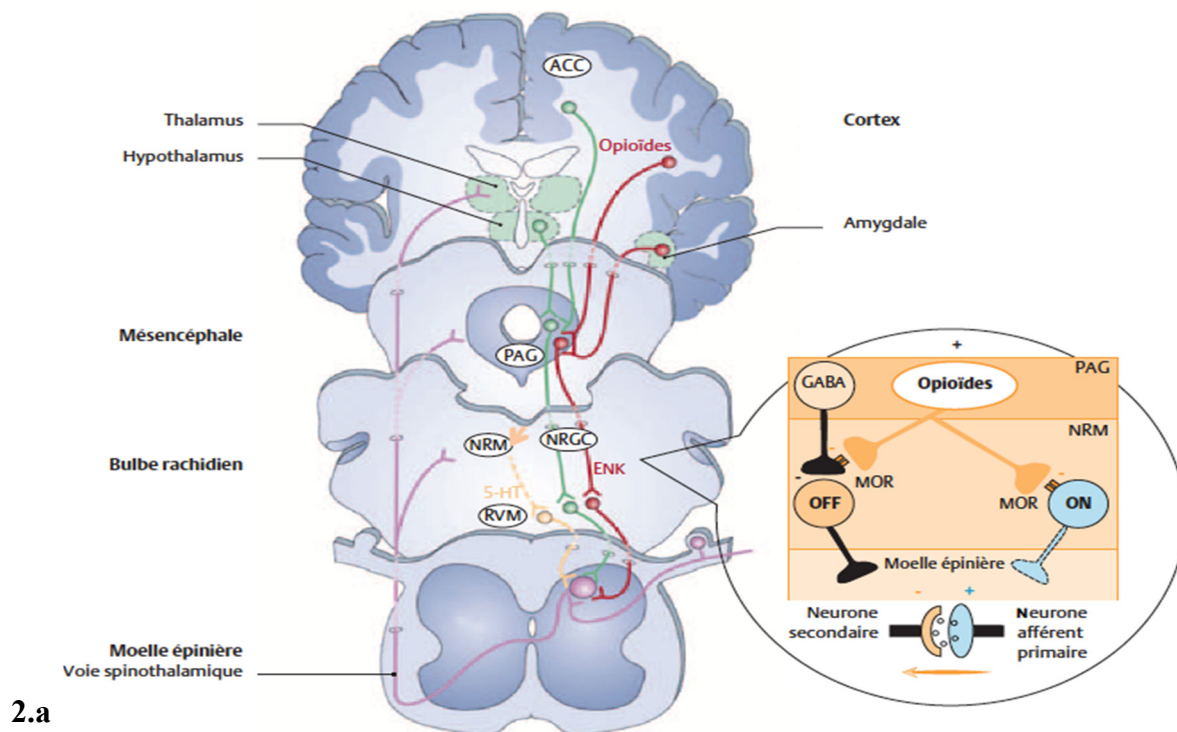


Figure n°1 : Schéma général des voies de la douleur présentant les étapes de la nociception : d'abord la transduction du signal nociceptif vers les voies ascendantes, puis la transmission de ce signal via la moelle épinière, ensuite la perception du stimulus nociceptif au niveau cortical, et enfin la modulation de la douleur par les voies descendantes inhibitrices. Légende : 5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine ; ENK : enképhaline ; LC : locus cœruleus ; NA : noradrénaline ; NRM : noyau du raphé magnus ; PAG : substance grise périaqueducale ; RVM : moelle rostroventromédiale ; VSM : voie spinomésencéphalique ; VSR : voie spinoréticulée. (Beaulieu, 2013 ; modifié d'après Fields, 2004).

La perception douloureuse ne résulte donc pas seulement de l'activation des voies nociceptives ascendantes, mais d'un véritable dialogue entre celles-ci et les différentes voies descendantes de rétrocontrôle de cette douleur, par l'intermédiaire des interneurons présents dans la corne dorsale, qui permettent donc de moduler ce signal nociceptif (Millan, 2002). Le cortex, le thalamus et le tronc cérébral incluant la substance grise périaqueducale (PAG), le noyau du raphé magnus (NRM) et le locus cœruleus (LC) y sont impliqués. La sérotonine et la

noradrénaline jouent un rôle prépondérant dans ces contrôles (Stamford, 1995). Les enképhalines, les endorphines, les endomorphines, les dynorphines, etc. sont aussi impliqués dans ces mécanismes (Argoff, 2011).

1.1.3 Ainsi il est possible de moduler notre nociception, car il existe un système dit endo-opioïde. Celui-ci fonctionne grâce aux récepteurs endogènes que nous possédons au niveau du SNC et en périphérie afin de moduler la nociception. Les récepteurs opioïdes (sans considérer le récepteur opioïde orphelin de la nociceptine, appelé aussi ORL1 ; Mollereau et al., 1994), desquels il en existe 3 types : le mu (MOP), le delta (DOP), et le kappa (KOR) (Buchen, 2012), sont activés via des peptides opioïdes endogènes comme l'endomorphine, les dynorphines, les endorphines, ou encore les enképhalines mentionnées précédemment (Garzon et al, 1983 ; Bodnar, 2012). Donc, comme *Homo sapiens* utilise lui-même des molécules de la famille des opioïdes pour moduler sa nociception, les opioïdes naturels en provenance du pavot (comme la morphine, la codéine), ou les opioïdes semi-synthétiques et synthétiques (comme le Fentanyl, Oxycodone, etc.) restent encore actuellement, les meilleurs composés pharmacologiques à notre disposition permettant de traiter les différentes formes de douleurs, et ainsi de fournir une analgésie thérapeutique (Al-Hasani & Bruchas, 2011).



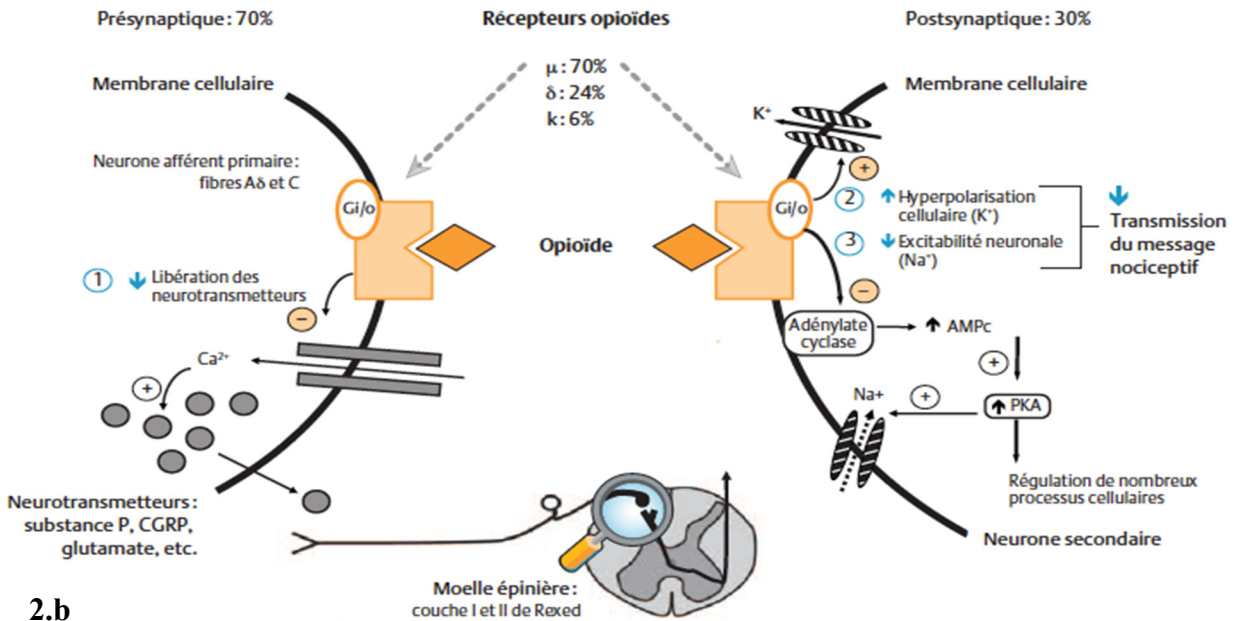


Figure n°2 : Mode d'action des opioïdes : **2.a** au niveau du système nerveux central ; et **2.b** au niveau de la moelle épinière. Légende : 5-HT : sérotonine ; ACC : cortex cingulaire antérieur ; ENK : enképhaline ; GABA : acide γ -aminobutyrique ; MOP : récepteur μ ; NRGC : noyau réticulo-(para)-gigantocellulaire ; NRM : noyau du raphé magnus ; PAG : substance grise périaqueducule ; ON / OFF : cellules « ON » et cellules « OFF » ; RVM : moelle rostroventromédiale. AMPc : AMP cyclique ; CGRP : calcitonin gene-related peptide ; PKA : protéine kinase A. (2.a : Beaulieu, 2013 - et 2.b : Beaulieu, 2013 ; modifié d'après Fields, 2004).

Cependant, l'administration répétée d'opioïdes est accompagnée de nombreux effets secondaires majeurs : dépression respiratoire, constipation, hyperalgésie (Lee et al., 2011), mais ironiquement aussi, la tolérance à l'analgésie elle-même (Nagi & Piñeyro, 2011), accompagnée également d'un certain potentiel d'abus (Benich, 2011). Il serait également question d'effets secondaires proépileptiques originant de l'hippocampe pour certains composés (Danielson et al., 2006), mais pas tous (Saitoh et al., 2011). En effet, la plupart de ces composés ciblent le récepteur mu et celui-ci est responsable des effets secondaires indésirables mentionnés précédemment, et notamment la tolérance à l'analgésie elle-même (Bohn et al., 2000), qui entraîne le besoin d'augmenter les doses régulièrement pour obtenir les mêmes effets, ce qui exacerbe toujours plus les effets secondaires conséquemment.

D'un point de vue clinique et thérapeutique, il existe donc un réel besoin pour de nouveaux et meilleurs traitements analgésiques, et c'est pourquoi le monde de la recherche en pharmacologie s'est intéressé à cibler les autres récepteurs opioïdes, delta et kappa (Mulder et al., 1984), afin de constater si les mêmes effets secondaires liés au mu étaient encore présents. En ce qui concerne le kappa, des effets secondaires principalement psychologiques ont pu être constatés comme des hallucinations, des effets de dissociation, de la dysphorie (Land et al., 2008), et ces propriétés analgésiques (Chavkin, 2011) n'étaient pas conséquentes, donc sa piste fut abandonnée concernant le traitement de la douleur.

Le récepteur delta quant à lui semble donc prometteur, car il n'aurait pas les effets secondaires du mu tout en gardant les propriétés antidouleur recherchées (Gavériaux-Ruff & Kieffer, 2011). Ces nuances fonctionnelles entre les différents récepteurs opioïdes s'expliquent en partie par rapport à la distribution différentielle des DOP par rapport aux MOP ou aux KOR (voir figure n°3, modifiée à partir de : Le Merrer et al., 2012).

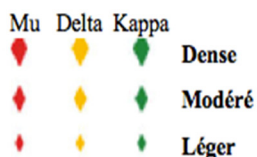
1.2 Le récepteur opioïde delta, ses promesses, et ses inconvénients.

1.2.1 Le récepteur opioïde delta reçut donc un intérêt nouveau par rapport à la recherche de voies alternatives pour fournir une analgésie thérapeutique sans avoir à faire face aux effets secondaires liés au récepteur mu (Pradhan et al., 2011). Différents agonistes ont donc été synthétisés afin de cibler le récepteur delta spécifiquement, par affinité avec ce dernier (Proteau-Gagné et al., 2010 ; Rochon et al., 2013).

Il a donc pu être constaté que les propriétés analgésiques du système opioïde delta étaient satisfaisantes par rapport au contexte thérapeutique, et de plus certaines études ont permis de démontrer que la tolérance à l'analgésie constatée avec le récepteur mu, n'était pas présente pour certains agonistes du récepteur delta (Gavériaux-Ruff, 2009 ; Nagi & Pineyro, 2011). Ainsi, cibler le DOP grâce à des agonistes sélectifs pour celui-ci serait une excellente alternative pour le traitement de la douleur chronique (Gendron et al., 2015).

Récepteurs opioïdes

Protéines



Corps cellulaires

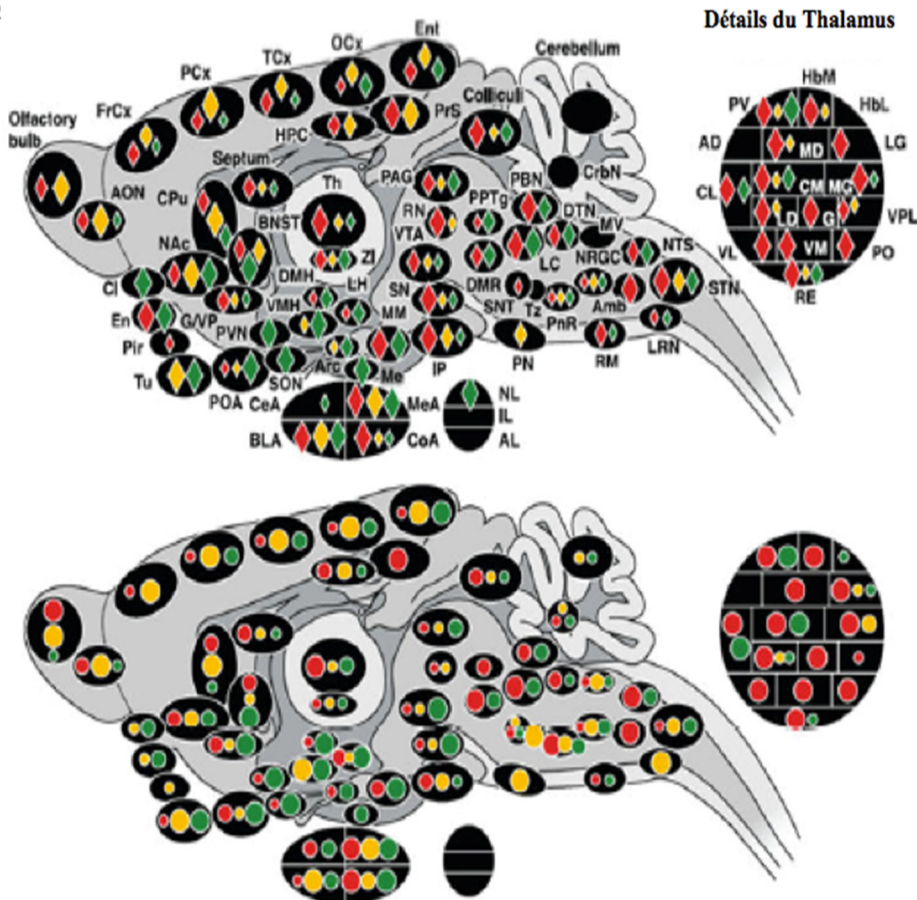
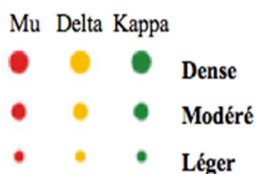


Figure n°3 : Distribution anatomique des récepteurs opioïdes mu, delta et kappa, en fonction des zones du cerveau du rongeur (rat et souris). Légende: Amb: noyau ambigu; AD: thalamus antérodorsal; AL: lobe antérieur; hypophyse; AON: noyau olfactif antérieur; Arc: noyau arqué; hypothalamus; BLA: noyau basolatéral; amygdale; BNST: noyau du lit de la strie terminale; CoA: noyau central amygdale; Cl: claustrum; CL: thalamus centrolatéral; CM: thalamus centromédial; CoA: noyau cortical amygdale; CPu: putamen caudé; CrbN: noyaux du cervelet; DMH: hypothalamus dorsomédial; DMR: raphé dorsal et médian; DTN: noyau tegmental dorsal; En: cortex endopiriforme; Ent: cortex entorhinal; FrCx: cortex frontal; G: noyau gélatineux, thalamus G/VP: globus pallidus/ pallidum ventral; HbL: habenula latérale; HbM: habenula médiale; HPC: hippocampe; IL: lobe intermédiaire, hypophyse; IP: noyau interpédonculaire; LC: locus coeruleus; LD: thalamus latérodorsal; LG: géniculé latéral, thalamus; LH: hypothalamus latéral; LRN: noyau réticulaire latéral; MD, thalamus médiadorsal; Me: éminence médiane; MEA: noyau médian, amygdale; MG: géniculé moyen; MM, noyau mamillaire moyen; MV, noyau vestibulaire médial; NAc: noyau accumbens; NL: lobe neuronal, hypophyse; NRG: noyau réticulaire gigantocellulaire; NTS: noyau du tractus solitaire; OCx: cortex occipital; PAG; PCx: cortex pariétal; Pir: cortex piriforme; PN: noyau pontin; PnR: pontin réticulaire; PO: thalamus postérieur; POA: aire préoptique; PPTg: noyau pédonculopontin; PrS: pr/subiculum; PV, thalamus paraventriculaire; PVN: hypothalamus paraventriculaire; RE: thalamus reuniens; RN: noyau rouge; RM: raphé magnus; SON: noyau supra-optique; SN: substantia nigra; SNT: noyau trijumeau sensoriel; STN:

noyau trigéminal spinal; TCx: cortex temporal; Th: thalamus; Tu: tubercule olfactif; Tz: noyau du corps trapézoïde; VL: thalamus ventrolatéral; VM :thalamus ventromédial; VMH: hypothalamus ventromédial; VPL: thalamus ventropostérolatéral; VTA: aire tegmentale ventrale; ZI: zona incerta. Modifiée à partir de : (Le Merrer et al., 2012)

Cette nouvelle piste thérapeutique offre donc une alternative intéressante pour le traitement de la douleur chronique qui restait problématique à ce jour, aux vues de la tolérance entraînée par les agonistes mu.

Aussi il a été démontré, sur différents modèles de douleur, que les agonistes delta sont capables d'être efficaces, notamment pour traiter la douleur neuropathique (Kabli & Cahill, 2007), mais également la douleur inflammatoire (Petrillo et al., 2003 ; Pradhan et al., 2013), et la douleur osseuse d'origine cancéreuse (Otis et al., 2011). De plus, ces agonistes du DOP auraient des propriétés additionnelles en tant qu'antidépresseurs (Jutkiewicz et al., 2003), cardioprotecteurs (Miller et al., 2015), et immunomodulateurs (Ranganathan et al., 2009).

1.2.2 Cependant, il a été démontré depuis quelques décennies déjà, que certains agonistes du récepteur delta pouvaient engendrer des convulsions (Tortella et al., 1984) ; mais pas tous (Tortella et al., 1985). Ces états proépileptiques déclenchés par l'activation du DOP proviennent d'ailleurs de l'hippocampe (Negus et al., 1994). Ils ont donc été un des principaux retardateurs de l'application clinique d'agonistes spécifiques du DOP.

Ceux-ci permettraient de traiter les différentes formes de douleurs chroniques mentionnées, ou encore de fournir des effets antidépresseurs, cardioprotecteurs, ou immunomodulateurs. Ainsi aucun agoniste du DOP n'a pu passer au-delà des tests cliniques à ce jour, et c'est pourquoi il nous semble important de mieux comprendre ces mécanismes proconvulsifs, et leurs pathophysiologie (Gendron et al., 2015).

Tableau I : Identification et classification des agonistes étudiés en fonction de leur nature (peptidique ou non), de leurs potentiels effets proconvulsivants, selon les doses et méthodes d'administration, tels que décrits dans la littérature existante sur le sujet.

Identification	Peptidique	Pro-convulsivant	Dose et méthode d'administration	Sources bibliographiques
McpTIPP	oui	inconnu	N.A.	N.A.
Met-Enképhaline	oui	oui	Chez le rat: 10 µg par injection intracérébroventriculaire	(Cain & Corcoran, 1985)
DADLE	oui	oui	Chez le rat: 35 nmol par injection intracérébroventriculaire	(Tortella et al., 1986)
Deltorphine B	oui	oui	Chez le lapin: 100 µg par injection intracérébroventriculaire	(Capasso, 2008)
SNC-80	non	oui	Chez la souris : 30 mg/kg par injection sous cutanée.	(Saitoh et al., 2011)
BW373U86	non	oui	Chez la souris: 10 mg/kg par injection sous cutanée.	(Comer et al., 1993)
ARM390	non	non	Chez la souris : jusqu'à 60 mg/kg par voie orale.	(Chung et al., 2015)
ADL-5747 / ADL-5859	non	non	Chez la souris : jusqu'à 300 mg/kg par voie orale.	(Nozaki et al., 2012)
SB-235863	non	non	Chez le rat et chez la souris : jusqu'à 70 mg/kg par voie orale.	(Petrillo et al., 2003)
KNT-127	non	non	Chez la souris : jusqu'à 100 mg/kg par injection sous cutanée.	(Saitoh et al., 2011)

1.3 Les convulsions liées à l'agonisme delta, mise en contexte, pathophysiologie, et bilan actuel.

1.3.1 Parmi les premières publications concernant les effets proépileptiques liés aux récepteurs opioïdes, on retrouve celles de l'équipe Tortella, Robles, Mosberg et Holaday. Tous d'abord en 1984 (Tortella et al., 1984), où il est question de trois analogues de la met-enképhaline, un des ligands endogènes du DOP (Garzon et al., 1983). Il s'agit du [D-Pen², D-Pen⁵]-Enképhaline ou DPDPE, du [D-Pen², L-Pen⁵]-Enképhaline ou DPLPE, tous deux des analogues cycliques de la met-enképhaline ; et du ([D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin) ou DADLE, un analogue de la leu-enképhaline, linéaire cette fois-ci (Tortella et al., 1984).

Par injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) chez des rats Sprague-Dawley, le DPDPE et le DPLPE ont tous deux produits de complexes réponses électroencéphalographiques, qui augmentaient de manière dose-dépendantes, mais ne produisaient pas de convulsions. Il fallut cependant une dose de 10 mg/kg de naloxone (un antagoniste opioïdérique considéré à l'époque comme sélectif du MOP ; Buchsbaum et al., 1977) pour abolir ces réponses d'EEG. Selon le même protocole, le DADLE quant à lui engendra des convulsions mesurables par électroencéphalographie qui étaient dose dépendante également, mais dont l'antagonisme par la naloxone fut efficace entre 0.01 et 1 mg/kg (Tortella et al., 1984). Les auteurs conclurent donc que les états proconvulsivants observés ne pouvaient être uniquement attribués à l'activation du DOP, car d'une part, le DPDPE et DPLPE sont plus sélectifs du DOP en comparaison au DADLE (qui est sélectif du DOP et du MOP). D'autre part, l'abolition de ces EEG de convulsions grâce au naloxone (considéré à l'époque comme sélectif du MOP), se fit à dose 10 à 1000 fois moindres pour le DADLE, qui est sélectif du DOP et MOP, que pour DPDPE et DPLPE (Tortella et al., 1984).

En 1985, la même équipe présenta des résultats qu'eux-mêmes décrivent comme paradoxaux, par rapport à leur précédente publication (Tortella et al., 1984). Ils démontrèrent qu'un traitement au DADLE permettait d'élever le seuil de sensibilité aux convulsions de manière dose-dépendante, que ceci était grâce au DOP ; et qu'ainsi le DADLE aurait des propriétés anticonvulsivantes (Tortella et al., 1985). De plus, les auteurs déclarent qu'il existe également une interaction entre récepteurs opioïdes δ et μ quant à cette régulation du seuil des convulsions (Tortella et al., 1985).

Enfin, la même équipe de Tortella et al. publia en 1987 un article qui démontrait que les états proconvulsivants entraînés par le DADLE étaient exclusivement liés à l'activation du MOP et non du DOP (Tortella et al., 1987). Dans cette étude, la mention de l'origine de ces convulsions commence à être décrite, il est donc question des cellules pyramidales présentes dans l'hippocampe, responsables du circuit d'efférence de ce dernier. Ainsi en inhibant par activation locale du système opioïde, l'inhibiteur de ces cellules pyramidales, soit les interneurons GABAergiques (les cellules en panier et en chandelier principalement), il y a une

hyperactivité neuronale au niveau de la sortie de l'hippocampe, entraînant ces états de convulsions (Duggan & North, 1983).

Le débat continue : en 1989 Lee et al. publient de nouveaux résultats, avec la même approche que celle de Tortella et al., concernant l'injection intracérébroventriculaire du DADLE (Lee et al. 1989). Leurs résultats indiquent également que le MOP semble être le seul responsable des états proconvulsifs originant de l'hippocampe, car en utilisant un inhibiteur sélectif du DOP (l'ICI-174,864), les convulsions persistaient ; alors que celles-ci étaient abolies grâce à un antagoniste irréversible du MOP (le β -Funaltrexamine) (Lee et al. 1989).

1.3.2 Ainsi deux théories s'opposent : celle argumentant que les effets proconvulsifs en provenance de l'hippocampe sont liés au DOP (Rezaï et al., 2012 ; Chung et al., 2015) ; tandis que d'autres (Tortella et al., 1987 ; Lee et al., 1989) insistent pour inculper le MOP.

Indépendamment de ces divergences, les convulsions liées à l'activation des récepteurs opioïdes δ ou μ seraient donc dues en particulier aux populations d'interneurones GABAergiques présentes dans l'hippocampe (Madison & Nicoll, 1988 ; Drake et al., 2007 ; Rezaï et al., 2012 ; Chung et al., 2015). La distribution des DOP et des MOP dans l'hippocampe de rat et de souris est similaire (Drake et al., 2007 ; Rezaï et al., 2012), les cellules possédant le plus de DOP et de MOP sont les parvalbumine positives, et notamment les cellules en chandelier et en panier (Chung et al., 2015). Ces cellules sont des interneurones GABAergiques responsables notamment de l'inhibition des cellules glutamatergiques du *stratum pyramidale* (voir figure n°4, page 26 ; Erbs et al., 2012).

Le mécanisme d'action proposé quant à l'activation du système opioïde serait donc d'une part l'hyperpolarisation des membranes via des canaux potassiques (voir figure n°2.b page 19 ; Beaulieu, 2013 ; modifié d'après Fields, 2004), en l'occurrence, de ces interneurones GABAergiques au niveau de l'hippocampe (Madison & Nicoll, 1988 ; Pang & Rose, 1989 ; Rezaï et al., 2012). Et d'autre part, la modulation de libération de neurotransmetteurs (voir figure n°2.b page 19 ; Beaulieu, 2013 ; modifié d'après Fields, 2004), en l'occurrence l'inhibition de

la libération de GABA par les interneurons GABAergiques de l'hippocampe lors de l'activation du système opioïde (Nicoll et al., 1980 ; Cohen et al., 1992 ; Rezaï et al., 2012).

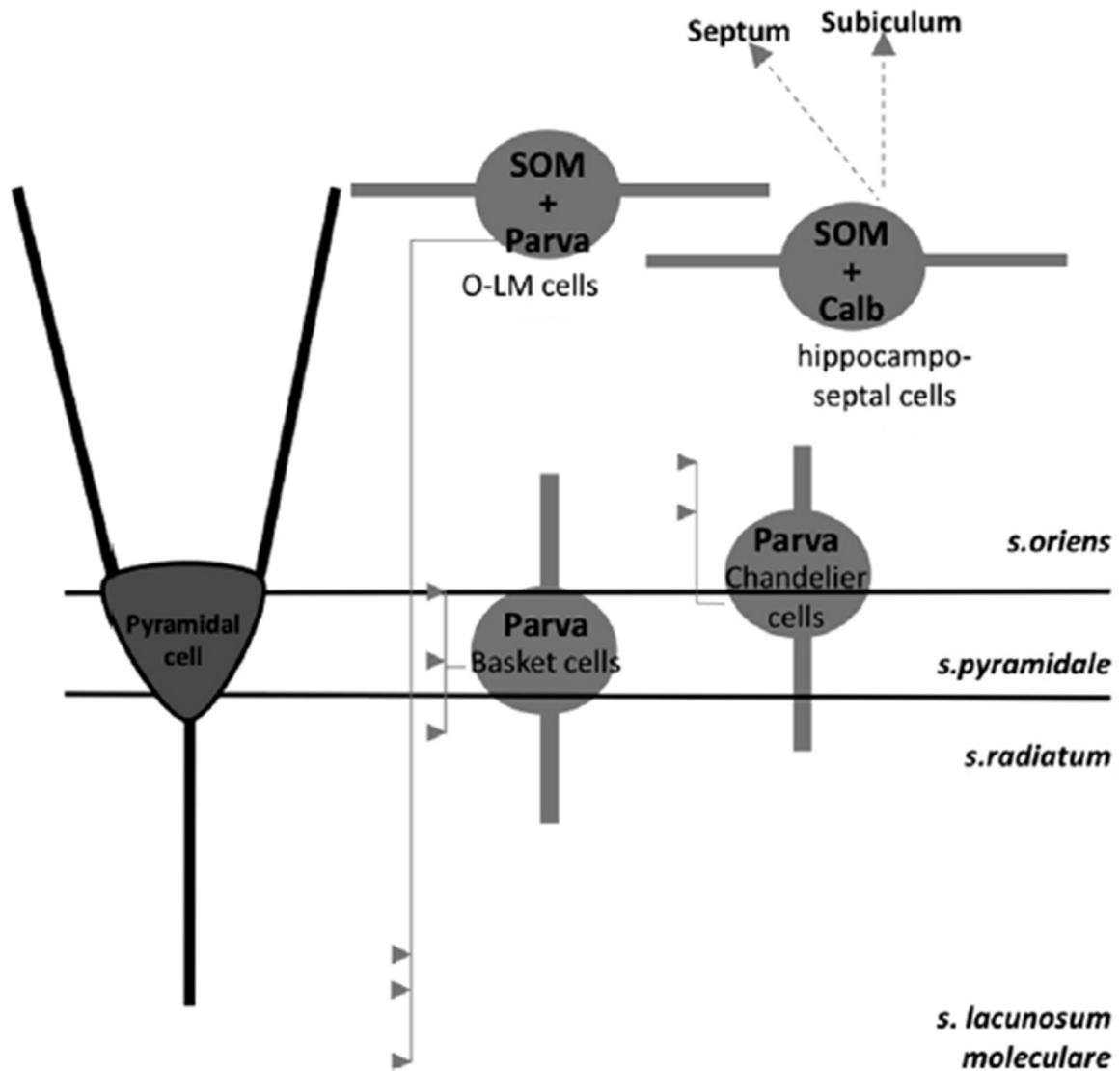


Figure n°4 : Diagramme schématique représentant le circuit général axonal et dendritique, entre les cellules glutamatergiques pyramidales, et les principales populations d'interneurones GABAergiques dans la corne d'Ammon de l'hippocampe, en fonction de ses strates. Légende : « Pyramidal cell » : cellule pyramidale ; « O-LM cells » : cellules oriens-lacunosum moleculare ; « Basket cells » : cellules en panier ; « Chandelier cells » : cellules en chandelier ; « hippocampo-septal cells » : cellules hippocamoseptales ; « SOM » : somatostatine(+); « Parva » : Parvalbumine(+); « Calb » : calbindin(+). Adapté à partir de Erbs et al., 2012.

Ceci entraînerait donc « l'inhibition des inhibiteurs » : les interneurons GABAergiques en chandelier et en panier ne réguleraient plus l'efférence des cellules glutamatergiques pyramidales en sortie de l'hippocampe, ce qui entraînerait ces états proconvulsifs (Duggan & North, 1983 ; Chung et al., 2015).

La figure n°3 (page 21) provenant d'une étude récente (Le Merrer et al., 2012) illustre la distribution des récepteurs opioïdes et confirme qu'il existe effectivement dans l'hippocampe, des récepteurs opioïdes δ et μ ; et ce modèle d'inhibition des interneurons GABAergiques persiste encore aujourd'hui dans la littérature (Drake et al., 2007 ; Erbs et al., 2012 ; Rezaï et al., 2012 ; Chung et al., 2015). Certains auteurs insistent cependant sur le fait qu'il existe une synergie entre le système opioïde δ et μ (Gomez et al., 2000 ; Law et al., 2005 ; Wang et al., 2005), et également au niveau de l'hippocampe. Ainsi, les deux seraient potentiellement impliqués quant aux effets secondaires proconvulsifs (Bausch & Chavkin, 1997).

1.3.3. Aujourd'hui, la piste du DOP étant à l'origine des convulsions est cependant de nouveau privilégiée (Chung et al., 2015). En effet, en 1994 déjà, l'équipe de Negus et al., démontra qu'une injection sous-cutanée d'un agoniste non peptidique, actif de manière systémique, et sélectif du récepteur δ : le BW373U86, entraînait des convulsions chez le singe rhésus dès 1.78 mg/kg. En revanche, un prétraitement au naltrindole, un antagoniste sélectif du DOP (Granier et al., 2012), permet d'abolir les convulsions entraînées par l'injection de BW373U86 jusqu'à des doses de 32 mg/kg (Negus et al., 1994). Concernant les effets secondaires proconvulsifs, ces résultats incriminent donc le DOP contrairement aux travaux de Tortella et al. qui eux incriminaient le MOP (Tortella et al., 1984 ; Tortella et al., 1987).

D'autre part, il existe aujourd'hui deux modèles de souris « Knock out » du gène du récepteur opioïde δ : un KO total appelé CMV-DOP ; et un KO conditionnel appelé Dlx-DOP, où les DOP sont absents de l'hippocampe (et donc des interneurons GABAergiques), mais toujours présents dans le cortex. Ainsi, l'équipe de Chung et al., semble avoir de nouvelles preuves impliquant le récepteur δ grâce à ces deux modèles KO murins, et les publia en 2015 (Chung et al., 2015). En effet, le SNC-80 étant un agoniste sélectif du récepteur opioïde δ ,

normalement proconvulsivant (Jutkiewicz et al., 2003 ; Danielsson et al., 2006 ; Chung et al., 2015), ne l'est plus chez les souris CMV-DOP, ni chez les Dlx-DOP (Chung et al., 2015).

L'implication du DOP quant à la pathophysiologie des convulsions liée à l'activation du système opioïde n'est donc plus à remettre en cause ; cependant, est-il réellement le seul responsable de celles-ci ?

1.4 Hypothèse de travail, et objectifs de la thèse.

1.4.1 Notre laboratoire se concentre notamment depuis plusieurs années sur la caractérisation moléculaire des différentes voies signalétiques impliquées dans l'analgésie médiée par les opioïdes (Piñeyro et al., 2001 ; Piñeyro & Archer-Lahlou, 2007 ; Audet et al., 2008 ; Nagi & Piñeyro, 2011 ; Nagi et al., 2014). L'étude de la sélectivité fonctionnelle, et notamment celle du récepteur opioïde δ (Audet et al., 2010) nous a permis d'abord d'avancer l'hypothèse qu'il serait possible de séparer les voies intracellulaires impliquées quant à l'effet voulu (ici l'analgésie, ou les effets antidépresseurs), versus les effets indésirables (ici les effets proconvulsivants), engendrés par les agonistes du DOP (Jutkiewicz et al., 2005). Cette sélectivité fonctionnelle ou agonisme biaisé permettrait donc de différencier les différents effets d'un composé en fonction des différents transducteurs de signaux utilisés, et des différents effecteurs intracellulaires recrutés.

Avec l'avènement de la cristallographie, de la cryomicroscopie électronique, et de l'étude pharmacologique par modélisation moléculaire en trois dimensions, il est aujourd'hui possible d'étudier le « docking & binding » grâce à certains logiciels comme UCSF Chimera (Santelli et al., 2004). Ceci permet donc de prédire la potentielle affinité d'un ligand pour tel ou tel récepteur d'une part, mais aussi de constater le changement de conformation engendré par la molécule sur le récepteur en question (Huang et al., 2015). Il est donc également possible de constater quels transducteurs de signaux intracellulaires sont impliqués, et comment ils le sont, quels effecteurs sont recrutés, etc. (Huang et al., 2015). Ceci est appelé la relation structure-activité (SAR), signifiant que chaque molécule possède sa propre architecture moléculaire, et qu'ainsi chacune

d'entre elles entraîne différents changements de conformation d'un récepteur, en fonction de sa structure (polarité, poids moléculaire, etc.) (Besnard et al., 2012).

Ceci nous permis donc d'établir l'hypothèse centrale suivante : il existe un lien au niveau moléculaire, entre la capacité de différents agonistes d'un même récepteur, à recruter différenciellement les voies signalétiques associées à ce dernier, en fonction des différents changements de conformation structurelle du récepteur entraîné par chacun. Il est donc potentiellement possible de caractériser les voies signalétiques médiatrices des effets voulus (ici l'analgésie), et de les distinguer de celles responsables des effets indésirables (ici les convulsions).

1.4.2 Ainsi notre objectif sera d'une part d'étudier, grâce à la technologie BRET (voir section Matériels & Méthodes pages 34 à 36 ; Gales et al., 2005), les différentes voies signalétiques impliquées au niveau du DOP en fonction des transducteurs (différentes sous-unités α de la protéine G hétérotrimérique) et effecteurs de signaux intracellulaires (canal potassique Kir 3.2) utilisés (Audet et al., 2008). Il faudra ensuite générer des profils de sélectivité fonctionnelle propre aux agonistes du DOP connus pour leurs effets convulsivants ; afin de les comparer aux profils d'autres agonistes du DOP connus pour ne pas engendrer de convulsions (voir tableau I page 23). Ces informations seront donc utilisées pour établir s'il existe une signature spécifique quant aux effets indésirables proconvulsivants entraînés par certains agonistes du DOP, en utilisant d'abord les paramètres classiques de la pharmacologie : puissance et efficacité ; puis en utilisant les paramètres pharmacologiques plus modernes du modèle opérationnel comme l'affinité fonctionnelle, le coefficient de transduction, et leurs corrélations (Black & Leff, 1983 ; Kenakin et al., 2012 ; Nagi & Piñeyro, 2015).

Ultimement, ces informations pourront être utilisées pour établir le profil idéal d'un agoniste des DOP, c'est-à-dire présentant les effets voulus (analgésiques en l'occurrence), sans éliciter les effets indésirables associés (proconvulsivants en l'occurrence). Ces informations permettront ensuite un jour donc d'identifier et synthétiser de meilleurs agonistes du DOP, capables de cibler uniquement les voies signalétiques médiatrices de l'analgésie, sans éliciter celles entraînant les effets secondaires associés.

2. Matériels et Méthodes :

2.1 Réactifs :

Les réactifs propres à la culture cellulaire comme le milieu minimum essentiel d'Eagle modifié (milieu/sérum de base), le sérum fœtal de veau, le sérum bovin, la glutamine, la pénicilline, la streptomycine, et la trypsine proviennent tous de chez Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Le bleu de trypan utilisé pour le marquage et décompte cellulaire provient de VWR. La polyéthylénimine (PEI) a été fournie par Polysciences, Inc. (Warrington, PA, États-Unis). La coérentérazine « Deep Blue » provient de Nanolight Technology (Pinetop, AZ, États-Unis).

Certains ligands utilisés proviennent des laboratoires de nos collaborateurs : le Mcp-Tic-Phe-Phe-OH [Mcp, 4-(methyl-carboxamido) phenylalanine ; Tic, 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid] ou McpTIPP provient du laboratoire du Dr Peter W. Schiller de l'Université de Montréal (Montréal, QC, Canada) ; le [8*R*-(4*bS*^{*},8*aa*,8*ab*,12*bb*)]-7,10-dimethyl-1-methoxy-1-(2-methylpropyl)-oxycarbonyl-5,6,7,8,12,12*b*-hexahydro-(9*h*)-4,8-methanobenzofuro-[3,2*e*]pyrrolo[2,3-*g*]-isoquinoline hydrochloride ou SB-235863 provient des laboratoires du Dr Louis Gendron de l'université de Sherbrooke (Sherbrooke, QC, Canada) ; tandis que le 14-hydroxy-SN-28 ou KNT-127 provient du laboratoire de Dr Hiroshi Nagase de l'université Kitasato (Tokyo, Japon).

Les autres ligands étudiés ont été achetés auprès des compagnies et laboratoires de référence : le (+)-4-[(α R)- α -((2*S*,5*R*)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxy-benzyl]-N,N-diethyl-benzamide ou SNC-80 et le 4-[(*R*)-[(2*S*,5*R*)-2,5-dimethyl-4-prop-2-enylpiperazin-1-yl]-3-hydroxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide ou BW373U86 proviennent de Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, États-Unis) ; le N,N-diethyl-3-hydroxy-4-(spiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide ou ADL5747 provient de Adooq Bioscience LLC (Irwin, CA, États-Unis) ; le N,N-Diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide ou ADL5859 provient de Cedarlane (Burlington, ON, Canada) ; le N,N-diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidene-methyl)-benzamide ou ARM390 provient de Cayman Chemical

Company (Ann Arbor, MI, États-Unis) ; le [D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin ou DADLE provient de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, États-Unis) ; et enfin, la [D-Ala²]-Deltorphine II ou deltorphine B et la met-enképhaline proviennent de AnaSpec Inc (Fremont, CA, États-Unis).

2.2 Culture cellulaire

Une lignée de cellules immortalisées, les HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), a été utilisée pour l'ensemble des expériences de la présente recherche. Dans des Petri de 100 mm, les « stocks » de ces cellules ont été cultivées dans du DMEM enrichi avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS), avec une concentration de 2mM de L-glutamine, et 100 unités par millilitre de pénicilline/streptomycine. Les Petri sont incubés à 37°C dans une atmosphère ayant une hygrométrie de 95% et une concentration en CO₂ de 5%.

2.3 Plasmides

Les plasmides utilisés pour exprimer les biosenseurs étudiés au sein des cellules HEK293 à transférer sont :

- Les différentes sous-unités de la protéine G :
 - $\alpha 1$ marquée d'une R.LucII a été générée et fournie par le Dr Michel Bouvier et son laboratoire de l'IRIC (Montréal, QC, Canada) (Yagi et al., 2011).
 - $\alpha 0A$ et $\alpha 0A$ marquée d'une R.LucII ont été générées et fournies par le Dr Michel Bouvier et son laboratoire de l'IRIC (Montréal, QC, Canada) (Richard-Lalonde et al., 2013)
 - $\alpha 0B$ marquée d'une R.LucII a été générée et fournie par le Dr Michel Bouvier et son laboratoire de l'IRIC (Montréal, QC, Canada)

- $\beta 1$ fournie par le Dr Michel Bouvier et son laboratoire de l'IRIC (Montréal, QC, Canada).
- $\gamma 2$ marquée d'une GFP10 et $\gamma 2$ marquée d'une R.LucII ont été générées et fournies par le Dr Michel Bouvier et son laboratoire de l'IRIC (Montréal, QC, Canada) (Gales et al., 2005).
- La sous-unité du canal potassique Kir3.1 ; fournie par le Dr Terry Hébert de l'université McGill (Montréal, QC, Canada) (Lavine et al., 2002).
- La sous-unité du canal potassique Kir3.2 marqué d'une GFP10 ; fournie par le Dr Terry Hébert de l'université McGill (Montréal, QC, Canada) (Lavine et al., 2002).

Pour plus d'information sur la génération des plasmides, se référer aux articles suivants : Lavine et al., 2002 ; Gales et al., 2005 ; Richard-Lalonde et al., 2013 ; Yagi et al., 2011.

2.4 Transfection

En vue de la transfection, les cellules HEK293 sont transplantées dans de nouveau Petri de 100mm, et quantifiées à raison de 3.5×10^6 cellules par Petri, 24 heures avant transfection. Le jour de la transfection, le milieu de chaque Petri est aspiré pour être remplacé par 4 ml de DMEM de base. À partir des différents plasmides nécessaires, un mélange est préparé en fonction du nombre de Petri à transférer, et du biosenseur étudié. Il est donc question par exemple de l'ADN codant pour le DOP, les différentes sous-unités de sa protéine G hétérotrimérique (portant les marqueurs pour le biosenseur BRET ou non), et d'un effecteur le cas échéant : le canal potassique KIR 3.

Le système de transfection employé utilise comme vecteur la polyéthylèneimine selon les protocoles déjà publiés pour cette méthode (Boussif et al., 1995). Les Petri contenant les cellules à transférer, reçoivent donc chacun un mélange d'ADN et de PEI en fonction du biosenseur

étudié, à raison de 1 ml par Petri, pour un volume total de 5 ml. La transfection est achevée lorsqu'un volume égal (5 ml) de milieu agrémenté de sérum de veau nouveau-né (NCS) est ajouté 3 à 4 heures après l'ajout du mélange d'ADN et PEI. Les Petri sont ensuite remis dans l'incubateur jusqu'au jour de l'expérience BRET.

Tableau II : Exemple d'une grille de transfection réalisée en fonction de chaque biosenseur étudié, référençant les plasmides respectivement nécessaires pour les exprimer, en fonction de leurs concentrations respectives, et des ratios / quantité en µg de plasmide nécessaire par Petri transfecté.

γ2-LucII vs. Kir3.2-GFP10			α0B-RlucII vs γ2-GFP DOR			α0A-RlucII vs γ2-GFP DOR			αi1-RlucII vs γ2-GFP DOR		
[Plasmide]	Plasmides	Quantité en µg	[Plasmide]	Plasmides	Quantité en µg	[Plasmide]	Plasmides	Quantité en µg	[Plasmide]	Plasmides	Quantité en µg
1.15	α0A	2.0	3.80	β1	3.0	3.80	β1	3.0	3.80	β1	3.0
3.80	β1	2.0	4.00	DOR (rat)	5.0	4.00	DOR (rat)	5.0	4.00	DOR (rat)	5.0
2.24	γ2-LucII	0.3	1.16	γ2-GFP10	3.0	1.16	γ2-GFP10	3.0	1.16	γ2-GFP10	3.0
1.74	Kir3.1	3.0	0.00	γ2	0.0	0.00	γ2	0.0	0.00	γ2	0.0
4.00	DOR (rat)	4.0	2.40	α0B-RlucII	0.6	1.15	α0A-RlucII	0.6	1.38	αi1-RlucII	0.6
2.03	Kir3.2-GFP10	3.0		Total µg	11.6		Total µg	11.6		Total µg	11.6
	Total µg	14.3									

2.5 BRET

Le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) est un phénomène naturel résultant d'un transfert énergétique entre un donneur de luminescence et un accepteur fluorescent (Anger et al., 2000). La présente étude est effectuée avec le BRET2 qui utilise comme source de bioluminescence la Renilla luciférase II ou R.lucII ; qui catalyse l'oxydation de la cœlentérazine (DeepBlueC dans notre cas, voir section 2.1 page 31). Ceci résulte en une émission de luminescence parmi le spectre de longueur d'onde d'excitation de la protéine fluorescente verte (370 et 450 nm), ici la GFP10 (Bertrand et al., 2002). Comme l'efficacité du transfert par énergie varie de façon inversement proportionnelle à la distance, l'émission de fluorescence par la GFP10 (compris entre 500 et 530 nm) n'aura lieu que si l'excitation donneur

se produit à proximité de l'accepteur (environ 100 Angströms ; voir figure n°5 ci-dessous) (Marullo & Bouvier, 2007). Ceci permet donc de quantifier avec précision et en temps réel, l'interaction protéine-protéine (si celles-ci sont respectivement marquées de la paire donneur / accepteur) ; en l'occurrence ici, l'interaction ligand-récepteur-transducteur de signal, et particulièrement celle du DOP et ses différents agonistes par rapport à différentes sous-unités α de la protéine G (Gales et al., 2005).

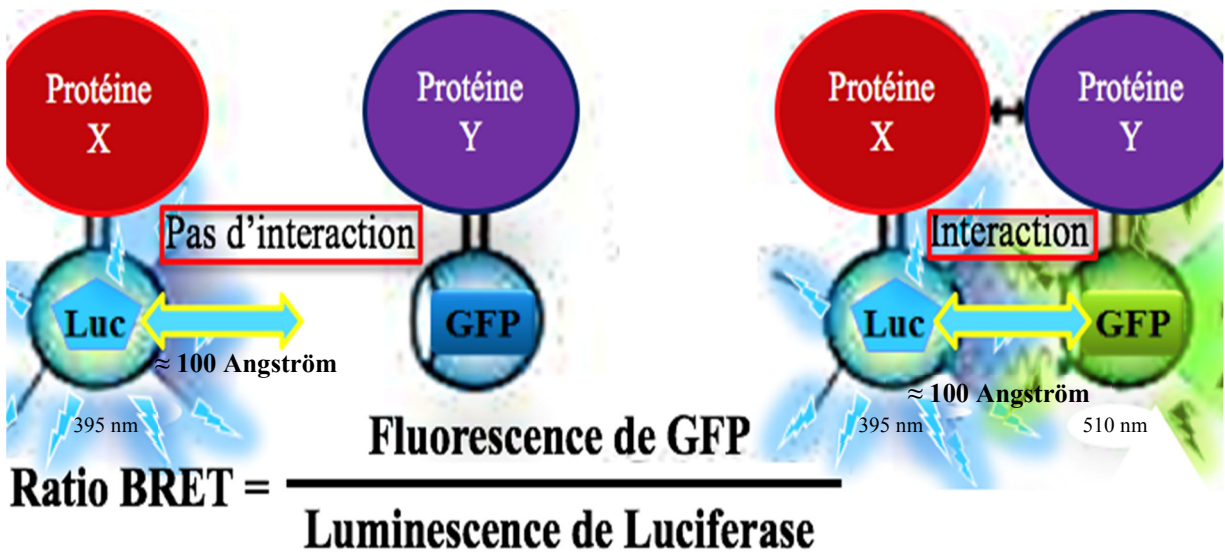


Figure n°5 : Diagramme schématisant le fonctionnement du transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET), entre deux protéines hypothétiques d'intérêts : X et Y, marquées respectivement d'une luciférase et d'une protéine fluorescente verte ; permettant ainsi la quantification de leur interaction par calcul du ratio BRET. Légende : « Luc » = luciférase ; « GFP » = Protéine Fluorescente Verte ; nm = nanomètre. (Adapté à partir de Bacart et al., 2008).

L'expérience BRET est réalisée 48 heures post-transfection. En premier lieu, il est important de préparer les dilutions en séries selon les concentrations voulues des différents agonistes étudiés. Une fois ceci réalisé, les Petri de 100mm contenant les cellules transfectées peuvent être sortis de l'incubateur. Le milieu de culture est aspiré, et ensuite les cellules transfectées sont d'abord rincées puis décollées des Petri à l'aide de PBS-MgCl₂. Une fois l'ensemble des cellules de chaque Petri collecté dans un tube Sarstedt de 15 ml, celles-ci sont centrifugées pendant 10 minutes à raison de 3000 RPM afin de les précipiter au fond du tube.

Le surnageant est ensuite aspiré, et les cellules sont ensuite diluées de nouveau avec du PBS-MgCl₂ selon le volume nécessaire pour obtenir le compte cellulaire (environ 100 000 cellules / puit), et la concentration de protéines exprimées voulues pour l'expérience. Les protocoles de préparation et lecture BRET utilisés quant à la quantification in vitro de l'interaction ligand-récepteur et protéine G hétérotrimérique, sont déjà décrits, optimisés, et publiés (Gales et al., 2005 ; Gales et al., 2006).

Il est ensuite possible de dispenser dans une plaque de 96 puits, 80 µl par puit de ce mélange de cellules transfectées. Les plaques de 96 puits à fond blancs utilisés pour les lectures BRET proviennent de Perkin-Elmer. Des triplicata ont été réalisés pour chaque lecture de chaque agoniste étudié. Une fois les cellules disposées dans le fond de chaque puit, la « Deep-Blue » Cœlentérazine (DBC) est ajoutée à chaque puits à intervalles réguliers de deux à trois secondes à raison de 10 µl par puit. Ce délai est observé de puit en puit, car il s'agit du temps nécessaire à la lecture de chacun d'entre eux par le lecteur BRET (le Mithras LB 940 de Berthold Technologies) selon le protocole utilisé.

Trois minutes après l'ajout de la DBC, les différentes dilutions de chaque agonistes testés peuvent être ajoutés à chaque puit correspondant, toujours à intervalles réguliers de deux à trois secondes, à raison de 10 µl par puit, pour un volume final par puit de 100 µl. Cinq minutes après l'ajout des agonistes, la plaque est placée dans le Mithras et la lecture BRET est effectuée, les données brutes sont ainsi produites.

2.6 Quantification des résultats

Les données brutes de BRET2 (comptes de luminescence et comptes de fluorescence), sont d'abord mis en rapport pour obtenir le ratio BRET (comptes de luminescences divisés par comptes de fluorescence), puis corrélés par rapport au minimum ou « bottom » de leur courbe qui permet d'obtenir le net BRET, puis par rapport à la met-enképhaline, et particulièrement son « span » (différence entre max / « top » et min / « bottom » de sa courbe dose-réponse) qui est considéré comme le 100% de référence, qui permet d'obtenir le delta net BRET en % de la

met-enképhaline (Nagi & Piñeyro, 2015).

Les analyses statistiques et l'ajustement des courbes dose réponses obtenues sont effectués à l'aide de la version 7 du logiciel Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, États-Unis). Les tests utilisés sont l'ANOVA (à un et deux facteurs / mesures non répétées), suivis par les comparaisons post hoc de Bonferroni (dans le cas de l'ANOVA à deux facteurs) et le test t non apparié (Nagi & Piñeyro, 2015).

Un niveau d'analyse supplémentaire des données est ensuite possible grâce au modèle opérationnel développé plus récemment par Black et Leff (Black & Leff, 1983), et élaboré par Kenakin (Kenakin, 2004 ; Kenakin et al., 2012). Ce modèle incorpore par exemple un paramètre comme le coefficient de transduction, qui n'est pas un facteur empirique ajouté *a posteriori* des postulats comme dans la théorie de l'occupation. En effet, ce coefficient découle du postulat de la saturabilité de l'activité du complexe ligand-récepteur (Kenakin, 2004), qui considère « l'affinité opérationnelle » de chaque ligand, ce qui est une approche plus exacte que celle de la théorie occupationnelle (Kenakin, 2004 ; Nagi & Piñeyro, 2015). Ce coefficient de transduction est calculé grâce au ratio entre l'efficacité opérationnelle ($\text{Log } \tau$) et l'affinité fonctionnelle (K_a) ; ce coefficient de transduction est donc très utile pour comparer l'efficacité relative des agonistes (Kenakin, 2004 ; Nagi & Piñeyro, 2015). Afin d'approfondir sur le sujet, le lecteur est invité à se référer à l'article de mes chers collègues : Nagi & Piñeyro, 2015.

3. Résultats :

3.1 Protéines G hétérotrimériques :

3.1.1 Gαi1 :

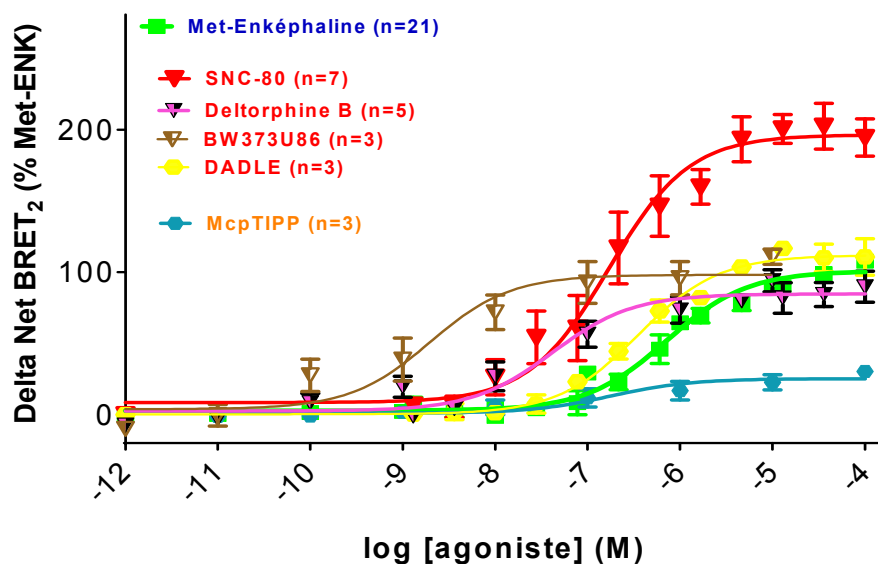
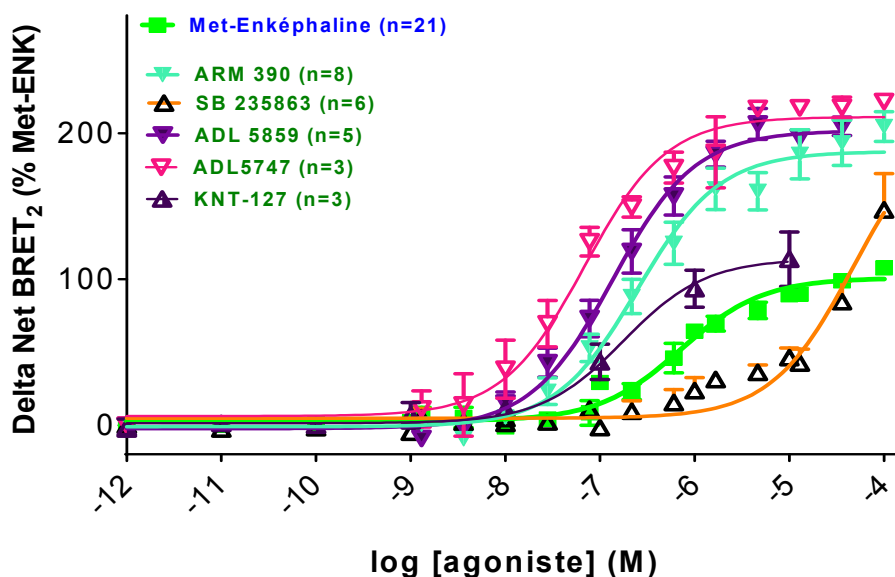


Figure n°6 : Données obtenues grâce au biosenseur [G- α i1.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log10 des concentrations molaires en abscisse, **6a.** des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant (en vert) ; **6b.** des agonistes connus pour être proconvulsivant (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange)

Comme la sous-unité $\alpha 1$ de la protéine G est ubiquitaire, présente parmi les populations neuronales (Siehler & Milligan, 2010), et responsable l'activation de l'effecteur Kir des récepteurs opioïdes par inhibition de l'adénylate cyclase (Beaulieu et al., 2010), notre intérêt s'est d'abord porté sur celle-ci. La figure n°6 ci-dessus illustre donc la réponse mesurée grâce au biosenseur [G- $\alpha 1$.RlucII Vs G- $\gamma 2$.GFP10] sous forme de Δ net-BRET², en pourcentage par rapport au référentiel, un ligand endogène du DOP, la met-enképhaline.

Il est possible de constater sur la figure n°6a. que les agonistes connus pour ne pas engendrer d'état proépileptique (en vert) (voir tableau I page 24) lié à l'activation du DOP, comme les ADLs (5747 et 5859) et le ARM390 présentent une efficacité d'environ 200% vers le biosenseur G- $\alpha 1$ par rapport au 100% du ligand endogène de référence, la met-enképhaline. De plus, leur puissance est également supérieure à celle du ligand de référence, d'environ un logarithme (0.1 micromolaire versus 1 micromolaire). Dans une autre catégorie, le KNT-127 possède la même puissance que les 3 ligands précédemment cités (soit 10^{-7} M), pour éliciter le biosenseur $\alpha 1$, en revanche, son efficacité est équivalente à celle du ligand de référence, soit environ 100%. Enfin, le SB-235863 qui lui possède une efficacité moyenne d'environ 150% par rapport au ligand de référence, possède une puissance inférieure à celle de la met-enképhaline de plus d'un ordre logarithmique (soit entre 10 et 100 μ M).

En Figure n°6b. cependant, il est possible de constater que les agonistes connus pour engendrer des états proépileptiques liés à l'activation du DOP (en rouge) (voir tableau I page 24), comme le BW373U86, la deltorphine B, et le DADLE, ont respectivement la même efficacité à éliciter le biosenseur G- $\alpha 1$ par rapport à la met-enképhaline, soit le 100% de référence. En revanche le BW373U86 est plus puissant de l'ordre de trois logarithmes par rapport à celle-ci (soit entre 1 et 10 nanomolaire versus 1 micromolaire). La deltorphine B quant à elle, est plus puissante que le référentiel de 100% de l'ordre d'un logarithme (soit 0.1 μ M versus 1 μ M) ; et le DADLE en plus d'être aussi efficace, est aussi puissant que la met-enképhaline (1 μ M). SNC-80 quant à lui, présente la même puissance que la deltorphine B (de l'ordre de 0.1 μ M), mais possède une efficacité à éliciter le biosenseur $\alpha 1$ d'environ 190% par rapport au référentiel. Enfin, le McpTIPP dont le statut proépileptique est inconnu (en orange), présente une efficacité d'environ 25% vers $\alpha 1$ avec une puissance relative de l'ordre de 1 μ M.

Tableau III : Données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- α 1.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP, soit la pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal.

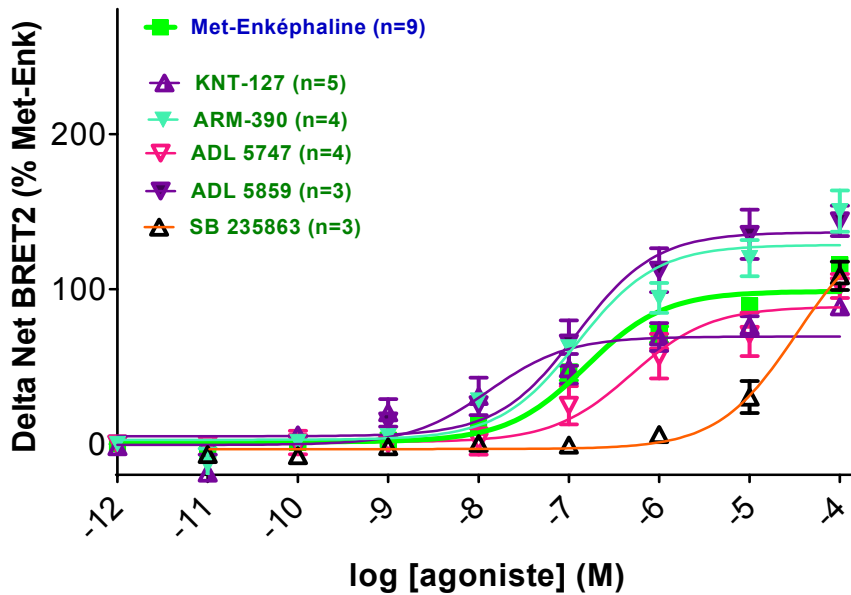
Agonistes	pEC50	Effet Maximal \pm	Erreur Type
Met-Enképhaline (n=21)	6.147	98.07	0.050
DADLE (n=3)	6.450	111.70	0.074
Deltorphine B (n=5)	7.380	82.17	0.176
SNC-80 (n=7)	6.770	187.90	0.111
BW373U86 (n=3)	8.702	94.34	0.245
McpTIPP (n=3)	6.746	24.33	0.355
ARM390 (n=8)	6.602	188.60	0.080
ADL5747 (n=3)	7.164	205	0.090
ADL5859 (n=5)	6.866	204.10	0.067
SB-235863 (n=6)	4.318	208.60	0.177
KNT-127 (n=3)	6.753	112.70	0.181

Le tableau III ci-dessus permet d'illustrer des paramètres analytiques du modèle logistique classique de la pharmacologie : le pEC₅₀, et l'effet maximal correspondants aux courbes doses réponses présentées en figure n°6a. et n°6b. ci- dessus, concernant le biosenseur [G- α 1.RlucII Vs G- γ 2.GFP10]. À titre de référence, la pEC₅₀ de la met-enképhaline pour ce biosenseur α 1 est de 6.15, et son effet maximal est de 98.07.

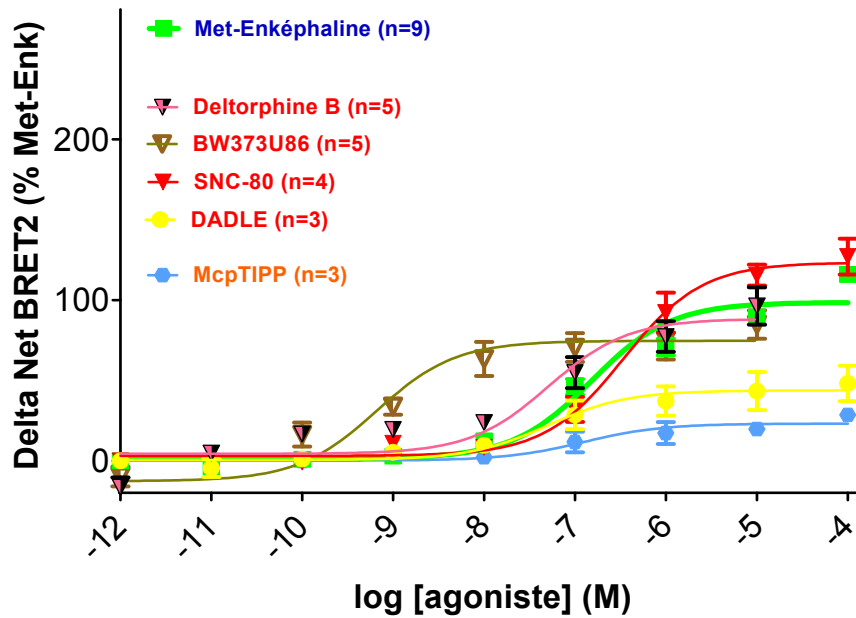
Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivants (en vert) (voir tableau I page 24), le pEC₅₀ varie de 4.318 pour le SB-235863 à 7.164 pour le ADL5747, pour une moyenne de 6.34 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.51. Enfin, l'effet maximal varie de 112.7 pour le KNT-127 à 208.6 pour le SB-235863, avec 183.8 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 18.1.

Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le pEC₅₀ varie de 6.45 pour le DADLE à 8.7 pour le BW373U86, pour une moyenne de 7.2 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.4. Enfin, l'effet maximal pour le biosenseur α 1 chez les ligands proconvulsivants varie de 24.37 pour le McpTIPP à 187.9 pour le SNC-80, avec 100.08 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 26.4.

3.1.2 G α o



7a.



7b.

Figure n°7 : Données obtenues grâce au biosenseur [G- α oA.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log₁₀ des concentrations molaires en abscisse, **7a.** des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant (en vert) ; **7b.** des agonistes connus pour être proconvulsivant (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange).

Comme la sous-unité αo de la protéine G est présente parmi les populations neuronales, neuroendocrines, et astrogliales (Siehler & Milligan, 2010), et responsable l'inhibition des canaux calciques présynaptiques, par activation des récepteurs opioïdes (Beaulieu et al., 2010), notre intérêt s'est ensuite porté sur celle-ci, et son premier sous type αoA . La figure n°7 ci-dessus est composée de deux graphiques, ayant tout deux en abscisses les concentrations molaires logarithmiques des molécules testées, et en ordonnées : la réponse mesurée grâce au biosenseur [G- αoA .RlucII Vs G- $\gamma 2$.GFP10] sous forme de Δnet -BRET2, en pourcentage par rapport au référentiel, un ligand endogène du DOP, la met-enképhaline.

Il est possible de constater sur la figure n°7a. que les agonistes connus pour ne pas engendrer d'état proépileptique (en vert) (voir tableau I page 24) lié à l'activation du DOP, comme le ADL5859 et le ARM390 présentent une efficacité d'environ 130% vers le biosenseur G- αoA par rapport au 100% du ligand endogène de référence, la met-enképhaline. En revanche, par rapport à cette dernière toujours, leur puissance est similaire (soit d'environ 0.1 micromolaire). Dans une autre catégorie, le KNT-127 possède une efficacité de 70% pour éliciter le biosenseur αoA , en revanche, sa puissance est supérieure à celle du ligand de référence, de l'ordre d'un logarithme (soit 0.01 μM versus 0.1 μM). Il est également possible de constater que pour le biosenseur G- αoA , le ADL5747 possède une puissance inférieure à la met-enképhaline d'environ un demi-logarithme (soit 1 μM), tandis que son efficacité est d'environ 90%. Enfin, le SB-235863 dont l'efficacité moyenne est d'environ 100% par rapport à la met-enképhaline, possède une puissance inférieure à celle-ci de plus de deux ordres logarithmiques (soit entre 10 et 100 μM).

En Figure n°7b. cependant, il est possible de constater que les agonistes connus pour engendrer des états proépileptiques, liés à l'activation du DOP (en rouge) (voir tableau I page 24), comme le BW373U86, et la deltorphine B ont une efficacité similaire (soit environ 85%) à éliciter le biosenseur G- αoA par rapport à la met-enképhaline, le 100% de référence. En revanche leur puissance lui est supérieure, de l'ordre de plus de deux logarithmes pour le BW373U86 et d'un demi pour la deltorphine B (soit respectivement de l'ordre de 1 nM et 0.05 μM versus 0.1 μM). L'agoniste dont le statut est incertain (en orange) le McpTIPP ; mais aussi le DADLE, quant à eux possèdent la même puissance relative que le ligand de référence à éliciter le biosenseur αoA (soit environ 0.1 μM) ; mais leur efficacité est respectivement de 25%

et 45% par rapport à la met-enképhaline. Enfin le SNC-80 présente la même puissance que la met-enképhaline envers α oA, cependant son efficacité par rapport à celle-ci est de 120%.

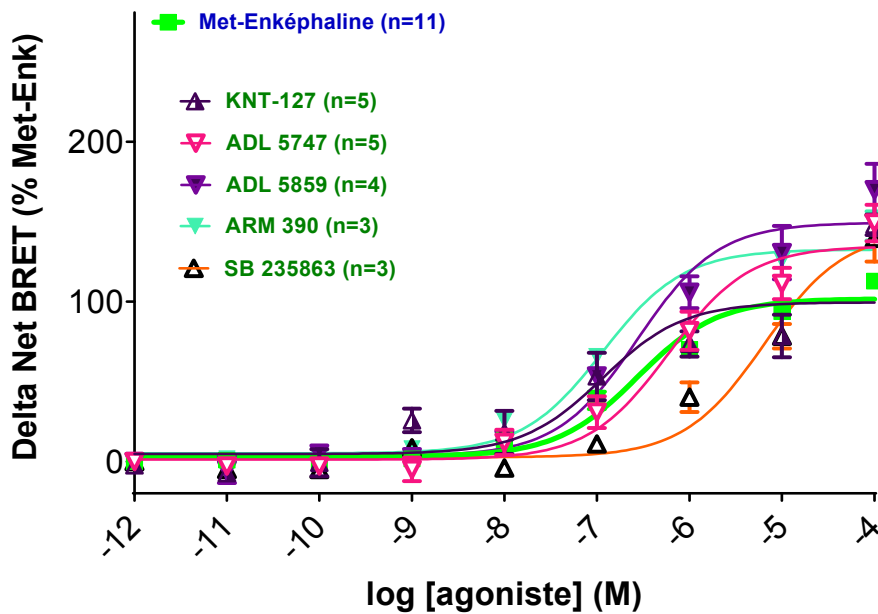
Tableau IV : *Données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- α oA.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP, soit la pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal.*

Agonistes	pEC50	Effet Maximal \pm Erreur Type	
Met-Enképhaline (n=9)	6.814	97.24	0.093
DADLE (n=3)	7.292	43.24	0.294
Deltorphine B (n=5)	7.289	84.11	0.222
SNC-80 (n=4)	6.470	120.40	0.120
BW373U86 (n=5)	9.183	87.36	0.217
McpTIPP (n=3)	6.908	23.02	0.291
ARM390 (n=4)	6.903	125.80	0.148
ADL5747 (n=4)	6.308	87.42	0.215
ADL5859 (n=3)	6.915	131.70	0.131
SB-235863 (n=3)	4.478	148.90	0.152
KNT-127 (n=5)	7.886	69.96	0.258

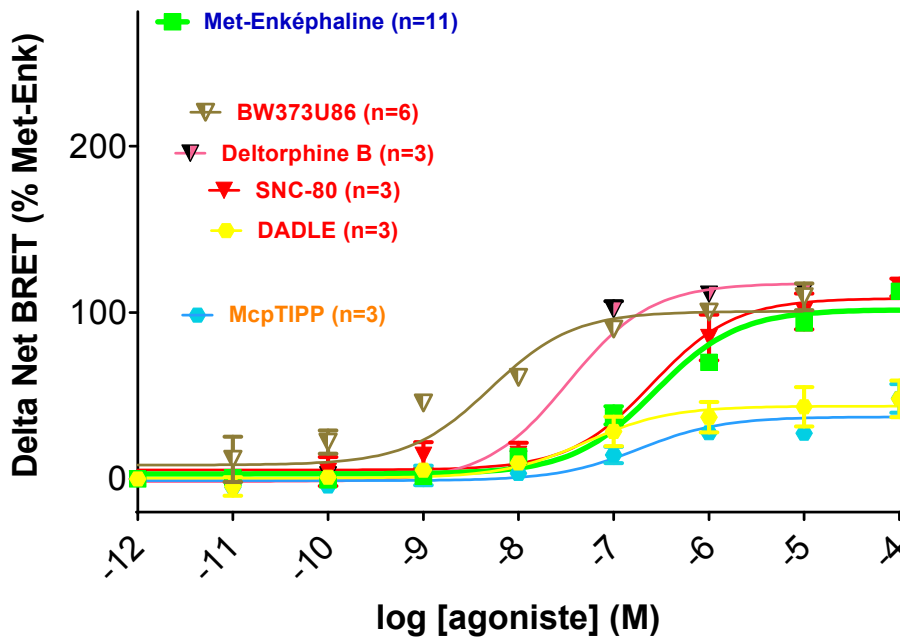
Le tableau IV ci-dessus permet d'illustrer des paramètres analytiques du modèle logistique classique de la pharmacologie : le pEC₅₀, et l'effet maximal correspondants aux courbes doses réponses présentées en figure n°7a. et n°7b. ci- dessus, concernant le biosenseur [G- α oA.RlucII Vs G- γ 2.GFP10]. À titre de référence, la pEC₅₀ de la met-enképhaline pour ce biosenseur α oA est de 6.81, et son effet maximal est de 97.24.

Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivants (en vert), le pEC₅₀ varie de 4.478 pour le SB-235863 à 7.886 pour le KNT-127, pour une moyenne de 6.50 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.56. Enfin, l'effet maximal varie de 69.9 pour le KNT-127 à 148.9 pour le SB-235863, avec 112.8 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 14.68. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange), le pEC₅₀ varie de 6.47 pour le SNC-80 à 9.18 pour le BW373U86, pour une moyenne de 7.43 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.46. Enfin, l'effet maximal pour le biosenseur α oA chez les ligands proconvulsivants varie de 23.02 pour le McpTIPP à 120.40 pour le SNC-80, avec 71.63 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 17.25.

3.1.3 Gaob



8a.



8b.

Figure n°8 : Données obtenues grâce au biosenseur [*G-αoB.RlucII* versus *G-γ2.GFP10*] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log10 des concentrations molaires en abscisse, **8a.** des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant (en vert) ; **8b.** des agonistes connus pour être proconvulsivant (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange).

Comme évoqué précédemment, la sous-unité αo de la protéine G est présente parmi les populations neuronales, neuroendocrines, et astrogliales (Siehler & Milligan, 2010), et responsable de l'inhibition des canaux calciques présynaptiques, par activation des récepteurs opioïdes (Beaulieu et al., 2010), notre intérêt s'est ensuite porté sur son autre sous type : αoB . La figure n°8 ci-dessus est composée de deux graphiques, ayant tout deux en abscisses les concentrations molaires logarithmiques des molécules testées, et en ordonnées : la réponse mesurée grâce au biosenseur [G- αoB .RlucII Vs G- γ 2.GFP10] sous forme de $\Delta\text{net-BRET2}$, en pourcentage par rapport au référentiel, un ligand endogène du DOP, la met-enképhaline.

Il est possible de constater sur la figure n°8a. que les agonistes connus pour ne pas engendrer d'état proépileptique (en vert) (voir tableau I page 24) lié à l'activation du DOP, comme les ADLs (5859 et 5747), le ARM390, et le SB-235863 présentent une efficacité relative d'environ 130% vers le biosenseur G- αoB par rapport au 100% du ligand endogène de référence, la met-enképhaline. En revanche, leur puissance varie pour éliciter αoB : les deux ADLs possèdent la même que le ligand de référence (soit environ 0.5 μM) ; tandis que ARM390 est plus puissant d'un demi-logarithme par rapport à la met-enképhaline (soit 0.1 μM versus 0.5 μM) ; et SB-235863 quant à lui est moins puissant que cette dernière de l'ordre d'un logarithme et demi (soit 10 μM versus 0.5 μM). Finalement, le KNT-127 possède une efficacité de 100% tout comme la référence met-enképhaline, pour éliciter le biosenseur αoB , en revanche, sa puissance est supérieure à celle de cette dernière, de l'ordre d'un demi-logarithme (soit 0.1 μM versus 0.5 μM).

En Figure n°8b. cependant, il est possible de constater que les agonistes connus pour engendrer des états proépileptiques, liés à l'activation du DOP (en rouge) (voir tableau I page 24), comme le BW373U86, le SNC-80, et la deltorphine B ont une efficacité similaire (environ 100%) à éliciter le biosenseur G- αoB par rapport à la met-enképhaline, le ligand de référence. En revanche leur puissance lui est supérieure, de l'ordre d'environ deux logarithmes pour le BW373U86 et d'un logarithme pour la deltorphine B (soit respectivement de l'ordre de 10 nM et 0.05 μM versus 0.5 μM). L'agoniste dont le statut proépileptique est inconnu (en orange) le McpTIPP, mais aussi le DADLE, possèdent quant à eux la même puissance relative que le ligand de référence à éliciter le biosenseur αoB (soit environ 0.5 μM) ; mais leur efficacité est respectivement de 40% et 45% par rapport à la met-enképhaline. Enfin le SNC-80 présente la

même puissance (soit 0.5 μ M) et la même efficacité (soit 100%) que la met-enképhaline envers α oB.

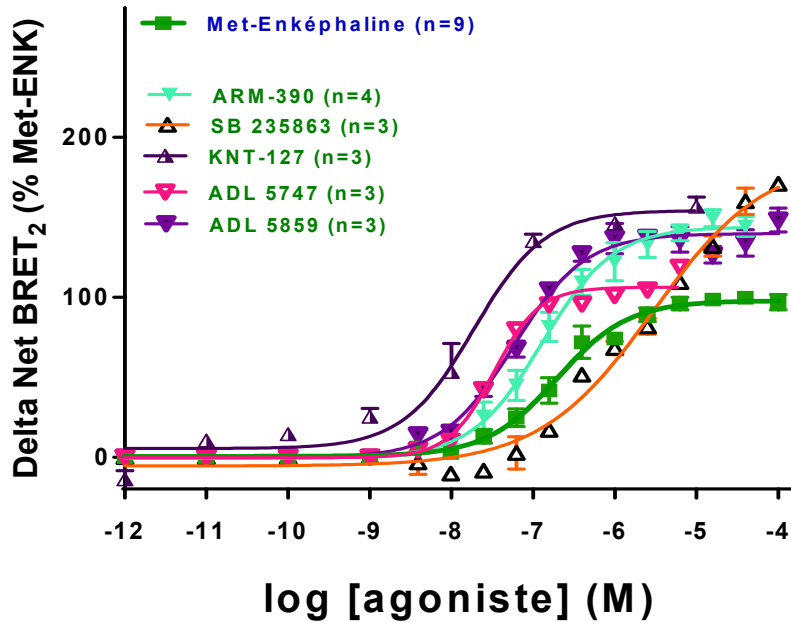
Tableau V : *Données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- α oB.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP, soit le pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal.*

Agonistes	pEC50	Effet Maximal \pm Erreur Type	
Met-Enképhaline (n=11)	6.569	98.80	0.081
DADLE (n=3)	7.292	43.24	0.294
SNC-80 (n=3)	6.599	103.20	0.149
Deltorphine B (n=3)	7.478	119.20	0.088
BW373U86 (n=6)	8.292	92.39	0.184
McpTIPP (n=3)	6.728	38.36	0.263
ARM390 (n=3)	6.934	127.60	0.090
ADL5747 (n=5)	6.221	133.60	0.132
ADL5859 (n=4)	6.562	146.20	0.139
SB-235863 (n=3)	5.191	141.70	0.130
KNT-127 (n=5)	6.937	94.86	0.260

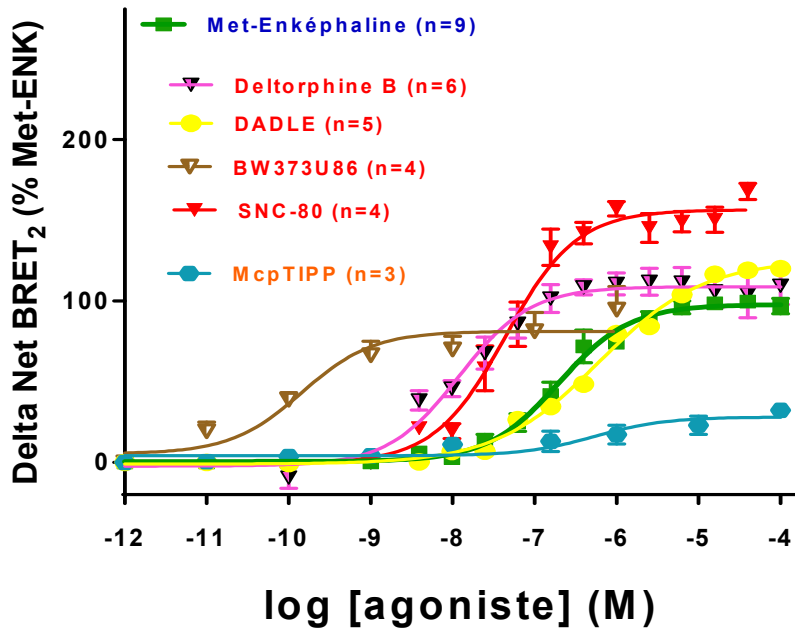
Le tableau V ci-dessus permet d'illustrer des paramètres analytiques du modèle logistique classique de la pharmacologie : le pEC₅₀, et l'effet maximal correspondants aux courbes doses réponses présentées en figure n°8a. et 8b. ci-dessus, concernant le biosenseur [G- α oB.RlucII Vs G- γ 2.GFP10]. À titre de référence, la pEC₅₀ de la met-enképhaline pour ce biosenseur α oB est de 6.57, et son effet maximal est de 98.8.

Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivants (en vert), le pEC₅₀ varie de 5.19 pour le SB-235863 à 6.94 pour le KNT-127, pour une moyenne de 6.37 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.32. Enfin, l'effet maximal varie de 94.9 pour le KNT-127 à 146.2 pour le ADL5859, avec 128.8 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 9.07. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange), le pEC₅₀ varie de 6.60 pour le SNC-80 à 8.29 pour le BW373U86, pour une moyenne de 7.28 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.30. Enfin, l'effet maximal pour le biosenseur α oA chez les ligands proconvulsivants varie de 38.36 pour le McpTIPP à 119.2 pour la deltorphine B, avec 79.28 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 16.3.

3.2 Canal Potassique Kir :



9a.



9b.

Figure n°9 : *Données obtenues grâce au biosenseur [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log10 des concentrations molaires en abscisse, 9a. des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant (en vert) ; 9b. des agonistes connus pour être proconvulsivant (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange).*

Comme mentionné dans l'introduction, l'activation des récepteurs opioïdes entraîne l'ouverture du canal potassique Kir 3 (composé des sous-unité 3.1 et 3.2 ; Lavine et al., 2002) en postsynaptique, ceci entraîne l'hyperpolarisation de la membrane postsynaptique (Beaulieu et al., 2010) et donc l'inhibition de la neurotransmission. Ce mécanisme est principalement celui par lequel les effets analgésiques des opioïdes sont médié (Beaulieu, 2013). Ainsi son rôle dans les convulsions originant de l'hippocampe semble plausible, puisqu'il s'agit de l'inhibition des interneurons GABAergiques lors de l'activation des récepteurs opioïdes qui en est la cause (Drake et al., 2007 ; Erbs et al., 2012 ; Chung et al., 2015). Notre intérêt s'est donc porté sur ce canal potassique rectifiant entrant. La figure n°9 ci-dessus est composée de deux graphiques, ayant tout deux en abscisses les concentrations molaires logarithmiques des molécules testées, et en ordonnées : la réponse mesurée grâce au biosenseur [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] sous forme de Δ net-BRET2, en pourcentage par rapport au référentiel, un ligand endogène du DOP, la met-enképhaline.

Il est possible de constater sur la figure n°9a. que les agonistes connus pour ne pas engendrer d'état proépileptique (en vert) (voir tableau I page 24) lié à l'activation du DOP, comme le ADL5859, le ARM390, le KNT-127, et le SB-235863 présentent une efficacité relative d'environ 150% vers le biosenseur Kir3.2 par rapport au 100% du ligand endogène de référence, la met-enképhaline. En revanche, leur puissance varie pour éliciter ce biosenseur : le SB-235863 est moins puissant que le référentiel met-enképhaline de l'ordre d'un logarithme (soit environ 1 μ M versus 0.1 μ M) ; tandis que ARM390 et le ADL5859 sont approximativement aussi puissants que la met-enképhaline (soit 0.1 μ M) ; et le KNT-127 quant à lui est plus puissant que le référentiel de l'ordre d'un logarithme (soit 10 nM versus 0.1 μ M). Finalement, le ADL5747 possède une efficacité d'environ 110% par rapport à la référence met-enképhaline, pour éliciter le biosenseur Kir3.2, en revanche, sa puissance est supérieure à celle de cette dernière, de l'ordre d'un demi-logarithme (soit environ 0.05 μ M versus 0.1 μ M).

En Figure n°9b. cependant, il est possible de constater que les agonistes connus pour engendrer des états proépileptiques liés à l'activation du DOP (en rouge) (voir tableau I page 24), comme le deltorphine B et le DADLE ont une efficacité d'environ 110% à éliciter le biosenseur Kir3.2 par rapport à la met-enképhaline, le ligand de référence. En revanche, la puissance de la deltorphine B lui est supérieure de l'ordre d'un logarithme (10 nM versus 0.1 μ M) ; alors que le DADLE est aussi puissant que la met-enképhaline (soit 0.1 μ M). Le SNC-80

en revanche, est aussi puissant que la deltorphine B (environ 10 nM), mais possède une efficacité de 150% par rapport à la met-enképhaline. Le BW373U86 quant à lui est efficace à 75% pour éliciter Kir3.2 par rapport au référentiel, mais plus puissant que celui-ci de trois ordres logarithmiques (soit 0.1 nM versus 0.1 μ M). Enfin, le McpTIPP dont le statut proépileptique est inconnu (en orange), est efficace à 25% envers le biosenseur Kir3.2 et moins puissant que la met-enképhaline de l'ordre d'un logarithme (soit 1 μ M versus 0.1 μ M).

Tableau VI : *Tableau des données relatives aux courbes obtenues grâce au biosenseur [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] par activation du rat DOP, soit la pEC₅₀, son erreur type, et l'effet maximal.*

Agonistes	pEC50	Effet Maximal \pm Erreur Type	
Met-Enképhaline (n=9)	6.708	97.33	0.059
DADLE (n=5)	6.278	113.90	0.039
Deltorphine B (n=6)	7.924	111.20	0.093
SNC-80 (n=4)	7.357	157	0.060
BW373U86 (n=4)	9.842	75.96	0.287
McpTIPP (n=3)	6.267	24.03	0.306
ARM390 (n=4)	6.889	144.70	0.056
ADL5747 (n=3)	7.444	114.60	0.050
ADL5859 (n=3)	7.237	140.30	0.045
SB-235863 (n=3)	5.765	160.20	0.064
KNT-127 (n=3)	7.729	148.90	0.114

Le tableau VI ci-dessus permet d'illustrer des paramètres analytiques du modèle logistique classique de la pharmacologie : le pEC₅₀, et l'effet maximal correspondants aux courbes doses réponses présentées en figure n°9a. et 9b. ci-dessus, concernant le biosenseur [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10]. À titre de référence, la pEC₅₀ de la met-enképhaline pour ce biosenseur Kir3.2 est de 6.71, et son effet maximal est de 97.3.

Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivants (en vert), le pEC₅₀ varie de 5.76 pour le SB-235863 à 7.73 pour le KNT-127, pour une moyenne de 7.01 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.34. Enfin, l'effet maximal varie de 114.6 pour le ADL5747 à 160.2 pour le SB-235863, avec 141.7 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 7.55.

Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le pEC50 varie de 6.27 pour le McpTIPP et le DADLE à 9.84 pour le BW373U86, pour une moyenne de 7.53 dans leur ensemble, avec une erreur type de 0.66. Enfin, l'effet maximal chez ces ligands pour le biosenseur Kir3.2 varie de 24.03 pour le McpTIPP à 157 pour le SNC-80 avec 96 de moyenne de groupe, pour une erreur type de 22.2.

3.3 Modèle Opérationnel :

Comme décrit dans l'introduction et la partie méthodes, un niveau d'analyse supplémentaire des données est ensuite possible grâce au modèle opérationnel développé plus récemment par Black et Leff (Black & Leff, 1983), et élaboré par Kenakin (Kenakin, 2004 ; Kenakin et al., 2012). Ses paramètres analytiques découlent du postulat de la saturabilité de l'activité du complexe ligand-récepteur (Kenakin, 2004) ; ils sont donc très utiles pour comparer l'efficacité relative des agonistes (Kenakin, 2004 ; Nagi & Piñeyro, 2015).

Le tableau VII (voir Annexe n° 2 page 97) permet d'illustrer un des paramètres analytiques du modèle opérationnel de la pharmacologie : le $\text{Log } \tau / K_a$ ou coefficient de transduction correspondant aux courbes doses réponses et données analytiques du modèle classique de la pharmacologie présentées ci-dessus, et ceux concernant tous les biosenseurs étudiés jusqu'à présent.

Concernant [G- α 1.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] : à titre de référence, le $\text{log } \tau / K_a$ de la mét-enképhaline pour ce biosenseur est de 5.56. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\text{log } \tau / K_a$ varie de 4.34 pour le SB-235863 à 6.28 pour le KNT-127, pour une moyenne de 6.07 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\text{log } \tau / K_a$ varie de 5.33 pour le McpTIPP à 8.29 pour le BW373U86, pour une moyenne de 6.50 dans leur ensemble.

Concernant [G- α A.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] : à titre de référence, le $\log \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est de 5.79. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\log \tau / K_a$ varie de 4.38 pour le SB-235863 à 6.89 pour le ADL5859, pour une moyenne de 5.96 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\log \tau / K_a$ varie de 4.77 pour le McpTIPP à 7.68 pour le BW373U86, pour une moyenne de 6.17 dans leur ensemble.

Concernant [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] : à titre de référence, le $\log \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est de 6.50. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\log \tau / K_a$ varie de 5.84 pour le SB-235863 à 7.83 pour le KNT-127, pour une moyenne de 6.98 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\log \tau / K_a$ varie de 5.91 pour le McpTIPP à 10.40 pour le BW373U86, pour une moyenne de 7.51 dans leur ensemble.

Concernant [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] : à titre de référence, le $\log \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est de 6.50. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\log \tau / K_a$ varie de 5.84 pour le SB-235863 à 7.83 pour le KNT-127, pour une moyenne de 6.98 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\log \tau / K_a$ varie de 5.91 pour le McpTIPP à 10.40 pour le BW373U86, pour une moyenne de 7.51 dans leur ensemble.

Tableau VIII : *Compilation pour chaque biosenseur des coefficients de transduction normalisés / relatifs à ceux du ligand de référence (met-enképhaline) : $\Delta \text{Log } \tau / K_a$, et de leur erreur type respective.*

	$\alpha i1$		αoA		αoB		Kir 3.2	
	$\Delta \text{Log } \tau / K_a$	Erreur Type	$\Delta \text{Log } \tau / K_a$	Erreur Type	$\Delta \text{Log } \tau / K_a$	Erreur Type	$\Delta \text{Log } \tau / K_a$	Erreur Type
Met-Enképhaline	0	0.101	0	0.216	0	0.233	0	0.088
DADLE	0.241	0.137	-0.142	0.464	-0.228	0.456	-0.313	0.090
Deltorphine B	1.026	0.333	0.746	0.303	1.149	0.266	1.231	0.088
SNC-80	0.949	0.094	0.411	0.241	0.248	0.270	0.838	0.080
BW373U86	2.729	0.206	1.889	0.323	1.966	0.253	3.904	0.190
McpTIPP	-0.236	0.395	-1.027	0.705	-1.168	0.495	-0.58	0.508
ARM390	0.639	0.088	0.846	0.24	0.691	0.251	0.329	0.080
ADL5747	1.405	0.094	-0.481	0.302	0.057	0.235	0.764	0.104
ADL5859	1.011	0.087	1.098	0.251	0.631	0.243	0.643	0.085
SB-235863	-1.225	0.090	-1.419	0.264	-0.696	0.245	-0.652	0.085
KNT-127	0.715	0.323	0.791	0.289	-0.177	0.234	1.343	0.108

Le tableau VIII ci-dessus permet d'illustrer un autre des paramètres analytiques du modèle opérationnel de la pharmacologie : le $\Delta \text{Log } \tau / K_a$ ou coefficient de transduction normalisé / relatif au ligand de référence, la met-enképhaline (soit $\text{Log } \tau / K_a$ de l'agoniste – $\text{Log } \tau / K_a$ de la met-enképhaline), correspondants aux données analytiques du modèle opérationnel de la pharmacologie présentées au tableau VII (voir annexe n°2 page 97), concernant tous les biosenseurs étudiés jusqu'à présent. Ce paramètre permet d'ajouter un degré supplémentaire de relativité (par rapport au ligand de référence) pour toujours mieux pouvoir comparer les données à travers les biosenseurs (Kenakin, 2004 ; Nagi & Piñeyro, 2015).

Concernant [G- $\alpha i1$.RlucII Vs G- $\gamma 2$.GFP10] : à titre de référence, le $\Delta \text{log } \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est logiquement de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -1.22 pour le SB-235863 à 1.40 pour le ADL5859, pour une moyenne de 0.51 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut

est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta \log \tau / K_a$ varie de -0.23 pour le McpTIPP à 2.73 pour le BW373U86, pour une moyenne de 0.94 dans leur ensemble.

Concernant [G- α 1.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] toujours, une analyse statistique supplémentaire a été effectuée à partir des $\Delta \log \tau / K_a$, grâce à un test ANOVA, avec une valeur P significative ($p < 0.0001$). Ce test à comparaison multiple permet d'établir l'ordre de rang (« rank order ») suivant : SB-235863 \ll McpTIPP \leq DADLE \leq ARM390 \leq KNT-127 \leq SNC-80 \leq ADL5859 \leq Deltorphine B \leq ADL5747 \ll BW373U86.

Concernant [G- α 0A.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] : à titre de référence, le $\Delta \log \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est logiquement égal à 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta \log \tau / K_a$ varie de -1.42 pour le SB-235863 à 1.10 pour le ADL5859, pour une moyenne de 0.17 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta \log \tau / K_a$ varie de -1.03 pour le McpTIPP à 1.89 pour le BW373U86, avec une moyenne de 0.37 dans leur ensemble.

Concernant [G- α 0a.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] toujours, une analyse statistique supplémentaire a été effectuée à partir des $\Delta \log \tau / K_a$, grâce à un test ANOVA avec une valeur P significative ($p < 0.0001$). Ce test à comparaison multiple permet d'établir l'ordre de rang (« rank order ») suivant : SB-235863 \leq McpTIPP \leq ADL5747 \leq DADLE \leq SNC-80 \leq Deltorphine B \leq KNT-127 \leq ARM390 \leq ADL5859 \leq BW373U86.

Concernant [G- α 0B.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] : à titre de référence, le $\Delta \log \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est donc de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta \log \tau / K_a$ varie de -0.70 pour le SB-235863 à 0.70 pour le ARM390, pour une moyenne de 0.10 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta \log \tau / K_a$ varie de -1.17 pour le McpTIPP à 1.87 pour le BW373U86, pour une moyenne de 0.39 dans leur ensemble.

Concernant [G- α ob.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] toujours, une analyse statistique supplémentaire a été effectuée à partir des $\Delta \log \tau / K_a$, grâce à un test ANOVA avec une valeur P significative ($p < 0.0001$). Ce test à comparaison multiple permet d'établir l'ordre de rang (« rank order ») suivant : McpTIPP \leq SB-235863 \leq DADLE \leq KNT-127 \leq ADL5747 \leq Deltorphine B \leq ADL5859 \leq ARM390 \leq SNC-80 \leq BW373U86.

Concernant [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] : à titre de référence, le $\Delta \log \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est évidemment de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta \log \tau / K_a$ varie de -0.65 pour le SB-235863 à 1.34 pour le KNT-127, pour une moyenne de 0.48 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta \log \tau / K_a$ varie de -0.58 pour le McpTIPP à 3.90 pour le BW373U86, pour une moyenne de 1.02 dans leur ensemble.

Enfin, concernant [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] toujours, une analyse statistique supplémentaire a été effectuée à partir des $\Delta \log \tau / K_a$, grâce à un test ANOVA avec une valeur P significative ($p < 0.0001$). Ce test à comparaison multiple permet d'établir l'ordre de rang (« rank order ») suivant : SB-235863 \leq McpTIPP \leq DADLE $<$ ARM390 \leq ADL5859 \leq ADL5747 \leq SNC-80 \leq Deltorphine B \leq KNT-127 \lllll BW373U86.

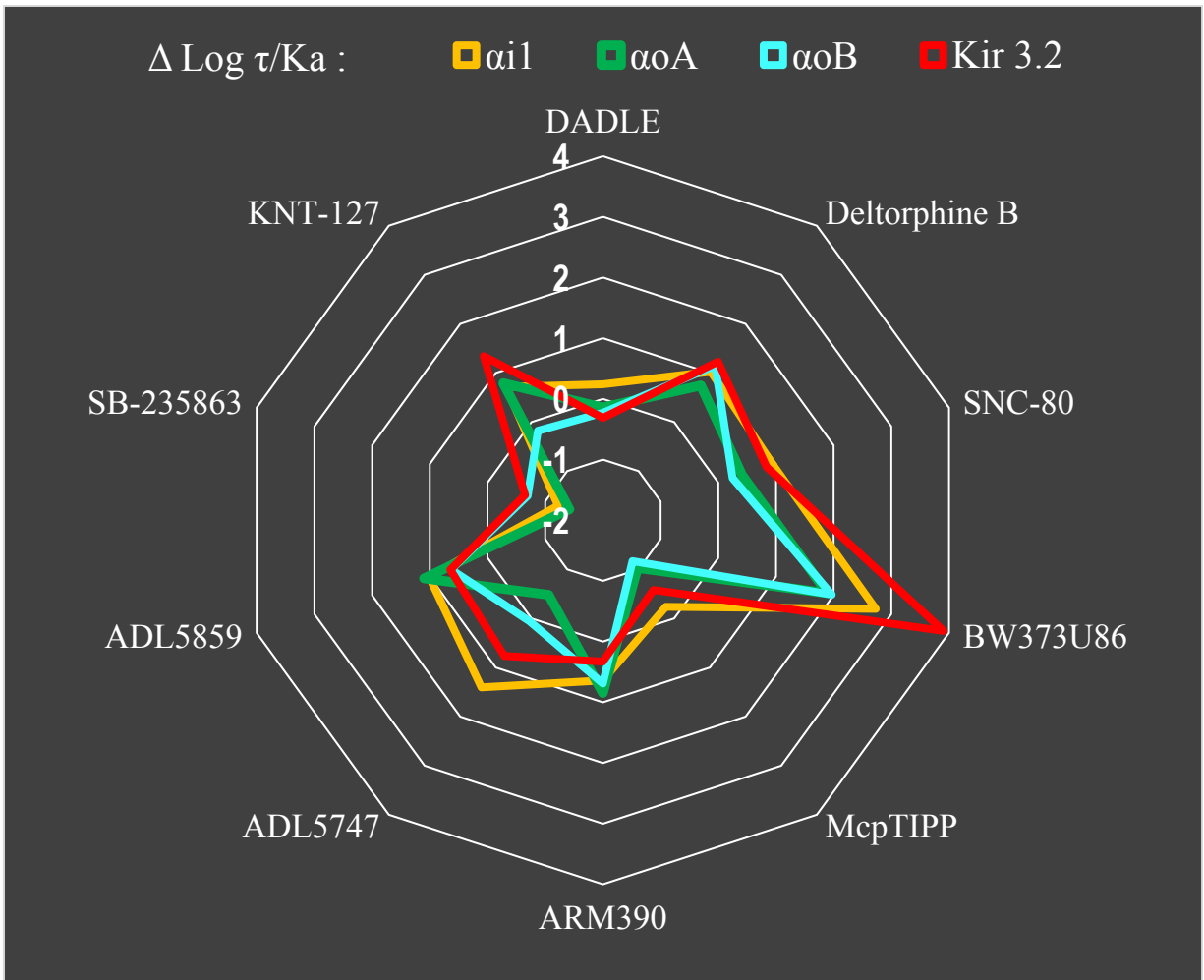


Figure n°10 : *Diagramme de Kiviat (en radar) obtenu à partir des $\Delta \log \tau / Ka$ ou coefficients de transductions normalisés / relatifs au ligand de référence (met-enképhaline) pour chaque biosenseur décrit par rapport à l'ensemble des agonistes à l'étude.*

Le biais de signalisation du modèle opérationnel fait référence à la capacité d'un ligand, d'un récepteur couplé aux protéines G, à diriger le stimulus pharmacologique à un sous-ensemble d'effecteurs parmi ceux contrôlés par le récepteur (Nagi & Piñeyro, 2015). La Figure n°10 présentée ci-dessus illustre un diagramme de Kiviat / en radar, réalisé à partir des $\Delta \log \tau / Ka$, ou coefficients de transduction normalisés / relatifs à la met-enképhaline (le ligand de référence), présentés dans le tableau VIII plus haut, et ce pour tous les biosenseurs à l'étude.

Ainsi représenté, il est donc possible de constater le profil du biais ou signature de chaque biosenseur par rapport aux différentes molécules étudiées, étant proconvulsivante ou non ; il est donc possible de les comparer entre eux. À titre de référentiel, le décagone « 0 » représente la met-enképhaline et son 100% relatif. Cette figure permet donc de visualiser la polarisation des biosenseurs, relativement les uns par rapport aux autres, en fonction de chaque agoniste étudié, afin de toujours mieux pouvoir analyser et comparer les données obtenues entre-elles (Kenakin, 2004 ; Nagi & Piñeyro, 2015).

Concernant [G- α 1.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] et [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] il est possible de constater que leurs signatures respectives par rapport à l'activation du DOP par les différents agonistes étudiés, sont très similaires dans l'ensemble. Leurs deux profils se superposent notamment au niveau de la deltorphine B et du SNC-80, les polygones de chaque biosenseur se suivent à travers le diagramme. Le polygone orange de α 1 dépasse le rouge du Kir3.2 principalement au niveau des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivant comme : ARM390, les deux ADLs (5747 et 5859) ; ou dont le statut est encore inconnu comme le McpTIPP ; mais également chez DADLE, un agoniste décrit comme proconvulsivant par certains auteurs. En revanche le polygone rouge de Kir3.2 dépasse d'un ordre logarithmique le polygone orange de α 1 au niveau du ligand proconvulsivant BW373U86 ; mais il le dépasse aussi au niveau des agonistes n'étant pas proconvulsivants comme le SB-235863, et le KNT-127. Les décagones orange (α 1) et rouge (Kir3.2) ne passent en dessous du seuil « 0 » de la met-enképhaline qu'au niveau du SB-235863 et du McpTIPP ; et sont au niveau de ce seuil par rapport au DADLE.

Concernant [G- α A.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] et [G- α B.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] il est possible de constater que leurs signatures respectives par rapport à l'activation du DOP par les différents agonistes étudiés, sont similaires dans l'ensemble. Leurs deux profils se superposent notamment au niveau du BW373U86, du McpTIPP, du DADLE, et du ARM390 ; quatre agonistes dont les statuts proépileptiques sont différents. Les polygones de chaque biosenseur se suivent à travers le diagramme : le polygone vert de α A dépasse le bleu du α A principalement au niveau des agonistes ADL5859 et KNT-127, tandis que le polygone bleu de α B dépasse le vert de α A au niveau du ADL5747 et du SB-235863 et à peine au niveau de la

deltorphine B. Les décagones vert (αA) et bleu (αB) ne passent en dessous du seuil « 0 » de la met-enképhaline qu'au niveau du SB-235863 et du McpTIPP ; et sont au niveau de ce seuil par rapport au ADL5747 et au DADLE.

Concernant [G- αA .RlucII Vs G- γ2 .GFP10] et [G- γ2 .RlucII versus Kir3.2-GFP10] il est possible de constater que leurs signatures respectives par rapport à l'activation du DOP par les différents agonistes étudiés, sont similaires dans l'ensemble. Leurs deux profils se superposent uniquement au niveau du DADLE, mais les polygones de chaque biosenseur se suivent à travers le diagramme : le polygone vert de αA dépasse légèrement le rouge du Kir3.2 au niveau des agonistes ADL5859 et ARM390, deux agonistes non-pros convulsivants ; tandis que le polygone rouge de Kir3.2 dépasse le vert de αA au niveau de tous les autres agonistes.

Tableau IX : *Mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs à ceux du ligand de référence (met-enképhaline) du biosenseur Kir, en fonction de ceux des biosenseurs alpha : $\Delta\Delta \text{Log } \tau / K_a$ ou facteur de polarisation, et leur erreur type respective.*

	Kir 3.2 Vs αI		Kir 3.2 Vs αA		Kir 3.2 Vs αB	
	$\Delta\Delta\text{Log } \tau/K_a$	Erreur Type	$\Delta\Delta\text{Log } \tau/K_a$	Erreur Type	$\Delta\Delta\text{Log } \tau/K_a$	Erreur Type
Met-Enképhaline	0	0.134	0	0.232	0	0.248
DADLE	-0.554	0.164	-0.171	0.472	-0.085	0.464
Deltorphine B	0.205	0.345	0.485	0.315	0.082	0.280
SNC-80	-0.111	0.123	0.427	0.253	0.59	0.282
BW373U86	1.175	0.281	2.015	0.375	1.938	0.312
McpTIPP	-0.344	0.448	0.447	0.868	0.588	0.709
ARM390	-0.31	0.119	-0.517	0.252	-0.362	0.263
ADL5747	-0.641	0.140	1.245	0.319	0.707	0.256
ADL5859	-0.368	0.122	-0.455	0.265	0.012	0.257
SB-235863	0.573	0.124	0.767	0.277	0.044	0.259
KNT-127	0.628	0.340	0.552	0.308	1.52	0.258

Le modèle opérationnel permet encore d'approfondir l'analyse des données et la mise en corrélation de celles-ci grâce au facteur de polarisation : le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$. Il correspond à la mise en rapport des $\Delta \text{log } \tau / K_a$ de différents biosenseurs, afin de pouvoir les comparer entre

eux relativement par rapport à un, en l'occurrence le biosenseur Kir (G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10) ; et permet ainsi de mesurer la magnitude du biais (Nagi & Piñeyro, 2015). Le tableau IX ci-dessus permet donc d'illustrer un des plus novateurs paramètres analytiques du modèle opérationnel de la pharmacologie : le $\Delta\Delta \text{Log } \tau / K_a$ ou facteur de biais / facteur de polarisation (soit $\Delta \text{Log } \tau / K_a$ de l'agoniste d'un des biosenseurs – $\Delta \text{Log } \tau / K_a$ du même agoniste dans un autre biosenseur). Celui-ci permet donc de directement mettre en rapport les données de différents biosenseurs par rapport à un autre.

Concernant [G- γ 2.RlucII Vs Kir3.2-GFP10] versus [G- α 11.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] : à titre de référence, le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est logiquement de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.64 pour le ADL5747 à 0.63 pour le KNT-127, pour une moyenne de -0.02 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.34 pour le McpTIPP à 1.17 pour le BW373U86, pour une moyenne de 0.07 dans leur ensemble.

Concernant [G- γ 2.RlucII Vs Kir3.2-GFP10] versus [G- α 0A.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] : à titre de référence, le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est logiquement de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.51 pour le ARM390 à 1.25 pour le ADL5747, pour une moyenne de 0.32 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.17 pour le DADLE à 2.01 pour le BW373U86, pour une moyenne de 0.64 dans leur ensemble.

Concernant [G- γ 2.RlucII Vs Kir3.2-GFP10] versus [G- α 0B.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] : à titre de référence, le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est logiquement de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta\Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.36 pour le ARM390 à 1.52 pour le KNT-127, pour une moyenne de 0.38 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être

proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta\Delta \log \tau / Ka$ varie de -0.08 pour le DADLE à 1.94 pour le BW373U86, pour une moyenne de 0.62 dans leur ensemble.

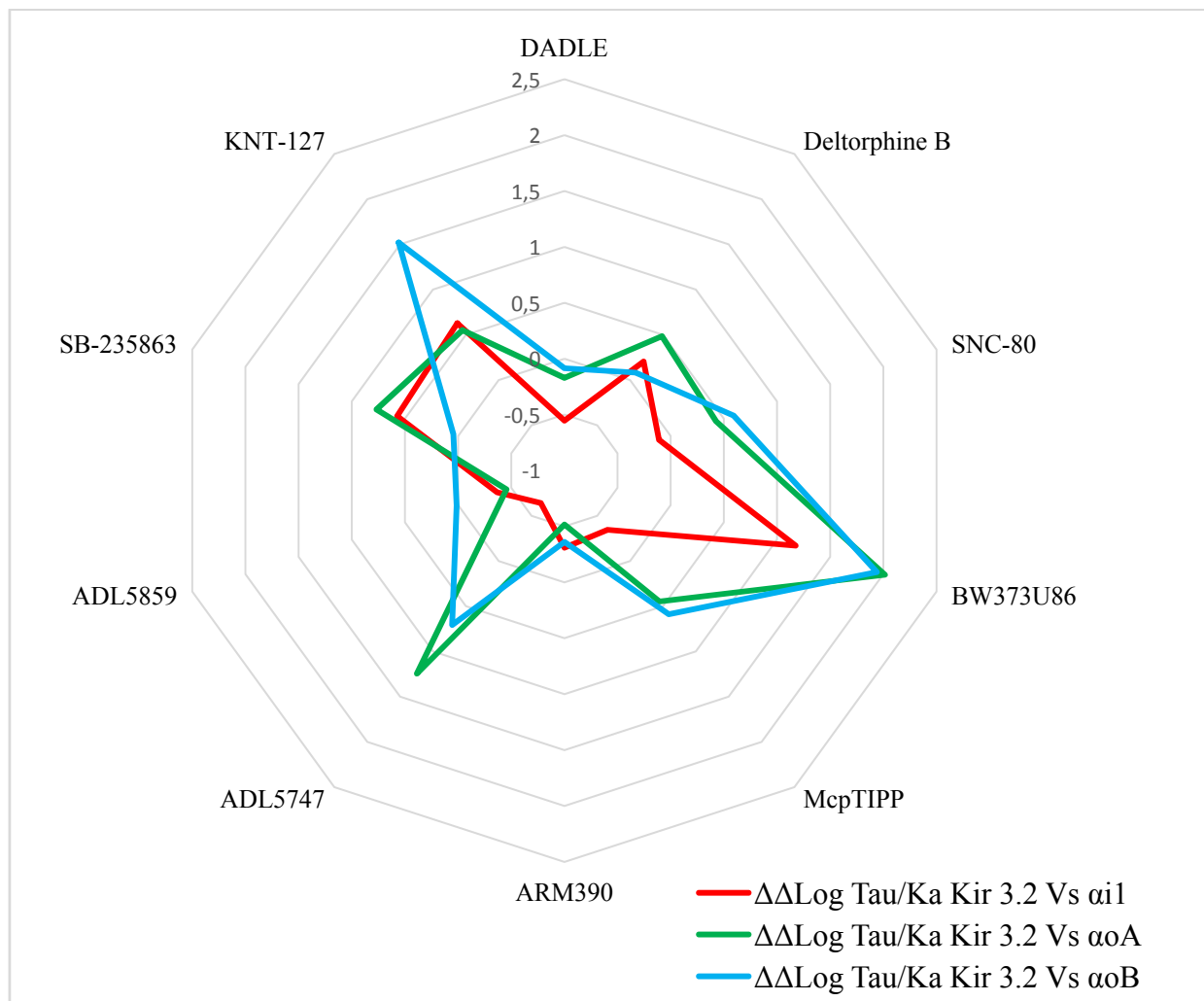


Figure n°11 : Diagramme de Kiviat (en radar) obtenu à partir de la mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs ($\Delta \text{Log } \tau / Ka$): $\Delta\Delta \text{Log } \tau / Ka$ du biosenseur Kir3.2, en fonction des trois biosenseurs alpha.

Afin d’observer et comparer plus aisément la magnitude du biais ou $\Delta\Delta \log \tau / Ka$ des données présentées au tableau IX page 56, il est intéressant de considérer la mise en graphique de ses données relatives. La Figure n°11 présentée ci-dessus illustre un diagramme de Kiviat /

en radar, réalisé à partir des des $\Delta\Delta \log \tau / K_a$ ou facteurs de biais, qui sont présentés dans le tableau IX plus haut.

Ainsi représenté il est possible d’observer la signature de chaque facteur de polarisation du biosenseur [G- γ 2.RlucII Vs Kir3.2-GFP10] par rapport à chaque autre biosenseur (les trois différents biosenseurs α), et ainsi de pouvoir les comparer entre eux ; et ce pour chaque molécule étudiée, étant proconvulsivante ou non (voir tableau I page 24). À titre de référentiel, le décagone « 0 » représente la met-enképhaline, en tant que ligand endogène de référence, donc considérée ici comme n’ayant pas de biais.

Tableau X : *Mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs à ceux du ligand de référence (met-enképhaline) du biosenseur $\alpha i1$, en fonction de ceux des biosenseurs αoA et αoB : $\Delta\Delta \text{Log } \tau / K_a$ ou facteur de polarisation, et leur erreur type respective.*

	$\alpha i1$ Vs αoA		$\alpha i1$ Vs αoB	
	$\Delta\Delta \text{Log } \tau / K_a$	Erreur Type	$\Delta\Delta \text{Log } \tau / K_a$	Erreur Type
Met-Enképhaline	0	0.238	0	0.253
DADLE	0.383	0.483	0.469	0.476
Deltorphine B	0.28	0.450	-0.123	0.425
SNC-80	0.538	0.258	0.701	0.283
BW373U86	0.84	0.383	0.763	0.326
McpTIPP	0.791	0.496	0.932	0.445
ARM390	-0.207	0.255	-0.052	0.266
ADL5747	1.886	0.316	1.348	0.250
ADL5859	-0.087	0.266	0.38	0.258
SB-235863	0.194	0.278	-0.529	0.260
KNT-127	-0.076	0.433	0.892	0.399

De la même manière, il est possible de mettre en relation les coefficients de transduction normalisés de chaque biosenseur des sous unité α , par rapport à $\alpha i1$ particulièrement versus αoA et αoB respectivement, et permet ainsi de mesurer la magnitude du biais ou facteur de polarisation (Nagi & Piñeyro, 2015). Le tableau X ci-dessus permet d’illustrer un des plus novateurs paramètres analytiques du modèle opérationnel de la pharmacologie : le $\Delta\Delta \text{Log } \tau /$

Ka ou facteur de biais / facteur de polarisation (soit $\Delta \text{Log } \tau / K_a$ de l'agoniste d'un des biosenseurs – $\Delta \text{Log } \tau / K_a$ du même agoniste dans un autre biosenseur).

Concernant [G- α i1.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] versus [G- α oA.RlucII Vs G- γ 2.GFP10 : à titre de référence, le $\Delta \Delta \text{log } \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est logiquement de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta \Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.21 pour le ARM390 à 1.89 pour le ADL5747, pour une moyenne de 0.34 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta \Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de 0.28 pour la deltorphine B à 0.84 pour le BW373U86, pour une moyenne de 0.57 dans leur ensemble.

Concernant [G- α i1.RlucII Vs G- γ 2.GFP10] versus [G- α oB.RlucII Vs G- γ 2.GFP10 : à titre de référence, le $\Delta \Delta \text{log } \tau / K_a$ de la met-enképhaline pour ce biosenseur est logiquement de 0. Parmi les différents agonistes décrits pour ne pas être proconvulsivant (en vert) (voir tableau I page 24), le $\Delta \Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.53 pour le SB-235863 à 1.348 pour le ADL5747, pour une moyenne de 0.41 dans leur ensemble. Concernant les différents agonistes décrits pour être proconvulsivant (en rouge), ou dont le statut est incertain (en orange) (voir tableau I page 24), le $\Delta \Delta \text{log } \tau / K_a$ varie de -0.12 pour la deltorphine B à 0.93 pour le McpTIPP, pour une moyenne de 0.55 dans leur ensemble.

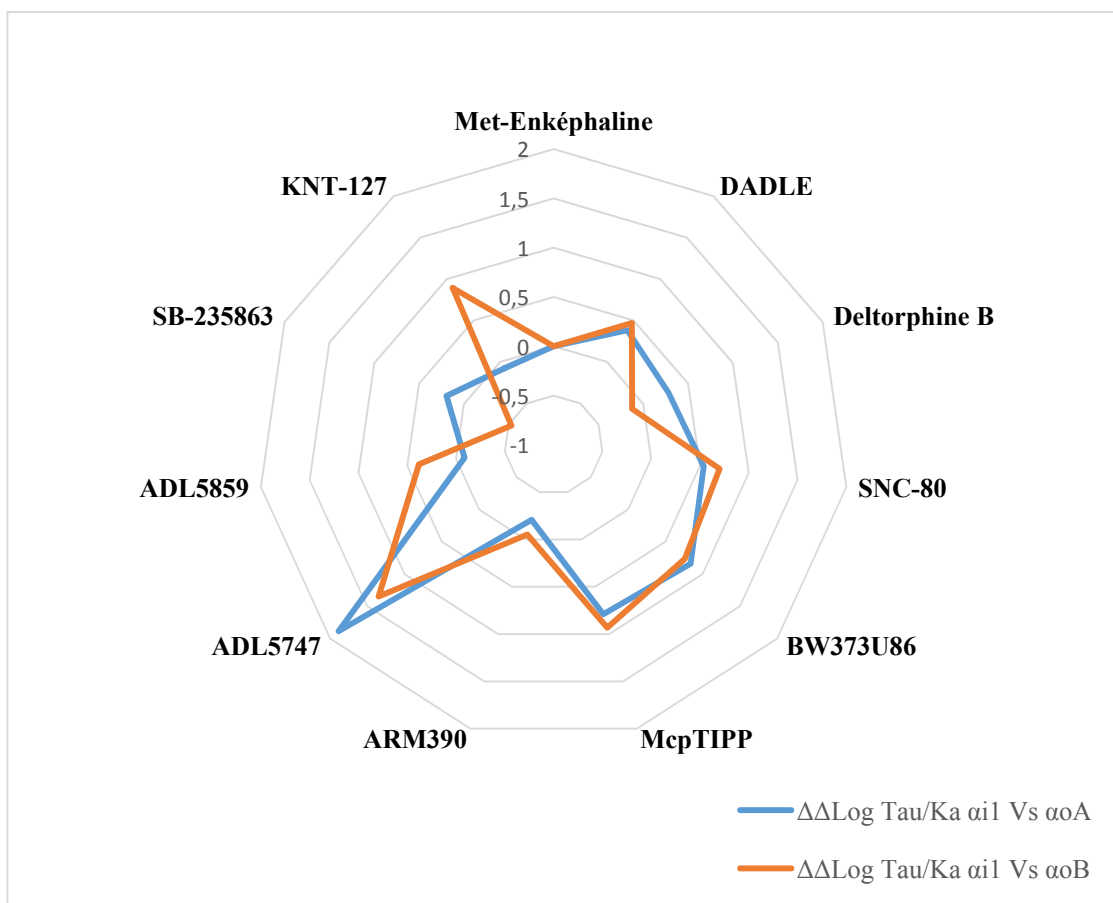


Figure n°12 : *Diagramme de Kiviat (en radar) obtenu à partir de la mise en relation des coefficients de transduction normalisés / relatifs ($\Delta \text{Log } \tau / K_a$): $\Delta \Delta \text{Log } \tau / K_a$ du biosenseur α_{i1} en fonction des biosenseurs α_{oA} et α_{oB} .*

Afin d’observer et comparer plus aisément la magnitude du biais ou $\Delta \Delta \log \tau / K_a$ des données présentées au tableau X page 59, il est intéressant de considérer la mise en graphique de ses données relatives. La Figure n°12 présentée ci-dessus illustre un diagramme de Kiviat / en radar, réalisé à partir des des $\Delta \Delta \log \tau / K_a$ ou facteurs de biais, qui sont présentés dans le tableau X plus haut.

Ainsi représenté il est possible d’observer la signature de chaque facteur de polarisation du biosenseur [G- α_{i1} .RlucII Vs G- γ_2 .GFP10] par rapport aux deux autres biosenseurs alpha (α_{oA} et α_{oB}) pour pouvoir les comparer entre eux ; et ce pour chaque molécule étudiée, étant proconvulsivante ou non. À titre de référentiel, le décagone « 0 » représente la met-enképhaline et son 100% relatif.

Discussion :

D'après nos résultats il semble qu'en moyenne, les agonistes proconvulsivants sont les plus puissants, et que les non convulsivants sont les plus efficaces. Ceci nous permet de dire que les agonistes proconvulsivants sont dirigés par l'affinité, et que les non convulsivants sont dirigés par l'efficacité. Analysons ces résultats d'abord individuellement, puis ensemble, afin de comprendre cette interprétation.

Les paramètres du modèle d'étude classique de la pharmacologie, propre à la théorie occupationnelle, ont été le point de départ dans l'analyse comparative de l'efficacité de différents agonistes d'un récepteur (Kenakin, 2014). Commençons donc par analyser ceux-ci pour comparer les biosenseurs des transducteurs et effecteurs étudiés. Comme la sous-unité $\alpha 1$ de la protéine G est ubiquitaire, présente parmi les populations neuronales (Siehler & Milligan, 2010), et responsable de l'activation de l'effecteur Kir des récepteurs opioïdes par inhibition de l'adénylate cyclase (Beaulieu et al., 2010), notre intérêt s'était d'abord porté sur celle-ci.

À partir de la figure n°6 (page 38), concernant les courbes doses-réponses du biosenseur [G- $\alpha 1$.RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10], il est possible de constater qu'il y a aussi bien des agonistes pleins à travers les ligands proconvulsivants (figure 6b) et ceux qui ne le sont pas (figure 6a) (voir aussi tableau I page 24). En effet, il est possible en corrélant cette figure au tableau III (page 40) de constater que les seuls agonistes à ne pas atteindre le seuil du 100% d'effet maximal par rapport à la met-enképhaline sont le McpTIPP (dont la nature proconvulsivante est inconnue), et la deltorphine B qui quant à elle est connue pour engendrer des convulsions. Il est donc inattendu de retrouver plus de ligands non convulsivants comme les deux ADLs, le SB-235863, ou encore le ARM-390. Seul le SNC-80 chez les proconvulsivants atteint ce seuil dans ce biosenseur.

En revanche, toujours à partir de la figure n°6 (page 38) et le tableau III (page 40), concernant les courbes doses-réponses du biosenseur [G- $\alpha 1$.RlucII versus G- $\gamma 2$.GFP10], il est possible de constater que l'efficacité moyenne des agonistes non convulsivants est

significativement supérieure à celle de ceux qui sont proconvulsivants. En revanche, la puissance moyenne ou pEC_{50} des agonistes proconvulsivants est supérieure d'environ un ordre logarithmique à celle des non convulsivants.

Les agonistes proconvulsivants sont donc en moyenne presque mille fois plus puissant que les agonistes non convulsivants, et le plus puissant agoniste sur ce biosenseur (bien qu'aussi efficace que la met-enképhaline de référence), le BW373U86 est proconvulsivant lui aussi. Pourtant, le constat n'est pas si évident puisqu'il est également possible de constater que certains agonistes non convulsivants comme l'ADL5859 sont plus efficaces et plus puissants que certains autres qui sont proconvulsivants comme le SNC-80. Mais en moyenne, les agonistes proconvulsivants sont donc plus puissant, et les non convulsivants sont plus efficaces.

Comme la sous-unité α_0 de la protéine G est présente parmi les populations neuronales, neuroendocrines, et astrogliales (Siehler & Milligan, 2010), et responsable l'inhibition des canaux calciques présynaptiques, par activation des récepteurs opioïdes (Beaulieu et al., 2010), notre intérêt s'est ensuite porté sur celle-ci. D'abord sur son premier sous type α_0A , afin de pouvoir continuer à établir une signature pour chaque ligand proconvulsivant ou non, par rapport à l'activation du DOP, et les comparer à celles du biosenseur α_1 .

À partir de la figure n°7 (page 43) et du tableau IV (page 45), concernant les courbes doses-réponses du biosenseur [G- α_0A .RlucII versus G- γ_2 .GFP10] et les paramètres analytiques de celles-ci, il est tout d'abord possible de constater que l'efficacité des agonistes ne dépasse pas les 150% (alors que certains dépassent les 200% chez α_1). Cependant, de manière générale, l'ordre de puissance et d'efficacité des agonistes les uns par rapport aux autres est maintenu par rapport à α_1 , sauf pour le DADLE qui devient un agoniste partiel pour le biosenseur α_0A . En revanche, le McpTIPP est toujours un agoniste partiel, le SB-235863 reste le ligand le plus efficace malgré sa faible puissance (son pEC_{50} est deux fois plus petit que celui du BW373U86 pour les deux biosenseurs), et enfin le BW373U86 justement, qui reste le ligand le plus puissant malgré son efficacité d'environ 90%.

Toujours à partir de la figure n°7 (page 43) et du tableau IV (page 45), concernant les courbes

doses-réponses du biosenseur [G- α A.RlucII versus G- γ 2.GFP10], il est possible de constater que l'efficacité moyenne des agonistes non convulsivants reste supérieure à celle des agonistes proconvulsivants. Comme c'est le cas chez le biosenseur α i1, même si l'écart est ici moins prononcé. De plus, la puissance moyenne ou pEC₅₀ des agonistes proconvulsivants est supérieure d'environ un ordre logarithmique à celle des non convulsivants. Ceci est également le cas pour le biosenseur α i1.

Chez α i1 comme chez α oA, les agonistes proconvulsivants sont donc en moyenne presque mille fois plus puissant que les agonistes non convulsivants. Le plus puissant agoniste sur ces biosenseurs : le BW373U86, est proconvulsivant lui aussi. En moyenne, les agonistes proconvulsivants sont donc plus puissants, et les non convulsivants sont plus efficaces.

En ce qui concerne α oB et son biosenseur, cette comparaison par rapport à α oA nous parue pertinente dans la mesure où différente sous population neuronale de l'hippocampe comme les interneurons GABAergiques pourraient potentiellement exprimer l'un ou l'autre. Ainsi, aux vues de la théorie de la sélectivité fonctionnelle, il est compréhensible qu'en fonction du sous-type d'effecteur, la capacité d'un ligand à induire une transduction de signal vers une réponse intracellulaire ne soit pas la même.

À partir de la figure n°8 (page 46) et du tableau V (page 48), concernant les courbes doses-réponses du biosenseur [G- α B.RlucII versus G- γ 2.GFP10] et les paramètres analytiques de celles-ci, il est tout d'abord possible de constater que l'efficacité des agonistes ne dépasse pas les 150%, comme pour α oA, alors que certains dépassent les 200% chez α i1. Cependant, de manière générale, l'ordre de puissance et d'efficacité des agonistes les uns par rapport aux autres est maintenu par rapport à α oA (le DADLE est aussi un agoniste partiel chez α oB) ; et aussi par rapport à α i1. Par exemple : le McpTIPP est toujours un agoniste partiel, le SB-235863 est un des ligands les plus efficaces malgré sa faible puissance (son pEC₅₀ est plus d'une fois et demi plus petit que celui du BW373U86 pour α oB et deux fois plus petit pour α i1 et α oA), et enfin le BW373U86 justement, qui reste le ligand le plus puissant malgré son efficacité d'environ 90%.

En revanche, toujours à partir de la figure n°8 (page 46) et du tableau V (page 48),

concernant les courbes doses-réponses du biosenseur [G- α B.RlucII versus G- γ 2.GFP10], il est possible de constater que l'efficacité moyenne des agonistes non convulsivants (128.8) reste significativement supérieure à celle des agonistes proconvulsivants (79.8). Comme c'est le cas chez le biosenseur α i1 et α oA. De plus, la puissance moyenne ou pEC₅₀ des agonistes proconvulsivants est supérieure d'environ un ordre logarithmique (moyenne des pEC₅₀ : 7.28 contre 6.37) à celle des non convulsivants. Ceci est également le cas pour le biosenseur α i1 et α oA.

Chez α i1 comme chez α oA et α oB, les agonistes proconvulsivants sont donc en moyenne presque mille fois plus puissants que les agonistes non convulsivants. Le plus puissant agoniste sur ces trois biosenseurs : le BW373U86, est proconvulsivant lui aussi. En moyenne, les agonistes proconvulsivants sont donc plus puissant, et les non convulsivants sont plus efficaces.

En ce qui concerne le canal potassique Kir3 et son biosenseur, comme mentionné dans l'introduction, l'activation des récepteurs opioïdes entraîne l'ouverture du canal potassique Kir 3 (composé des sous-unité 3.1 et 3.2 ; Lavine et al., 2002), et ceci entraîne l'hyperpolarisation de la membrane postsynaptique (Beaulieu et al., 2010), et donc l'inhibition de la neurotransmission. Ce mécanisme est principalement celui par lequel les effets analgésiques des opioïdes sont médiés (Beaulieu, 2013). Ainsi son rôle dans les convulsions originant de l'hippocampe semble plausible, puisqu'il s'agit de l'inhibition des interneurons GABAergiques lors de l'activation des récepteurs opioïdes qui en est la cause (Drake et al., 2007 ; Erbs et al., 2012 ; Chung et al., 2015). Notre intérêt s'est donc porté sur ce canal potassique rectifiant entrant, afin de pouvoir comparer à nos trois biosenseurs de transducteurs, le biosenseur d'un effecteur, ce canal potassique Kir3 dont l'activation est prépondérante pour l'analgésie opioïde (voir figure n°2 page 22).

À partir de la figure n°9 (page 49) et du tableau VI (page 51), concernant les courbes doses-réponses du biosenseur [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] et les paramètres analytiques de celles-ci, il est tout d'abord possible de constater que l'efficacité des agonistes ne dépasse pas les 150% (sauf pour le SB-235863 à 160%), comme pour α oA et α oB ; alors que certains dépassent les 200% chez α i1. Cependant, de manière générale, l'ordre de puissance et d'efficacité des agonistes les uns par rapport aux autres est maintenu par rapport aux trois

biosenseurs des transducteurs étudiés. Le DADLE redevient dans Kir3 un agoniste plein comme chez $\alpha 1$, alors qu'il est un agoniste partiel chez les deux $\alpha 0$. le McpTIPP est toujours un agoniste partiel, le SB-235863 est le ligand le plus efficace malgré sa faible puissance (son pEC_{50} est plus d'une fois et demi plus petit que celui du BW373U86 pour Kir3 et $\alpha 0B$, et deux fois plus petit pour $\alpha 1$ et $\alpha 0A$), et enfin le BW373U86 justement, qui reste le ligand le plus puissant pour les biosenseurs des transducteurs, et pour celui de l'effecteur Kir3.

En revanche, toujours à partir de la figure n°9 (page 49) et du tableau VI (page 51), concernant les courbes doses-réponses du biosenseur [G- $\gamma 2$.RlucII versus Kir3.2-GFP10], il est possible de constater que l'efficacité moyenne des agonistes non convulsivants reste significativement supérieure à celle des agonistes proconvulsivants. Comme c'est le cas chez les trois biosenseurs des transducteurs α . De plus, la puissance moyenne ou pEC_{50} des agonistes proconvulsivants est supérieure d'environ un demi-ordre logarithmique à celle des non convulsivants. Ceci est également le cas pour les trois biosenseurs des transducteurs α , cependant chez ceux-ci, la puissance moyenne des agonistes proconvulsivants est supérieure d'environ un ordre logarithmique à celle des non convulsivants.

À travers les quatre biosenseurs étudiés, les agonistes proconvulsivants sont donc en moyenne mille à cinq cents fois plus puissants que les agonistes non convulsivants. Le plus puissant agoniste sur ces quatre biosenseurs : le BW373U86, est proconvulsivant lui aussi. Ainsi, il apparaît qu'en moyenne, les agonistes proconvulsivants sont donc plus puissants, et les non convulsivants sont plus efficaces, et ce à travers les quatre biosenseurs étudiés. Considérons à présent l'approche du modèle opérationnel afin d'approfondir la comparaison des différents agonistes à travers les biosenseurs étudiés. De plus, ces paramètres analytiques découlent du postulat de la saturabilité de l'activité du complexe ligand-récepteur ; et non de la théorie occupationnelle (Kenakin, 2004).

La sélectivité fonctionnelle fait référence à la capacité des récepteurs couplés aux ligands des protéines G à diriger un stimulus pharmacologique à un sous ensemble d'effecteurs parmi ceux contrôlés par le récepteur en question (Nagi & Piñeyro, 2015). Pour pouvoir illustrer ce concept pharmacologique avec plus de nuance que le modèle occupationnel classique et ses

paramètres présentés précédemment ; le modèle opérationnel est un puissant outil. Il permet en effet d'apporter une méthode d'analyse complémentaire, mettant en avant la diversité de réponse de chaque agoniste, grâce à de nouveaux paramètres analytiques comme les coefficients de transduction. Représentés sous forme de diagrammes de Kiviat (aussi appelés « web of efficacities » ; Evans et al., 2010), ceux-ci permettent de représenter, de quantifier, et de comparer de manière fiable et intuitive le profil de biais unique de chaque agoniste.

En effet, en considérant le tableau VII (Annexe n°2 page) présentant les coefficients de transductions pour chaque biosenseur, il est possible de notamment constater que l'ordre d'efficacité et de puissance précédemment décrit des différents agonistes étudiés n'est plus le même. Le $\log \tau / K_a$ du SB-235863 par exemple est systématiquement inférieur à celui de l'agoniste partiel McpTIPP, et ce à travers les quatre biosenseurs. En revanche le BW373U86 qui était l'agoniste le plus puissant (mais loin d'être le plus efficace) selon les paramètres du modèle classique, se retrouve être l'agoniste avec le plus grand $\log \tau / K_a$ selon le modèle opérationnel, à travers les quatre biosenseurs.

Les différences observées entre le modèle classique et le modèle opérationnel sont dues au fait que τ intègre dans une même variable le potentiel de couplage d'un système avec les unités signalétiques, et l'efficacité intrinsèque du ligand (Nagi & Piñeyro, 2015). Donc, plus τ est élevé, plus un complexe ligand-récepteur peut activer une voie de signalisation dans un système donné. Aussi, bien que la valeur de τ varie d'un système à l'autre pour un même agoniste ; les valeurs relatives entre les agonistes restent constantes, ce qui constitue un avantage certain par rapport à la théorie occupationnelle (Kenakin, 2004).

Afin de pouvoir comparer les quatre biosenseurs de manière encore plus exacte et précise, il est donc possible de normaliser les coefficients de transductions par rapport à un ligand endogène de référence utilisé à travers l'ensemble des biosenseurs, soit la met-enképhaline ici. Ce $\Delta \log \tau / K_a$ ou coefficient de transduction normalisé / relatif au ligand de référence est représenté pour chaque agoniste et biosenseur au tableau VIII (page 54) ; et illustré grâce à la figure n°10 (page 56). Il est ici possible de constater que le SB-235863 a systématiquement le $\Delta \log \tau / K_a$ le plus faible à travers les biosenseurs ; tandis que BW373U86 à l'inverse possède

le plus fort coefficient de transduction relatif à travers les biosenseurs.

Peu d'agonistes ont un $\Delta \log \tau / K_a$ supérieur à 1, mais de ceux qui le sont, il existe aussi bien des ligands proconvulsivants (BW373U86 pour les quatre biosenseurs, et Deltorphine B pour $\alpha 1 / \alpha B / Kir3$) que non convulsivants (les deux ADLs pour $\alpha 1$, ou le KNT-127 pour Kir3). Ceci est également constatable grâce à la figure n°10 (page 56), où la juxtaposition sous forme de diagramme permet de facilement appréhender les différences de chaque ligand à travers les biosenseurs. Cependant, il est malgré tout possible de constater que les ligands proconvulsivants possèdent en moyenne un coefficient de transduction relatif significativement supérieur à celui des agonistes non convulsivants, ce à travers les quatre biosenseurs étudiés ($\alpha 1 : 0.51 \text{ Vs } 0.94 / \alpha A : 0.17 \text{ Vs } 0.37 / \alpha B : 0.10 \text{ Vs } 0.39 / Kir3 : 0.48 \text{ Vs } 1.02$).

Le modèle opérationnel permet encore cependant d'approfondir l'analyse des données et la mise en corrélation de celles-ci grâce au facteur de polarisation : le $\Delta \Delta \log \tau / K_a$. Il correspond à la mise en rapport des $\Delta \log \tau / K_a$ décrits précédemment des différents biosenseurs, afin de pouvoir les comparer entre eux relativement par rapport à un seul. En l'occurrence premièrement le biosenseur de l'effecteur Kir, versus les biosenseurs des trois transducteurs alpha ; et ensuite les transducteurs entre eux : $\alpha 1$ versus αA et αB . Ainsi, il est possible de mesurer la magnitude du biais (Nagi & Piñeyro, 2015), car ce ratio de transduction peut être très utile pour comparer l'efficacité relative des agonistes à travers différentes voies signalétiques (Kenakin, 2004).

Concernant les $\Delta \Delta \log \tau / K_a$ du transducteur $\alpha 1$, versus ceux des transducteurs αA et αB , répertoriés au tableau X (page 61) et illustrés à la figure n°12 (page 63), il est possible de constater que ADL5747 possède une grande polarisation vers $\alpha 1$, tandis que ARM-390 à l'inverse n'en possède pas (biais vers les deux α), alors que tous deux sont des agonistes non convulsivants. Le BW373U86, et le SNC-80 quant à eux présentent aussi une polarisation vers $\alpha 1$, alors qu'ils sont tous deux convulsivants.

Cependant, il est malgré tout possible de constater que les ligands proconvulsivants possèdent en moyenne un facteur de polarisation significativement supérieur à celui des

agonistes non convulsivants, et ce à travers les deux mises en relation des coefficients de transduction ($\alpha 1-\alpha A : 0.34 \text{ Vs } 0.57 / \alpha 1-\alpha B : 0.41 \text{ Vs } 0.55$).

Il est donc possible d'apprécier, individuellement pour chaque agoniste, les différentes polarisation et magnitude du biais à travers les biosenseurs étudiés, mais il n'est pas encore possible de discerner un profil spécifique aux agonistes proconvulsivants à partir de ceux-ci.

Concernant les $\Delta \Delta \log \tau / K_a$ de l'effecteur Kir, versus ceux des biosenseurs des trois transducteurs alpha, répertoriés au tableau IX (page 58) et illustrés à la figure n°11 (page 60) il est possible de constater la polarisation du SNC-80 et du ADL5747 vers les αA et αB ($\Delta \Delta \log \tau / K_a$ positif) versus $\alpha 1$ ($\Delta \Delta \log \tau / K_a$ négatif), alors que l'un est proconvulsivant et l'autre non. Il est également possible de constater que le BW373U86 reste le ligand ayant le plus grand coefficient de transduction relatif à travers les biosenseurs, et lui aussi présente une plus grande polarisation vers les deux α . Comme $\alpha 1$ est le plus efficace transducteur parmi les trois sous-unités alpha étudiées, il est attendu que la mise en ratio par rapport à Kir3 représente un tel biais.

Cependant, il est malgré tout possible de constater que les ligands proconvulsivants possèdent en moyenne un facteur de polarisation significativement supérieur à celui des agonistes non convulsivants, ce à travers les trois mises en relation des coefficients de transduction (Kir3.2- $\alpha 1 : -0.02 \text{ Vs } 0.07 / \text{Kir3.2-}\alpha A : 0.32 \text{ Vs } 0.64 / \text{Kir3.2-}\alpha B : 0.38 \text{ Vs } 0.62$).

Il est donc possible d'apprécier, individuellement pour chaque agoniste, les différentes polarisation et magnitude du biais à travers les biosenseurs étudiés, mais il n'est toujours pas possible de discerner un profil spécifique aux agonistes proconvulsivants à partir de ceux-ci.

Comment expliquer un tel phénomène ? Il se pourrait que nos biosenseurs qui se situent en amont de la succession d'intermédiaire pharmacologique et de la réponse cellulaire, ne soient également pas capables de déterminer à eux seuls la prépondérance d'un agoniste à engendrer des convulsions.

En effet nos biosenseurs sont placés au niveau récepteur et transducteurs de signal (les trois sous types de sous-unités alpha de la protéine G) et au niveau transducteur-effecteur (entre la sous-unité gamma de la protéine G et le canal potassique Kir3.2). C'est également pour cette raison qu'il paraît important de continuer à définir et élaborer des profils de biais toujours plus détaillés (« web of efficacities » ; Evans et al., 2010).

En effet, en comparant les profils de différents agonistes sur un ensemble de biosenseurs à travers les différentes étapes de la cascade intracellulaire, la prédictibilité de la prépondérance d'un agoniste à engendrer des effets secondaires proconvulsivants accroît.

Effectivement il semblerait important également de considérer dans le futur, en plus de ce que notre recherche a pu apporter, des biosenseurs qui seraient capables de quantifier l'interaction du complexe agoniste-récepteur, au niveau de l'internalisation, du recyclage (rôle des β -arrestines ; Bohn et al., 2000 ; Kovacs et al., 2009), ou encore de la désensibilisation du récepteur (Charlton, 2009). En effet, ces phénomènes pourraient être impliqués dans les mécanismes proconvulsifs, et il serait intéressant et important à l'avenir de se pencher sur le sujet.

L'hypothèse de la sélectivité fonctionnelle décrivant la complexité intrinsèque de chaque réponse intracellulaire prend alors tout son sens. En effet, elle permet d'appréhender concrètement les différents comportements d'un système moléculaire comme les GPCRs, qui sont engendrés par chaque changement de conformation de celui-ci, en fonction notamment de l'activité structure-fonction de chaque agoniste sur chaque récepteur, et ce aussi en fonction des différents types d'effecteurs liés au récepteur.

Comme il est question de convulsions qui sont dose-dépendantes (Tortella et al., 1984 ; Cain & Corcoran, 1985 ; Tortella et al., 1986 ; Tortella et al., 1987 ; Caspaso, 2008 ; Saitoh et al., 2011 ; Chung et al., 2015) ; l'hypothèse pharmacodynamique de la saturation des récepteurs opioïdes, épuisant ainsi ce qui est décrit comme la réserve du récepteur (« receptor reserve » ; Cox et al., 1998 ; Broom et al., 2002 ; Kenakin, 2004 ; Charlton, 2009) par certains agonistes plus rapidement et plus efficacement que d'autres, semble pertinente. De plus, il semble

important de rappeler que la variabilité expérimentale à travers les différentes études ayant permis de déterminer le potentiel proconvulsivant des agonistes étudiés (voir tableau I page 26), est à prendre en compte lors de la considération du potentiel proconvulsivant des agonistes étudiés.

Cette théorie stipule que les effets convulsivants et anti-nociceptifs des agonistes δ et μ auraient potentiellement différentes réserves de récepteur, et par conséquent différentes exigences d'efficacité et/ou de puissance (Cox et al., 1998 ; Broom et al., 2002). Ce mécanisme d'action permettrait d'expliquer pourquoi certains agonistes aussi efficaces et puissant n'ont pas les mêmes propriétés proconvulsivantes, et correspond aux résultats obtenus dans la présente recherche puisque nous avons démontré qu'en moyenne, les agonistes proconvulsivants était toujours plus puissants que les agonistes non convulsivants, mais pas nécessairement plus efficaces. Ceci nous permet de dire que les agonistes proconvulsivants sont dirigé par l'affinité, et que les non convulsivants sont dirigés par l'efficacité.

En effet, plusieurs études ont été publiées quant à la capacité de séparer les effets proconvulsivants des agonistes δ ; des effets bénéfiques de ceux-ci (Jutkiewicz et al., 2005 ; Saitoh et al., 2011). Ces publications renforcent encore l'idée d'activité structure-fonction, de sélectivité fonctionnelle, et de réserve de récepteur, et donc de saturabilité de celle-ci.

D'autres suggèrent encore que l'augmentation des niveaux de production d'enképhalines endogènes et de récepteurs mu opioïdes, au sein des populations d'interneurones GABAergiques, signifie que la libération endogène d'enképhalines pourrait inhiber encore plus efficacement les influx GABAergiques qu'à travers une stimulation exogène, qui entraînerait ultimement les décharges glutamatergiques causées par le bourgeonnement des fibres moussues (« mossy fiber sprouting » ; tck & Nadler, 1985 ; Cronin et al., 1992). Il est d'ailleurs intéressant de noter que les enképhalines justement, ont une affinité dix fois supérieure pour le DOP que pour le MOP (Corbett et al., 1993).

Cependant d'autres auteurs argumentent que l'augmentation de transmission GABAergique et de l'action des MOP, est indépendante de la transmission glutamatergique excitatoire, et

qu'ainsi, la réinnervation excitatoire des interneurons GABAergiques restant, par bourgeonnement des fibres moussues, ne peut pas être la seule cause de l'augmentation de l'inhibition des interneurons GABAergiques, et autres effets médiés par les récepteurs opioïdes (Bausch & Chavkin, 1997).

Quant à savoir s'il s'agit du MOP ou du DOP à mettre en cause quant aux convulsions, pour ma part je me réserverais quant à vouloir les opposer ainsi. Effectivement, certains auteurs insistent déjà sur le fait qu'il existe une synergie entre le système opioïde δ et μ (Gomez et al., 2000 ; Law et al., 2005 ; Wang et al., 2005). En effet, malgré les effets décrits au sein des populations neuronales de l'hippocampe quant aux opioïdes endogènes, aux récepteurs opioïdes (μ ou δ), et leur capacité respective à faire basculer l'équilibre entre contrôle inhibiteur et excitateur au niveau des interneurons GABAergiques ; il paraît inexact de blâmer l'un ou l'autre exclusivement, car une combinaison de ces deux phénomènes est sans doute responsable des activités proconvulsivantes *in vivo*.

De plus, il existe également au niveau de l'hippocampe une interaction entre récepteurs opioïdes δ et μ quant à cette régulation du seuil des convulsions (Tortella et al., 1985). Ainsi, les deux seraient impliqués quant aux effets secondaires proconvulsivants (Bausch & Chavkin, 1997). Sans parler du fait que certains autres auteurs défendent l'hypothèse que la complexité des récepteurs opioïdes va bien plus loin que les 3 types décrits (μ , δ , et κ). Il existerait d'autres types et sous-types de récepteurs, qui ont été proposés selon des études de liaison au récepteur (« binding »), par autoradiographie, et études comportementales (Gendron et al., 2015).

Ainsi il existerait les sous-types μ_1 et μ_2 (Wolozin & Pasternak, 1981), l'hétérodimère μ/δ (Rothman et al., 1983, 1987), et les sous-types δ_1 et δ_2 (Jiang et al., 1991 ; Mattia et al., 1991). Certains auteurs stipulent d'ailleurs que seul un des sous-types du DOP est responsable des activités proconvulsivantes (Beaudry et al., 2015).

Cependant, malgré ces arguments, seulement un gène pour chaque type de récepteur opioïde a pu être trouvé et décrit (Slowe et al., 1999) ; ce qui n'empêche pas que d'autres puissent exister,

ou que ces sous-types soient la résultante d'épissages alternatifs, mais ceci n'a pas été démontré, ce qui diminue la crédibilité de l'hypothèse des sous-types de récepteurs.

L'hétérodimérisation des DOP et MOP est cependant extensivement documentée (Gomes et al., 2000 ; Law et al., 2005 ; Wang et al., 2005 ; Rozenfeld & Devi, 2007), et celle-ci est conditionnelle quant au recrutement membranaire du DOP (Gomes et al., 2000 ; Law et al., 2005 ; Rozenfeld & Devi, 2007). De plus l'hétérodimérisation entraîne de nombreux changements et modulations quant à la pharmacodynamique, relation structure-activité, et sélectivité fonctionnelle du récepteur (Jordan & Devi, 1999 ; Rozenfeld & Devi, 2007). Ceci est donc un facteur capital à prendre en considération pour les études futures.

Il est aussi important de garder à l'esprit que cette étude est réalisée à partir d'un système hétérologue *in vitro*, qui n'est donc pas du tout à même de pouvoir représenter la complexité des synergies pharmacologiques *in vivo*. Au-delà de ça, il faut également considérer que notre étude n'est pas réalisée au sein de populations neuronales, et encore moins d'interneurones GABAergiques ; mais de cellules HEK293 transfectées pour surexprimer les protéines d'intérêts comme le DOP, les sous-unités de la protéine G, etc. (voir matériels et méthodes).

Malgré la surexpression de nos protéines d'intérêts, les cellules HEK293 possèdent déjà de manière constitutive d'autres GPCRs, protéines G, effecteurs, et transducteurs (Dautzenberg et al., 2000 ; Meyer zu Heringdorf et al., 2001 ; Luo et al., 2008). Par conséquent, le risque d'interaction, synergie, et autre « cross talk » avec notre système opioïde à l'étude est inévitable.

Ainsi il paraît trivial, mais important de rappeler que tout modèle reste une réduction d'un système, avec ses avantages et ses inconvénients, mais que celui-ci permet malgré tout pour nous, humbles scientifiques, d'appréhender certains concepts et phénomènes, que ce soit en biologie, en pharmacologie, en chimie, ou en physique. Ceci nous permet d'avancer ensemble, à tâtons dans l'obscurité de notre ignorance collective ; et pas à pas, en travaillant en collaboration et grâce aux découvertes de chacun, de pouvoir ainsi continuer à voir ensemble toujours plus loin.

Conclusion :

Malgré nos efforts de recherche grâce aux différents biosenseurs utilisés pour essayer de déterminer un profil de biais qui permettrait d'identifier spécifiquement les agonistes du DOP ayant des effets secondaires proconvulsivants, ceci n'a pas encore été possible. À travers le profil des biosenseurs étudiés, soit trois combinaisons de transducteurs différents (sous-unités alpha des protéines G), et d'un effecteur (le canal potassique Kir 3), il n'est pour l'instant pas possible de clairement différencier les agonistes du DOP proconvulsivants, de ceux qui ne le sont pas.

Il a cependant été démontré qu'à travers l'ensemble de nos biosenseurs et systèmes analytiques, que les agonistes proconvulsivants sont en moyenne plus puissants que ceux qui ne le sont pas. Nos résultats vont donc dans le sens de la théorie pharmacodynamique de saturation de la réserve du récepteur.

Cependant mon projet s'inclut dans un ensemble collaboratif de recherche en voie de développement ; et à mon échelle, j'apporte ma simple contribution à l'édifice en construction. Ainsi, en continuant d'ajouter des ramifications aux profils de biais établis par la présente recherche grâce à différents autres biosenseurs, visant par exemple l'internalisation ou encore le recyclage du récepteur, il sera éventuellement possible d'avoir une capacité à différencier les ligands proconvulsivants de ceux qui ne le sont pas.

Ultimement, cette recherche permettra d'aboutir à de meilleurs traitements analgésiques, toujours plus précis dans leur efficacité pharmacologique, sans avoir à faire face aux effets secondaires indésirables. La mise en place de ce genre de profils de biais représenté sous forme de diagramme de Kiviat, permettra notamment de pouvoir éventuellement prédire les effets engendrés, voulus ou indésirables, par chaque agoniste, en fonction de leurs affinités respectives pour les différentes voies de signalisation impliquée en fonction du récepteur / système pharmacologique étudié.

Cette nouvelle approche quant à l'étude et l'analyse de la signalisation cellulaire des GPCR, permet d'apporter une perspective supplémentaire quant à la compréhension de l'interaction entre une substance pharmacologique et un système moléculaire / cellulaire. En apportant cette texture aux concepts comme l'efficacité grâce au modèle opérationnel, une nouvelle voie d'exploration de recherche pharmacologique s'ouvre quant au ciblage thérapeutique des GPCR. Et ce, grâce à des ligands toujours plus efficaces et spécifiques.

Concernant le présent désaccord dans le domaine, visant à savoir si les opioïdes endogènes comme les enképhalines, ou encore, lequel des récepteurs opioïdes (mu versus delta), seraient responsable de pouvoir engendrer des convulsions. Quant à leur capacité respective à faire basculer l'équilibre entre contrôle inhibiteur et excitateur au niveau des interneurons GABAergiques ; il paraît inexact de mettre en cause l'un ou l'autre exclusivement, car une combinaison de ces phénomènes est sans doute responsable des activités proconvulsivantes *in vivo*.

Ainsi, grâce à la recherche de nos collègues et collaborateurs, il est important de continuer à approfondir dans ce domaine. La compréhension de ces complexes systèmes pharmacologiques permettra ensuite d'unifier et/ou invalider les différentes théories qui coexistent présentement.

Pour finir, les mots du Cheikh Al-Albânî semblent adéquats : "Plus j'apprends, et plus je me rends compte de mon ignorance.". Ainsi nous continuons d'avancer ensemble à travers l'obscurité de l'ignorance, en apposant inlassablement pierre après pierre, bâtissant et rebâtissant interminablement, le titanesque édifice qu'on appelle la Science.

Bibliographie :

1. Al-Hasani R., et Bruchas R.R. (2011). "Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior.". *Anesthesiology*; 115: 1363-1381.
2. Angers S., Salahpour A., Joly E., Hilairat S., Chelsky D., Dennis, M., et Bouvier M. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)". *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 97: 3684-3689.
3. Argoff C. (2011). "Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management.". *Curr. Med. Res. Opin.*; 27(10): 2019-2031.
4. Audet N., Galés C., Archer-Lahlou E., Richard-Lalonde M., et Piñeyro G. (2010). "Sélectivité fonctionnelle des ligands des récepteurs opiacés.". *Medecine/Sciences*; 26: 734-739.
5. Audet N., Galés C., Archer-Lahlou E., Vallières M., Schiller P.W., Bouvier M., et Piñeyro G. (2008). "Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assays Reveal Ligand-specific Conformational Changes within Preformed Signaling Complexes Containing δ -Opioid Receptors and Heterotrimeric G Proteins.". *J Biol Chem.*; 283(22): 15078-15088.
6. Bacart J., Corbel C., Jockers R., Bach S., et Couturier C. (2008). "The BRET technology and its application to screening assays.". *Biotechnol. J.*; 3(3): 311-324.
7. Basbaum A.I., Bautista D.M., Scherrer G., et Julius D. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain.". *Cell*; 139: 267-284.

8. Bausch S.B., et Chavkin C. (1997). "Changes in hippocampal circuitry after pilocarpine-induced seizures as revealed by opioid receptor distribution and activation." *J Neurosci.*; 17(1): 477-492.
9. Beaudry H., Gendron L., et Morón J.A. (2015). "Implication of delta opioid receptor subtype 2 but not delta opioid receptor subtype 1 in the development of morphine analgesic tolerance in a rat model of chronic inflammatory pain." *European Journal of Neuroscience*; 41(7): 901-907.
10. Beaulieu P. (2013). "La douleur: guide pharmacologique et thérapeutique." Presses de l'Université de Montréal.
11. Beaulieu P., Lussier D., Porreca F., et Dickenson A. (2010). "Pharmacology of pain." Publication de l'IASP. Edition 2015.
12. Benich J.J. (2011). "Opioid dependence." *Prim. Care Clin. Office Pract.*; 38: 59-70.
13. Bertrand L., Parent S., Caron M., Legault M., Joly E., Angers, S., Bouvier M., Brown M., Houle B., et Menard L. (2002). "The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRS)." *J. Recept. Signal Transduct. Res.*; 22: 533-541.
14. Besnard J., Filippo Ruda G., Setola V., Abecassis K., Rodriguiz R.M., Huang X-P., Norval S., Sassano M.F., Shin A.I., Webster L.A., Simeons F.R.C., Stojanovski L., Prat A., Seidah N.G., Constam D.B., Bickerton G.R., Read K.D., Wetsel W.C., Gilbert I.H., Roth B.L., et Hopkins A.L. (2012). "Automated design of ligands to polypharmacological profiles." *Nature*; 492: 215-220.
15. Black J.W., et Leff P. (1983). "Operational models of pharmacological agonism." *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*; 220, 141-162.

16. Bodnar R.J. (2012). "Endogenous opiates and behavior." *Peptides*; 38: 463-522.
17. Bohn L. M., Gainetdinov R.R., Lin F.T., Lefkowitz R.J., et Caron M.G. (2000). "Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence." *Nature*; 408(6813): 720-723.
18. Broom D.C., Nitsche J.F., Pintar J.E., Rice K.C., Woods J.H., et Traynor J.R. (2002). "Comparison of Receptor Mechanisms and Efficacy Requirements for δ -Agonist-Induced Convulsive Activity and Antinociception in Mice." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 303(2): 723-729.
19. Buchen L. (2012). "Opioid receptors revealed." *Nature*; (483): 383.
20. Buchsbaum M.S., Davis G.C., et Bunney Jr. W.E. (1977). "Naloxone alters pain perception and somatosensory evoked potentials in normal subjects." *Nature*; 270: 620-622.
21. Cain P.D., et Corcoran M.E. (1985). "Epileptiform Effects of Met-enkephalin, β -endorphin and Morphine: Kindling of Generalized Seizures and Potentiation of Epileptiform Effects by Handling." *Brain Research*; 338: 327-336.
22. Capasso A. (2008). "The Involvement of Prostaglandins and Nitric Oxide in the Development of Brain Excitability: A Relationship Study." *Curr. Med. Chem.*; 15(24):2518-2526.
23. Chavkin C. (2011). "The therapeutic potential of κ -opioids for treatment of pain and addiction." *Neuropsychopharmacology*; 36(1): 369-370.
24. Charlton S.J. (2009). "Agonist efficacy and receptor desensitization: from partial truths to a fuller picture." *Br. J. Pharmacol.*; 158: 165-168.

25. Chung P.C.S., Boehrer A., Stephan A., Matifas A., Scherrer G., Darceq E., Befort K., et Kieffer L.B. (2015). "Delta opioid receptors expressed in forebrain GABAergic neurons are responsible for SNC80-induced seizures." *Behav Brain Res.*; 278: 429-434.
26. Cohen G.A., Doze V.A., et Madison D.V. (1992). "Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal neurons." *Neuron*; 9: 325-335.
27. Corbett A.D., Paterson S.J., et Kosterlitz H.W. (1993). "Selectivity of ligands for opioid receptors." *Handbook Exp. Pharmacol.*; 104(1): 645-679.
28. Cox E.H., Kerbush T., Van der Graaf P.H., et Danhof M. (1998). "Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Electroencephalogram Effect of Synthetic Opioids in the Rat: Correlation with the Interaction at the *Mu*-Opioid Receptor." *JPET*; 284(3): 1095-1103.
29. Cronin J., Obenaus A., Houser C.R., et Dudek F.E. (1992). "Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers." *Brain Res.*; 573: 305-310.
30. Danielsson I., Gasior M., Stevenson G.W., Folk J.E., Rice K.C., et Negus S.S. (2006). "Electroencephalographic and convulsant effects of the delta opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys." *Pharmacol. Biochem. Behav.*; 85(2): 428-434.
31. Dautzenberg F.M., Higelin J., et Teichert U. (2000). "Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells." *Eur. J. Pharmacol.*; 390 (1-2): 51-59.
32. Drake C.T., Chavkin C., Milner T.A. (2007). "Opioid systems in the dentate gyrus." *Prog. Brain Res.*; 163: 245-263.
33. Duggan A.W., et North R.A. (1983). "Electrophysiology of Opioids." *Pharmacological*

Reviews; 35: 4219-4281.

34. Erbs E., Faget L., Scherrer G, Kessler B.P., Hentsch D., Vonesch C. J-L., Matifas C.A., Kieffer B.L., et Massottea D. (2012). "Distribution of delta opioid receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus.". *Neuroscience*; 221: 203-213.
35. Evans B.A., Sato M., Sarwar M., Hutchinson D.S., et Summers R.J. (2010). "Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors.". *Br. J. Pharmacol.*; 159: 1022-1038.
36. Fields HL. (2004). "State-dependent opioid control of pain.". *Nat. Rev. Neurosci.*; 5: 565-575.
37. Gales C., Rebois R.V., Hogue M., Trieu P., Breit A., Hebert T. E., et Bouvier M. (2005). "Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells.". *Nat. Methods*; 2: 177-184.
38. Gales C., Van Durm J.J., Schaak S., Pontier S., Percherancier Y., Audet M., Paris H., et Bouvier M. (2006). "Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes.". *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 13: 778-786.
39. Garzon J., Sanchez-Blazquez P., Hollt V., Lee N.M., et Loh H.H. (1983). "Endogenous opioid peptides: comparative evaluation of their receptor affinities in the mouse brain.". *Life Sciences*; 33(1): 291-294.
40. Gaveriaux-Ruff C. (2009). "Le récepteur delta aux opiacés : une nouvelle cible pour le traitement des douleurs chroniques ?". *Douleur et Analgésie*; 22(4): 201-209.
41. Gaveriaux-Ruff C., et Kieffer B.L. (2011). "Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches.". *Behav. Pharmacol.*; 22(5-6): 405-414.

42. Gendron L., Cahill C.M., Von Zastrow M., Schiller P.W., et Piñeyro G. (2016). "Molecular Pharmacology of δ -Opioid Receptors.". *Pharmacological Reviews*; 68(3): 631-700.
43. Gendron L., Mittal N., Beaudry H., et Walwyn W. (2015). "Recent advances on the δ opioid receptor: from trafficking to function.". *Br J Pharmacol.* 2015 Jan; 172(2): 403-419.
44. Goldberg D., et McGee S. (2011). "Pain as a global public health priority.". *BMC Public Health*; 11: 770.
45. Gomes I., Jordan B.A., Gupta A., Trapaidze N., Nagy V., et Devi L.A. (2000). "Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: a role in opiate synergy.". *J. Neurosci.*; 20: RC110.
46. Granier S., Manglik A., Krusel A.C., Kobilka T.S., Thian F.S., Weis W.I., et Kobilka B.K. (2012). "Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole.". *Nature*; 485: 400-404.
47. Huang H., Manglik A., Venkatakrisnan A.J., Laeremans T., Feinberg E.N., Sanborn A.L., Kato H.E., Livingston K.E., Thorsen T.S., Kling R., Granier S., Gmeiner P., Husbands S.M., Traynor J.R., Weis W.I., Steyaert J., Dror R.O., et Kobilka B.K. (2015). "Structural insights into μ -opioid receptor activation.". *Nature*; 524(7565): 315-321.
48. Jordan B.A., Devi L.A. (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." *Nature*; 399: 697-700.
49. Jordt S.E., McKemy D.D., et Julius D. (2003). "Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation.". *Curr. Opin. Neurobiol.*; 13: 487-492.
50. Jutkiewicz E.M., Rice K.C., Woods J.H., Winsauer P.J. (2003). "Effects of the delta-

opioid receptor agonist SNC80 on learning relative to its antidepressant-like effects in rats.”. *Behav. Pharmacol.*; 14: 509-516.

51. Jutkiewicz E. M., Traynor J. R., et Woods J.H. (2005). “Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats.”.
52. Kabli N., et Cahill C.M. (2007). “Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain.”. *Pain*; 127: 84-93.
53. Kenakin T. (2004). “Principles: receptor theory in pharmacology.”. *Trends Pharmacol. Sci.*; 25: 186-192.
54. Kenakin T., Watson C., Muniz-Medina V., Christopoulos A., et Novick S. (2012). “A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias.”. *ACS Chem. Neurosci.*; 3, 193-203.
55. Kenakin T. (2014). “A Pharmacology Primer: Theory, Application and Methods. Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery”. Fourth edition, Academic Press.
56. Kovacs J.J., Hara M.R., Davenport C.L., Kim J., et Lefkowitz R.J. (2009). “Arrestin Development: Emerging Roles for β -arrestins in Developmental Signaling Pathways.”. *Dev. Cell.*; 17(4): 443-458.
57. Land B.B., Bruchas M.R., Lemos J.C., Xu M., Melief E.J., et Chavkin C. (2008). “The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin kappa-opioid system.”. *The Journal of Neuroscience*; 28, (2): 407-414.
58. Lavine N., Ethier N., Oak J.N., Pei L., Liu F., Trieu P., Rebois V.R., Bouvier M., Hébert T.E., et Van Tol H.H.M. (2002). “G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase.”. *J. Biol.*

Chem.; 277(48): 46010-46019.

- 59.** Law P.Y., Erickson-Herbrandson L.J., Zha Q.Q., Solberg J., Chu J., Sarre A., et Loh H.H. (2005). "Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions." *J. Biol. Chem.*; 280: 11152-11164.
- 60.** Lee P.H.K., Obie J., et Hong J. (1989). "Opioids Induce Convulsions and Wet Dog Shakes in Rats: Mediation by Hippocampal Mu, But Not Delta or Kappa Opioid Receptors." *The Journal of Neuroscience*; 9(2): 892-897.
- 61.** Lee M., Silverman S., Hansen H., Patel V., et Manchikanti L. (2011). "A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia." *Pain Physician*; 14: 145-161.
- 62.** Le Bourdonnec B., Windh R.T., Ajello C.W., Leister L.K., Gu M., Chu G-H., Tuthill P.A., Barker W.M., Koblish M., Wiant D.D., Graczyk T.M., Belanger S., Cassel J.A., Feschenko M.S., Brogdon B.L., Smith S.A., Christ D.D., Derelanko M.J., Kutz J., Little P.J., DeHaven R.N., DeHaven-Hudkins D.L., et Dolle R.E. (2008). "Potent, Orally Bioavailable Delta Opioid Receptor Agonists for the Treatment of Pain: Discovery of N,N-Diethyl-4-(5-hydroxy-spiro-[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide (ADL5859)." *J. Med. Chem.*; 51: 5893-5896.
- 63.** Le Bourdonnec B., Windh R.T., Ajello C.W., Leister L.K., Gu M., Chu G-H., Tuthill P.A., Barker W.M., Koblish M., Wiant D.D., Graczyk T.M., Belanger S., Cassel J.A., Feschenko M.S., Brogdon B.L., Smith S.A., Christ D.D., Derelanko M.J., Kutz J., Little P.J., DeHaven R.N., DeHaven-Hudkins D.L., et Dolle R.E. (2009). "Spirocyclic Delta Opioid Receptor Agonists for the Treatment of Pain: Discovery of N,N-Diethyl-3-hydroxy-4-(spiro[chromene-2,40-piperidine]-4-yl) Benzamide (ADL5747)." *J. Med. Chem.*; 52: 5685-5702.
- 64.** Le Merrer J., Becker J.A., Befort K., et Kieffer B.L. (2009). "Reward processing by the

opioid system in the brain.”. *Physiological reviews*; 89(4): 1379-1412.

65. Luo J., Busillo J.M., et Benovic J.L. (2008). “M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signaling is Regulated by Distinct Mechanisms.”. *Mol. Pharmacol.*; 74 (2): 338-347.
66. Madison D.V., et Nicoll R.A. (1988). “Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus.”. *J. Physiol. (Lond)*; 398: 123-130.
67. Marchand S. (2008). “The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain.”. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*; 34 :285-309.
68. Marullo S., et Bouvier M. (2007). “Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond.”. *Trends Pharmacol. Sci.*; 28: 362-365.
69. Meyer zu Heringdorf D., Lass H., Kuchar I, Lipinski M., Alemany R., Rümenapp U., et Jakobs K.H.(2001). “Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors.”. *Eur. J. Pharmacol.*; 414 (2-3): 145-154.
70. Millan M.J. (2002). “Descending control of pain.”. *Prog. Neurobiol.*; 66(6): 355-474.
71. Miller L.E., McGinnis G.R., Peters B.A., Ballmann C.G., Nanayakkara G., Amin R., et Quindry J.C. (2015). “Involvement of the δ -opioid receptor in exercise-induced cardioprotection.”. *Exp. Physiol.*; 100(4): 410-421.
72. Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G., et Meunier J.C. (1994). “ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization.”. *FEBS Letters*; 341 (1): 33-8.
73. Mulder, A. H., Wardeh G., Hogenboom H., et Frankhuyzen A.L. (1984). "Kappa- and

delta-opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release." *Nature*; 308(5956): 278-280.

74. Nagase H., Nemoto T., Matsubara A., Saito M., Yamamoto N., Osa Y., Hirayama S., Nakajima M., Nakao K., Mochizuki H., et Fujii H. (2010). "Design and synthesis of KNT-127, a δ -opioid receptor agonist effective by systemic administration." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 20(21): 6302-6305.
75. Nagi K., Charfi I., et Piñeyro G. (2014). "Kir3 channels undergo arrestin-dependant internalization following delta opioid receptor activation." *Cell. Mol. Life Sci.*; 72(18): 3543-3557.
76. Nagi K., et Piñeyro G. (2011). "Regulation of opioid receptor signaling: implications for the development of analgesic tolerance." *Mol. Brain*; 4-25.
77. Nagi K., et Piñeyro G. (2015). "Practical guide for calculating and representing biased signaling by GPCR ligands: A stepwise approach." *Methods*; 92(1): 78-86.
78. Negus S.S., Butelman E.R., Chang K.-J., Decosta B., Winger G., et Woods J.H. (1994). "Behavioral effects of the systemically active delta opioid agonist BW373U86 in rhesus monkeys." *JPET*; 270(3): 1025-1034.
79. Nicoll R.A., Alger B.E., et Jahr C.E. (1980). "Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS." *Nature*; 287: 22-25.
80. Nozaki C., Le Bourdonnec B., Reiss D., Windh R.T., Little P.J., Dolle R.E., Kieffer B.L., et Gaveriaux-Ruff C. (2012). " δ -Opioid Mechanisms for ADL5747 and ADL5859 Effects in Mice: Analgesia, Locomotion, and Receptor Internalization." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 342(3): 799-807.
81. Otis V., Sarret P., et Gendron L. (2011). Spinal activation of delta opioid receptors

alleviates cancer-related bone pain.”. *Neuroscience*; 183(2): 221-229.

- 82.** Pang K., Rose G.M. (1989). “Differential effects of methionine5-enkephalin on hippocampal pyramidal cells and interneurons.” *Neuropharmacology*; 28: 1175-1181.
- 83.** Petrillo P., Angelici O., Bingham S., Ficalora G., Garnier M., Zaratin P. F., Petrone, G., Pozzi O., Sbacchi M., Stean T. O., Upton N., Dondio G. M., et Scheideler M. A. (2003). “Evidence for a selective role in the δ -opioid agonist [8R-(4bS*, 8aR, 8a_, 12b_)7,10-dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8 methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses.”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*;307: 1079-1089.
- 84.** Piñeyro G. et Archer-Lahlou E. (2007). “Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signaling and regulation.”. *Cell Signal*; 19(1): 8-19.
- 85.** Piñeyro G., Azzi M., De Léan A., Schiller P.W., et Bouvier M. (2001). “Short-Term Inverse-Agonist Treatment Induces Reciprocal Changes in δ -Opioid Agonist and Inverse-Agonist Binding Capacity.”. *Molecular Pharmacology*; 60(4): 4816-4827.
- 86.** Pradhan A.A., Befort K., Nozaki C., Gaveriaux-Ruff C., et Kieffer B.L. (2011). “The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders.”. *Trends Pharmacol. Sci.*; 32(10): 581-590.
- 87.** Pradhan A.A., Smith M., McGuire B., Evans C., et Walwyn W. (2013). “Chronic inflammatory injury results in increased coupling of delta opioid receptors to voltage-gated Ca²⁺ channels.”. *Mol. Pain*; 9: 8.
- 88.** Proteau-Gagné A., Bournival V., Rochon K., Dory Y.L., et Gendron L. (2010). “Exploring the Backbone of Enkephalins to Adjust Their Pharmacological Profile for the δ -Opioid Receptor.”. *ACS Chem Neurosci.*; 1(11):757-69.

- 89.** Ranganathan P., Chen H., Adelman M.K., et Schluter S.F. (2009). "Autoantibodies to the delta-opioid receptor function as opioid agonists and display immunomodulatory activity." *J Neuroimmunol.*; 217: 65-73.
- 90.** Rebois R. V., Robitaille M., Galés C., Dupré D. J., Baragli A., Trieu P., Ethier N., Bouvier M., et Hébert T. E. (2006). "Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells." *J. Cell. Sci.*; 119(13): 2807-2818.
- 91.** Rezaï X., Faget L., Bednarek E., Schwab Y., Kieffer B.L., Massotte D. (2012). "Mouse δ opioid receptors are located on presynaptic afferents to hippocampal pyramidal cells." *Cell. Mol. Neurobiol.*; 32(4): 509-516.
- 92.** Richard-Lalonde M., Nagi K., Audet N., Sleno R., Amraei M., Hogue M., Balboni G., Schiller P.W., Bouvier M., Hébert T.E., et Pineyro G. (2013). "Conformational Dynamics of Kir3.1/Kir3.2 Channel Activation Via δ -Opioid Receptors." *Molecular Pharmacology*; 83(2): 416-428.
- 93.** Rochon K., Proteau-Gagné A., Bourassa P., Nadon J.F., Côté J., Bournival V., Gobeil Jr. F., Guérin B., Dory L.Y., et Gendron L. (2013). "Preparation and Evaluation at the Delta Opioid Receptor of a Series of Linear Leu-Enkephalin Analogues Obtained by Systematic Replacement of the Amides." *ACS Chem. Neurosci.* 21; 4(8): 1204-1216.
- 94.** Rogers H., Hayes A. G., Birch P. J., Traynor J. R., et Lawrence A. J. (1990). "The selectivity of the opioid antagonist, naltrindole, for δ -opioid receptors." *J. Pharm. Pharmacol.* 42: 358-359.
- 95.** Roosterman D., George T., Schneider S.W., Bunnett N.W., et Steinhoff M. (2006). "Neuronal control of skin function: The skin as a neuroimmunoendocrine organ." *Physiol. Rev.*; 86: 1309-1379.

96. Rozenfeld R., et Devi L.A. (2007). "Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers.". *FASEB J.* ; 21: 2455-2465.
97. Saitoh A., Sugiyama A., Nemoto T., Fujii H., Wada K., Oka J.I., Nagase H., et Yamada M. (2011). "The novel delta opioid receptor agonist KNT-127 produces antidepressant-like and antinociceptive effects in mice without producing convulsions.". *Behav. Brain Res.*; 223(2): 271-279.
98. Santelli E., Bankston L.A. , Leppla S.H., et Liddington R.C. (2004). "Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor.". *Nature*; 430, 905-908.
99. Siehler S., et Milligan G. (2010). "G Protein-Coupled Receptors: Structure, Signaling, and Physiology.". Cambridge University Press.
100. Stamford J. A. (1995). "Descending control of pain.". *Br. J. Anaesth.*; 75(2): 217-227.
101. tck D.L., Nadler J.V. (1985). "Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats.". *J. Neurosci.*; 5(4): 1016-1022.
102. Tortella F.C., Robles L., Mosberg H.I., et Holaday J.W. (1984). "Electroencephalographic assessment of the role of δ -receptors in opioid peptide-induced seizures.". *Neuropeptides*; 5: 213-216.
103. Tortella F.C., Robles L., Mosberg H.I., et Holaday J.W. (1985). "The anticonvulsant effects of DADLE are primarily mediated by activation of δ Opioid receptors: interactions between δ and μ receptor antagonists.". *Life Sciences*; 37: 497-503.

- 104.** Tortella F.C., Robles L., Mosberg H.I., et Holaday J.W. (1987). “Evidence for Mu Opioid Receptor Mediation of Enkephalin-induced Electroencephalographic Seizures.”. *JPET*; 240(2): 571-577.
- 105.** Wang D., Sun X., Bohn L.M., et Sadee W. (2005). “Opioid receptor homo and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer.”. *Mol. Pharmacol.*; 67: 2173-2184.
- 106.** Woolf C.J., et Ma Q. (2007). “Nociceptors – noxious stimulus detectors.”. *Neuron*; 55: 353-364.
- 107.** Yagi H., Tan W., Dillenburg-Pilla P., Armando S., Amornphimoltham P., Simaan M., Weigert R., Molinolo A.A., Bouvier M., et Gutkind J.S. (2011). “A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells.”. *Sci. Signal.*; 4: ra60.

Annexe n°1 : Superposition des courbes dose réponses des agonistes convulsivants et non-convulsivants à travers les biosenseurs étudiés.

Afin d'apprécier et comparer visuellement, les différences et similarités observables entre ligands non convulsivants et proconvulsivants, la superposition des courbes dose-réponse de ceux-ci a été réalisée pour chaque biosenseur. Ces figures présentées en annexe pour ne pas trop alourdir de figures la section résultat, et à titre indicatif, car elles sont deux fois plus grandes que ces dernières.

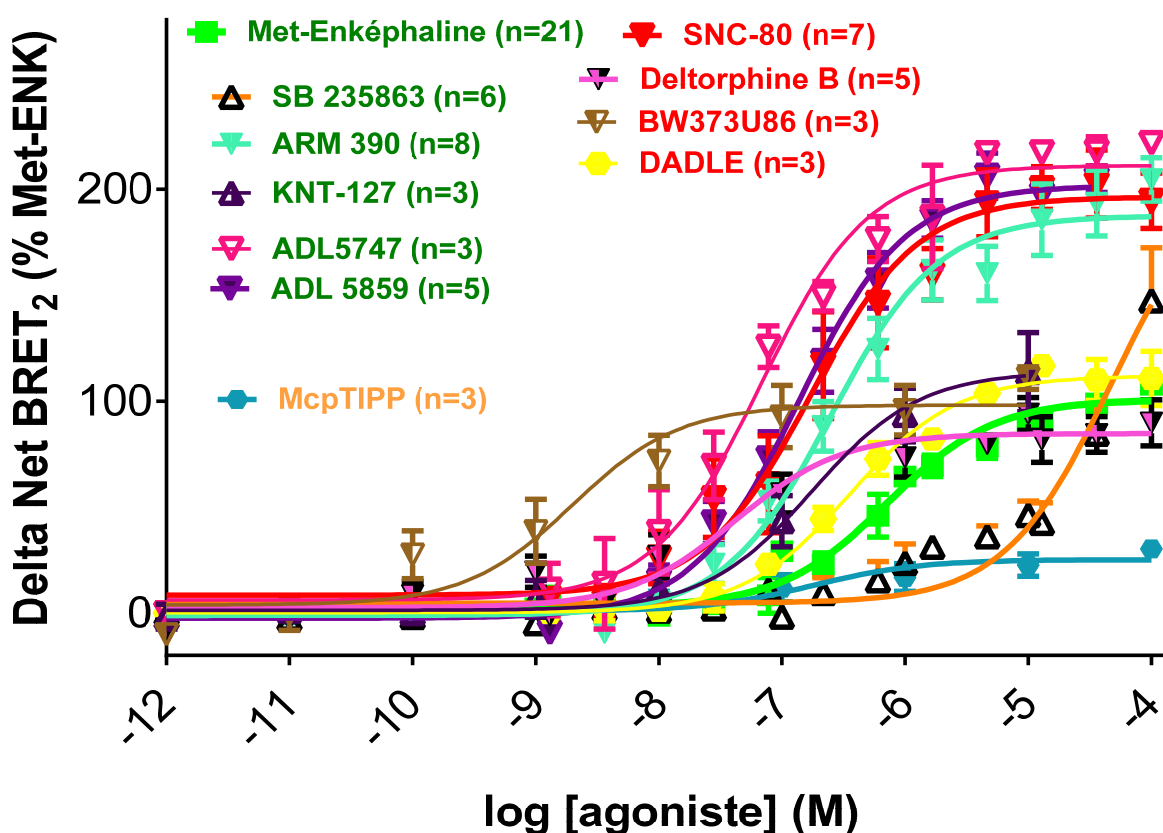


Figure n°13 : Données obtenues grâce au biosenseur [G- α 1.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET₂ (% Met-ENK) en ordonnée, et des log₁₀ des concentrations molaires en abscisse, des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivants ; des agonistes connus pour être proconvulsivants (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange).

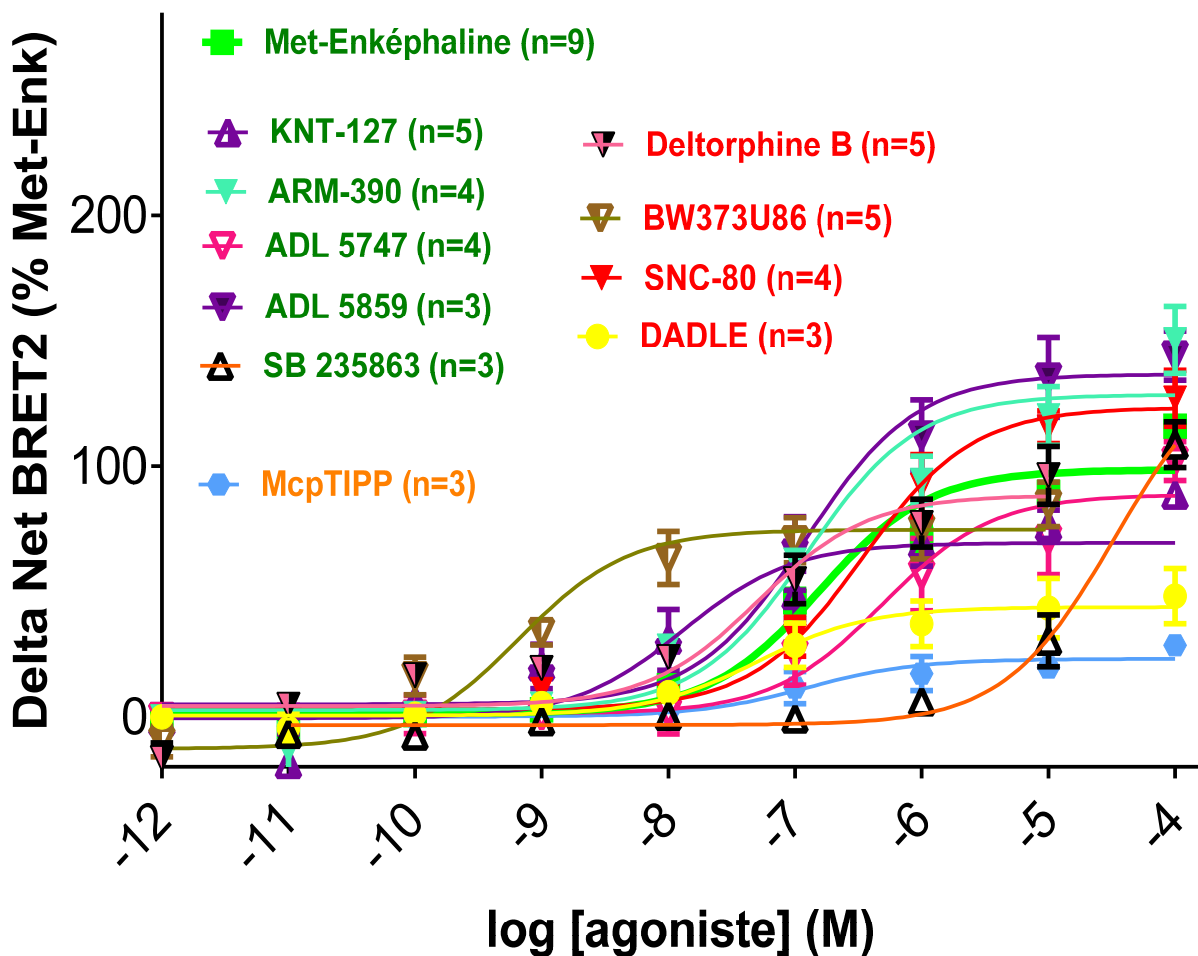


Figure n°14 : Données obtenues grâce au biosenseur [G-aoA.RlucII versus G-γ2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log10 des concentrations molaires en abscisse, des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivants ; des agonistes connus pour être proconvulsivants (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange).

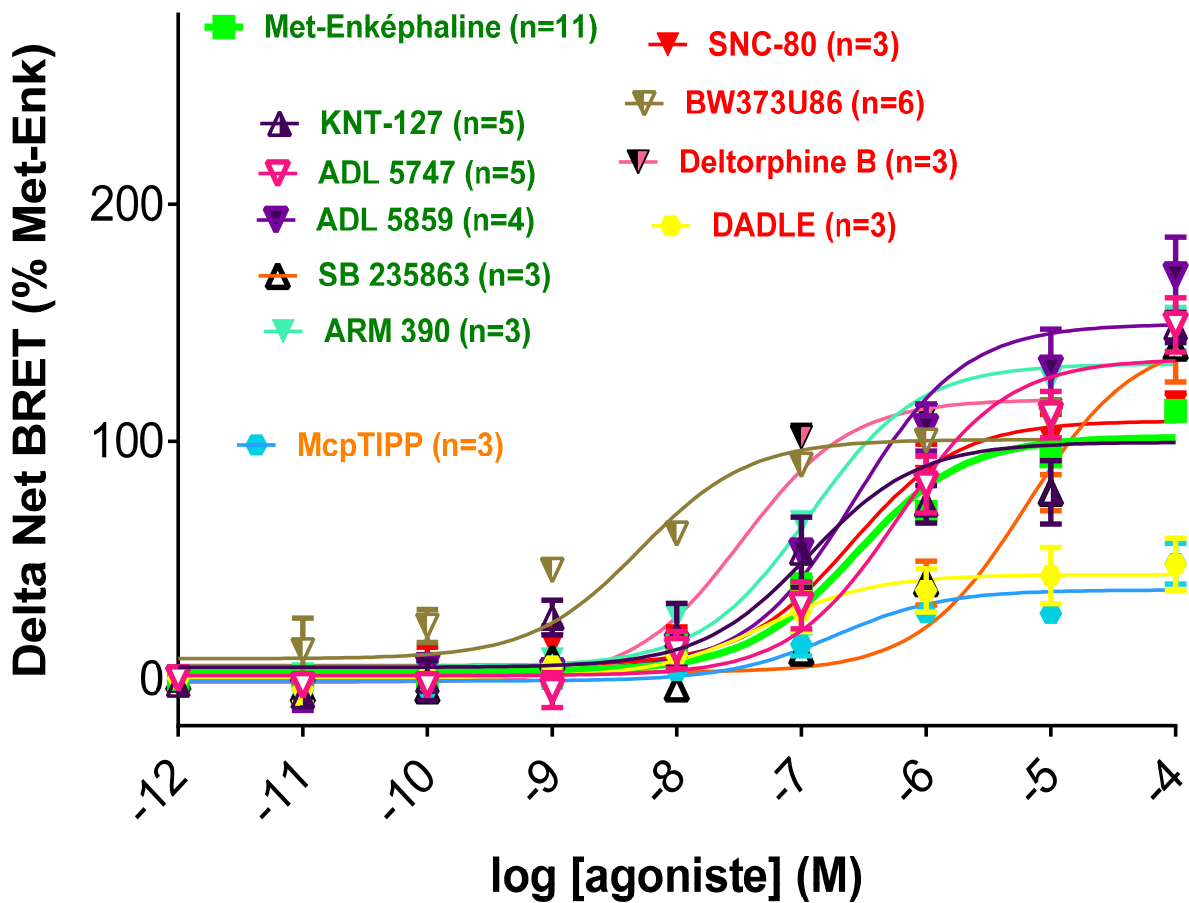


Figure n°15 : Données obtenues grâce au biosenseur [G- α B.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log10 des concentrations molaires, des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivants ; des agonistes connus pour être proconvulsivants (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange).

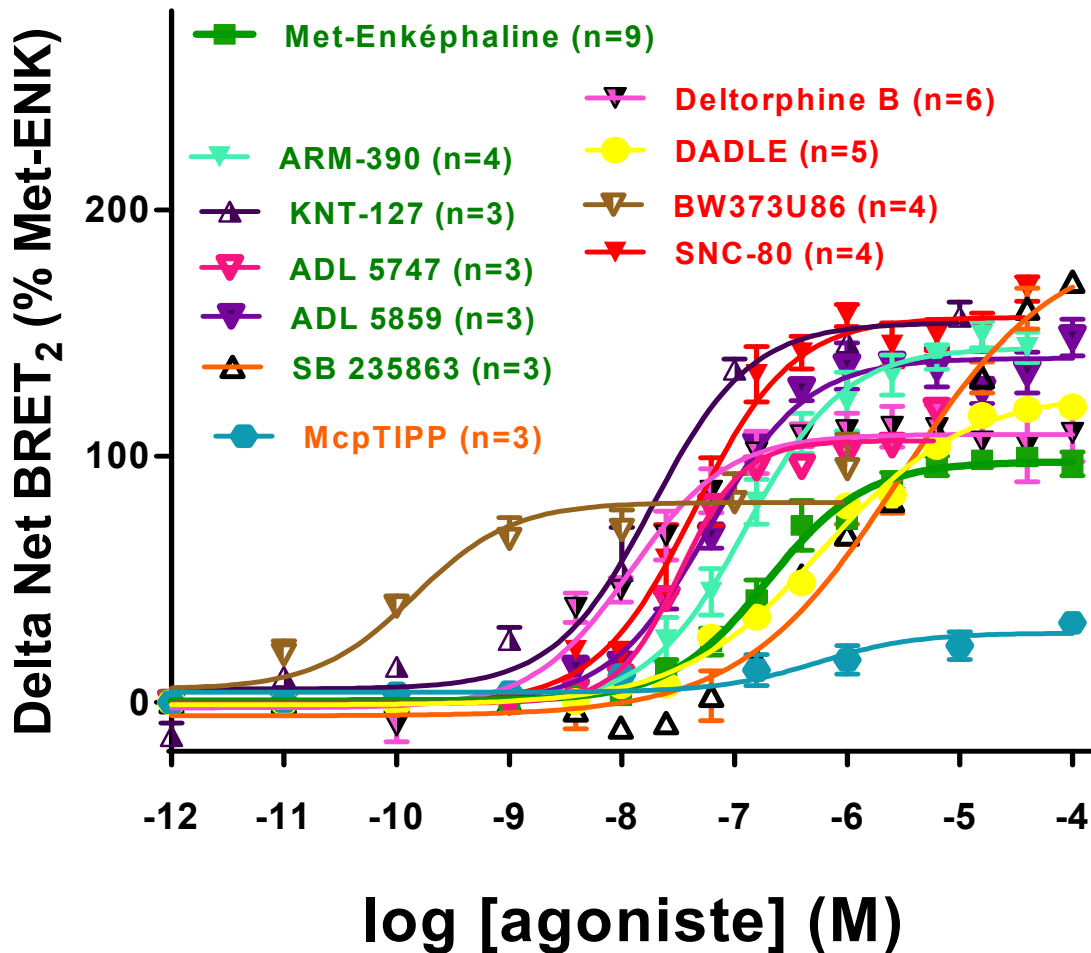


Figure n°16 : Données obtenues grâce au biosenseur [G- γ 2.RlucII versus Kir3.2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET₂ (% Met-ENK) en ordonnée, et des log₁₀ des concentrations molaires en abscisse, des agonistes connus pour ne pas être proconvulsivants ; des agonistes connus pour être proconvulsivants (en rouge) et ceux dont le statut proconvulsivant est encore inconnu (en orange).

Annexe n°2 : Compilation des Log τ/Ka pour chaque biosenseur :

Tableau VII: Compilation pour chaque biosenseur des coefficients de transduction (Log τ / Ka) et de leur erreur type respective, obtenue grâce à l'équation du modèle opérationnel.

	α_{i1}		α_{oA}		α_{oB}		Kir 3.2	
	Log τ/Ka	Erreur Type	Log τ/Ka	Erreur Type	Log τ/Ka	Erreur Type	Log τ/Ka	Erreur Type
Met-Enképhaline	5.564	0.071	5.795	0.152	5.587	0.1645	6.496	0.061
DADLE	5.805	0.116	5.653	0.437	5.359	0.4253	6.183	0.065
Deltorphine B	6.59	0.326	6.541	0.261	6.736	0.2094	7.727	0.062
SNC-80	6.513	0.061	6.206	0.186	5.835	0.2149	7.334	0.049
BW373U86	8.293	0.193	7.684	0.284	7.553	0.1916	10.4	0.180
McpTIPP	5.328	0.394	4.768	0.687	4.419	0.4671	5.916	0.504
ARM390	6.203	0.051	6.641	0.184	6.278	0.1898	6.825	0.051
ADL5747	6.969	0.060	5.314	0.260	5.644	0.1673	7.26	0.084
ADL5859	6.575	0.050	6.893	0.199	6.218	0.1793	7.139	0.058
SB-235863	4.339	0.054	4.376	0.215	4.891	0.1811	5.844	0.058
KNT-127	6.279	0.315	6.586	0.245	5.41	0.1676	7.839	0.088

Annexe n°3 : Les agonistes du DOP développés par le Dr Gendron

Mon codirecteur, le Dr Gendron de l'Université de Sherbrooke et son équipe, ont synthétisé différentes nouvelles molécules qui sont des agonistes spécifiques du récepteur delta. Ils l'ont fait en travaillant par rapport à l'affinité de ces derniers, notamment grâce à l'étude de relation structure-activité (SAR), par modélisation 3D de la poche de liaison du récepteur (Proteau-Gagné et al., 2010).

Une partie de ces nouvelles molécules sont linéaires, et synthétisées à partir de substitutions thioamides (appelés « Thio » de 1 à 4) effectuées à différents sites le long de la colonne de la leucine-enképhaline, une forme d'un des ligands endogènes du DOP. Tandis qu'une autre partie de ces nouvelles molécules synthétisées, dont le DACDACE (D-allyl-Cys-D-allyl-Cys-Enképhaline), sont cycliques et synthétisées à partir du DPDPE. Ces ligands cycliques comme linéaires sont ensuite chacun retravaillés de nouveau, par modification ou ajout d'autres groupements moléculaires (alcène, NMe, etc) afin de toujours augmenter l'affinité et la spécificité des agonistes synthétisés.

Concernant les détails liés à la conception et synthèse de ces composés, je ne peux me permettre de les révéler, ainsi j'invite le lecteur à lire la publication de l'équipe du Dr Gendron (Proteau-Gagné et al., 2010), qui aborde le sujet. Je présenterais cependant les courbes que j'ai pu obtenir avec ceux-ci par rapport aux cinq biosenseurs que nous avons étudiés.

Les résultats liés à ces agonistes ne sont présentés qu'en annexes, car par manque de disponibilité de certains de ces agonistes (étant encore des prototypes), l'ensemble des expériences nécessaires à travers nos biosenseurs n'a pu être réalisé. Ces courbes sont donc présentées à titre indicatif, pour illustrer de nouveau la sélectivité fonctionnelle des ligands du DOP observable à travers certains de nos biosenseurs.

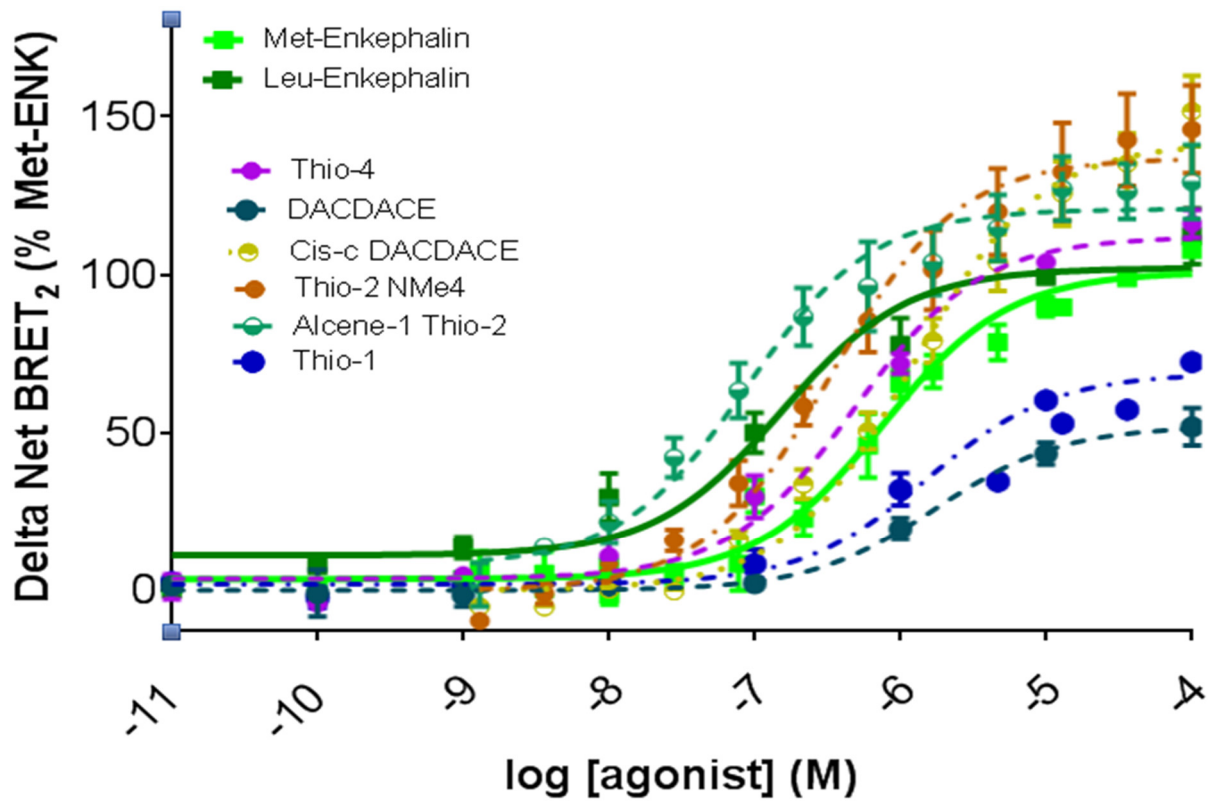


Figure n°17 : Données obtenues grâce au biosenseur [G-ai1.RlucII versus G-γ2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET₂ (% Met-ENK) en ordonnée, et des log₁₀ des concentrations molaires des en abscisse, de certains agonistes du Dr Gendron et de son équipe.

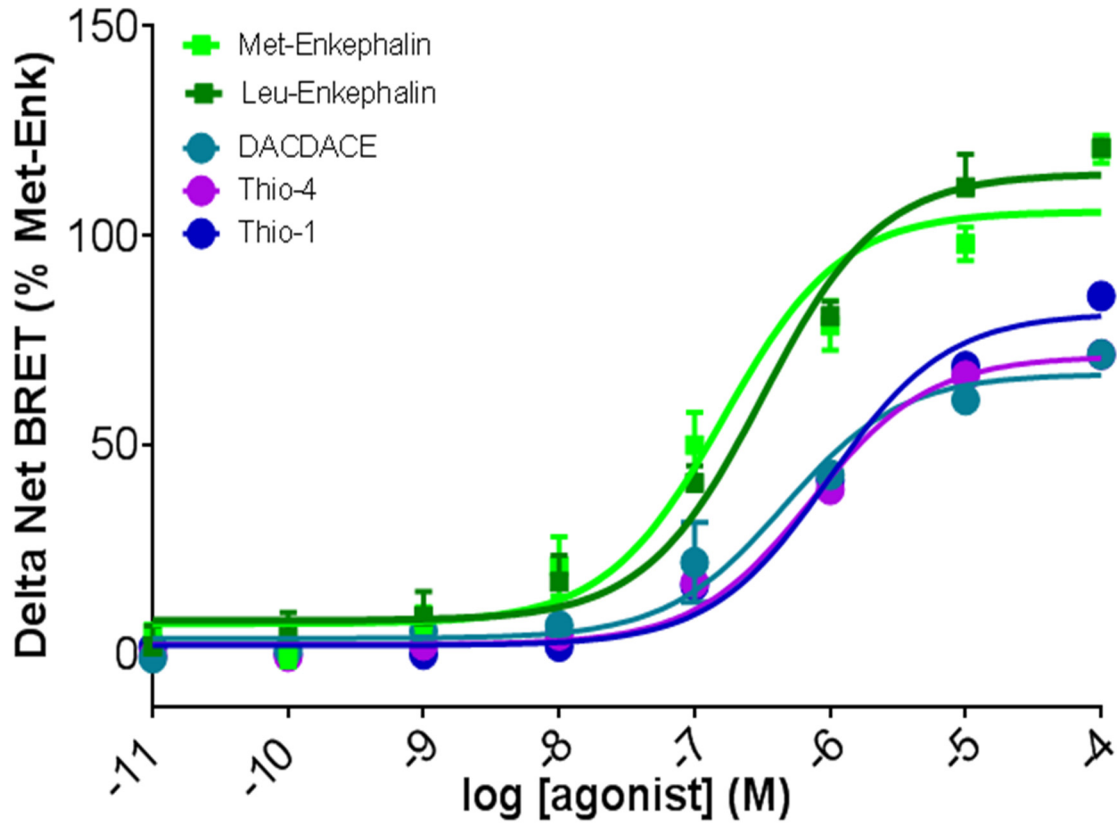


Figure n°18 : Données obtenues grâce au biosenseur [G- α A.RlucII versus G- γ 2.GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log10 des concentrations molaires en abscisse, de certains agonistes du Dr Gendron et de son équipe.

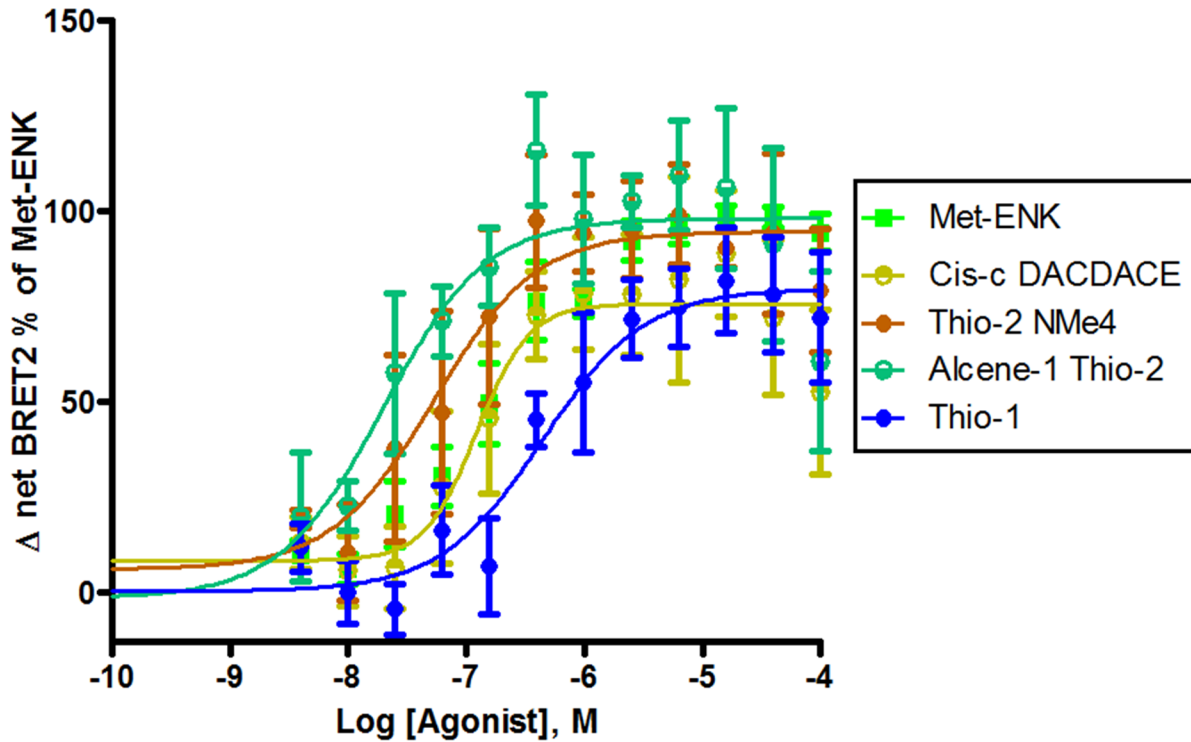


Figure n°19 : Données obtenues grâce au biosenseur [G-γ2.RlucII versus Kir3.2-GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET2 (% Met-ENK) en ordonnée, et des log10 des concentrations molaires en abscisse, de certains agonistes du Dr Gendron et de son équipe. Données obtenues en collaboration avec Karim NAGI.

Annexe n°4 : Le Biosenseur [G-γ2.RlucII versus Cav2.2-GFP10]

Lors de notre processus de recherche expérimentale, nous nous sommes intéressés à un canal calcique présynaptique, le Cav2 (canal calcique voltage dépendant de type N ; Beaulieu et al., 2010). Ce canal contribue à l'influx calcique présynaptique responsable de la décharge de neurotransmetteurs lors de l'influx nerveux ; et celui-ci est inhibé par l'activation des récepteurs opioïdes (voir figure 2 page Beaulieu, 2013).

Ce canal calcique est présent au niveau des populations d'interneurones GABAergiques de l'hippocampe (Drake et al., 2007), et pourrait donc être impliqué dans les effets proconvulsivants associés à l'activité des récepteurs opioïdes. Cependant malgré les courbes doses-réponses obtenues, il n'a pas été possible de confirmer la fonctionnalité du biosenseur par électrophysiologie, et ainsi les résultats ont été abandonnés.

Je tenais cependant à présenter ces résultats préliminaires, car malgré ce manque de confirmation par électrophysiologie, il est possible de constater d'intéressants phénomènes de sélectivité fonctionnelle quant aux agonistes qui ont été testés. Également pour signifier que nous avons tenté d'étudier cet autre effecteur qui lui est en amont de la fente synaptique, contrairement à Kir.

Après que le biosenseur de Cav2.2 n'ait pas été confirmé par électrophysiologie, nous avons également tenté de cloner 4 autres types de biosenseurs à partir de ce canal, en disposant les marqueurs de luminescence (R.lucII et N.luc) à différents endroits stratégiques de ce dernier (les différentes boucles intracellulaires, le C-terminal, etc.). Cependant ces tentatives de clonages n'ont pas fonctionné et ont également été laissées de côté pour ma part afin de continuer les travaux sur les autres biosenseurs.

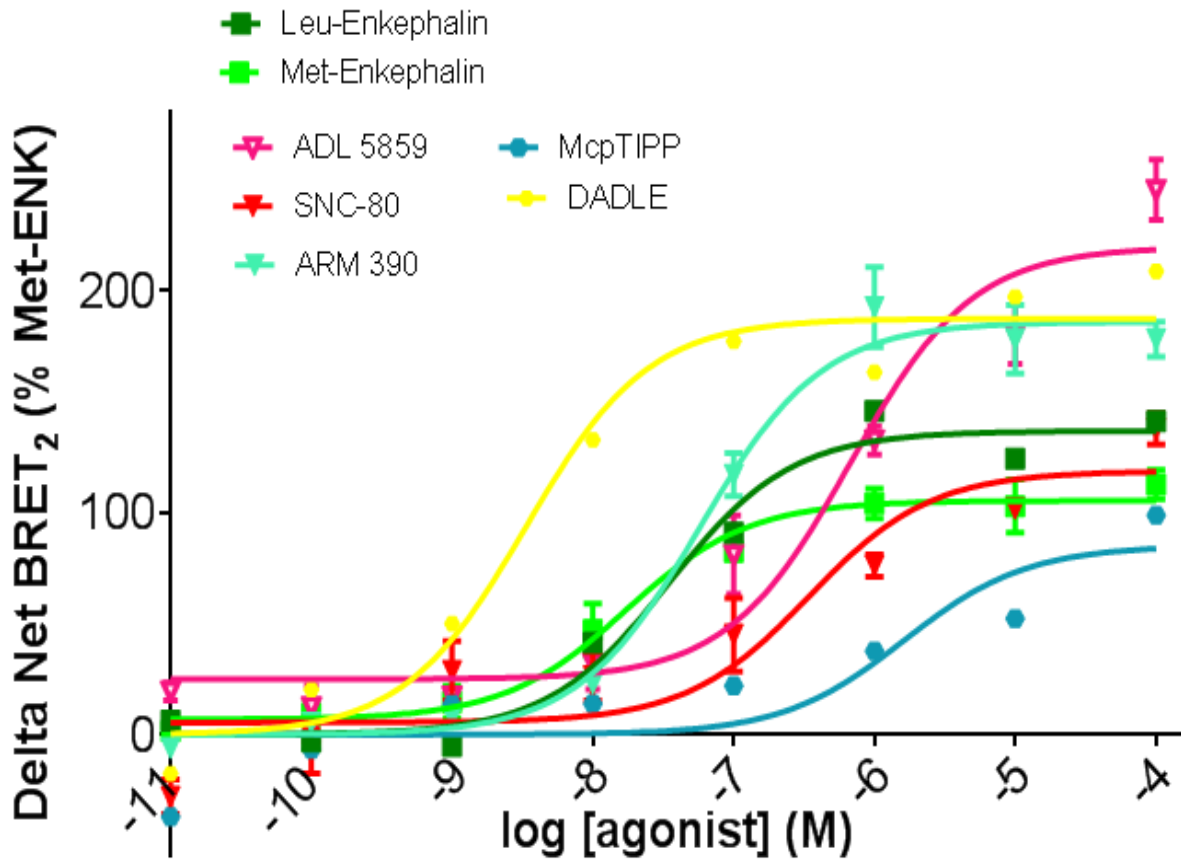


Figure n°20 : Données obtenues grâce au biosenseur [G-γ2.RlucII versus Cav2.2-GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET₂ (% Met-ENK) en ordonnée, et des log₁₀ des concentrations molaires en abscisse, de certains agonistes non convulsivants et proconvulsivants.

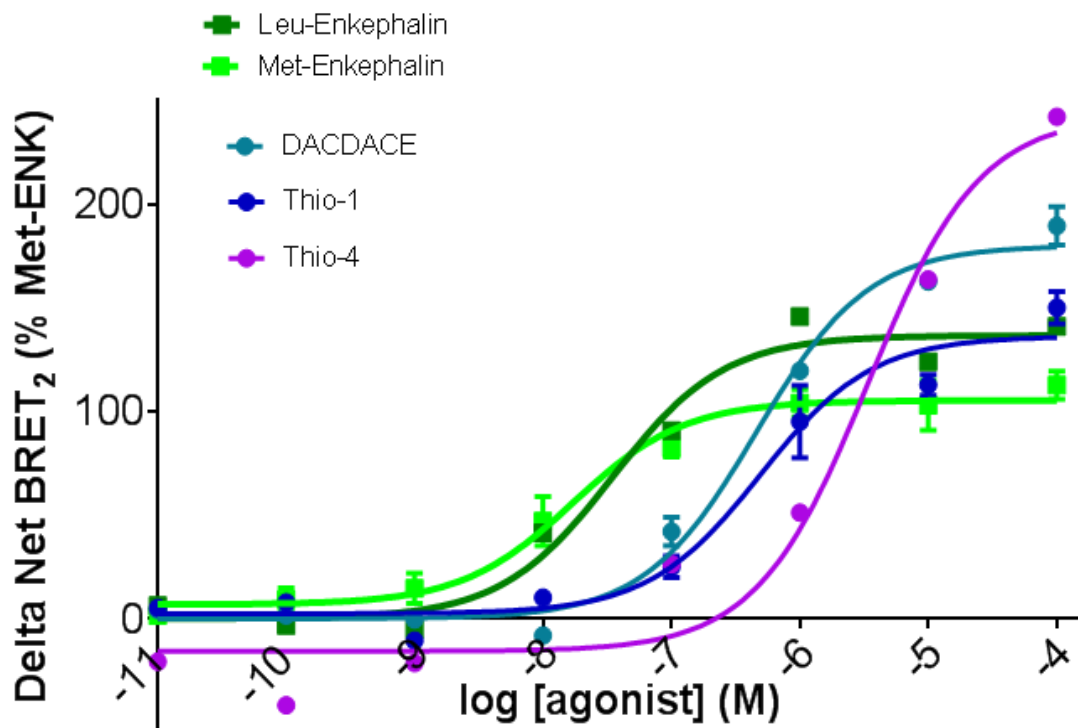


Figure n°21 : Données obtenues grâce au biosenseur [G-γ2.RlucII versus Cav2.2-GFP10] par activation du rat DOP : Compilation des courbes dose-réponse présentées en fonction du delta Net BRET₂ (% Met-ENK) en ordonnée, et des log₁₀ des concentrations molaires en abscisse, de certains agonistes du Dr Gendron et de son équipe.