

Université de Montréal

**Étude des propriétés de signalisation et de trafic du récepteur delta opiacé :  
vers une meilleure compréhension des bases cellulaires de la tolérance  
analgésique aux opioïdes**

par Iness Charfi

Département de pharmacologie, Faculté de médecine  
Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Ph. D. en pharmacologie  
option neurosciences

Mars 2018

©, Iness Charfi, 2018

Université de Montréal

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

Étude des propriétés de signalisation et de trafic du récepteur delta opiacé : vers une meilleure compréhension des bases cellulaires de la tolérance analgésique aux opioïdes

présentée par :

Iness Charfi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis Deblois

Président-rapporteur

Graciela Pineyro

Directrice de recherche

Sébastien Talbot

Membre du jury

Christine Lavoie

Examinatrice externe

Pierre-Paul Rompré

Représentant de la doyenne

*“ Je crois que l'avenir de l'humanité est dans le progrès de la raison  
par la science ”*

*Emile Zola*

## Résumé

L'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) déclenche en parallèle avec le processus de signalisation une réponse de régulation. Cette réponse est initiée par la phosphorylation du récepteur suivie par le recrutement de la  $\beta$ -arrestine ( $\beta$ arr), l'internalisation du récepteur et son tri ultérieur vers la voie de dégradation ou de recyclage vers la membrane plasmique. De nombreux rapports ont signalé pour le récepteur opioïde delta (DOPr) la présence de réponses biaisées en fonction du ligand, le long des différentes étapes des cascades de signalisation et de régulation. Cette sélectivité fonctionnelle a expliqué dans certains cas la capacité différentielle de ces ligands à produire la tolérance analgésique *in vivo*. En effet, il a été démontré que les ligands biaisés qui activent préférentiellement la voie de signalisation par rapport à l'internalisation produisent moins de tolérance analgésique que ceux favorisant l'internalisation du récepteur. D'autre part, les mécanismes de tri post-endocytaire du récepteur (recyclage ou dégradation) ont récemment constitué la pierre angulaire pour la compréhension des bases moléculaires de cette tolérance analgésique. Dans ce contexte, il a été établi que les ligands produisant le recyclage du récepteur suite à son internalisation produisent une action analgésique soutenue en les comparant à ceux envoyant le récepteur vers la voie de dégradation. Cette étude était alors réalisée dans le but ultime de mieux comprendre les déterminants moléculaires à la base de la perte de l'efficacité analgésique avec l'administration des opioïdes. Nous avons alors voulu tout d'abord évaluer comment le biais de signalisation par rapport à l'internalisation prédit la tolérance analgésique *in vivo* et en second lieu nous nous sommes intéressés à décrire l'itinéraire post-endocytaire du DOPr et son rôle dans la prévention de cette tolérance. Nous avons alors démontré qu'il existe un biais mesurable pour la modulation de la signalisation par rapport à l'internalisation pour certains agonistes du DOPr en utilisant les nouveaux outils pharmacologiques de quantification du biais. Ce biais mesuré au niveau des cellules HEK293 n'a pas prédit la tolérance analgésique *in vivo* d'autant plus que les propriétés d'internalisation du DOPr différaient entre les cellules HEK293 et les neurones, lieu biologique où les opioïdes exercent leurs fonctions analgésiques. Ceci soulève la question si le biais observé serait maintenu à travers les différents systèmes biologiques d'où l'intérêt de l'étude des mécanismes du trafic post-endocytaire comme alternative pour la compréhension de cette tolérance analgésique. Ainsi, nous avons établi que le DOPr recycle des endosomes tardifs vers la membrane plasmique en passant par le réseau du trans-Golgi (TGN) en faisant intervenir la



protéine X interagissant avec le gène 2 lié à l'apoptose (ALIX) et le complexe de récupération Rab9/ Protéine interagissant avec la queue de 47kD (TIP47). L'interférence avec cet itinéraire établi a précipité la tolérance à l'analgésie, indiquant que le recyclage du récepteur tel que décrit contribue au maintien de la réponse analgésique aux agonistes du DOPr *in vivo*. Ces informations fournissent des éléments pertinents pour le processus de criblage de nouveaux opioïdes ayant une activité analgésique durable.

**Mots clés :**

RCPG

DOPr

Signalisation

Internalisation

Sélectivité fonctionnelle

Modèle opérationnel

Recyclage

TGN

Rab9

TIP47

ALIX

Tolérance analgésique

## Abstract

Activation of G protein coupled receptors (GPCR) triggers a regulatory response in parallel with signaling processes. This response is initiated by receptor phosphorylation followed by  $\beta$ -arrestin ( $\beta$ arr) recruitment, receptor internalization, and subsequent sorting towards either the degradation pathway or recycling back to the membrane. Numerous reports have spoken of delta opioid receptor (DOPr) ligand-biased responses among signaling and regulation cascades. This functional selectivity may explain the differential profiles of these ligands to produce analgesic tolerance in vivo. Indeed, it has been shown that biased ligands that preferentially activate the signaling pathway over internalization produce less analgesic tolerance than those producing receptor internalization. On the other hand, the post-endocytic sorting mechanisms (recycling or degradation) of receptors have recently been the cornerstone for understanding the molecular basis of this analgesic tolerance. In this context, ligands producing receptor recycling following internalization have been shown to produce sustained analgesic action by comparing them to those sending the receptor to the degradation pathway. In the light of these observations, this study was conducted to better understand the molecular determinants underlying the loss of analgesic efficacy following prolonged opioid administration. We first wanted to evaluate how signaling versus internalization bias predicts analgesic tolerance in vivo, and secondly we are interested in describing the post-endocytic route of DOPr and how it prevents this tolerance. We then demonstrated that there is a measurable signaling versus internalization bias for some DOPr agonists using novel pharmacological tools for quantifying bias. This bias measured in HEK293 cells did not predict the analgesic tolerance in vivo and the DOPr internalization properties were different between HEK293 cells and neurons, where opioids exert their analgesic functions. This raises the question whether the observed bias would be maintained across the different biological systems. We were then interested to study the post-endocytic trafficking mechanisms as an alternative for understanding this analgesic tolerance. We established that the late endosome sorting mechanism involved the ALG-2-interacting Protein X (Alix) and the tail-interacting protein 47 (TIP47)/Rab9 retrieval complex, which support translocation of the receptor to the trans-Golgi network (TGN), from where it is subsequently recycled to the cell membrane. Preventing DOPr from completing this route precipitated acute analgesic tolerance, supporting the relevance of this recycling path in maintaining the analgesic response by this

receptor. These results provide relevant insights for the process of screening new opioids with sustained analgesic activity.

**Keywords:**

GPCR

DOPr

Signaling

Internalization

Functional selectivity

Operational model

Recycling

TGN

Rab9

TIP47

ALIX

Analgesic tolerance

# Table des matières

Résumé .....	iv
Table des matières.....	viii
Liste des figures .....	xii
Liste des tableaux .....	xiv
Liste des abréviations .....	xv
Remerciements.....	xxi
1 Introduction .....	1
1.1 Douleur et nociception .....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.1.1 Définition .....	1
1.1.1.2 Mécanismes .....	2
1.1.2 Classification .....	2
1.1.2.1 Douleur aiguë.....	2
1.1.2.2 Douleur chronique.....	3
1.1.2.2.1 Définition .....	3
1.1.2.2.2 Défis reliés à la douleur chronique .....	3
1.1.3 Physiopathologie .....	5
1.1.4 Récepteurs opioïdes .....	9
1.1.4.1 Caractérisation moléculaire.....	9
1.1.4.2 Distribution des récepteurs opioïdes.....	14
1.1.4.3 Effets secondaires des ligands des récepteurs opioïdes.....	16
1.1.4.4 Les ligands du récepteur opioïde delta.....	17
1.2 Signalisation des récepteurs opioïdes delta .....	19
1.2.1 Activation du récepteur .....	20
1.2.2 Transduction du signal.....	23
1.2.3 Les effecteurs du récepteur opioïde delta.....	27
1.2.3.1 L'adénylate cyclase .....	27
1.2.3.2 Les phospholipases .....	31
1.2.3.3 Les canaux ioniques .....	34
1.2.3.3.1 Les canaux potassiques à rectification entrante de la famille Kir3 .....	34

1.2.3.3.2	Les canaux calciques voltage-dépendants.....	37
1.2.3.4	Les protéines kinases activées par des mitogènes .....	39
1.2.4	Régulation de la signalisation médiée par le récepteur opioïde delta .....	41
1.2.4.1	Phosphorylation du récepteur .....	42
1.2.4.1.1	Phosphorylation du récepteur opioïde delta par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G .....	42
1.2.4.1.1.1	Aspects généraux sur les kinases des récepteurs couplés aux protéines G ..	42
1.2.4.1.1.2	Aspects structurels de l'activation des kinases des récepteurs couplés aux protéines G	45
1.2.4.1.1.3	Action des kinases des récepteurs couplés aux protéines G sur le récepteur opioïde delta .....	46
1.2.4.1.2	Phosphorylation du récepteur opioïde delta par d'autres kinases .....	47
1.2.4.1.2.1	La protéine kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup> .....	47
1.2.4.1.2.2	Les kinases de la famille Src.....	50
1.2.4.1.2.3	Les kinases cycline-dépendantes 5 (Cdk5).....	52
1.2.4.2	Intervention des arrestines.....	53
1.2.4.2.1	Généralités.....	53
1.2.4.2.2	Régulation de l'activité des β-arrestines .....	56
1.2.4.2.3	Signalisation médiée par la β-arrestine .....	57
1.2.4.2.4	Régulation de l'activité du récepteur opioïde delta par la β-arrestine .....	58
1.3	Théorie des récepteurs.....	60
1.3.1	Les modèles analytiques.....	61
1.3.1.1	Théorie de l'occupation .....	61
1.3.1.2	Modèle opérationnel .....	62
1.3.2	Les modèles mécanistiques .....	65
1.3.2.1	Modèle à deux étapes .....	65
1.3.2.2	Modèle à deux états .....	66
1.3.2.3	Modèle ternaire .....	66
1.3.2.4	Modèle probabiliste.....	68
1.4	La sélectivité fonctionnelle .....	69
1.5	Trafic endocytaire et post-endocytaire.....	72
1.5.1	Internalisation.....	72
1.5.2	Trafic post-endocytaire .....	74

1.5.2.1	Propriétés de trafic du récepteur opioïde delta suite à son internalisation .....	74
1.5.2.2	Voies de recyclage et propriétés moléculaires sous-jacentes .....	77
1.5.2.2.1	Le recyclage rapide des récepteurs couplés aux protéines G à partir des endosomes précoces .....	79
1.5.2.2.2	Recyclage via le réseau trans-Golgi .....	81
1.5.2.2.2.1	Transport rétrograde .....	82
1.5.2.2.2.2	Fusion des vésicules avec le réseau trans-Golgi .....	82
1.5.2.2.2.3	Biogenèse des transporteurs au niveau du réseau trans-Golgi.....	83
1.5.2.2.2.3.1	Tri et ségrégation du cargo .....	83
1.5.2.2.2.3.2	Extrusion le long des microtubules.....	84
1.5.2.2.2.3.3	Fission tubulaire.....	87
1.5.2.2.3	Autres partenaires et mécanismes de recyclage.....	87
1.5.2.2.3.1	Les GTPases de la famille Rab .....	87
1.5.2.2.3.1.1	Généralités.....	87
1.5.2.2.3.1.2	Maturation endosomale .....	88
1.5.2.2.3.1.3	Organisation fonctionnelle des GTPases de la famille Rab .....	90
1.5.2.2.3.2	Formation des vésicules intraluminales et processus de rétrofusion .....	92
1.6	Tolérance à l'analgésie.....	98
1.6.1	Définition .....	98
1.6.2	Mécanismes sous-jacents .....	99
1.6.2.1	Mécanismes moléculaires de la tolérance à l'analgésie .....	99
1.6.2.1.1	Le rôle complexe de la $\beta$ -arrestine dans la tolérance.....	100
1.6.2.1.1.1	Internalisation et tolérance analgésique .....	103
2	Hypothèse et objectifs.....	105
2.1	Caractérisation des propriétés de signalisation et des déterminants moléculaires de l'endocytose du récepteur opioïde delta stimulé par différents ligands .....	105
2.2	Établissement de l'itinéraire post-endocytique du récepteur opioïde delta suite à sa stimulation par le D-Pen (2,5)-enképhaline et de son rôle dans la prévention de survenue de la tolérance analgésique.....	106
3	Résultats .....	107
3.1	Première publication .....	107
3.1.1	Introduction et mise en contexte du premier article .....	107
<b>3.1.2</b>	<b>Article 1 .....</b>	<b>108</b>

3.2	Deuxième publication.....	154
3.2.1	Introduction et mise en contexte du deuxième article .....	154
<b>3.2.2</b>	<b>Article 2.....</b>	<b>155</b>
4	Discussion .....	202
4.1	Mise en évidence du biais des ligands dans les réponses médiées par le récepteur opioïde delta 202	
4.2	Les propriétés d’internalisation du récepteur opioïde delta dépendent de l’environnement biologique dans lequel ils sont exprimés.....	204
4.3	Estimation de la sélectivité fonctionnelle par l’inversement de l’ordre d’efficacité.....	206
4.4	Le récepteur opioïde delta suit la voie de recyclage suite à son internalisation aussi bien au niveau des cellules HEK293 que les neurones.....	207
4.5	Le recyclage du récepteur opioïde delta des endosomes tardifs vers la membrane plasmique repose sur la protéine X interagissant avec le gène 2 lié à l’apoptose (ALIX) et le complexe Rab9/protéine interagissant avec la queue de 47kD (TIP47) .....	208
4.6	Le récepteur opioïde delta regagne la membrane plasmique à partir du réseau trans-Golgi 210	
4.7	L’itinéraire post-endocytique établi pour le récepteur opioïde delta le protège contre la survenue de tolérance analgésique.....	211
5	Perspectives et directions futures .....	213
6	Conclusions.....	216
7	Références .....	217

## Liste des figures

Figure 1. Voies de la douleur.....	9
Figure 2. Superposition des structures hélicoïdales des quatre ROs.....	12
Figure 3. Alignement des séquences d'acides aminés primaires du DOPr de souris, rat et humain.....	13
Figure 4. Modèle d'interaction protéine G-MOPr.....	22
Figure 5. Le cycle de la protéine G.....	26
Figure 6. Domaines structuraux des AC membranaires.....	28
Figure 7. Site de clivage des phospholipases.....	32
Figure 8. Structure d'une sous unité du canal Kir.....	36
Figure 9. Structure des sous-unités du canal calcique.....	39
Figure 10. La structure des domaines des GRK.....	44
Figure 11. Représentation schématique de la structure primaire de la famille de gènes PKC.....	49
Figure 12. Changements conformationnels de la $\beta$ arr1 lors de son activation.....	56
Figure 13. Sites d'interaction du DOPr avec cdk5, Src, PKC, GRK et $\beta$ arr.....	59
Figure 14. Modèle ternaire.....	67
Figure 15. Modèle ternaire étendu.....	67
Figure 16. Modèle ternaire cubique.....	68
Figure 17. Sélectivité fonctionnelle.....	70
Figure 18. Voies post-endocytiques des RCPG.....	79
Figure 19. Recyclage à partir des endosomes précoces.....	81
Figure 20. Régulation de la fonction du DOPr.....	86
Figure 21. Organisation fonctionnelle des Rabs.....	92
Figure 22. Formation de vésicules intraluminales et triage du cargo dans ces vésicules.....	94
Figure 23. Le double rôle d'Alix dans la formation des vésicules intraluminales.....	97
Figure 24. Déplacement de la courbe dose-réponse vers la droite en cas de tolérance analgésique.....	99
Figure 25. Représentation de l'hypothèse illustrant comment l'interaction stable au sein du	



complexe DOPr-Gβγ-βarr2 empêchera l'action d'ALIX et de TIP47/RAB9.....214

## Liste des tableaux

Tableau 1. Structure des ligands opioïdes utilisés dans notre étude.....	19
--	----

## Liste des abréviations

5-HT4 : Récepteur à la sérotonine de type 4  
AA : Acide arachidonique  
AC : Adénylate cyclase  
ALIX : Protéine X interagissant avec le gène 2 lié à l'apoptose.  
AMPC : Adénosine monophosphate cyclique  
AP : Acide phosphatidique  
AP2 : Protéine adaptatrice de type 2  
ARF : Facteur de ribosylation de l'ADP  
ARRDC3 : Protéine contenant le domaine arrestine de type 3  
ASIC : Canal ionique activé par le proton  
ASRT : Complexe Actine-SNX27-Rétromère-Tubules  
ATP : Adénosine triphosphate  
 $\beta$ arr :  $\beta$ -arrestine  
 $\beta$ 1AR : Récepteur  $\beta$ -adrénergique de type 1  
 $\beta$ 2AR : Récepteur  $\beta$ -adrénergique de type 2  
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau  
BRET : Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence  
BSA : Bas seuil d'activation  
 $\text{Ca}^{2+}$  : Ion calcique  
CaM : Calmoduline  
CaMKII : Protéine kinase dépendante de la calmoduline  
 $\text{Ca}_v$  : Canaux calciques voltage-dépendants  
CB1 : Récepteur aux cannabinoïdes de type 1  
CB2 : Récepteur aux cannabinoïdes de type 2  
Cdk5 : Kinase cycline-dépendante de type 5  
CERT : Protéine de transport de céramide  
CGRP : Peptide relié au gène calcitonine  
CHO : Cellules ovariennes de hamster chinois

COS : Cellules de rein de singe vert africain  
CXCR4 : Récepteur de chimiokine de type 4  
DADLE : [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-Enképhaline  
DAG: Diacylglycérol  
DAMGO: [D-Ala(2),N-Me-Phe(4),Gly(5)-ol]-enképhaline  
DTLET : [D-Thr<sup>2</sup>]-Leu-enképhaline-Thr<sup>6</sup>  
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium  
DOPr : Récepteur opioïde delta  
DOPr-eGFP : DOPr marqué par l'eGFP  
DPDPE : D-Pen (2,5)-enképhaline  
DRG : Ganglions de la corne dorsale  
E : Efficacité d'un ligand à activer un effet dans un système  
ECE2 : Enzyme de conversion de l'endothéline de type 2  
EDTA : Acide tétra-acétique éthylène diamine  
EGFR : Récepteurs du facteur de croissance épidermique  
EL : Boucle extracellulaire  
ELISA : dosage immuno-enzymatique sur support solide  
Emax : Effet maximal  
EPAC : Facteurs d'échange des protéines G monomériques  
 $\varepsilon$  : Efficacité intrinsèque d'un agoniste pour activer une voie de signalisation  
ERK : Kinase régulée par des signaux extracellulaires  
ESCRT : De l'anglais endosomal sorting complex required for transport  
*f* : Fonction qui décrit l'efficacité du couplage entre le stimulus et le système pour produire l'effet  
FRET : Transfert d'énergie par résonance de fluorescence  
G : Protéine G  
GAP : Protéines activatrices de la GTPase  
GABA : Acide- $\gamma$ -amino-butyrique  
GARP : De l'anglais Golgi-Associated Retrograde Protein  
GASP : Protéine de triage associée aux RCPG

GCaMP : Indicateur calcique fluorescent codé génétiquement  
GDF : Facteur de déplacement du GDP  
GDP : Guanosine diphosphate  
GEF : Facteurs d'échange du nucléotide guanine  
GFP : Protéine fluorescente verte  
GGA: De l'anglais Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein family  
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
GRK : Kinase des RCPG  
GTP : Guanosine triphosphate  
GTPase : Enzyme hydrolysant le GTP  
HEK293 : Cellules embryonnaires de rein humain 293  
H8 : Hélice 8  
HOPS : De l'anglais homotypic fusion and vacuole protein sorting  
HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque  
H<sup>+</sup> : Ion hydrogène  
HRS: De l'anglais hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate  
HSA : Haut seuil d'activation  
IASP : Association internationale pour l'étude de la douleur  
IL : Boucle intracellulaire  
IP3 : Inositol triphosphate  
JNK : Kinase N-terminale c-Jun  
K<sup>+</sup> : Ion potassique  
KA : Affinité fonctionnelle  
*Kd* : Constante de dissociation du ligand pour le récepteur  
KD : domaine catalytique  
*Ke* : Constante de couplage du complexe LR à une voie de signalisation donnée  
Kir3 : Canaux potassiques à rectification entrante de type 3  
KOPr : Récepteur opioïde  $\kappa$   
L : Ligand  
[L] : Concentration du ligand libre

LBPA : L'acide phospholipidique non conventionnel lysobisphosphatidique  
LGR5 : De l'anglais Leucine-Rich G protein-coupled receptor-5  
LIMK : LIM-kinase  
LPA : Acide lyso-phosphatidique  
[LR] : Concentration du complexe ligand/récepteur  
MAPK : Protéine kinase activée par des mitogènes  
M2R : Récepteur muscarinique de type 2  
Mg<sup>2+</sup> : Ion magnésium  
MVB : Corps multivésiculaires  
μM : Micromolaire  
MOPr : Récepteur opioïde μ  
M6PR : Récepteur du mannose-6-phosphate  
Na<sup>+</sup> : Ion sodique  
NaV : Canaux sodiques voltage-dépendants  
nm : Nanomètre  
nM : Nanomolaire  
NOPr : Récepteur à la nociceptine/orphanine FQ  
NRM : Noyau du raphé Magnus  
OSBP : Protéine de liaison à l'oxystérol de type I  
PA : Acide phosphatidique  
PAR1 : Récepteur activé par la protéase de type 1  
PBS : Tampon phosphate salin  
PEI : Polyéthylénimine  
PFA : Paraformaldéhyde  
Pi4p : Phosphatidylinositol-4-phosphate  
PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc  
PKC : Protéine kinase dépendante du Ca<sup>2+</sup>  
PKD : protéine kinase D  
PLA2, PLC, PLCβ, PLD : Phospholipase de type A2, C, Cβ ou D  
PPi : Pyrophosphate

PTHR : Récepteur de l'hormone parathyroïdienne  
 PTX : Toxine pertussique  
 R : Récepteur  
 Ra : Récepteur actif  
 RACK : Récepteurs pour les PKC activées  
 RCPG : Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques  
 RGS : Régulateur de signalisation des protéines G  
 RH : De l'anglais RGS homology domain  
 RhoGEF: De l'anglais guanine nucleotide exchange factor for Rho/Rac/Cdc42-like GTPase  
 Ri : Récepteur inactif  
 RO(s) : Récepteur(s) opioïde(s)  
 ROCK: De l'anglais Rho-associated coiled-coil containing kinase  
 [Rt] : Concentration totale du récepteur  
 RTK : Récepteurs à activité tyrosine kinase  
 SNARE: SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor  
 SNC-80: (+)-4-[( $\alpha$ R)- $\alpha$ -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxy-benzyl]-N,N-diethyl-benzamide  
 SNX : De l'anglais Sorting Nexin  
 SUMO : De l'anglais Small ubiquitin-like modifier  
 $\tau$  : Efficacité fonctionnelle  
 TGN : Réseau trans-Golgi  
 TICP: H-Tyr-Tic[CH<sub>2</sub>N]Cha-Phe-OH  
 TIP47: Protéine interagissant avec la queue de 47kD  
 TIPP: H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH  
 TM : Hélice transmembranaire  
 TrkA : Récepteurs du facteur de croissance nerveuse de type A  
 TrkB : Récepteurs du facteur de croissance nerveuse de type B  
 TRPV1: De l'anglais transient receptor potential cation channel subfamily V member 1  
 UFP-512: H-Dmt-Tic-NH-CH(CH<sub>2</sub>-COOH)-Bid  
 V2R : Récepteur de la vasopressine de type 2  
 VI : Vésicules intraluminales

VPS : De l'anglais Vacuolar Protein Sorting

WASH: De l'anglais Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homolog



## Remerciements

La thèse de doctorat représente un travail s'inscrivant dans la durée, et pour cette raison, constitue le fil conducteur d'une tranche de ma vie, au crépuscule de la vie étudiante, et à l'aube de la maturité scientifique. De nombreuses âmes généreuses se retrouvent ainsi de manière fortuite ou non, entre moi et mon doctorat. Ce sont certaines de ces personnes que j'aimerais mettre en avant dans ces remerciements.

Je tiens à remercier sincèrement et en premier lieu Dre **Graciela Pineyro**, qui, en tant que directrice de thèse, s'est toujours montrée à l'écoute malgré ses charges académiques et professionnelles. J'ai trouvé en toi une personne qui a su me guider dans l'acquisition des compétences et de la rigueur scientifique. Les mots ne seraient entièrement assez pour exprimer ma reconnaissance envers ta générosité et ton amabilité dont tu as toujours fait preuve. Tu t'es montrée compréhensive de toutes les situations plus ou moins délicates par lesquelles je suis passée. Merci d'avoir été mon inspiration durant toutes ces années!

J'exprime ma haute considération à la ***fondation du CHU Sainte-Justine et la fondation des étoiles***, à l'***FRQS***, au ***département de pharmacologie de la faculté de médecine de l'Université de Montréal*** et à la ***faculté des études supérieures et postdoctorales*** pour les différentes bourses d'études qui me furent attribuées. Soyez assurés que votre contribution financière m'était d'une grande aide et m'a permis de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je tiens à exprimer mon entière reconnaissance et ma profonde gratitude envers Mr **Denis Deblois**, Mr **Sébastien Talbot**, Mme **Christine Lavoie** et Mr **Pierre Paul Rompré** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

J'adresse mes vifs remerciements à mes collègues de laboratoire, actuels comme anciens, **Ahmed, Hanieh, Besma, Derek, Paul, Giacomo, Karim, Nicolas, Mélissa** et **Ouissame** pour tous les bons moments que nous avons vécus ensemble. Vous avez fait preuve d'un esprit d'équipe indéniable, d'une gentillesse immense et d'une grande aide. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'aimerais aussi témoigner toute ma gratitude à tout le personnel du centre de recherche du CHU Sainte-Justine et du département de pharmacologie qui a très gentiment contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse et la réussite de cette formation.

À mes chers parents **Rachid Charfi** et **Rakia Mnif**, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance. Vous avez toujours respecté mes choix et m'avez encouragée pour aller plus haut dans mes études. J'espère être à la hauteur de vos attentes et digne de votre confiance indéfectible. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et le fruit de vos innombrables sacrifices. Que dieu vous garde toujours à mes côtés et en bonne santé!

J'exprime ma reconnaissance envers mon cher mari **Fakher Ben Salah**. Tu m'as aidée durant toutes ces années et tu as toléré mes changements d'humeur et géré mon stress. Je n'oublie pas ta générosité débordante et tes conseils judicieux. Merci de faire partie de ma vie!

À mes chers garçons **Adam** et **Iyed**, vous êtes ma raison d'être. Vous comblez ma vie de bonheur et d'allégresse. Que dieu vous protège!

Je remercie mon cher frère **Mohamed Charfi** et ma chère sœur **Hana Charfi**. Vous êtes des frère et sœur en or et sachez que je suis vraiment fière de vous avoir dans ma vie. Je tiens à souligner votre aide si précieuse à mon cœur et vos encouragements tout le long de ces années. Trouvez ici le témoignage de ma grande affection!

Je remercie ma belle sœur **Amina**, mon beau frère **Mohamed**, ma belle mère **Monia**, mes beaux frères **Mohamed** et **Nabil**, mes belles sœurs **Rim**, **Hela** et **Raoudha** ainsi que leurs maris et enfants pour leur immense gentillesse et chaleureux accueil lors de mes visites estivales.

J'adresse également mes plus sincères remerciements à mes chers amis **Asma** et **Mahdi**, **Rahma** et **Bassem**, **Marwa** et **Walid**, **Rania** et **Fayssal**, **Coraline** et **Sariah**, **Ines** et **Anouar**, **Siwar** et **Amin**, **Ghofrane** et **Amin**, **Nawel** et **Housseem**, **Arwa** et **Amin**, **Caroline** et **Sofiène** et à ma très chère **Awatef Zaiter**. Depuis mon arrivée au Québec, vous êtes ma deuxième famille. Votre aide si généreuse, votre bonne humeur et votre soutien moral ont rendu les années passées ici parmi vous, plus qu'agréables.

Je n'oublie pas mes tantes, mes oncles, mes cousins et mes amis de l'autre côté de l'atlantique. Je vous remercie de tout votre amour et de m'avoir soutenue durant toute ma vie. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus sincères!

*Je dédie cette thèse,  
À Adam et Iyed,  
Les deux prunelles de mes yeux,  
Pour l'espoir que vous gravez de jour en jour dans mon coeur!*

# 1 Introduction

## 1.1 Douleur et nociception

### 1.1.1 Généralités

#### 1.1.1.1 Définition

D'après la définition de l'IASP (association internationale pour l'étude de la douleur), la douleur est « une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle, ou décrite en ces termes ». La douleur apparaît ainsi comme une expérience subjective qui interfère autant avec le psychisme et le social qu'avec les fonctions physiques. C'est un événement neuropsychologique pluridimensionnel et non une réaction simple, univoque [1,2]. Il convient alors de distinguer :

- la composante sensori-discriminative qui correspond aux mécanismes neurophysiologiques de la nociception : processus neuronal permettant le décodage d'un stimulus douloureux au niveau du système nerveux central. Ils assurent la détection du stimulus, sa nature (brûlure, décharges électriques, torsion, etc.), sa durée, son évolution, son intensité, et l'analyse de ses caractères spatiaux; c'est ce que sent le patient.

- la composante affective qui exprime la connotation désagréable, pénible, rattachée à la perception douloureuse. Cette composante peut mener à l'anxiété et/ou la dépression. Elle est déterminée par le stimulus nociceptif, mais aussi par le contexte dans lequel le stimulus est appliqué (incertitude de l'évolution de la maladie...); c'est ce que ressent le patient.

- la composante cognitive référant à l'ensemble des processus mentaux qui accompagnent et donnent du sens à une perception en adaptant les réactions comportementales comme les processus d'attention, d'anticipation et de diversion, les interprétations et valeurs attribuées à la douleur, le langage et le savoir sur la douleur (sémantique) avec les phénomènes de mémoire d'expériences douloureuses antérieures personnelles (mémoire épisodique) décisives sur le comportement à adopter; c'est la signification de la douleur.

- la composante comportementale qui correspond à l'ensemble des manifestations observables : physiologiques (paramètres somato-végétatifs ex. : pâleur), verbales (plaintes, gémissements...) et motrices (immobilité, agitation, attitudes antalgiques); c'est l'expression de la douleur.

### 1.1.1.2 Mécanismes

La douleur compte trois grands mécanismes de genèse : la douleur de nociception, la douleur neurogène et la douleur psychogène. La douleur nociceptive est générée par un récepteur spécifique, un nocicepteur, dont le rôle est de signaler les atteintes à l'intégrité de l'organisme. Elle résulte de lésions des tissus périphériques, qui mènent à un influx électrique transmis par le système nerveux intact. C'est un signal d'alarme normal, et même souhaitable dans la mesure où il induit une attitude appropriée dont l'absence est potentiellement dangereuse pour l'organisme [3]. La douleur neurogène est liée à la destruction ou la lésion d'une structure nerveuse du système somato-sensoriel périphérique (nerf, plexus, ou racine) ou central (tissus médullaires ou tronc cérébral) [4]. Contrairement aux douleurs par excès de nociception, les douleurs neurogènes sont peu sensibles, voire insensibles aux antalgiques périphériques et centraux et aux blocs anesthésiques. Ces douleurs peuvent se manifester en l'absence de tout stimulus avec des paroxysmes, des décharges électriques, des coups de poignard. C'est aussi la douleur que ressentent les malades amputés et en particulier la sensation perçue dans un membre qui a disparu (membre fantôme). La douleur psychogène est générée par le psychisme et existe en l'absence de lésion. Les mécanismes physiologiques de ces douleurs ne sont pas clairement définis, mais l'utilisation d'antalgique semble inefficace. Ces manifestations douloureuses sont liées à la somatisation des problèmes psychologiques, psychiques ou sociaux de l'individu et c'est en traitant ces problèmes que les douleurs sont ainsi traitées [5].

### 1.1.2 Classification

#### 1.1.2.1 Douleur aiguë

On distingue principalement deux types de douleur, aiguë et chronique. La douleur aiguë est une douleur d'installation récente (< 3 mois), le terme « aiguë » caractérisant la durée et non pas l'intensité de la douleur [6]. Il s'agit d'une sensation douloureuse soit transitoire, comme celle qui fait suite à un traumatisme modéré, soit plus durable, comme celle qui révèle une maladie ; dans ce cas, elle est réversible lorsque la lésion causale est traitée. C'est un signal d'alarme dont la 'finalité' est d'informer l'organisme d'un danger pour son intégrité. Elle est

souvent associée à des manifestations neurovégétatives (tachycardie, sueurs, élévation de la pression artérielle) et à une anxiété. Une fois son origine identifiée, sa prise en charge nécessite sa reconnaissance et un traitement essentiellement pharmacologique reposant sur les antalgiques. L'évolution se fait en règle vers la résolution [6].

## 1.1.2.2 Douleur chronique

### 1.1.2.2.1 Définition

Une fois passée la phase aiguë lorsque la douleur persiste, alors que la lésion traumatique ou pathologique est résolue ou traitée, la douleur est dite chronique. Il s'agit maintenant d'un syndrome clinique, véritable maladie à part entière, distincte de la douleur aiguë. Elle se caractérise notamment par la longueur de sa durée d'évolution (conventionnellement supérieure à 3 mois), mais surtout par l'ensemble des répercussions psychologiques plus ou moins sévères qu'elle entraîne, sur l'humeur et les activités (physiques, professionnelles, sociales et familiales) et sur le comportement du patient et sa qualité de vie [7]. L'objectif thérapeutique est réadaptatif, basé sur une approche multimodale (pharmacologique et non pharmacologique). Toute douleur doit être signalée et soulagée rapidement pour éviter qu'elle ne s'installe et ne devienne chronique.

Dans les douleurs chroniques, il faut distinguer :

- Les douleurs liées à une pathologie évolutive d'origine maligne (cancer, SIDA ...), mais aussi bénigne (certaines pathologies rhumatismales). Leur mécanisme générateur est généralement un excès de nociception.
- Les douleurs liées à une pathologie séquellaire non ou peu évolutive, d'origine bénigne, telle qu'une lésion nerveuse périphérique et/ou centrale. Leur mécanisme est généralement neuropathique.

### 1.1.2.2.2 Défis reliés à la douleur chronique

Au Canada, environ un individu sur cinq souffre de douleur chronique [8]. La prévalence de la douleur chronique augmente avec l'âge, étant aussi élevée que 65 % chez les personnes âgées ( $\geq 65$ ans) vivant dans la collectivité et 80 % chez les personnes âgées vivant dans des

établissements de soins de longue durée. Cette douleur est sous-estimée et souvent soulagée de façon inadéquate [9]. Le traitement des douleurs par excès de nociception fait appel aux antalgiques définis en trois niveaux par l'Organisation mondiale de la Santé. En ce qui concerne la douleur neuropathique, elle touche environ 7 % de la population générale, mais seulement 15 à 30 % des patients sont soulagés avec les moyens thérapeutiques actuels. Une méta-analyse de 2015 portant sur les traitements pharmacologiques de la douleur neuropathique a révélé que même si l'utilisation de certains médicaments (voir plus bas) est fortement recommandée, les effets sont relativement modestes : le nombre nécessaire à traiter pour produire une réduction de 50% de la douleur pour les médicaments fortement recommandés varie de 3,6 à 7,7, c'est-à-dire que 4 à 8 patients doivent être traités pour qu'un seul patient ressente 50% de réduction de la douleur lorsque la réponse au placebo est soustraite [10].

La survenue des effets secondaires souvent non traités [11] et l'observance thérapeutique sous-optimale attribuable à de fausses croyances et attitudes face à la douleur [12] font que de nombreux patients soient insatisfaits de leur traitement [13]. En effet, malgré les progrès de la recherche sur la douleur, la douleur chronique reste un défi à gérer [14]. Bien que de nombreuses options de traitement soient disponibles pour soulager cette douleur, il n'y a pas de consensus sur le traitement le plus approprié [15]. Cependant, des recommandations peuvent être proposées pour des traitements pharmacologiques de première, deuxième et troisième ligne basés sur le niveau de preuve pour les différentes stratégies de traitement. Les thérapies disponibles qui s'avèrent efficaces dans la gestion de la douleur neuropathique comprennent les opioïdes, le tramadol, les anticonvulsivants, les antidépresseurs, les traitements topiques (dispositif transdermique de lidocaïne, capsaïcine) et la kétamine. Les antidépresseurs tricycliques sont souvent prescrits pour soulager la douleur neuropathique. Bien qu'ils soient efficaces dans la réduction de la douleur, le traitement peut être compromis par l'apparition de nombreux effets secondaires. Les médicaments antiépileptiques (prégabaline et gabapentine) ont un profil d'innocuité favorable avec des préoccupations minimales concernant les interactions médicamenteuses et ne montrant aucune interférence avec les enzymes hépatiques. Sinon, les opioïdes (oxycodone et méthadone) et le tramadol peuvent être utilisés. Malgré les nombreuses options thérapeutiques disponibles, moins de la moitié des patients ressentent un soulagement de la douleur cliniquement significatif, qui est presque toujours un soulagement



partiel. De plus, les patients éprouvent fréquemment des effets indésirables lourds et, par conséquent, sont souvent incapables de tolérer le traitement. Chez les patients restants, les thérapies combinées utilisant deux ou plusieurs analgésiques avec différents mécanismes d'action peuvent également offrir un soulagement adéquat de la douleur. Cependant, les essais sur les différentes combinaisons d'analgésiques (quelle combinaison utiliser, apparition d'effets additifs ou supra-additifs, traitement séquentiel ou concomitant, profils d'effets indésirables de ces analgésiques, seuls et en combinaison) sont rares. Si les traitements médicaux ont échoué, des thérapies physiques et psychologiques et des thérapies invasives telles que l'administration intrathécale de médicaments et les techniques de stimulation neurochirurgicale (neurostimulation transcutanée, stimulation de la moelle épinière, stimulation cérébrale profonde et stimulation du cortex moteur) peuvent être envisagées [15].

D'autre part, le coût global annuel de prise en charge d'un patient atteint de douleurs neuropathiques serait estimé à 10268\$CA, dont 44,3% en coûts directs relatifs aux traitements et à la prestation de services de santé et 55,7% en coûts indirects relatifs à la perte de productivité et à la hausse des montants versés en indemnités d'invalidité [16]. Ceci représente un lourd fardeau économique sur le plan sociétal, au Canada et ailleurs [14]. Le besoin de développer de nouveaux agents thérapeutiques qui répondent véritablement aux besoins des patients est alors tellement pressant et c'est pour cette raison que nous nous intéressons au cours de cette étude au récepteur delta-opiacé (DOPr), une cible prometteuse pour le développement de nouveaux analgésiques contre la douleur chronique [17].

### 1.1.3 Physiopathologie

Pour identifier de nouvelles cibles analgésiques potentielles et pour développer de nouveaux traitements pour la douleur, il est important de comprendre d'abord le circuit de la douleur: comment la douleur est-elle déclenchée et comment cette information est-elle transmise au système nerveux central? Pour ce faire, il est nécessaire de comprendre comment fonctionnent les nocicepteurs. Le corps humain est équipé de différents types de neurones sensoriels et les nocicepteurs sont le sous-ensemble qui fonctionne comme l'unité primaire de perception de la douleur, étant équipé de récepteurs et de canaux ioniques qui permettent la

détection de stimuli susceptibles de causer des dommages. Les molécules impliquées proviennent de la lyse cellulaire, des tissus environnants inflammés et des fibres sensorielles elles-mêmes. Les progrès de la biologie moléculaire ont enrichi la soupe inflammatoire de composition de plus en plus complexe: ATP et récepteur purinergique P2X3, ions H<sup>+</sup> et récepteur ASIC (canal ionique sensible au proton), chaleur et récepteur vanilloïde TRPV1 (De l'anglais transient receptor potential cation channel subfamily V member 1), etc. Lorsqu'un stimulus nociceptif active un canal ionique sur un nocicepteur, l'influx cationique dépolarise le nocicepteur en produisant un potentiel de récepteur. Si le potentiel du récepteur est suffisamment grand pour atteindre le seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants (NaV), il déclenchera une génération de potentiel d'action et la transmission d'un signal électrique à la moelle épinière puis au cerveau propageant le signal de la douleur [18-20].

Les données anatomiques et électrophysiologiques *in vivo* et *in vitro* montrent que certains nocicepteurs sont des fibres A $\delta$  myélinisées et d'autres sont des fibres C non myélinisées. Les fibres A $\delta$  sont de diamètre moyen et interviennent dans la première douleur, c'est-à-dire la douleur aiguë, rapide et localisée. Ces fibres afférentes myélinisées diffèrent des fibres A $\beta$  de plus grand diamètre, de conduction rapide et qui répondent à une stimulation mécanique inoffensive (toucher léger par exemple). Les fibres C sont de petit diamètre et véhiculent la douleur secondaire, lente et moins bien localisée [21]. La plupart des fibres sont polymodales c'est-à-dire sensibles à la fois aux stimuli nociceptifs thermiques, mécaniques et chimiques, mais il en existe des *fibres* qui répondent uniquement à un seul type de stimuli [18,20]. Des développements récents dans les technologies d'imagerie chez les souris transgéniques ont conduit à des expériences élégantes *in vivo* utilisant l'indicateur calcique fluorescent codé génétiquement GCaMP, dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité du calcium intracellulaire [22-24]. Contrairement aux études électrophysiologiques, qui suggèrent un phénotype prédominant polymodal des nocicepteurs, certaines études au GCaMP ont montré que dans des conditions normales, la plupart des neurones sensoriels *in vivo* sont réellement unimodaux, c'est-à-dire qui répondent à un seul stimulus nociceptif, tel qu'un pincement mécanique, mais pas la chaleur extrême ou le froid [22,23]. Cependant, comme les études électrophysiologiques antérieures, des études au GCaMP *in vivo* ont montré que les lésions et l'inflammation produisent une réponse neuronale accrue, entre autres par un

phénomène d'activation couplée des neurones sensoriels primaires [22-24]; l'excitabilité accrue des neurones sensoriels observée après une blessure est probablement un facteur clé de la douleur spontanée et/ou provoquée par le stimulus ressenti par les patients souffrant de douleur neuropathique. La discordance entre les études électrophysiologiques et celles au GCaMP a été suggérée par le caractère invasif des approches électrophysiologiques *in vivo* et le traumatisme de la dissociation nécessaire à l'analyse *in vitro*, pouvant induire une inflammation contribuant à l'induction de la polymodalité nociceptive [22]. En plus des expériences fonctionnelles, le séquençage de cellule unique de l'ARN des neurones sensoriels a montré qu'ils peuvent être divisés en groupes selon leurs transcriptomes [25,26]. Un avantage significatif du séquençage de cellule unique est la nature non biaisée de la manière dont les données sont produites. Cependant, pour exploiter son véritable pouvoir, il doit être effectué sur des neurones sensoriels d'innervation anatomique connue, c'est-à-dire en utilisant des techniques de marquage rétrograde, car cette technique a été utilisée pour montrer que les neurones innervant différents tissus présentent des propriétés distinctes [27]. Par exemple, le canal NaV1.7 est exprimé dans les neurones du côlon NaV1.8-positifs et pourtant les souris qui manquent le NaV1.7 dans les neurones NaV1.8-positifs, bien qu'ayant une douleur somatique diminuée, éprouvent une douleur viscérale normale, suggérant que le blocage pharmacologique du NaV1.7 seul dans les viscères peut être insuffisant pour cibler la douleur viscérale chronique [28]. De plus, toujours en utilisant les techniques de marquage rétrograde, il a été démontré que les neurones articulaires ont une faible réponse à l'acide, mais répondent mieux à l'ATP que les neurones cutanés [29], et des 6 sous-unités du canal ASIC, ASIC3 médie l'excitation acide des fibres afférentes dures, cornéennes et cardiaques, contribuant potentiellement à la douleur de la céphalée, les pathologies cornéennes et l'ischémie cardiaque, respectivement [30-32]. Le suivi rétrograde a été couplé avec le séquençage de cellule unique pour identifier l'empreinte moléculaire de sous-ensembles neuronaux distincts innervant différents tissus [33,34]. Avec une telle information à portée de main, différentes protéines et/ou sous-ensembles neuronaux peuvent être ciblés en utilisant des souris transgéniques pour déterminer leur contribution dans les processus physiologiques et ainsi identifier de nouvelles cibles thérapeutiques [35].

Pour continuer avec la transmission de la douleur, ces fibres primaires afférentes (dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions de la racine dorsale pour le corps et le

ganglion de Gasser pour le visage) se projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière, qui est organisée en couches distinctes anatomiquement et électrophysiologiquement. Par exemple, les fibres A $\delta$  se projettent au lamina I ainsi que dans la corne dorsale profonde (lamina V). En revanche, les nocicepteurs C iront plus superficiellement aux laminae I et IIb [21]. La moelle épinière envoie des projections vers l'aire parabrachiale, située dans la région dorsolatérale du pont, qui présente une connexion très rapide avec l'amygdale, une région généralement considérée pour traiter les informations pertinentes pour les propriétés aversives de la douleur. Les neurones des laminae I et V constituent la principale efférence de la corne dorsale vers le cerveau [36]. Un sous-ensemble de ces neurones transmet l'information au cortex somatosensoriel via le thalamus, fournissant des informations sur l'emplacement et l'intensité du stimulus douloureux. D'autres neurones se connectent avec le gyrus cingulaire antérieur et le cortex insulaire via le tronc cérébral et l'amygdale, contribuant à la composante affective de la douleur. Cette information ascendante accède également aux neurones du bulbe rostroventromédian et de la substance grise périaqueducale pour activer les différentes voies descendantes de contrôle qui modulent cette douleur [21]. En effet, la modulation de la douleur joue un rôle de plus en plus important dans la compréhension des mécanismes de la douleur. Ainsi, une modulation du signal nerveux peut s'effectuer au niveau spinal par l'intermédiaire d'interneurones excitateurs ou inhibiteurs (ex. GABAergique), de la microglie (cellules immunitaires du système nerveux central) ou des fibres inhibitrices descendantes provenant de diverses régions supraspinales citées ci-haut (en particulier par l'intermédiaire de la sérotonine, de la noradrénaline et des opioïdes endogènes) (figure 1). La libération d'opioïdes endogènes, entre autres, au niveau spinal permet l'activation des récepteurs opioïdes (ROs), provoquant l'inhibition de la transmission des stimuli douloureux vers les structures supérieures, et produisant ainsi l'analgésie [37].

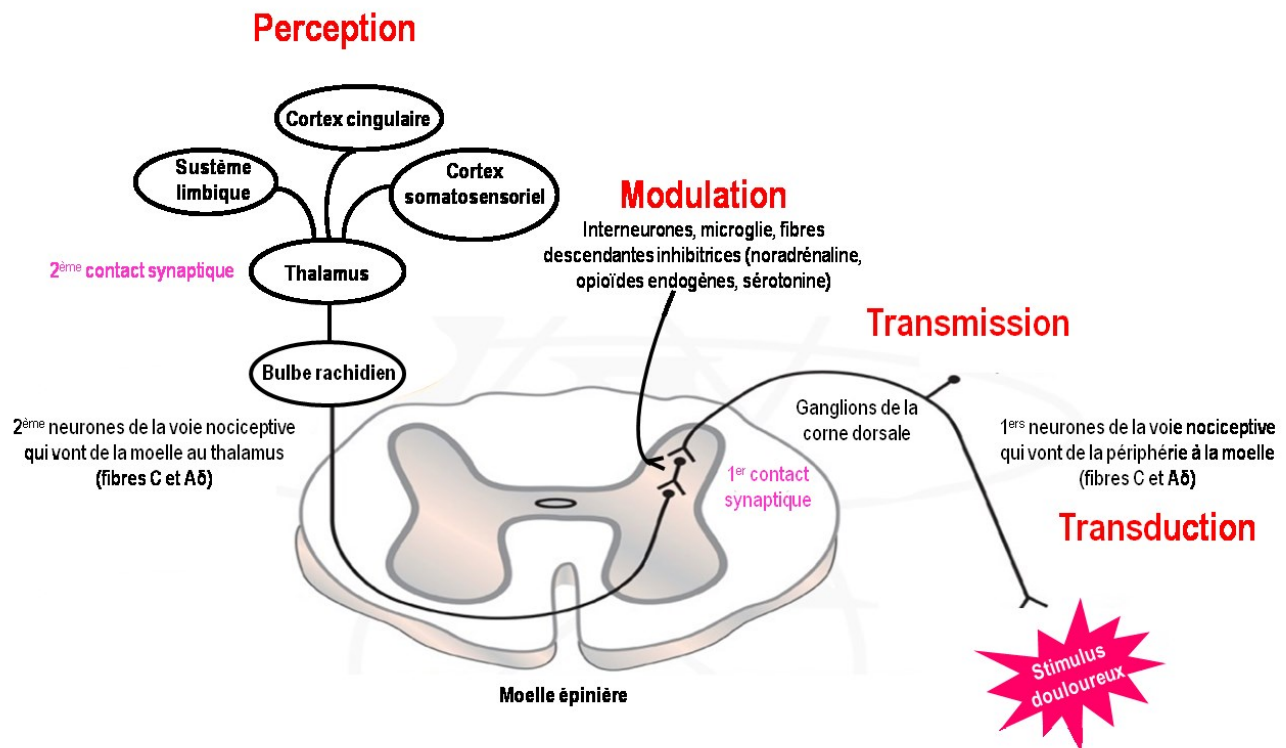


Figure 1. Voies de la douleur.

La cascade électrique et chimique de la douleur se divise en 4 étapes distinctes: transduction, transmission, modulation et perception.

#### 1.1.4 Récepteurs opioïdes

##### 1.1.4.1 Caractérisation moléculaire

Les ROs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui constitue la plus grande famille des récepteurs membranaires des mammifères, ainsi que la cible d'environ un tiers des médicaments approuvés/commercialisés [38]. Ils interagissent principalement avec la protéine G inhibitrice de l'adénylate cyclase (AC), *Gai/o*. La protéine G sert de transducteur principal de signal vers les seconds messagers et les effecteurs. Les ROs, comme tous les RCPG, se caractérisent par une structure commune de sept hélices hydrophobes transmembranaires (TM1-TM7), connectées par trois boucles extracellulaires (EL1-EL3) et trois boucles intracellulaires (IL1-IL3) avec deux queues N et C-terminales, en plus de la présence de l'hélice 8 (H8). Les EL avec la queue N-terminale extracellulaire permettent la

liaison des ligands, la queue C-terminale intracellulaire permet l'interaction avec différentes protéines interagissant avec les RCPG et celles de régulation. Les IL lient les protéines G et certaines protéines régulatrices comme les arrestines. L'hélice 8 fait partie des interfaces à travers lesquelles se forment les oligomères de ROs et son réarrangement est nécessaire pour la conformation active du récepteur qui reconnaît la  $\beta$ -arrestine.

Il existe trois principaux sous-types de ROs: mu (MOPr), delta (DOPr) et kappa (KOPr), qui sont activés par les peptides endogènes tels que les endomorphines, les enképhalines, les  $\beta$ -endorphines et les dynorphines, mais aussi par les alcaloïdes naturels et autres ligands synthétiques et semi-synthétiques. Bien qu'un quatrième sous-type de récepteur : le récepteur à la nociceptine/orphanine FQ (NOPr), est lié phylogénétiquement aux ROs, il n'est pas activé par les mêmes ligands. La comparaison des structures cristallines des ROs révèle des interactions ligand-récepteur communes responsables de la reconnaissance moléculaire des opioïdes classiques. En effet, les quatre ROs présentent une très grande similarité de séquence des régions transmembranaires (à partir d'un minimum de 67% pour le récepteur NOPr comparé aux autres ROs jusqu'à un maximum de 76% entre les récepteurs MOPr et DOPr) [39] et une structure cristallographique très similaire, même dans la région des boucles la moins conservée (figure 2). Ceci est particulièrement évident dans la structure en feuillet  $\beta$  caractéristique de l'EL2, qui est également présente dans la structure cristalline du récepteur de chimiokine CXCR4 [40], un autre RCPG liant différents peptides. Tel qu'illustré dans la figure 2, la plus grande différence entre les structures cristallines des ROs se trouve dans la moitié extracellulaire de TM1, qui semble être beaucoup plus droite dans le KOPr par rapport à celles du DOPr, MOPr et NOPr. Elle était également différente de la portion équivalente au niveau de la structure cristallographique du CXCR4. L'EL3 entre TM6 et TM7 était également très différente entre les ROs. Les ligands des ROs occupent une région délimitée par les hélices transmembranaires formant les poches de liaison. La partie inférieure de la poche de liaison est conservée parmi les DOPrs, MOPrs et KOPrs et est responsable de son efficacité. La partie supérieure extracellulaire de ces poches de liaison est différente selon le sous-type de récepteur et est responsable de la spécificité des ligands pour un sous-type donné. En effet, les interactions des ligands du MOPr et DOPr se font avec des résidus des hélices transmembranaires TM3, TM5, TM6 et TM7, alors que ceux du KOPr et NOPr se font avec des résidus des TM2, TM7 et TM3 [39,41]. Différents

résidus de ces hélices transmembranaires pour chaque sous-type de récepteur confèrent également la sélectivité différentielle des ligands pour un récepteur donné (exemple la leucine en position 300 pour le DOPr) [39].

Des détails supplémentaires importants sur la liaison et la signalisation des ROs ont été fournis par la structure cristalline à ultra-haute résolution du DOPr [42] qui a révélé la présence d'un site de liaison allostérique occupé par le sodium, et a été trouvé dans les structures cristallines d'autres RCPG [43,44]. Dans toutes ces structures cristallines à ultra-haute résolution, cet ion est situé à proximité du résidu aspartate qui interagit avec plusieurs ligands orthostatiques des RCPG, y compris les ligands opioïdes classiques [41]. La mutagenèse dirigée et les études fonctionnelles du DOPr révèlent que la modification du résidu allostérique du site de sodium : l'asparagine en position 131 en alanine ou en valine augmente la signalisation constitutive via l'arrestine. Les mutations de l'acide aspartique en position 95, de l'asparagine en position 310 et celle en position 413 en alanine transforment les antagonistes classiques du DOPr comme le naltrindole en agonistes biaisés vers la signalisation  $\beta$ -arrestine. Ces données établissent les bases moléculaires du contrôle allostérique de la signalisation des opioïdes, révélant que ces résidus agissent comme des «commutateurs d'efficacité» au niveau d'un RCPG [42].

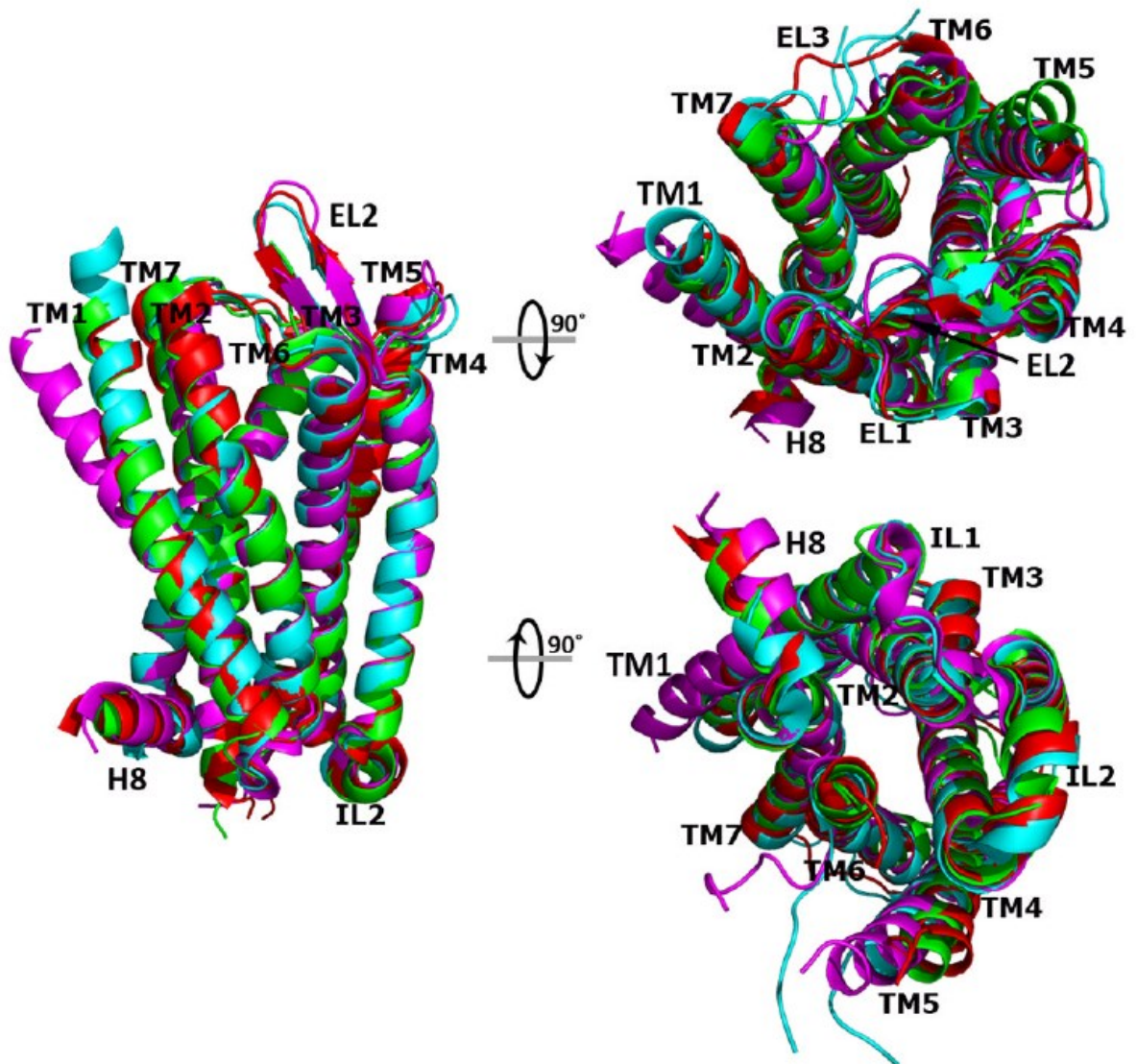


Figure 2. Superposition des structures hélicoïdales des quatre ROs.

Vues verticales (à gauche), extracellulaires (en haut à droite) et intracellulaires (en bas à droite) de la superposition des quatre structures cristallines des ROs. Les structures cristallines des récepteurs MOPr, DOPr, KOPr et NOPr sont représentées en rouge, cyan, magenta et vert, respectivement [39].



Le gène du DOPr chez la souris, le rat et l'humain code pour une protéine de 372 acides aminés avec 7 domaines transmembranaires [45,46]. La séquence primaire d'acides aminés du DOPr est hautement conservée chez ces espèces, avec plus de 90% d'homologie (Figure 3) [47].

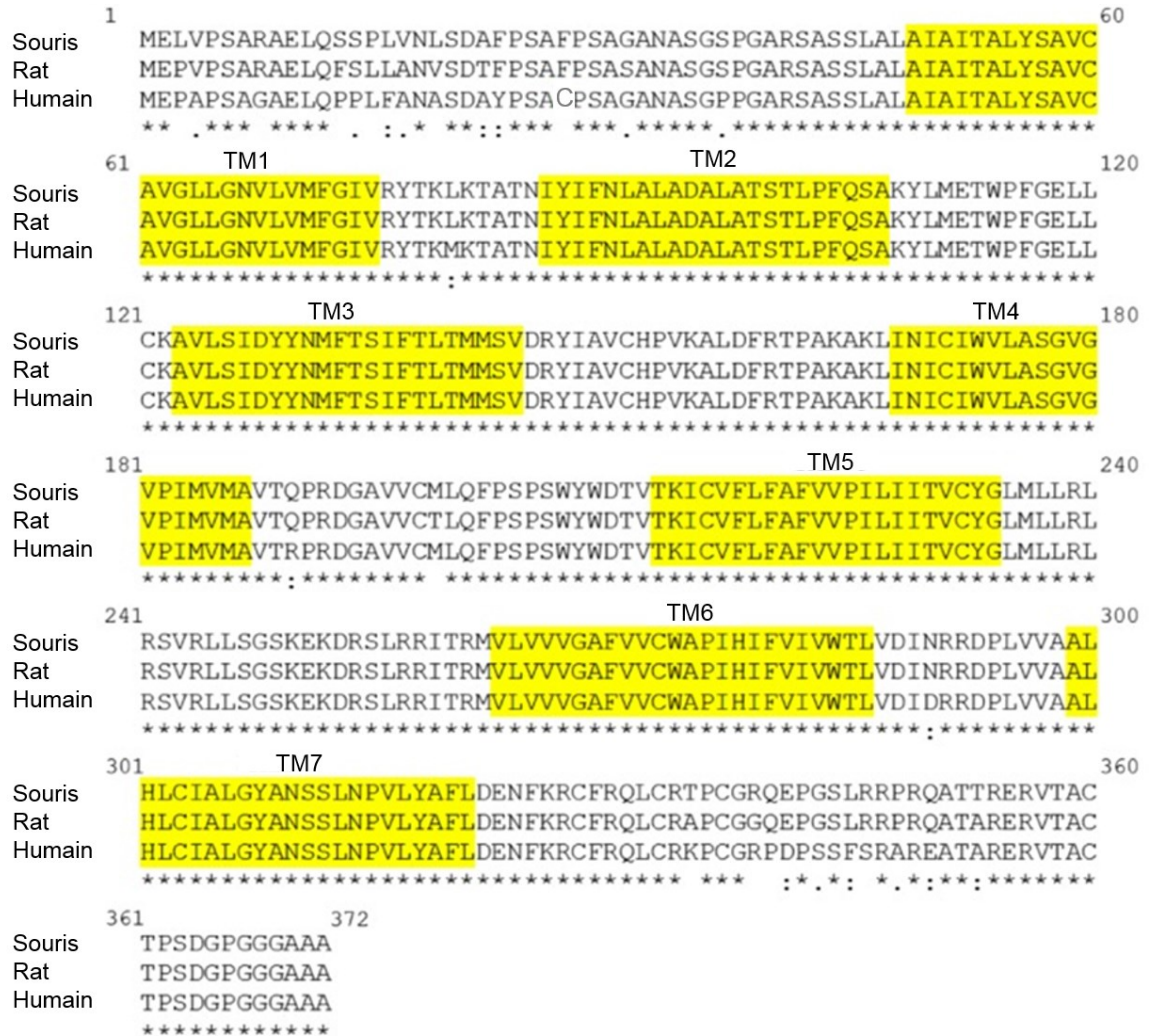


Figure 3. Alignement des séquences d'acides aminés primaires du DOPr de souris, rat et humain

Les astérisques démontrent les régions conservées, les deux points les régions hautement similaires et les points celles faiblement similaires. Les séquences d'acides aminés formant les domaines transmembranaires (TM) sont surlignées en jaune.

#### 1.1.4.2 Distribution des récepteurs opioïdes

Ils sont présents dans le système nerveux central et périphérique, dans le système digestif et le système immunitaire. Ils sont largement étudiés en raison de leur rôle crucial dans la gestion de la douleur, l'abus et l'addiction des drogues et les troubles de l'humeur [41]. Ils sont également responsables d'une multitude de fonctions biologiques comme la mémoire, l'apprentissage, le sentiment de satiété et de soif, le développement du système nerveux central, la locomotion, les fonctions digestives, respiratoires et cardiovasculaires et la liste est encore longue. Pour une revue de ces systèmes, voir [48].

Dans cette thèse, nous nous intéresserons à la localisation anatomique du DOPr dans le système nerveux des mammifères. Dans le système nerveux central, les DOPrs sont exprimés dans des régions spécifiques du cerveau avec des densités élevées dans le bulbe olfactif, le cortex, le striatum et l'amygdale. Ils sont également exprimés dans les zones impliquées dans la régulation de l'humeur [49-51]. Tout au long du circuit de la douleur, les DOPrs s'expriment dans plusieurs structures impliquées dans la transduction (terminaisons nerveuses périphériques), la transmission (neurones des DRG (ganglions de la corne dorsale) et substance grise de la moelle épinière) et la perception du stimulus douloureux (cortex cérébral). Plus récemment, il a été montré que les DOPrs étaient exprimés dans des axones périphériques entourant les follicules pileux et d'autres organes mécanosensoriels. Ces récepteurs réduisent la transmission de l'influx nerveux vers la corne dorsale de la moelle épinière via l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants ce qui régule probablement l'hypersensibilité cutanée mécanique typique des syndromes de douleur chronique [52]. L'expression du DOPr diffère entre les espèces. Dans les neurones des DRG des rongeurs, l'expression du DOPr est dispersée dans différents types de cellules tandis que chez les primates, l'ARNm du DOPr est principalement détecté dans les neurones de diamètres petits et moyens et les sites de liaison du DOPr sont concentrés dans les laminae I et II de la moelle épinière [53].

Le marquage pharmacologique [54] et celui à l'or colloïdal du DOPr ont révélé que ce récepteur est principalement localisé dans le cytoplasme des cellules [55,56-58], suggérant que le DOPr est l'un des rares RCPG qui soient dirigés à la surface des cellules via la voie de sécrétion régulée [59-62], c'est-à-dire en réponse à un signal particulier. En effet, le DOPr est recyclé à la membrane plasmique suite à des conditions spécifiques comme le stress

physiologique (nage forcée, privation d'eau, décharge électrique, hypoxie), l'exposition prolongée aux drogues d'abus (morphine, méthadone, étorphine), la douleur inflammatoire chronique et la plasticité liée à l'apprentissage [47]. D'autre part, des études ont démontré que le DOPr peut être acheminé à la membrane plasmique via la voie de sécrétion constitutive où les récepteurs sont constamment dirigés vers la membrane plasmique à travers les microtubules du cytosquelette [47,63]. En effet, l'activation du DOPr stimule la cofiline, une protéine qui régule la dynamique des filaments d'actine, contrôlant son expression membranaire. Ce processus implique le recrutement de la protéine kinase ROCK (de l'anglais Rho-associated coiled-coil containing kinase), de la kinase LIMK (LIM-kinase) et de  $\beta$ arr1 (mais pas de  $\beta$ arr-2) (voir détails dans la section 1.5.2.2.2.3.2) [63]. Ces données suggèrent que les deux voies sécrétoire et constitutive sont impliquées dans l'acheminement du DOPr vers la membrane plasmique. Bien qu'il existe des preuves solides affirmant la localisation subcellulaire du DOPr principalement dans les compartiments intracellulaires, une controverse concernant ce dogme est apparue. La création de souris exprimant le DOPr-eGFP (DOPr marqué par l'eGFP : protéine fluorescente verte) a permis la visualisation du récepteur au niveau de la surface des neurones sensoriels [64,65], ce qui a alimenté le débat sur la non-spécificité des anticorps anti-DOPr (utilisés pour montrer la distribution intracellulaire), d'autant plus qu'ils produisent un immunomarquage chez les souris invalidées génétiquement pour le DOPr [64]. En utilisant ces souris, on a démontré la localisation du DOPr dans les afférences myélinisées et non peptidiques avec une absence quasi complète de leur expression dans les neurones exprimant la substance P [64], bien que d'autres démontrent que le DOPr colocalise avec la substance P et le CGRP (peptide relié au gène calcitonine) en utilisant la microscopie électronique et l'électrophysiologie. Cette même étude a démontré que les agonistes du DOPr sont plus efficaces pour réduire la douleur mécanique que celle thermique, une découverte corroborée avec le fait que les afférences myélinisées sont sensibles aux stimuli mécaniques et pas thermiques [66]. Il faut cependant ne pas oublier que chez ces souris modifiées génétiquement, l'étiquette eGFP de 26.9 kDa placée au niveau C-terminal du récepteur pourrait modifier l'interaction du récepteur avec les protéines de signalisation, de triage, de trafic et de régulation qui se lient essentiellement au domaine C-terminal du récepteur. D'autre part, l'eGFP peut former des oligomères covalents par liaison disulfure dans des environnements oxydants, tel que le réticulum endoplasmique, provoquant leur mauvais repliement et supprimant leur

fluorescence [67]. En conséquence, une proportion substantielle du DOPr intracellulaire chez les souris exprimant le DOPr-eGFP peut ne pas être visible en raison des molécules eGFP mal repliées (non fluorescentes) qui affectent non seulement la visualisation de la fluorescente verte (GFP), mais aussi la liaison des anticorps anti-GFP. En accord avec cette possibilité, la fusion de plusieurs marqueurs au DOPr a induit des profils de distribution subcellulaires distincts, où l'eGFP fusionné à l'extrémité N ou C-terminale a donné une localisation principalement à la surface cellulaire contrairement aux récepteurs fusionnés avec les marqueurs Myc- ou hémagglutinine [68]. Donc les données obtenues avec ces souris doivent être interprétées avec précaution.

#### 1.1.4.3 Effets secondaires des ligands des récepteurs opioïdes

Bien que leur efficacité analgésique soit largement établie, l'utilisation médicale efficace des ligands des ROs est limitée par l'apparition de nombreux effets secondaires indésirables, y compris la dépression respiratoire, la sédation, les nausées, les vomissements et la constipation. En outre, l'utilisation prolongée d'opioïdes entraîne souvent le développement de tolérance analgésique et de dépendance physique et psychologique [69,70]. L'utilisation de modèles de souris transgéniques a établi que les effets désirés et indésirables des opioïdes disponibles en clinique sont médiés par les MOPr [71]. Cela a stimulé la recherche sur les DOPr et les KOPr en tant que cibles alternatives pour le développement rationnel de nouveaux analgésiques avec moins d'effets secondaires. Ces deux types de récepteurs produisent une analgésie efficace [72,17], mais le stress et les réponses dysphoriques associés à l'activation du KOPr [73,74] font des DOPr une alternative plus attrayante pour le développement de médicaments analgésiques. En effet, les agonistes du DOPr produisent moins d'effets secondaires gastro-intestinaux [75-77], de dépression respiratoire [78,76] et de dépendance physique [79,80] que ceux du MOPr. Des études cliniques réalisées sur les agonistes du DOPr ont souligné l'absence de dépression respiratoire suite à leur administration [81]. Un autre avantage à soulever réside dans le fait que les agonistes du DOPr présentent des propriétés anxiolytiques et antidépressives [82]. Leur capacité à moduler ces réactions émotionnelles est hautement souhaitable, non seulement en termes de nouvelles applications thérapeutiques, mais aussi en raison de l'association fréquente de l'anxiété et des troubles de l'humeur avec la douleur chronique, où les agonistes du DOPr ont

démontré une efficacité notable, comme déjà mentionné dans la section 1.1.2.2.2 [17]. La participation DOPr aux réponses de récompense est aussi considérablement moindre que celle du MOPr, étant principalement associée à l'apprentissage des récompenses physiologiques [71,83]. Cependant, les agonistes du DOPr peuvent augmenter l'excitabilité du cerveau en réduisant le seuil des crises épileptiques [82,84] et présentent un potentiel de tolérance analgésique considérable [85,86]. Mais de façon intéressante, l'ampleur des effets indésirables n'est pas la même pour tous les ligands du DOPr, ce qui suggère que la conception rationnelle de nouveaux agonistes peut améliorer de façon réaliste leur profil thérapeutique. Et c'est pour toutes ces raisons que nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des caractéristiques pharmacologiques (signalisation et trafic) des agonistes du DOPr afin d'ultimement comprendre les causes biologiques de la tolérance analgésique, ce qui aidera pour le développement rationnel de nouveaux analgésiques ayant un profil pharmacologique plus sécuritaire.

#### 1.1.4.4 Les ligands du récepteur opioïde delta

Bien qu'aucun ligand du DOPr ne soit retrouvé en pratique clinique, plusieurs ont été développés et identifiés. Dans ce travail, on s'intéressera aux ligands peptidiques DPDPE (D-Pen (2,5)-enképhaline), TIPP (H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH) et UFP-512 (H-Dmt-Tic-NH-CH(CH<sub>2</sub>-COOH)-Bid), au ligand non peptidique SNC-80 (4-[(R)-[(2R,5S)-2,5-diméthyl-4-prop-2-enylpiperazin-1-yl]-(3-méthoxyphényl)méthyl]-N,N-diéthylbenzamide) et à l'alcaloïde classique à savoir la morphine (tableau 1).

Le DPDPE est un agoniste opioïde dérivé de l'enképhaline, un pentapeptide endogène, en remplaçant les acides aminés 2 et 5 de l'enképhaline par un dérivé D-Pen (pénicillamine; β, β-diméthylcystéine). Il contient une liaison disulfure via les deux dérivés D-Pen afin de rendre la conformation plus rigide pour se lier spécifiquement au DOPr [87,88]. Il est devenu un outil pharmacologique largement utilisé.

Le térapeptide TIPP est très sélectif du DOPr. Caractérisé par une extrémité carboxylique libre, il présente une affinité nanomolaire au DOPr et aucune activité sur le MOPr [89].

L'UFP-512 a été synthétisé à partir d'un pharmacophore antagoniste, le Dmt-Tic, en modifiant l'extrémité C-terminale dans le but de créer un puissant agoniste. Il a une très grande affinité au DOPr [90]. L'UFP-512 peut traverser la barrière hématoencéphalique et a montré son efficacité dans certains troubles de l'humeur comme l'anxiété et la dépression [91]. La présence d'une fonction CH<sub>2</sub>-COOH entre les pharmacophores Dmt-Tic et l'anneau bid (benzimidazole) augmente la puissance et la sélectivité pour le DOPr et confère à la molécule des propriétés pharmacocinétiques favorables lui permettant de traverser la barrière hématoencéphalique.

Le SNC-80 a été synthétisé à partir de l'énantiomère du 1-allyl-trans-2,5-diméthylpiperazine, et présente une très grande sélectivité au DOPr [92]. Pendant longtemps, l'évaluation de l'efficacité antalgique des agonistes du DOPr a été freinée par l'absence d'agonistes de bonne affinité, sélectifs et stables *in vivo* [93]. La synthèse de ces molécules a ainsi représenté une avancée importante pour l'étude de ce récepteur [94].

En ce qui concerne la morphine, des méthodes de synthèse chimique existent, mais la production à partir du pavot reste la plus rentable. Elle présente une sélectivité plus grande pour le MOPr que le DOPr.

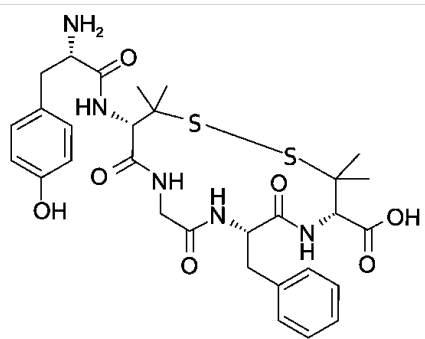
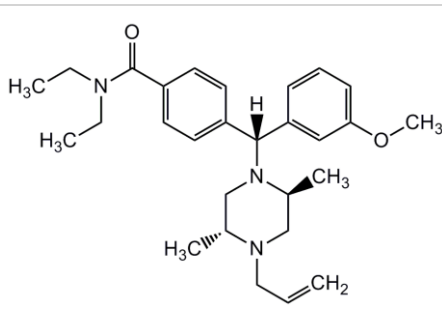
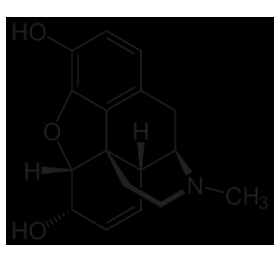
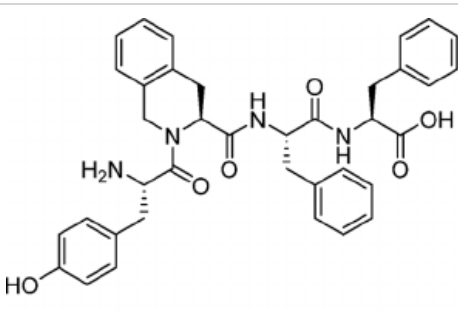
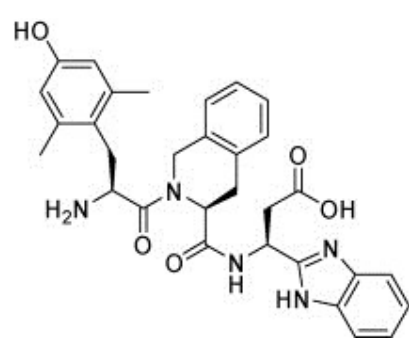
	Sélectivité pour le DOPr	
	Moins sélectif	Très sélectif
Agoniste complet	 <p style="text-align: center;">DUFDE</p>	 <p style="text-align: center;">SNC-80</p>
Agoniste partiel	 <p style="text-align: center;">Morphine</p>	 <p style="text-align: center;">TIPP</p>
		 <p style="text-align: center;">UFP-512</p>

Tableau 1. Structure des ligands opioïdes utilisés dans notre étude.

## 1.2 Signalisation des récepteurs opioïdes delta

Comme les autres ROs, la signalisation des DOPrs se fait via l'activation des protéines G hétérotrimériques. Les premières observations ont démontré que les opioïdes réduisent la production d'AMPc, un effet sensible à la toxine pertussique (PTX), qui inhibe spécifiquement les protéines de la famille  $G_{\alpha i/o}$ , suggérant ces dernières comme transducteurs de l'activation

des ROs [95,96]. La PTX catalyse l'ADP-ribosylation des protéines Gi/o ce qui empêche les protéines G d'interagir avec les RCPG sur la membrane cellulaire, interférant ainsi avec la communication intracellulaire. Les sous-unités Gi restent bloquées dans leur état inactif lié au GDP, donc incapables d'inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, conduisant à des concentrations cellulaires accrues d'AMPc [97]. Depuis, le répertoire des signaux médiés par les opioïdes n'a cessé de croître, d'abord avec la découverte que les dimères  $\beta\gamma$  de la protéine G peuvent moduler les enzymes membranaires comme l'AC, la phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) et les canaux ioniques tels que Ca<sub>v</sub>2 (canaux calciques voltage-dépendants) et Kir3 (canaux potassiques à rectification entrante de type 3) et plus récemment avec la découverte que les DOPr engagent également des cascades de signalisation médiées par les kinases de la famille MAPK (Protéine kinase activée par des mitogènes) [47]. Tous ces effecteurs seront détaillés un par un dans les prochaines sections.

### 1.2.1 Activation du récepteur

La structure cristalline du MOPr à l'état actif a été tout récemment résolue en utilisant un agoniste de haute affinité et un fragment d'anticorps de camélidé mimant la protéine G [98]. La comparaison de cette structure avec les structures à l'état inactif du MOPr [99] et du DOPr [42,100], ainsi que les structures à l'état inactif et actif du récepteur  $\beta$ 2AR (récepteur  $\beta$ -adrénergique de type 2) [101,102], muscarinique M2 (M2R) [103,104], et de la rhodopsine [105], a identifié des mécanismes d'activation partagés des RCPG. En effet, les changements conformationnels à la surface cytoplasmique des MOPr,  $\beta$ 2AR, M2R et la rhodopsine activés incluent un grand mouvement vers l'extérieur de TM6 et un mouvement vers l'intérieur plus faible de TM5 et TM7. Au niveau de la poche de liaison, la différence structurale entre l'état actif et inactif est relativement subtile pour le MOPr. L'activation des  $\beta$ 2AR et M2R implique des interactions polaires spécifiques entre le récepteur et les agonistes avec un mouvement vers l'intérieur de 2 Å de TM5 pour le  $\beta$ 2AR et un mouvement vers l'intérieur de 2 Å de TM6 pour le M2R. Malgré ces petites différences, les changements structurels globaux observés à l'interface récepteur/protéine G sont très similaires [98]. Les mécanismes par lesquels ces changements se propagent vers la surface cytoplasmique sont similaires entre le MOPr et le  $\beta$ 2AR : il y a un réarrangement d'une triade d'acides aminés conservés (phénylalanine, proline



et isoleucine) appelée la triade du noyau conservée qui se trouve juste en dessous de la poche de liaison. Ce réarrangement est associé à une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (vue de la surface extracellulaire) et à un mouvement vers l'extérieur de l'extrémité cytoplasmique de TM6. En plus du réarrangement de la triade du noyau conservée, la comparaison des structures inactives et actives de ces récepteurs révèle un vaste réseau d'interactions polaires entre la poche de liaison orthostérique et l'interface de couplage à la protéine G qui se réorganise lors de son activation. Les changements conformationnels dans TM5 et TM6, qui sont nécessaires pour l'engagement complet de la protéine G, dépendent presque complètement de la présence de l'agoniste et du nanocorps qui mime la protéine G, révélant un faible couplage allostérique entre la poche de liaison et l'interface de couplage à la protéine G (TM5 et TM6) [106]. En présence d'agoniste seul, les changements conformationnels d'IL1 et H8 sont plus importants que ceux de TM5 et TM6. Ces résultats suggèrent qu'au moins un de ces domaines joue un rôle dans l'interaction initiale avec la protéine G, et que TM5 et TM6 ne sont engagés que plus tard dans le processus de formation du complexe. Les interactions initiales entre la protéine G et l'IL1 et/ou H8 peuvent être impliquées dans la spécificité de couplage de la protéine G, comme cela a été suggéré pour d'autres RCPG [106]. En d'autres termes, ces observations supportent un modèle où la protéine G pourrait initialement interagir avec les domaines H8 et/ou IL1 du récepteur avant de se connecter aux domaines transmembranaires et de stabiliser les domaines TM5 et TM6 dans une conformation ouverte [106] (figure 4).

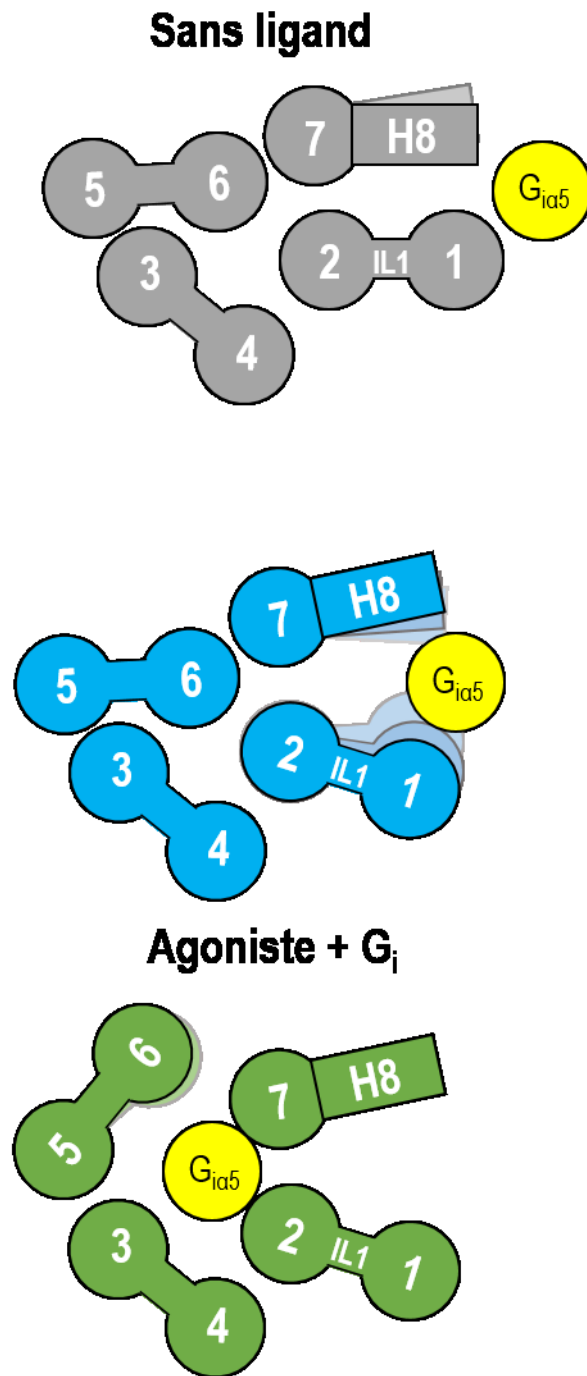


Figure 4: Modèle d'interaction protéine G-MOPr.

Modèle proposant la propagation des changements conformationnels de la poche de liaison aux domaines IL1 et H8 initiant des interactions avec la protéine G<sub>i</sub> (cercle jaune) suivie de l'interaction avec TM5 et TM6. Les cercles numérotés représentent l'identité et la position des domaines TM vus du côté intracellulaire de la membrane (image modifiée de [98]).

Pour le DOPr, une étude plus ancienne de mutagenèse utilisant des récepteurs mutés constitutivement actifs a proposé une activation du récepteur par le ligand comme suit : l'agoniste opioïde se lie à la partie hydrophobe de l'EL3 et éventuellement dans la région N-terminale, déstabilisant ainsi les interactions de TM6 et TM7 près du côté extracellulaire du récepteur. Le ligand pénètre ensuite dans la poche de liaison et perturbe les interactions hydrophobes et hydrophiles au sein des hélices 3, 6 et 7. Il en résulte des mouvements de ces hélices et la propagation ultérieure de ces mouvements dans le récepteur. Ce mouvement aboutit finalement à une rupture des liaisons cytoplasmiques ioniques et éventuellement l'exposition des domaines intracellulaires des récepteurs aux protéines G et d'autres protéines effectrices [107].

### 1.2.2 Transduction du signal

Les protéines G sont les transducteurs moléculaires qui activent les cascades de signalisation intracellulaires en réponse à l'activation des RCPG par des stimuli extracellulaires. Les protéines G sont hétérotrimériques composées d'une des 23 isoformes de la sous-unité  $\alpha$ , une des 7 isoformes de la sous-unité  $\beta$  et une des 12 isoformes de la sous-unité  $\gamma$  (quand les variantes d'épissage et les modifications post-traductionnelles sont prises en compte). Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  forment un dimère qui ne se dissocie pas dans les conditions physiologiques, mais il demeure controversé si l'activation de la sous-unité  $\alpha$  crée ou non une dissociation complète avec le dimère  $\beta\gamma$  [108]. Les isoformes  $G\alpha$  (45kDa) peuvent être séparées en quatre sous-familles :  $G_i/o$  (inhibition de l'AC),  $G_s$  (activation de l'AC),  $G_q$  (activation de PLC $\beta$ ) et  $G_{12/13}$  (activation de la protéine RhoGEF; de l'anglais guanine nucleotide exchange factor for Rho/Rac/Cdc42-like GTPase). Les quatre premières isoformes  $G\beta$  découvertes,  $G\beta_{1-4}$ , sont des protéines de 36 kDa hautement homologues (80-90% de similarité),  $G\beta_5$ , une protéine de 40 kDa, est identique à seulement 50% aux quatre premières isoformes  $G\beta$ . Toutes les 12 isoformes  $G\gamma$  ont une taille comprise entre 7 et 8,5 kDa, mais sont beaucoup plus divergentes que les isoformes  $G\beta$ . Puisque  $G\beta$  et  $G\gamma$  sont censées former un dimère fonctionnel *in vivo*, l'hétérogénéité de  $G\beta\gamma$  définie comme le produit des gènes  $G\beta$  et  $G\gamma$  est plus grande que  $G\alpha$  même si toutes les combinaisons  $G\beta\gamma$  possibles ne peuvent se former. Les modifications post-traductionnelles contribuent également à la diversité structurale de ces protéines [108].

Le dimère  $G\beta\gamma$  active différents effecteurs y compris les canaux ioniques, l'AC, les PLC et des composantes de la cascade des MAPK. L'architecture générale de la sous-unité  $G\alpha$  est constituée d'un domaine GTPase (enzyme hydrolysant le GTP) qui est homologue aux protéines G monomériques liant le GTP (telles que les protéines Ras), et d'un domaine hélicoïdal qui ne se trouve que dans les sous-unités  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques et est responsable de la rétention des nucléotides GDP (guanosine diphosphate) et GTP (guanosine triphosphate) à l'intérieur du noyau de la protéine. Elle oscille entre une conformation inactive liée au GDP et une conformation active liée au GTP qui peut moduler l'activité des protéines effectrices. La sous-unité  $G\beta$  présente une structure en feuillet  $\beta$  et interagit en N-terminal avec la sous-unité  $G\gamma$  grâce à un faisceau d'hélices. Le dimère  $G\beta\gamma$  lie une poche hydrophobe présente sur la sous-unité  $G\alpha$  non activée liée au GDP. L'activation de  $G\alpha$  par le GTP fait disparaître cette poche hydrophobe et réduit l'affinité de cette dernière pour  $G\beta\gamma$ . En effet, basé sur les structures cristallines, et prédit à partir d'expériences biochimiques antérieures, le modèle d'activation de la protéine G affirme que le récepteur activé catalyse l'échange de GDP pour le GTP sur la sous-unité  $\alpha$ , induisant un changement conformationnel qui réduit sensiblement l'affinité de la protéine  $G\alpha$  pour  $G\beta\gamma$  résultant en leur dissociation [109]. Le site de liaison nucléotidique au sein de la protéine G est situé entre les deux domaines GTPasique et hélicoïdal de la protéine  $G\alpha$ . La majorité des contacts impliqués dans cette liaison au GDP est fournie par le domaine GTPasique. Il est composé d'un feuillet  $\beta$  à six brins ( $\beta 1$ - $\beta 6$ ) et cinq hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ). Plusieurs boucles de ce domaine jouent un rôle important dans la liaison aux nucléotides. En particulier, la boucle  $\beta 1$ - $\alpha 1$  qui relie le brin  $\beta 1$  et l'hélice  $\alpha 1$  coordonne les phosphates nucléotidiques avec l'hélice  $\alpha 1$  adjacente, tandis que les boucles  $\beta 5$ - $\alpha 4$  et  $\beta 6$ - $\alpha 5$  engagent l'anneau de guanine du GDP. Une autre partie de la poche de liaison aux nucléotides est formée par le domaine hélicoïdal de la protéine  $G\alpha$  qui contient six hélices  $\alpha$  ( $\alpha A$ - $\alpha F$ ) insérées entre l'hélice  $\alpha 1$  et le brin  $\beta 2$  du domaine GTPasique. En s'appuyant contre le domaine GTPasique, le domaine hélicoïdal fonce les nucléotides liés dans l'interface entre les deux domaines. L'apposition étroite des deux domaines, en premier observée dans la structure cristalline de la sous-unité  $G\alpha$  de la transducine (*Gat*), a conduit à l'hypothèse que le couplage de la protéine G aux récepteurs peut entraîner une séparation des deux domaines suivie d'une dissociation du GDP [110]. Cela a été confirmé plus tard par la structure cristalline du récepteur  $\beta 2AR$  en complexe avec la protéine  $G\alpha s$  qui montre un grand déplacement du domaine hélicoïdal par rapport au domaine GTPasique

lors de la libération des nucléotides [111]. En outre, plusieurs méthodes de mutagenèse, biochimiques et biophysiques (comme la spectroscopie à double résonance, les mesures de l'échange hydrogène/deutérium) sur plusieurs isoformes des protéines G ont fourni la preuve que la séparation des domaines est d'une importance générale pour la libération des nucléotides dans toutes les protéines G hétérotrimériques. Le domaine hélicoïdal délocalisé est très dynamique et adopte des conformations variables par rapport au domaine GTPasique [112]. La libération de nucléotides est aussi déclenchée par d'autres changements conformationnels induits par des connexions allostériques au niveau de l'interface récepteur-protéine G comme celles médiées par l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha 5$  du domaine hélicoïdal avec les domaines transmembranaires 3, 5 et 6 et les boucles intracellulaires 2 et 3. L'hélice  $\alpha 1$  et la région charnière  $\alpha N$ - $\beta 1$  y jouent aussi un grand rôle [112].

Leurs sous-unités libres de la protéine G activent leurs voies de signalisations respectives via différents effecteurs, jusqu'à ce que l'hydrolyse du GTP par  $G\alpha$  (avec les protéines RGS : régulateurs de signalisation des protéines G) permette à ces sous-unités de se réassocier, désactivant effectivement la protéine G jusqu'à une autre interaction avec le récepteur activé [108] (figure 5).

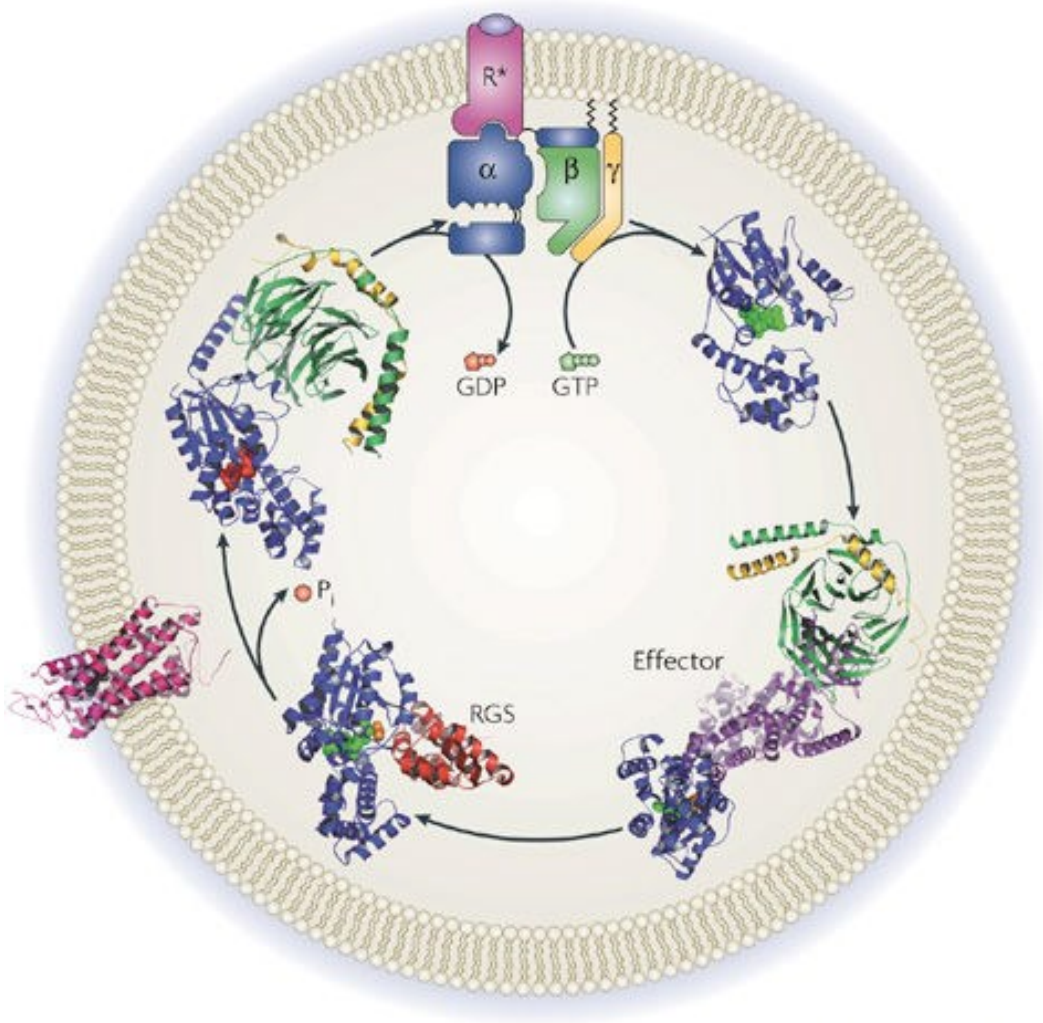


Figure 5. Le cycle de la protéine G.

À l'état inactif, les protéines G sont des hétérotrimères de sous-unités  $\alpha$  (bleu) liées au GDP,  $\beta$  (verte) et  $\gamma$  (jaune). Lors de la liaison d'un agoniste (violet clair), les récepteurs (rose) subissent un changement conformationnel qui se propage vers  $G\alpha$ . Cette protéine hélicoïdale se rabat et permet l'échange du GDP par le GTP. Cet échange déstabilise le complexe récepteur activé  $R^*$ -protéine G, permettant aux deux sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  séparées d'interagir avec les protéines effectrices en aval. Le signal se termine par l'hydrolyse du GTP en GDP par  $G\alpha$ , qui peut être catalysée par le RGS (rouge foncé) [113].

### 1.2.3 Les effecteurs du récepteur opioïde delta

Les protéines G activent ou inhibent différents effecteurs intracellulaires qui peuvent être dans le cas du DOPr des canaux ioniques (ex : Ca<sub>v</sub>2 et Kir3), des enzymes membranaires (ex : AC, phospholipases) ainsi que certaines cascades de kinases (ex : celles appartenant à la famille MAPK).

#### 1.2.3.1 L'adénylate cyclase

L'AC est l'enzyme qui synthétise l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). L'AMPc fonctionne comme un second messenger pour relayer les signaux extracellulaires aux effecteurs intracellulaires. C'est un composant clé des voies de signalisation intracellulaires procaryotes et eucaryotes. Chez les eucaryotes, l'AMPc induit des réponses physiologiques allant de la croissance, la différenciation et l'expression des gènes à la sécrétion et la neurotransmission. Récemment, on a démontré leur importance dans les processus d'apprentissage et de mémoire, d'addiction aux drogues, de longévité et ceux cardiovasculaires. Il active principalement la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA), qui régule par phosphorylation l'activité de nombreuses enzymes, kinases secondaires, facteurs de transcription, récepteurs et canaux [114]. L'AMPc active également les facteurs d'échange des protéines G monomériques nommés protéines EPAC [115,116], active les canaux dépendants des nucléotides cycliques et régule l'activité de certaines phosphodiésterases cycliques spécifiques du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) [117]. Dans les bactéries, l'AMPc se lie directement aux facteurs de transcription et est responsable de la répression des gènes impliqués dans le métabolisme, servant également de mécanisme de rétroaction [118].

Chez les mammifères, 10 gènes ont été clonés qui codent pour les AC membranaires (AC1 à AC9) ou pour une forme soluble de l'AC (sAC). Les isoformes de l'AC chez les mammifères présentent une identité de séquence de 50 à 90%. Les 9 formes membranaires, partageant environ 60% d'homologie, sont composées de 6 segments transmembranaires suivis d'une grande boucle cytoplasmique répétés en tandem, donnant un total de 12 segments transmembranaires et 2 domaines cytoplasmiques (C1 et C2) (figure 6). La structure cristalline aux rayons X des domaines cytoplasmiques a fourni des détails atomiques du site actif et du

mécanisme de catalyse [119]. Le noyau catalytique de l'AC des mammifères est composé d'un hétérodimère des domaines C1 et C2, qui sont reliés entre eux par une pseudo-symétrie double. En particulier, le site actif de la catalyse, où les nucléotides se lient, est situé à l'interface des domaines, mais est pseudo-symétrique par rapport au site de liaison de la forskoline (un diterpène qui augmente la quantité d'AMPc dans les cellules en stimulant l'AC). Deux résidus d'acide aspartique dans le site actif supportent la liaison de l'ATP par la coordination de deux ions magnésium. Les AC utilisent des cations divalents (par exemple,  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ ) pour déprotoner le groupement hydroxyle du cycle ribose de l'ATP [119]. Cette étape clé est nécessaire pour l'attaque nucléophile subséquente du phosphate par l'oxyanion nouvellement formé. Les produits finaux sont l'AMPc et le pyrophosphate (PPi). La protéine G $\alpha$ s se lie sur un site partagé entre les domaines C1 et C2, tandis que la forskoline se lie à une poche hydrophobe à l'interface des deux domaines. Bien que le rôle fonctionnel des domaines membranaires des AC reste controversé, il a été suggéré qu'ils peuvent se dimériser à travers ces domaines [120]. L'activation de toutes les isoformes de l'AC par G $\alpha$ s est terminée par l'hydrolyse du GTP en GDP.

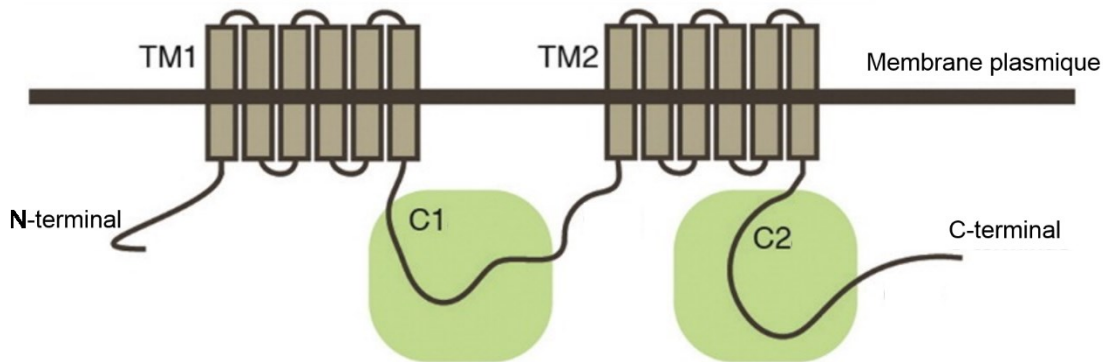


Figure 6. Domaines structuraux des AC membranaires.

Les neuf AC membranaires comprennent un domaine N-terminal intracellulaire, deux domaines TM1 et TM2 (six TM chacune) liés par le domaine cytoplasmique C1 et une extrémité C-terminale intracellulaire contenant le domaine C2. Le domaine catalytique hautement conservé est formé suite à l'association des domaines C1 et C2 (en vert) (image modifiée de [121]).



Chez les eucaryotes supérieurs, on pense que les protéines G, la calmoduline (CaM), les protéines kinases et les ions bicarbonate sont les modulateurs natifs de l'activité de l'AC [122-125]. En effet, les protéines  $G_{\alpha_{i1,2,3}}$ ,  $G_{\alpha o}$  et  $G_{\alpha z}$  (appartenant aussi à la sous famille des protéines Gi/o) inhibent l'activité de l'AC dépendamment de l'isoforme. La  $G_{\alpha i}$  inhibe l'AC5 et AC6, les  $G_{\alpha o}$  inhibent l'AC1. La protéine  $G_{\alpha z}$  inhibe également l'activité de l'AC sans être affectée par la PTX. La protéine  $G_{\beta\gamma}$  peut stimuler l'activité de l'AC2, AC4 et AC7, bien qu'elle dépende de la coactivation par  $G_{\alpha s}$ . La protéine  $G_{\beta\gamma}$  interagit avec le domaine C1 de l'AC2 pour la stimuler [126]. Au contraire, elle a l'effet opposé sur l'AC1, AC3 et AC8, provoquant une réduction de l'accumulation d'AMPc. Il a été aussi démontré que la protéine  $G_{\beta\gamma}$  inhibe l'AC5 et AC6 dans des expériences de culture cellulaire [127], mais pas dans des expériences *in vitro* [128]. Ces résultats opposés peuvent résulter des effets de  $G_{\beta\gamma}$  sur d'autres molécules de signalisation, et devront être mieux compris dans des recherches futures. Les protéines RGS ont également été impliquées dans la régulation directe des AC. RGS2 diminue l'accumulation d'AMPc [129] et se lie au domaine C1 de l'AC5 [130]. De plus, les expériences de transfert d'énergie par résonance de bioluminescence (BRET) suggèrent que RGS2 peut interagir directement avec l'AC2 et AC6 [131]. La CaM est un activateur puissant de plusieurs isoformes de l'AC de mammifères comme l'AC1 [132], AC8 [133] et AC3 [134]. La CaM inhibe l'AC1 et AC3 indirectement par l'activité de la protéine kinase dépendante de la CaM (CaMK) de type II et IV. La phosphorylation de l'AC1 et AC3 par les CaMK inhibe la cyclase en bloquant la liaison des activateurs. La modification post-traductionnelle des AC par phosphorylation, qui peut être provoquée par la PKA ou la protéine kinase dépendante du  $Ca^{2+}$  (PKC), est généralement inhibitrice. La PKA supporte un mécanisme de rétroaction négative où l'augmentation de production d'AMPc induit l'activation de PKA qui va à son tour phosphoryler et inhiber l'AC. Le niveau de  $Ca^{2+}$  cellulaire peut également réguler l'activité de l'AC directement, car toutes les isoformes sont inhibées par des concentrations élevées de calcium [135]. La fonction de l'AC peut également être affectée par le stress cellulaire [136], ainsi que par des petites molécules exogènes telles que la forskoline, un diterpène activateur de l'AC [137]. Bien que de multiples isoformes de l'AC puissent être exprimées dans une seule cellule, elles sont souvent sélectivement régulées par des facteurs spécifiques et organisées par compartimentalisation [138].

Il est reconnu depuis longtemps que le DOPr module la production d'AMPc en engageant différents sous-types des protéines *Gai/o* sensibles à la PTX [37]. Dans les lignées cellulaires immortalisées exprimant le DOPr endogène ou recombinant, la protéine *Gai2* a été fréquemment associée à l'inhibition de l'AMPc, bien que des sous-types supplémentaires soient également impliqués dans cette réponse [47]. Par exemple, les DOPrs exprimés dans les cellules CHO (cellules ovariennes de hamster chinois), les cellules COS (cellules de rein de singe vert africain) [139,140] et les cellules HEK293 (Cellules embryonnaires de rein humain 293) [141] activent *Gaz* et modulent l'activité de l'AC d'une manière insensible à PTX. Dans les cellules COS et CHO, l'inhibition de l'AC par les agonistes du DOPr n'était évidente que lorsque ces récepteurs étaient co-exprimés avec le MOPr [140], cependant, dans les cellules HEK293, les DOPrs exprimés seuls étaient capables à la fois d'inhiber [141,142] ou stimuler la production d'AMPc via *Gaz* [143,142]. La raison pour laquelle certaines cellules, mais pas d'autres permettent au DOPr d'activer *Gaz* en l'absence du MOPr n'est pas évidente. *Gaz* a un taux d'hydrolyse GTP très lent [144], qui peut être sélectivement accéléré par les protéines RGS de type Z1 [145], réduisant fortement l'inhibition de la production d'AMPc par *Gaz* [146]. Des différences dans la concentration des protéines RGS entre les différentes cellules peuvent expliquer pourquoi l'inhibition de la production d'AMPc a été observée dans les cellules HEK293, mais pas dans les cellules CHO ou COS. Cependant, si c'est effectivement le cas, l'activation de *Gaz* par le dimère MOPr-DOPr impliquerait que l'hétéromère est capable d'inactiver les protéines RGS [47].

L'activation aiguë du DOPr dans le cerveau peut également produire une modulation positive ou négative des niveaux d'AMPc. Ainsi, bien que l'activation du DOPr au niveau du striatum inhibe la production d'AMPc, la stimulation de ceux présents dans les bulbes olfactifs [147], le cortex préfrontal médian [148] et les cultures primaires de neurones hippocampiques [149] potentialisent la production d'AMPc. Ce modèle distinct de modulation de l'AMPc par le DOPr est étroitement corrélé avec l'expression spécifique des différentes isoformes de l'AC qui sont distinctement modulées par *Gai/o* et  $G\beta\gamma$  [47].

La signalisation du DOPr par l'AMPc peut également contribuer aux effets analgésiques des opioïdes, mais le mécanisme par lequel ces signaux peuvent influencer la nociception reste à élucider. En effet, il a été démontré que l'analgésie est réduite chez les souris qui n'expriment

pas l'AC5 [150] et augmentée chez celles surexprimant l'AC7 [151], ce qui plaide en faveur d'une implication de l'AC dans l'effet analgésique des opioïdes. Cependant, l'effet analgésique aigu de la morphine n'a pas été affecté chez les souris qui n'expriment pas l'AC1 et l'AC8 [152]. L'échec des inhibiteurs de la PKA à modifier l'analgésie morphinique aiguë confirme également que les effecteurs de l'AMPc sont minimalement impliqués dans les réponses analgésiques aiguës aux opioïdes [153], tout comme l'observation que les inhibiteurs de la phosphodiesterase ne modifient pas l'analgésie engendrée par l'administration intracérébroventriculaire ou intrathécale du DPDPE [154]. D'autre part, la signalisation via l'AC a été impliquée dans les adaptations cellulaires qui résultent d'une stimulation chronique du DOPr et peut contribuer à la tolérance analgésique.

#### 1.2.3.2 Les phospholipases

Ce sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons ester des phospholipides membranaires. Elles sont au nombre de cinq selon leur site d'action sur la molécule : A1, A2, B, C et D. Les phospholipases A1 et A2 libèrent respectivement les acides gras qui estérifient les fonctions alcool primaire et secondaire du glycérol. La phospholipase B effectue une combinaison des deux activités enzymatiques précédentes. La phospholipase C ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le groupement phosphate. Enfin la phospholipase D (D1 et D2) libère la choline en générant un acide phosphatidique (figure 7). On s'intéressera uniquement aux PL activées par le DOPr à savoir la phospholipase A2 (PLA2), la phospholipase C de type  $\beta$  (PLC $\beta$ ) et la phospholipase D2 (PLD2).

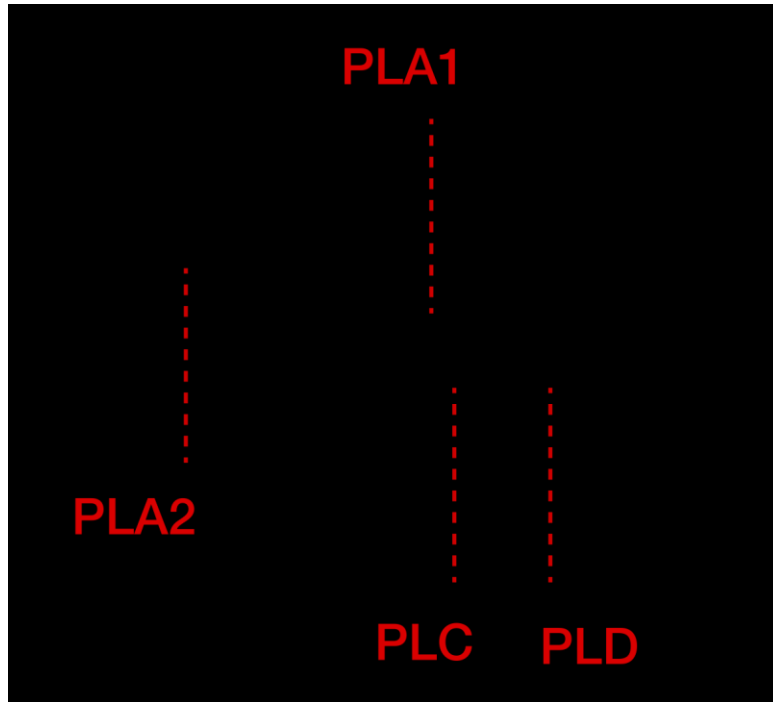


Figure 7: Site de clivage des phospholipases

Une enzyme qui effectue à la fois les activités de PLA1 et PLA2 est appelée phospholipase B.

La PLA2 cytoplasmique est activée après sa phosphorylation par les kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK) et PKC, tandis que le  $\text{Ca}^{2+}$  assure sa translocation vers la membrane. À ce niveau, la PLA2 induit la production d'acide arachidonique (AA) qui est ensuite converti en eicosanoïdes actifs par l'action des cyclooxygénases, des lipoxygénases et de l'époxygénase/cytochrome P450 [155-157]. Dans les cellules CHO, la PKC et ERK contribuent à la stimulation de la PLA2 par le DOPr [158]. Le type d'eicosanoïdes produits en aval de l'AA par les agonistes du DOPr n'était pas caractérisé dans les cellules CHO. Cependant, dans les interneurons GABAergiques du noyau raphé Magnus (NRM), l'AA produit par l'activation du DOPr a été métabolisé en acide hydroperoxyeicosatétraénoïque (HPETE) par la 12-lipoxygénase [159]. Les HPETE produits de cette manière étaient impliqués dans l'inhibition présynaptique de la libération de GABA (Acide- $\gamma$ -amino-butyrique) et dans les effets analgésiques des agonistes du DOPr perfusés dans le NRM des animaux préexposés à la morphine [61,159].

En ce qui concerne la famille des PLC $\beta$ , la PLC $\beta$ 1 est régulée par la protéine G $\alpha$ , alors que les sous-unités G $\beta\gamma$  libérées par les protéines hétérotrimériques contenant les G $\alpha$ i/o modulent la PLC $\beta$ 2 et PLC $\beta$ 3 [160]. Toutes les isoformes de la PLC peuvent être engagées par le DOPr pour métaboliser le phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3), mais la voie la plus fréquemment engagée par ces récepteurs est dépendante de la protéine G $\beta\gamma$ . La production d'IP3 par les agonistes du DOPr favorise la libération du Ca<sup>2+</sup> et entraîne une stimulation de la PKC [161-163]. Les conséquences de la signalisation du DOPr via G $\beta\gamma$  incluent des réponses physiologiques comme la modulation de la dynamique de l'humeur aqueuse, le contrôle de la pression intraoculaire [164], la contraction musculaire lisse viscérale [165] et la modulation spinale et supraspinale de la nociception [166-168]. Bien que le DOPr stimule complètement l'activité de la PLC $\beta$  et la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> dans les cellules musculaires lisses [165], les cellules NG108-15 [161] et les cellules CHO [162], la signalisation du DOPr via cette voie n'est pas aussi efficace dans d'autres cellules comme SH-SY5Y et COS-7, nécessitant une coactivation de G $\alpha$ q [162] ou G $\alpha$ 16 [169] pour produire une réponse PLC $\beta$  mesurable. Puisque la sensibilité des trois isoenzymes de la PLC $\beta$  à la protéine G $\beta\gamma$  n'est pas la même (PLC $\beta$ 3 > PLC $\beta$ 2 >>> PLC $\beta$ 1 [160]), ces différences cellulaires dans la capacité du récepteur à activer la PLC $\beta$  ont été attribuées à la présence de différentes isoformes dans les différentes cellules [162]. Cette hypothèse est supportée par le fait que dans le muscle lisse gastro-intestinal où le DOPr induit une signalisation PLC $\beta$ /Ca<sup>2+</sup> indépendante des autres stimuli, la réponse est médiée par PLC $\beta$ 3 [170,171,165].

La PLD est une diesterase spécifique des phospholipides qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique (AP) et en choline. Parmi les deux isoformes mammifères connues, la PLD2 est celle qui est exclusivement présente sur la membrane où elle est activée à la fois par le DOPr et le MOPr [172]. Les deux récepteurs activent la PLD2 en stimulant des petites protéines G de la famille du facteur de ribosylation de l'ADP (ARF) [173,174], bien que le mécanisme de cette activation reste à élucider complètement. Les études réalisées sur le MOPr indiquent une interaction directe entre le récepteur et la lipase qui s'associe également à ARF [175]. Cette organisation supramoléculaire a suggéré la possibilité que les réarrangements conformationnels déclenchés par l'activation du récepteur puissent conduire à une stimulation en aval de la PLD2 [175]. Le fait qu'ARF active la PLD2 en se liant

au motif NPXXY d'autres RCPG et non via l'activation de sous-unités hétérotrimériques appuie ce raisonnement [176]. Il n'a pas été démontré si le DOPr forme un complexe similaire avec la PLD2 et ARF1-6, mais un mécanisme d'activation similaire à celui du MOPr semble raisonnable compte tenu de la grande conservation du motif NPXXY parmi ces récepteurs. L'AP libéré par la PLD2 est converti en DAG, qui stimule la p38 (une kinase appartenant à la famille des MAPK, voir section 1.2.3.4). La p38 activée phosphoryle les effecteurs de la Rab5 [177], qui régulent la formation, le trafic et la fusion des vésicules recouvertes de clathrine aux endosomes précoces [178], expliquant pourquoi l'inhibition de la PLD2 interfère avec l'internalisation du DOPr et du MOPr [174].

### 1.2.3.3 Les canaux ioniques

#### 1.2.3.3.1 Les canaux potassiques à rectification entrante de la famille Kir3

Les canaux Kir3 constituent un sous-ensemble spécifique des canaux ioniques sélectifs au potassium ( $K^+$ ). Ils sont activés via une cascade de transduction du signal par les RCPG stimulés par un ligand. Cette activation se fait par la protéine  $G\beta\gamma$  qui se lie aux extrémités N et C-terminales du canal ce qui entraîne leur ouverture et l'entrée de  $K^+$  induisant l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire. Ces mécanismes de transduction sont utilisés par différents récepteurs, y compris les récepteurs de la somatostatine et de la 5-hydroxytryptamine-1, le récepteur  $\beta$ 2AR, le MOPr, le DOPr, les récepteurs dopaminergiques D2, les récepteurs glutaminergiques et gabaergiques dans les neurones et les cellules sécrétant des hormones ainsi que dans les cellules musculaires lisses. Ils jouent un rôle clé dans la maintenance du potentiel membranaire de repos et dans la régulation de la durée du potentiel d'action dans des cellules électriquement excitables telles que les cellules musculaires cardiaques [179].

Les techniques de clonage moléculaire ont identifié quatre sous-unités du canal chez les mammifères (Kir3.1, Kir3.2, Kir3.3 et Kir3.4). Diverses combinaisons (monomériques ou hétéromériques) de sous-unités forment différents canaux Kir3. Leurs activités et fonctions sont précisément réglées par leur localisation, leurs interactions protéine-protéine et une variété de petites substances. Les canaux fonctionnels sont des assemblages tétramériques de sous-unités de la famille Kir3. Le seul homotétramère fonctionnel est celui formé par 4 sous-unités Kir3.2.

Kir3.2 peut également former un canal hétérotétramérique avec les 3 autres sous-unités [179]. L'hétérotétramère le plus abondant au niveau du cerveau est celui formé par Kir3.1/Kir3.2 [180]. De point de vue structure, les canaux Kir3 possèdent un motif commun formé par deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2) liés par une région extracellulaire (H5) formant le pore de sélectivité ionique et deux domaines amino (N) et carboxy (C)-terminaux (figure 8). La structure cristallographique aux rayons X démontre que les extrémités N et C-terminales sont cytoplasmiques et associées les unes avec les autres pour former un domaine cytoplasmique qui est lié au domaine transmembranaire. Le domaine transmembranaire est principalement responsable de la perméabilité ionique alors que le domaine cytoplasmique est censé agir comme un régulateur d'activation.

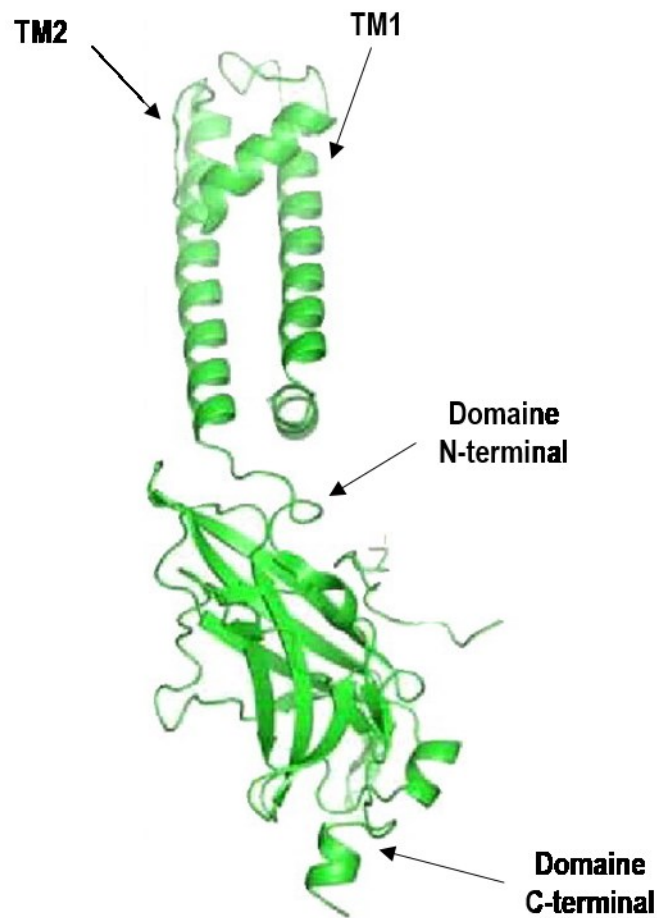


Figure 8. Structure d'une sous unité du canal Kir.

L'architecture moléculaire d'une sous unité du canal Kir démontre qu'elle est divisée en domaines transmembranaires et cytoplasmiques (domaines N et C terminaux) (image modifiée de [179]).

L'ouverture des canaux par  $G\beta\gamma$  qui se lie au domaine cytoplasmique induit un changement de conformation qui est transmis à la région inférieure du domaine TM2 résultant en l'ouverture du canal [181]. Outre leur activation par la protéine  $G\beta\gamma$ , les canaux Kir3 sont soumis à une régulation médiée par les protéines RGS, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, l'ion sodium  $Na^+$  et les phénomènes d'acidification et d'oxydoréduction [179].

La capacité des DOPrs à activer les Kir3 a été démontrée *in vitro* [182] ainsi qu'*in vivo* [183]. Aussi, le rôle des canaux Kir3 dans l'analgésie opioïde a été clairement établi en utilisant des souris invalidées génétiquement pour différentes sous-unités du canal [184,185]. De plus, la



contribution de Kir3 à la réponse clinique des analgésiques opioïdes a été confirmée par des études d'association montrant que les variations génétiques des différentes sous-unités Kir3 influencent les doses d'opioïdes pour la gestion de la douleur [186,187]. Pour les DOPr en particulier, la contribution de Kir3 à l'analgésie périphérique [188] et spinale [184] a été clairement documentée dans les modèles précliniques. De plus, l'analyse par immunohistochimie a révélé que les sous-unités Kir3.1 et Kir3.2 étaient présentes dans les afférences non peptidiques [188] qui expriment également le DOPr [52]. La distribution postsynaptique des sous-unités Kir3.1/3.2 dans la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière [184] est similaire à l'expression du DOPr, telle que visualisée par autoradiographie [189] et dans les souris exprimant le DOPr-GFP [64]. Conformément à cette distribution, l'analgésie par administration intrathécale de la deltorphine II (un agoniste du DOPr) a été réduite chez les souris traitées à la tertiapine Q (bloqueur du Kir3) et chez les souris dépourvues des sous-unités Kir3.1 ou Kir3.2 [184]. Les DOPr modulent également les Kir3 dans les sites de régulation nociceptive supraspinale [190].

#### 1.2.3.3.2 Les canaux calciques voltage-dépendants

Les  $Ca_v$  sont des transducteurs clés des changements transitoires du potentiel membranaire qui déclenchent de nombreux événements physiologiques. Chez les mammifères, il existe 3 sous-familles des canaux  $Ca_v$  qui jouent des rôles distincts dans la transduction du signal cellulaire. La sous-famille  $Ca_v1$  initie la contraction, la sécrétion, la régulation de l'expression génique, l'intégration de la stimulation synaptique dans les neurones et la transmission synaptique dans les cellules sensorielles spécialisées. La sous-famille  $Ca_v2$  est principalement responsable de l'initiation de la transmission synaptique au niveau des synapses rapides. La sous-famille  $Ca_v3$  est importante pour le déclenchement répétitif des potentiels d'action dans des cellules qui présentent une activité rythmique comme les cardiomyocytes et les neurones thalamiques [191]. Sur la base de propriétés électrophysiologiques, les  $Ca_v$  peuvent être subdivisés en deux classes : (1) les canaux à « bas seuil d'activation » (BSA) activés par de faibles dépolarisations membranaires et (2) les canaux à « haut seuil d'activation » (HSA) activés pour de plus fortes dépolarisations membranaires. La classe des canaux BSA regroupe exclusivement les canaux de type T alors que la classe des canaux HSA comprend les canaux

de type L, P/Q, N, et R [192]. Les  $Ca_v1$  (1.1-1.4) représentent les canaux de type L, les  $Ca_v2$  (2.1-2.3) sont composées des types N, P/Q et R tandis que les  $Ca_v3$  (3.1-3.3) sont composées des canaux de type T. Chacun de ces canaux présente des propriétés biophysiques et pharmacologiques propres. Au niveau structural, les  $Ca_v$  se composent d'une sous-unité principale  $\alpha1$  déterminant le sous-type du canal calcique, responsable ses propriétés fonctionnelles et centrée autour de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\alpha2\delta$  dont les principales fonctions sont de moduler l'expression membranaire de la sous-unité  $\alpha1$ , son comportement biophysique ainsi que ses propriétés pharmacologiques. La sous-unité principale  $\alpha1$  forme le pore ionique. Elle se compose de quatre domaines (domaines I à IV) constitués chacun par six segments transmembranaires (S1 à S6). Ces quatre domaines sont reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques permettant l'interaction avec les protéines régulatrices et la modulation des seconds messagers (figure 9). Les canaux HSA sont des protéines hétéromultimériques tandis que les BSA sont composés uniquement de la sous unité  $\alpha1$  [193]. L'emphase sera mise sur la famille de  $Ca_v2$ , car c'est la seule famille modulée par la protéine G et constitue un des effecteurs de notre récepteur d'étude : le DOPr.

D'un point de vue régulateur, les canaux  $Ca_v2$  sont typiquement soumis à une modulation par l'intermédiaire du dimère  $G\beta\gamma$  qui inhibe la sous unité  $\alpha1$  du canal  $Ca_v2\alpha1$  [194]. Cette liaison augmente le seuil d'activation du canal le rendant moins sensible aux changements du potentiel membranaire [195]. Le dimère  $G\beta\gamma$  n'affecte pas de la même façon l'activité du canal. Alors que  $G\beta$  inhibe le canal,  $G\gamma$  semble plus être impliquée dans la localisation du dimère à proximité du canal. En effet, les  $G\beta1$  et  $G\beta2$  sont les sous-unités qui inhibent le plus les canaux calciques [195] tandis que la  $G\gamma2$  semble la plus efficace pour localiser le dimère près du canal [196]. La liaison de la protéine  $G\beta\gamma$  au canal se fait au niveau des régions N et C terminales cytoplasmiques de la sous unité  $\alpha1$  [197]. D'autres études ont démontré que la boucle connectant les domaines I et II de cette sous-unité y est aussi impliquée. Cette région détient la séquence QXXER retrouvée aussi au niveau des AC et des Kir [198] et constitue également la cible d'autres régulateurs des canaux  $Ca_v2$  comme la PKC qui phosphoryle ce site induisant l'ouverture du pore [199].

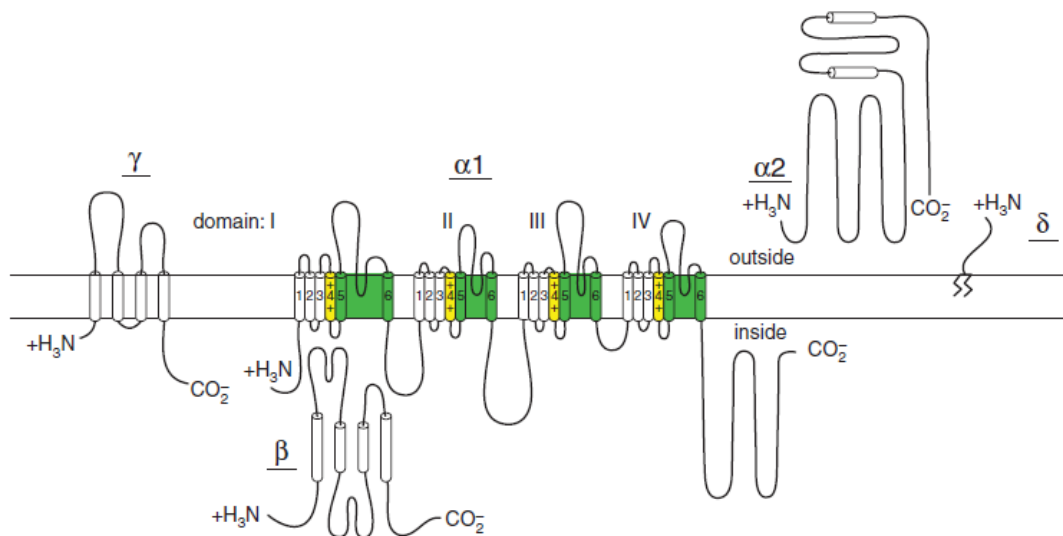


Figure 9. Structure des sous-unités du canal calcique [191].

Les hélices  $\alpha$  sont représentées comme des cylindres, la longueur des lignes correspond approximativement à la longueur des segments polypeptidiques représentés et la ligne en zigzag sur la sous-unité  $\delta$  illustre son ancrage glycoposphatidylinositol.

L'activation du DOPr exprimé de façon endogène dans le carcinome pulmonaire à petites cellules [200] et les lignées cellulaires NG108-15 [201] inhibe les HSA d'une manière indépendante de l'AMPc, mais sensible à la PTX, et l'effet a été progressivement atténué à des potentiels membranaires de plus en plus élevés [201,200]. Dans les neurones sensoriels des DRG, l'inhibition la plus importante par les agonistes du DOPr était sur les canaux de type N ( $Ca_v2.2$ ) ainsi que les canaux de type P/Q ( $Ca_v2.1$ ) [47].

#### 1.2.3.4 Les protéines kinases activées par des mitogènes

Les MAPK sont une famille de sérine/thréonine kinases qui répondent à une variété de stimuli extracellulaires (facteurs de croissance, mitogènes, stress osmotique, choc thermique et cytokines pro-inflammatoires) et régulent diverses activités cellulaires, telles que l'expression des gènes, la mitose, la croissance, la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la survie cellulaire. Elles jouent un rôle crucial dans la transduction du signal en aval des tyrosine-kinases et des protéines Ras et Raf. Les MAPK régulent les protéines du

cytosquelette, la PLA2 et plusieurs facteurs de transcription. Cette famille de kinases inclut entre autres les ERKs (1-8), les JNKs (kinase N-terminale c-Jun) et les p38 [202].

Les DOPrs sont au cœur des actions adaptatives coordonnées par le système opioïde en réponse à des stimuli stressants. En effet, en plus des actions analgésiques, anxiolytiques et antidépressives [203,204] mentionnées dans les sections précédentes, les opioïdes favorisent également la survie cellulaire [205,206], la cardioprotection [207], la neuroprotection [208], la réponse immunitaire et inflammatoire [41,209] et la cicatrisation [210]. Au niveau cellulaire, la majorité de ces réponses sont médiées par un ensemble de cascades de kinases dont l'activation a été traditionnellement associée aux récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) [211]. Plus récemment, il est devenu bien accepté que ces voies sont également engagées par les RCPG [212] et les DOPrs ne font pas exception. Dans ce qui suit, on va alors détailler comment le DOPr active les ERK, p38 et JNK et en quoi résulte cette activation.

Le DOPr active la cascade ERK1/2 dans la plupart des réponses au stress que nous venons de mentionner via le dimère  $G\beta\gamma$  qui relaie le signal à la kinase Src ou la  $PLC\beta$  [213-215]. La stimulation de la PLC induit une transactivation des RTK via un mécanisme impliquant des intégrines et  $PKC\delta$ . Les RTK activés peuvent être les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) dans les cellules HEK ou les récepteurs du facteur de croissance nerveuse de type A (TrkA) au niveau des lignées cellulaires NG108-15 [216,217]. Ces voies de signalisation médiées par ERK1/2 ont été associées à des propriétés anti-apoptotiques et de survie des cellules neuronales. Les récepteurs TrkB pour le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) sont bien connus pour participer à la réponse aux antidépresseurs [218,219], et la stimulation du DOPr par les agonistes endogènes et exogènes produit des effets antidépresseurs concomitants à la régulation positive du BDNF et de l'ARNm de son récepteur TrkB chez les patients dans différentes zones limbiques responsables de la gestion des émotions [220,221]. En dehors du système nerveux, l'activation d'ERK par le DOPr a également été décrite dans des lignées cellulaires de kératinocytes régulant les processus de cicatrisation et d'homéostasie cutanée [222].

Les DOPrs ont aussi été impliqués dans la stimulation de la cascade p38 dépendamment de la PTX [223]. Cette stimulation est associée aux effets cardioprotecteurs des agonistes du DOPr chez les jeunes souris. Les agonistes du DOPr ont également entraîné l'activation de p38 dans une lignée cellulaire de macrophages murins [224] et dans des astrocytes en culture [225].

Dans le premier cas, l'activité de p38 a réduit la production de cytokines pro-inflammatoires, et dans le deuxième cas, elle a contribué avec ERK1/2 à la régulation à la hausse des transporteurs d'acides aminés excitateurs [225]. Puisque l'élimination du glutamate de l'espace extracellulaire peut réduire l'excitotoxicité, les auteurs ont suggéré un rôle neuroprotecteur de cette cascade d'activation par les DOPr astrocytaires. Dans des cultures neuronales corticales prénatales, l'activation du DOPr était associée à une inhibition de l'activité de p38 qui produisait des dommages neuronaux menant à la mort cellulaire lors de l'hypoxie [226,206]. L'inhibition a également été observée dans les neurones des DRG cultivés [227].

Le DOPr active également la JNK dans plusieurs types cellulaires, bien que les événements de signalisation qui relaient l'information du récepteur à la MAPK diffèrent entre les milieux cellulaires. Ainsi, dans les lymphocytes T [228] où le DOPr joue un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée, l'activation de JNK implique la cascade PI3K/Akt [229,230]. Dans ces cellules, la stimulation de JNK par les agonistes du DOPr favorise la transcription des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL2, l'interféron- $\gamma$  et le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  [229,228]. Dans les cellules du neuroblastome ou les cellules COS7, ce sont plutôt les kinases de la famille Src et les petites protéines G de la famille Rho qui activent la JNK [231].

#### 1.2.4 Régulation de la signalisation médiée par le récepteur opioïde delta

L'activation des RCPG par divers agonistes induit non seulement le déclenchement de différentes voies de signalisation, mais aussi une régulation de son activité. Cette régulation permet un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur qui peuvent se manifester par certaines maladies ou même aboutir à la mort cellulaire. Ces mécanismes de régulation sont connus sous le nom de désensibilisation qui débute par la phosphorylation du récepteur, son découplage fonctionnel de la protéine G hétérotrimérique, l'internalisation du récepteur qui peut résulter en sa dégradation ou son recyclage à la membrane plasmique et finalement la régulation de l'expression des gènes qui aboutit à une adaptation de la cellule à long terme.

#### 1.2.4.1 Phosphorylation du récepteur

Elle se fait entre autres par la famille des kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), la famille des phosphorylases activées par les seconds messagers (PKC), la tyrosine-kinase Src et la kinase cycline-dépendante Cdk5.

##### 1.2.4.1.1 Phosphorylation du récepteur opioïde delta par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G

###### 1.2.4.1.1.1 Aspects généraux sur les kinases des récepteurs couplés aux protéines G

La phosphorylation du DOPr par la sérine/thréonine kinase GRK est initiée uniquement après liaison spécifique du ligand à son récepteur. Elle est donc dépendante du ligand. Les GRK phosphorylent efficacement les RCPG actifs. On parle alors de désensibilisation homologue. Sept gènes codant pour des GRK (1 à 7) ont été clonés chez l'homme. Sur la base d'une homologie de leur séquence primaire, la famille des GRK a été subdivisée en trois sous-groupes : celui de la rhodopsine kinase (GRK1 et GRK7), celui des kinases spécifiques des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (GRK2 et GRK3) et celui de la GRK4 (GRK4, GRK5 et GRK6). Ces kinases ont des distributions tissulaires très diverses. Certaines sont spécifiques d'un type cellulaire ou d'un tissu, comme GRK1 qui est spécifique des cellules photoréceptrices et qui participe à la désensibilisation de la rhodopsine photoexcitée, ou GRK4 qui est spécifique du testicule, rein, utérus et cervelet. En revanche, les autres GRK peuvent être retrouvées dans plusieurs types de tissus. L'importance des GRK est mieux illustrée dans le système visuel, où l'absence de GRK1 ou de sites de phosphorylation par GRK1 sur la rhodopsine conduit à la perte des photo-réponses, la dégénérescence des photorécepteurs et la cécité chez les souris et l'homme [232]. Dans d'autres types de cellules, les résultats ne sont pas aussi spectaculaires, sauf en développement. Les GRK sont des protéines ayant plusieurs domaines qui consistent en une région N-terminale de 25 résidus uniques à cette famille de kinases, suivie par le domaine RH (de l'anglais RGS homology domain) et le domaine catalytique KD (domaine de la protéine kinase sérine/thréonine). Cet assemblage de 500 à 520 résidus est partagé par toutes les GRK. La partie C-terminale spécifique pour chaque kinase contient des éléments structuraux responsables de leur association aux membranes. Les GRK1 et GRK7 vont être farnésylées au

niveau d'un motif CAAX. Les GRK2 et GRK3 vont quant à elles présenter un domaine d'homologie à la pleckstrine qui interagit avec les sous-unités de la protéine G ( $G\beta\gamma$ ). La GRK5 présente une séquence riche en résidus basiques lui conférant une affinité pour les phospholipides. Finalement les GRK 4 et 6 vont être palmitylées au niveau de résidus cystéines [233] (Figure 10). Dans les cellules non stimulées, les GRK 1, 2 et 3 sont localisées dans le cytosol et leur translocation à la membrane a lieu suite à l'activation du récepteur par l'agoniste. Les GRK 4, 5 et 6 présentent toutes une localisation membranaire. La palmitoylation des GRK 4 et 6 semble essentielle pour leur localisation membranaire. L'association de la GRK5 à la membrane plasmique pourrait être expliquée par une interaction électrostatique entre 46 résidus acides aminés basiques contenus dans la partie C-terminale de la kinase et les phospholipides membranaires [234]. Dans le cerveau, les isoformes GRK 2 et 3 montrent une distribution subcellulaire quelque peu différente, la GRK3 étant plus associée à la membrane que GRK2 [235] bien qu'elles se comportent de manière similaire dans les cellules HEK293. Les GRK 5 et 6 se localisent préférentiellement sur les membranes synaptiques [235]. Actuellement, il n'y a aucun mécanisme connu qui assurerait une localisation spécifique des GRK. Ces données suggèrent qu'il existe des mécanismes spécifiques au type de cellule ciblant les GRKs à différents compartiments qui doivent être étudiés dans des cellules pertinentes, tels que les neurones, *in vivo*.

L'activité de la plupart des enzymes est hautement régulée. Les GRK ne font pas exception. Le mécanisme le plus connu de la régulation de la GRK est la liaison directe avec le RCPG. Cependant, ce n'est que l'un de nombreux mécanismes établis. En effet, les GRK sont régulées par phosphorylation et des interactions protéine-protéine. Parmi les kinases responsables de la régulation de l'activité de la GRK on peut citer la PKA, la PKC, ERK1/2, Src et la kinase cycline-dépendante CDK2 [232]. Aussi, plusieurs protéines interagissent avec les GRK régulant leurs activités comme l'actine, la monoxyde d'azote synthase, la calmoduline, la cavéoline, l'ubiquitine et la liste est encore longue [232].

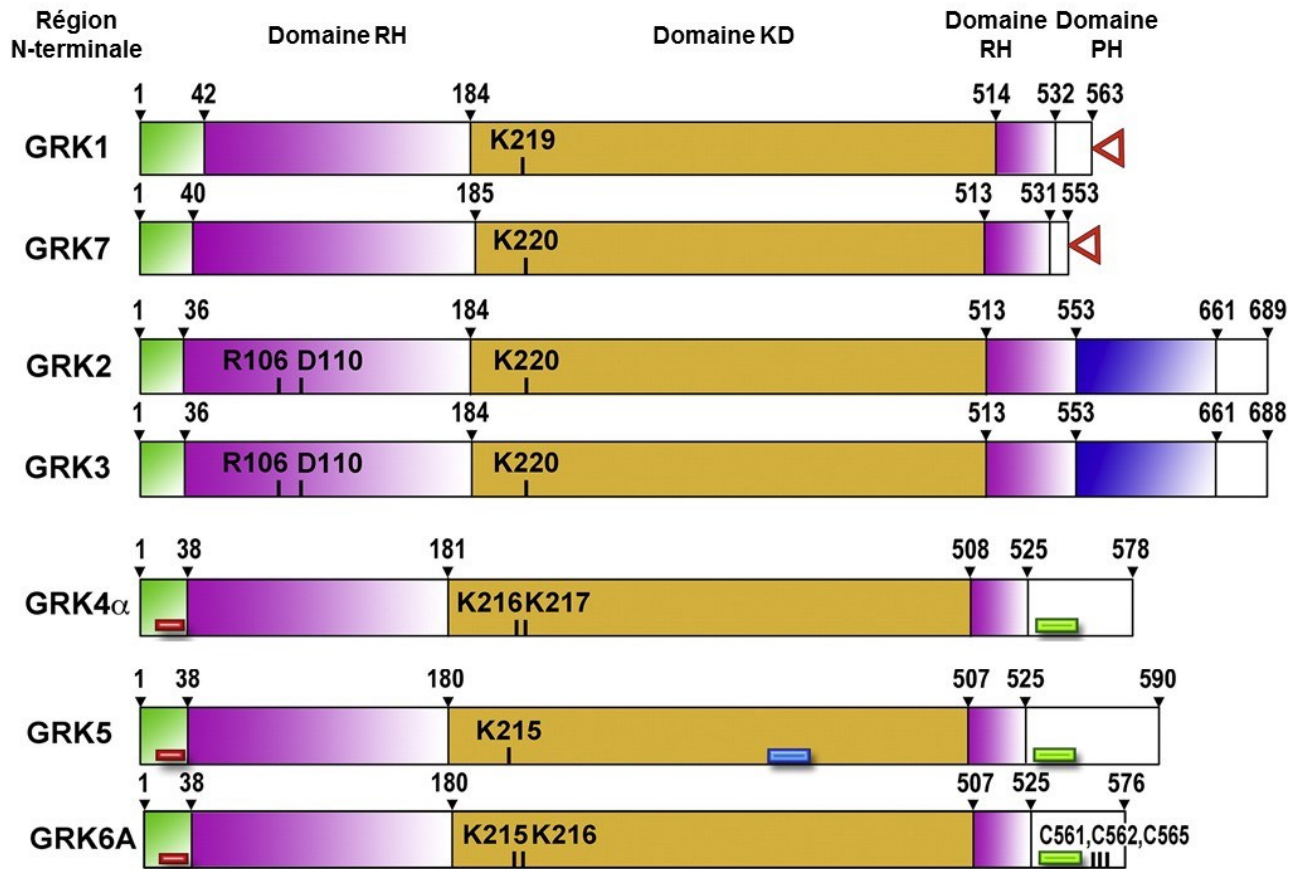


Figure 10. La structure des domaines des GRK.

Le nombre au-dessus des structures indique la position des acides aminés des GRK humaines basé sur [236]. Toutes les GRK ont une courte région N-terminale (verte), qui est impliquée dans la liaison aux RCPG, suivie par le domaine d'homologie RGS (RH) (magenta). Cette région N-terminale est unique à la famille des kinases GRK. Le domaine RH est interrompu par le domaine catalytique partagé par toutes les kinases : domaine KD (jaune foncé). Ces éléments sont partagés par les sous-familles GRK2/3 et GRK4/5/6. La caractéristique déterminante de la sous-famille GRK2/3 est un domaine d'homologie de la pleckstrine (PH), C-terminal (bleu) impliqué dans la liaison des phospholipides anioniques et  $G\beta\gamma$ . Les membres de la sous-famille GRK4/5/6 utilisent d'autres mécanismes de ciblage membranaire dont la palmitoylation. Les résidus chargés positivement sont présentés sous forme de rectangles verts, les résidus basiques N-terminaux sont représentés par des rectangles rouges et dans le cas des sous-types visuels, les sites de prénylation C-terminale dans la GRK1 et GRK7 sont représentés par des triangles rouges. Les résidus Arginine en position 106 et acide aspartique en position 110 dans les GRK2/3 sont importants pour la liaison de  $G\alpha_q$ , une fonction unique à cette sous-famille. La position de la lysine clé (K) responsable de la catalyse dans le domaine kinase est montrée. La boîte bleue montre la position du signal de localisation nucléaire dans GRK5 (résidus 388-395) (image modifiée de [232]).



#### 1.2.4.1.1.2 Aspects structurels de l'activation des kinases des récepteurs couplés aux protéines G

Les structures cristallines d'un représentant de chaque sous-famille ont été résolues: la GRK2 seule [237], en complexe avec la sous-unité  $G\beta\gamma$  [238] et avec  $G\alpha_q$  et  $G\beta\gamma$  [239], la GRK6 [236] et la GRK1 [240]. Une caractéristique distinguant la plupart de ces GRK des autres kinases est que les lobes du KD sont dans une conformation ouverte et la queue C-terminale est désordonnée indépendamment de la présence d'un analogue de l'ATP ou des sous-unités de la protéine G, ce qui est atypique pour une sérine/thréonine kinase [236]. Cela indique que la kinase nécessite un réarrangement pour devenir active, ce qui est induit par les RCPG actifs. En effet, l'extrémité N-terminale des GRK, ainsi que plusieurs résidus liant le récepteur dans le domaine KD semblent être responsable de cette activation [241]. Les résidus impliqués dans les contacts entre l'hélice N-terminale et le reste de la kinase sont hautement conservés parmi les GRK, et la mutagenèse dirigée de ces acides aminés suivie d'une analyse cinétique révèle des défauts prononcés dans la phosphorylation des RCPG [242,241]. Ainsi, le pont interdomaine formé par l'hélice N-terminale semble être une structure critique pour maintenir les GRK dans un état catalytiquement compétent [243]. En effet, l'introduction d'une liaison disulfure qui attache de manière covalente l'extrémité N-terminale de GRK1 à sa queue C-terminale améliore son efficacité catalytique [241]. Comme les GRK n'interagissent que transitoirement avec les RCPG, aucune structure cristalline de GRK n'a été déterminée en complexe avec un RCPG [244]. Tout récemment, une approche intégrée de spectrométrie de masse, de microscopie électronique, de mutagenèse, de simulations de dynamique moléculaire et d'analyse computationnelle a été utilisée pour analyser l'interaction de GRK5 avec le  $\beta$ 2AR [245]. Cette étude a révélé un mécanisme dynamique d'interaction qui implique de grands changements conformationnels dans l'interface RH/KD de la GRK5 lors de sa liaison au récepteur. Ces changements facilitent les contacts entre les boucles intracellulaires 2 et 3 et l'extrémité C-terminale du  $\beta$ 2AR avec le domaine RH, la surface de liaison à la membrane et le domaine catalytique de la kinase, respectivement.

La plupart des GRK nécessitent la présence de lipides chargés négativement pour phosphoryler efficacement les RCPG et une surface cytoplasmique du récepteur actif pour former une poche qui n'est pas accessible dans l'état inactif [105,101] auquel la GRK se liera.

On s'attend à ce que la taille et les propriétés physiques de cette poche soient hautement conservées parmi les récepteurs, alors que la taille et la séquence des boucles cytoplasmiques plus exposées du récepteur ne le sont manifestement pas. La charge négative du feuillet interne de la bicouche lipidique serait à son tour reconnue par une surface complémentaire chargée positivement dans la GRK, telle que celle trouvée immédiatement adjacente à l'hélice N-terminale de GRK6 [242]. Ainsi, un autre modèle probable cohérent pour l'activation de la GRK médiée par le RCPG est celui qui implique le récepteur activé dans son environnement lipidique natif formant une surface qui est complémentaire de forme et de charge à celle des GRKs dans leur conformation fermée active. Un tel mécanisme permettrait aux GRK de reconnaître un large éventail de RCPG. Une fois liée, la kinase adopte une conformation fermée qui lui permet de phosphoryler n'importe quel substrat à proximité, bien que le récepteur ancré soit favorisé de façon entropique.

#### 1.2.4.1.1.3 Action des kinases des récepteurs couplés aux protéines G sur le récepteur opioïde delta

La phosphorylation du DOPr par les GRK se produit avec une demi-vie approximative de 1,5 minute, atteignant son maximum en 10 minutes, et persistant jusqu'à 1 heure avec peu ou pas de dégradation du récepteur [47]. Les études de troncature et de mutagenèse ont localisé des sites majeurs de phosphorylation dans la queue C-terminale du DOPr, notamment au niveau des résidus thréonine à la position 358 et sérine à la position 363 pour la GRK2. La thréonine en position 361 fonctionne comme un site pour la reconnaissance des kinases et sa présence est également nécessaire pour la phosphorylation adéquate des deux autres résidus [246] (figure 13). L'acide glutamique en position 355 et l'acide aspartique en position 364 sont également des sites d'interaction avec la kinase, leur présence étant nécessaire pour un recrutement optimal de GRK2, GRK3 et GRK5 et une phosphorylation ultérieure du récepteur aux positions 358 et 363 [247,248]. Le recrutement de GRK2/GRK3 par le DOPr a également été étudié dans des cellules vivantes, révélant une colocalisation rapide entre GRK2/GRK3 et le DOPr à la membrane (première minute). Aucune colocalisation n'a été mise en évidence entre le DOPr et la GRK6 ou entre le MOPr et la GRK2 dans cette étude indiquant une certaine spécificité dans l'interaction de la GRK avec les différents ROs [249]. La translocation de GRK2 vers la membrane et son

interaction physique avec le DOPr nécessite la présence de  $G\beta\gamma$ , qui faisait partie du complexe de co-immunoprécipitation avec le récepteur et la kinase [247,249]. En revanche, l'activité de la protéine G n'apparaissait pas indispensable pour la phosphorylation du DOPr puisque la PTX n'influçait pas les niveaux de sérine phosphorylés en position 363 détectés après exposition à différents agonistes [250]. Cette observation pourrait indiquer que des GRK indépendantes de  $G\beta\gamma$  (GRK5/6) peuvent prendre le relais lorsque celles dépendantes du dimère ne sont pas fonctionnelles ou sont faiblement exprimées. Autrement, les GRK 2 et 3 pourraient être recrutées à proximité du récepteur même si les protéines G hétérotrimériques sont inactives, une option qui semble moins plausible, car plusieurs résidus de liaison de la GRK2 à la  $G\beta\gamma$  sont les mêmes que ceux qui interagissent avec la  $G\alpha$  liée au GDP dans l'hétérotrimère inactif [251].

Plusieurs études ont démontré que le DOPr subit différents mécanismes de régulation en fonction du ligand activant le récepteur [47] (voir section 1.4). Parmi ces observations, le taux de phosphorylation du DOPr par la GRK s'est avéré spécifique du ligand. Le DPDPE, SNC-80, BW373U86 et deltorphine II sont tous capables de phosphoryler le DOPr au niveau de la sérine à la position 363. La morphine le fait de façon moindre, alors que le TIPP et le TAN-67 ne produisent aucun changement visible des niveaux de la sérine phosphorylée [47]. Ces différences quantitatives ne nous permettent pas de conclure sans équivoque si elles sont dues à des conformations spécifiques du ligand ou sont simplement déterminées par l'efficacité du ligand (TIPP, morphine et TAN-67 se comportent comme des agonistes partiels dans la voie de l'activation de la protéine G). En effet, la capacité du ligand à recruter [247] et activer [252] ce type de kinase est liée à l'activation de la protéine G. Contrairement à ces différences quantitatives, les études de mutagenèse ont clairement établi que les différents agonistes peuvent phosphoryler le DOPr à différents domaines intracellulaires, ce qui implique que les récepteurs occupés par différents ligands exposent différents sites de phosphorylation aux kinases régulatrices [253,254].

#### 1.2.4.1.2 Phosphorylation du récepteur opioïde delta par d'autres kinases

##### 1.2.4.1.2.1 La protéine kinase dépendante du $Ca^{2+}$

Les kinases PKC ont été identifiées il y a plus de trois décennies comme kinases activées

par protéolyse [255]. Initialement identifiées comme des sérine-kinases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et indépendantes des nucléotides, les PKC forment une famille de sérine/thréonine kinases qui sont activées suite à la stimulation de la PLC par le récepteur et l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires [256]. La PKC est impliquée dans la désensibilisation hétérologue du récepteur. La désensibilisation hétérologue est distincte de la désensibilisation homologue induite par l'activation du récepteur par le ligand et médiée par les GRKs. En effet, la désensibilisation hétérologue est indépendante du ligand et provoquée par l'activation d'un autre récepteur sur la même cellule. Ce phénomène est lié au fait que les kinases dépendantes des seconds messagers vont phosphoryler non seulement les récepteurs activés par les agonistes, mais aussi les récepteurs n'ayant pas été stimulés préalablement par un ligand.

Les treize membres actuellement connus de la famille PKC ont été regroupés en trois classes selon les différences de liaison de leur domaine de régulation : les PKC classiques ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ) activées par le calcium, le diacylglycérol et les phospholipides, les nouvelles PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) activées par le diacylglycérol seulement et les PKC atypiques ( $\zeta$ ,  $\lambda/\iota$ ) activées par la phosphatidylsérine, un composant de la bicouche de phospholipides [257].

Toutes les PKC ont une structure générale commune composée d'une seule chaîne polypeptidique avec deux modules principaux comprenant un domaine régulateur N-terminal qui contient les motifs de ciblage membranaire et un domaine catalytique C-terminal qui lie l'ATP et les substrats. La recherche initiale en 1986 par Caussens et al. [258] a révélé que tout au long de la séquence primaire des enzymes, il y a quatre régions (C1-C4) conservées, chaque région étant un module fonctionnel, et sont flanquées par des régions variables (V) (Figure 11).

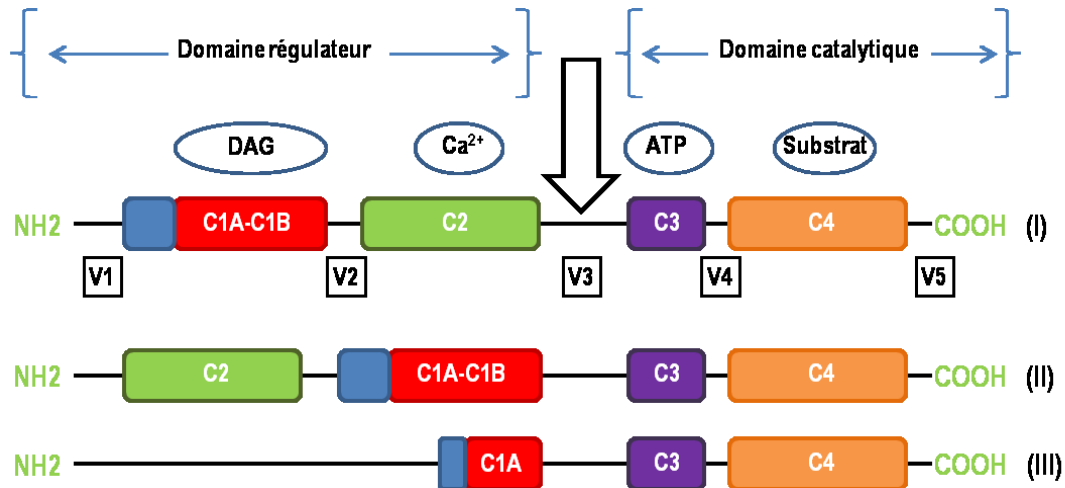


Figure 11. Représentation schématique de la structure primaire de la famille de gènes PKC. Les isoenzymes de la PKC sont composées de chaînes polypeptidiques uniques constituées de domaines régulateurs et catalytiques. Il s'agit de 4 régions conservées (C1-C4) et 5 régions variables (V1-V5). La région C1 (rouge) est constituée de motifs riches en cystéine, la région C2 (verte) est la région de liaison du calcium, la région C3 (violette) comprend le lobe de liaison de l'ATP et la région C4 (jaune) est la zone de liaison du substrat. Les domaines régulateurs et catalytiques sont séparés par une charnière V3. Le domaine du pseudosubstrat (bleu) dans la région V1 est également indiqué. La structure (I) représente celle des PKC classiques, la structure (II) représente celle des nouvelles PKC et la structure (III) représente celle des PKC atypiques (image modifiée de [257]).

Le domaine régulateur N-terminal des PKC contient plusieurs régions partagées. Le domaine C1 se lie au DAG et les analogues non physiologiques non hydrolysables appelés esters de phorbol dans les isoformes classiques et nouvelles, mais pas dans les isoformes atypiques. Le domaine C2 est présent dans les isoformes classiques et nouvelles et agit comme un capteur de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les PKC classiques. Le domaine de pseudosubstrat (figure 10), qui est présent dans les trois classes de PKC, est une petite séquence d'acides aminés qui imite le substrat, lie la cavité de liaison au substrat dans le domaine catalytique et manque les résidus liant les sérine/thréonine, gardant l'enzyme inactive. Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  et le DAG sont présents en concentrations suffisantes, ils se lient aux domaines C2 et C1, respectivement, et recrutent la PKC vers la membrane. Cette interaction avec la membrane entraîne la libération du pseudosubstrat du site catalytique et l'activation de l'enzyme. Parlons plus en détails de cette activation. Pour que ces interactions allostériques se produisent, la PKC doit d'abord se replier et avoir une conformation convenable permettant l'action catalytique. Cela dépend de la phosphorylation de la région catalytique. Cette dernière présente une structure bilobale avec un

feuillet  $\beta$  comprenant le domaine N-terminal et une hélice  $\alpha$  constituant le domaine C-terminal. Les deux sites de liaison de l'ATP et du substrat sont situés dans la fente formée par ces deux lobes. C'est également là que se lie le domaine de pseudosubstrat de la région de régulation. La protéine kinase dépendante du 3-phosphoinositide est la kinase responsable de l'initiation en amont du processus par la phosphorylation de la boucle d'activation de la PKC  $\zeta$  et  $\delta$  [259,260]. Lors de l'activation, les PKC sont transloquées à la membrane plasmique par les protéines RACK (récepteurs pour les PKC activées), et en cas d'activation prolongée, il a été constaté que la PKC perdait son activité aussi bien au niveau cytoplasmique qu'au niveau membranaire. Deux mécanismes régissent cette régulation négative: l'un est une diminution de la synthèse de la PKC, l'autre est une dégradation de la protéine par des protéases. Il semblerait que le processus de protéolyse ait une certaine sélectivité et que les isoformes préférentiellement lysées varient en fonction du type cellulaire et du second messager intervenant lors de l'activation de l'isoenzyme concernée [261]. Les enzymes activées sont plus sensibles à l'action des protéases. La déphosphorylation de l'enzyme par des phosphatases prédispose la PKC à la protéolyse [262].

L'activation de la PKC par les esters de phorbol, la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ou l'activation des récepteurs couplés à la protéine  $G\alpha_q$  induisent l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  par le DOPr [263,264]. Cette phosphorylation est également rapide et atteint des niveaux d'incorporation de  $^{32}\text{P}$  en cinq minutes qui sont similaires à ceux induits par l'activation directe du DOPr. Les mutants du DOPr mimant la phosphorylation médiée par les GRK ne subissent pas autant de phosphorylation dépendante de la PKC, suggérant que la phosphorylation par les GRK pourrait freiner l'incorporation du phosphate induite par la PKC [264]. Cette même étude a identifié la sérine en position 344 comme le site de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  médiée par la PKC (figure 13), avec une contribution minimale ou nulle des autres résidus sérine/thréonine C-terminaux [264].

#### 1.2.4.1.2.2 Les kinases de la famille Src

La famille Src comporte des protéines tyrosine-kinases jouant un rôle clé dans la régulation de la transduction du signal via les récepteurs membranaires. Cette machinerie régule de nombreux processus cellulaires fondamentaux, y compris la croissance cellulaire, la

différenciation, la forme cellulaire, la migration, la survie ainsi que les signaux cellulaires spécialisés [265]. Ces kinases présentent une organisation de domaines conservée, qui comprend un segment N-terminal myristoylé permettant l'ancrage membranaire, suivi des domaines SH3 et SH2, un domaine tyrosine kinase et un court segment C-terminal. L'analyse structurale des kinases Src a élucidé les mécanismes canoniques de la reconnaissance de la phosphotyrosine par le domaine SH2 et la reconnaissance des motifs proline par le domaine SH3. L'analyse cristallographique de kinases Src à l'état auto-inhibé a révélé que ces motifs d'interaction protéique se replient vers l'intérieur et bloquent la kinase dans une conformation inactive via des interactions intramoléculaires [265]. En effet, lorsque Src est inactive, le groupe tyrosine phosphorylé en position 527 interagit avec le domaine SH2 qui aide le domaine SH3 à interagir avec le domaine de liaison flexible et maintient ainsi l'unité inactive fermement liée. L'activation de la Src provoque la déphosphorylation de la tyrosine en position 527. Ceci induit un changement allostérique au niveau des domaines de la protéine, provoquant la déstabilisation de la structure en entraînant l'ouverture des domaines SH3, SH2 et le domaine kinase et l'autophosphorylation du résidu tyrosine en position 416 [266-268].

La tyrosine-kinase Src peut être activée par de nombreuses protéines transmembranaires qui comprennent les récepteurs d'adhésion, les récepteurs tyrosine-kinases, les récepteurs de cytokines et les RCPG ; le DOPr ne fait pas exception. En effet, il a été démontré que l'activation du DOPr par le DPDPE, le DTLET ([D-Thr2]-Leu-enképhaline-Thr6) et l'etorphine produit la phosphorylation de ses résidus tyrosine par la kinase Src, une action absente suite à la stimulation du même récepteur par la morphine ou le TICP (H-Tyr-Tic[CH2N]Cha-Phe-OH) [269,252,270]. Ceci démontre encore une fois que le DOPr subit différents mécanismes de régulation en fonction du ligand activant le récepteur. Les DOPrs contiennent plusieurs résidus cytoplasmiques qui peuvent être ciblés par les tyrosine-kinases comme ceux situés dans la première et deuxième boucle intracellulaire, ainsi que le motif NPXXY à l'extrémité cytoplasmique de TM7 (figure 13). La substitution de ce dernier par la phénylalanine a réduit la phosphorylation du récepteur induite par le ligand de près de 50% [271]. Il est important de noter que bien que ce résidu soit un substrat critique, les mécanismes de phosphorylation de la tyrosine au-delà du récepteur peuvent également contribuer à la régulation de la signalisation du DOPr. Un de ces mécanismes implique la kinase GRK2, qui est activée suite à sa phosphorylation par la kinase Src [272,273]. En particulier, l'activation du DOPr par le DPDPE,

mais pas par le TIPP ou la morphine, a augmenté le taux de tyrosines phosphorylées dans la GRK2, entraînant la phosphorylation du DOPr au niveau de la sérine en position 363. La phosphorylation de GRK2 ainsi que celle du DOPr ont été bloquées par des inhibiteurs de Src [252], indiquant une régulation en tandem du DOPr par phosphorylation par la tyrosine-kinase de la GRK2 suivie d'une phosphorylation sérine/thréonine du récepteur.

#### 1.2.4.1.2.3 Les kinases cycline-dépendantes 5 (Cdk5)

La Cdk5 a été découverte au début des années 1990 et depuis, de grands progrès ont été réalisés en identifiant sa fonction. Le rôle le plus connu de la Cdk5 est sa régulation de la cytoarchitecture du système nerveux central, mais il existe également des preuves qu'elle est impliquée dans le guidage axonal, le transport membranaire, la fonction synaptique, la signalisation de la dopamine et la toxicomanie. Il s'agit d'une sérine/thréonine kinase cycline-dépendante qui, comme les autres Cdk, nécessite pour son activité enzymatique sa liaison à des partenaires comme le p35 et le p39, deux enzymes neuronales indispensables pour l'activation de la Cdk5. Le mode principal de régulation pour toute la famille Cdk est leur association avec la cycline, une protéine qui contrôle la progression des cellules à travers le cycle cellulaire en activant les Cdk. Les événements transcriptionnels et post-traductionnels régulent également les Cdk actifs. Bien que les activateurs p35 et p39 possèdent peu de similitudes de séquence avec les cyclines, la modélisation par ordinateur et des études de mutagenèse ont prédit que la p35 pourrait adopter une structure tertiaire de type cycline [274,275]. La cristallisation du complexe Cdk5/p25 (un résidu protéolytique carboxy-terminal de p35) a confirmé ces prédictions, montrant que la p25 se plie en une conformation très semblable à celle d'une cycline [276]. L'activation optimale des Cdk nécessite également leur phosphorylation au résidu Thr160; le complexe non phosphorylé étant 200 fois moins actif [277]. La Cdk5 est une kinase dirigée par la proline c'est-à-dire elle phosphoryle les sérines et thréonines immédiatement en amont d'un résidu de proline. En plus d'une exigence absolue de la proline dans la position +1, la Cdk5 montre une préférence marquée pour un résidu basique dans la position +3 [278,279].

Le DOPr est également un substrat de la Cdk5 [280,281], qui le phosphoryle au niveau du résidu thréonine à la position 161 situé dans la seconde boucle intracellulaire (figure 13). Ce résidu représente le site principal de phosphorylation basale du DOPr. La substitution de ce



résidu par l'alanine ou l'inhibition de Cdk5 réduit de façon considérable cette phosphorylation basale du DOPr à la fois dans les lignées cellulaires immortalisées et dans les neurones des DRG [281]. La phosphorylation du DOPr au niveau de la thréonine en position 161 permet son expression à la membrane plasmique et son hétérodimérisation avec le MOPr [280,281].

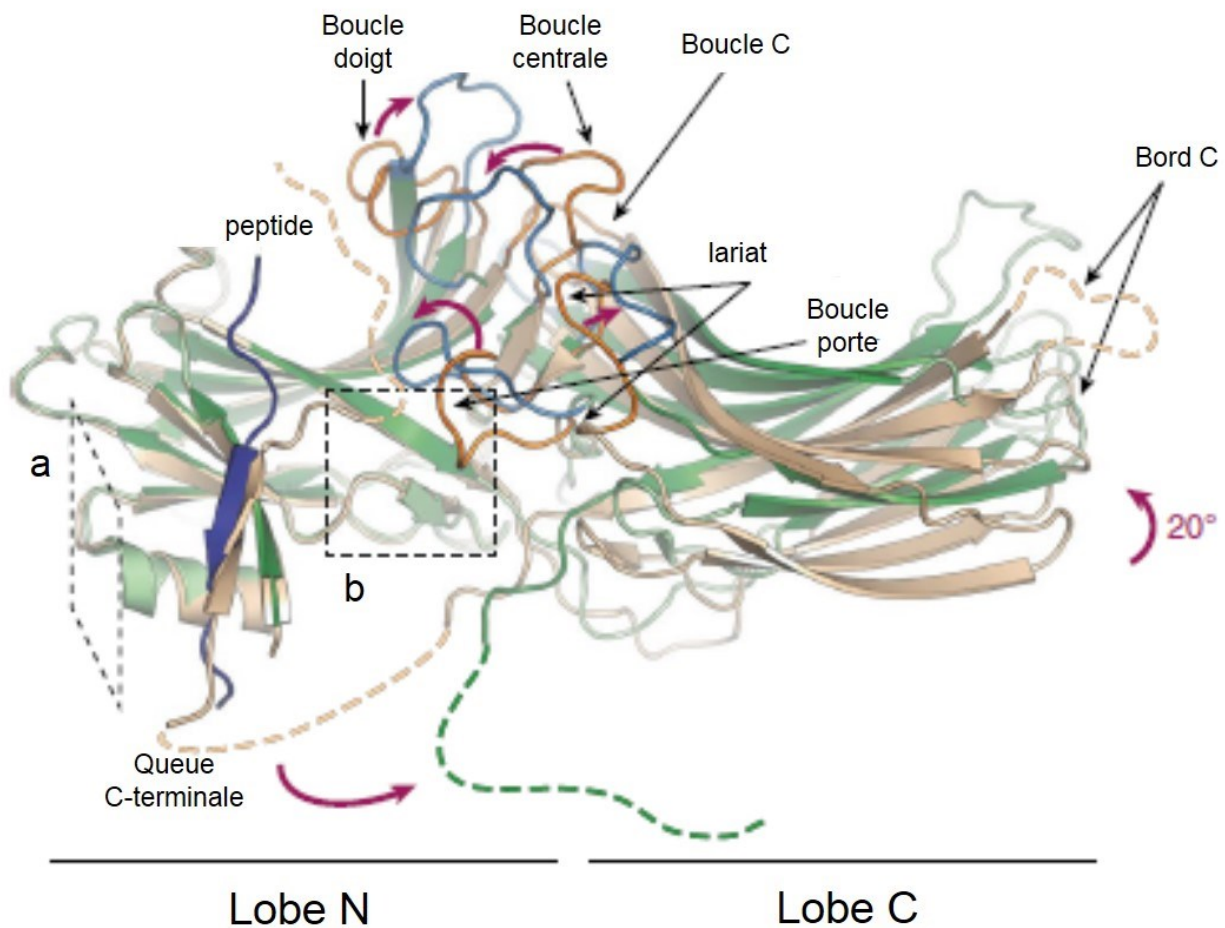
#### 1.2.4.2 Intervention des arrestines

##### 1.2.4.2.1 Généralités

La phosphorylation du récepteur diminue son couplage à la protéine G [282] et permet sa liaison de haute affinité à l'arrestine, qui arrête la signalisation médiée par la protéine G en bloquant la surface cytoplasmique des récepteurs [283]. Depuis leur découverte dans les années 1970 et 1980, les arrestines ont évolué de simples terminateurs de signalisation à des protéines adaptatrices multifonctionnelles qui forment un nœud central dans plusieurs voies de signalisation indépendantes de la protéine G [112]. Il en existe 4 isoformes; deux arrestines visuelles: l'arrestine 1 (arr1) et l'arrestine 4 (arr4) et deux arrestines omniprésentes: l'arrestine 2 et l'arrestine 3 également connues sous le nom de  $\beta$ -arrestine 1 ( $\beta$ arr1) et  $\beta$ -arrestine 2 ( $\beta$ arr2). Uniquement la double invalidation génétique de  $\beta$ arr1 et  $\beta$ arr2 est létale chez les souris [284], ce qui suggère une certaine redondance fonctionnelle entre les isoformes de  $\beta$ -arrestine. Cependant, les différences de niveau d'expression, de localisation cellulaire et d'affinité de liaison pour les récepteurs suggèrent des rôles partiellement distincts pour les deux isoformes non visuelles. Les structures des quatre isoformes ont été résolues dans leur état inactif, telles que révisées dans la référence [285]. Les arrestines sont des protéines de ~45 kDa organisées en lobes N et C, chacun formant une structure en sandwich à brins  $\beta$  reliée par une région charnière (figure 11). À cette interface de domaines N et C, la boucle C, la boucle doigt et la boucle centrale forment la crête centrale, flanquée par le lariat formé de 17 à 18 boucles, dont une partie est souvent appelée la boucle de la porte. Deux boucles sur le côté externe du lobe C-terminal composent le bord C, qui interagit avec la bicouche membranaire lors de l'activation de l'arrestine [112]. Deux grands réseaux d'interaction maintiennent l'arrestine dans sa conformation basale, inactive. Premièrement, l'interaction à trois éléments est médiée par des interactions hydrophobes entre la partie proximale de la queue C-terminale, le brin  $\beta$  N-terminal I et l'hélice  $\alpha$  I (figure 11, pointillé a). Deuxièmement, le noyau polaire est un réseau de liaisons

hydrogène entre cinq résidus chargés sur les brins  $\beta$  III et X de l'extrémité N-terminale, la boucle de la porte et la partie distale de la queue C-terminale (Figure 11, pointillé b). Ensemble, ces interactions maintiennent les régions de la crête centrale étroitement serrées et forment un verrou N-C intramoléculaire, empêchant l'accès à une rainure chargée positivement sur le lobe N. Lors de son activation par liaison au récepteur, l'arrestine subit plusieurs changements conformationnels majeurs, à savoir la perturbation de l'interaction à trois éléments, la rupture du noyau polaire, une rotation interdomaine de  $\sim 20^\circ$ , la libération de la queue C-terminale et des réarrangements substantiels des boucles de doigt, centrale et de porte, récemment détaillées dans la référence [286] (figure 12). Ces changements exposent la surface concave du lobe N de l'arrestine et ses sites de phospho-interaction positivement chargés tels que les lysines et les arginines qui engagent des sérines et des thréonines de l'extrémité C-terminale du récepteur phosphorylées par les GRK. La structure du complexe rhodopsine/arrestine-1 a indiqué que les interactions récepteur/arrestine sont essentiellement médiées par deux interfaces: la queue C-terminale du récepteur avec la rainure du lobe N de l'arrestine et le noyau du récepteur avec la crête centrale de l'arrestine. L'engagement de base du récepteur avec la crête centrale de l'arrestine est principalement médié par trois interactions: (i) la boucle de doigt de l'arrestine avec la poche de liaison intracellulaire du récepteur (ii) la base C-terminale de la boucle doigt et la boucle arrière de l'arrestine avec les extrémités intracellulaires de TM5 et TM6 reliées par IL3 dans la rhodopsine et (iii) la fente formée par les boucles centrales, de lariat et C de l'arrestine avec l'extrémité intracellulaire de TM3 et IL2 dans la rhodopsine [112]. Plus tôt, des études de mutation et de cartographie fonctionnelle des différentes isoformes de l'arrestine ont fourni des validations de ces interfaces d'interactions [287] et des résidus impliqués dans la spécificité de couplage du récepteur [288-290]. Des études récentes de BRET et FRET (transfert d'énergie par résonance de fluorescence) sur la  $\beta$ arr2 ont indiqué que les domaines périphériques et ceux des lobes N et C de l'arrestine montrent des signatures conformationnelles spécifiques au récepteur et au ligand [291,292]. La capacité de l'arrestine à déclencher spécifiquement plusieurs voies de signalisation suggère qu'elle est capable d'adopter des conformations multiples pour engager efficacement différents effecteurs en aval, même lorsqu'elle est liée à un récepteur. La plasticité de sa surface joue probablement un rôle important dans ce processus, une propriété de l'arrestine qui commence à être largement étudiée [293,112,294-296]. Un autre niveau de complexité de la variabilité conformationnelle est ajouté

par la phosphorylation de l'extrémité C-terminale et/ou des boucles intracellulaires du récepteur médiée par les GRK. Différentes GRK donnent des motifs phosphosérines/phosphothréonines distincts sur le récepteur qui sont ensuite "lus" différemment par l'arrestine, modulant ainsi l'affinité d'interaction et déclenchant des voies de signalisation spécifiques tels que la désensibilisation, l'endocytose ou l'activation de kinases [112]. Une structure cristalline récemment résolue du complexe rhodopsine/arrestine visuelle suggère, avec des essais de proximité, que la présence de charges négatives et/ou de trois phosphates sur le récepteur distinctement espacés sont critiques pour une haute affinité de liaison entre le récepteur et l'arrestine [297], ce qui peut expliquer pourquoi certains récepteurs interagissent faiblement ou transitoirement avec l'arrestine et d'autres s'y lient fortement [298].



## Figure 12. Changements conformationnels de la $\beta$ arr1 lors de son activation.

Une superposition de l'état inactif (beige) et actif (vert) de la  $\beta$ arr1 est représentée. Dans la conformation inactive, la queue C-terminale (les lignes pointillées représentent les résidus non résolus) se fixe sur le lobe N de l'arrestine. L'état actif était obtenu par cristallisation de l'arrestine en présence d'un peptide correspondant à l'extrémité C-terminale du récepteur de la vasopressine 2 complètement phosphorylée (bleu) et un fragment d'anticorps stabilisant l'état actif (non représenté). L'activation induit des changements conformationnels majeurs (indiqués par des flèches violettes): réarrangements des boucles à l'interface des lobes N et C, déplacement de la queue C-terminale et rotation interdomaines de  $\sim 20^\circ$ . Deux réseaux d'interactions majeures maintiennent l'arrestine dans sa conformation basale et inactive : 1. L'interaction à trois éléments est médiée par des interactions hydrophobes entre la partie proximale de la queue C-terminale, le brin  $\beta$  N-terminal I et l'hélice  $\alpha$  I (pointillé a), 2. Le noyau polaire est un réseau de liaisons hydrogène entre cinq résidus chargés sur les brins  $\beta$  III et X de l'extrémité N-terminale, la boucle de la porte et la partie distale de la queue C-terminale (pointillé b) (image modifiée de [112]).

### 1.2.4.2.2 Régulation de l'activité des $\beta$ -arrestines

La variabilité conformationnelle des arrestines est contrôlée à plusieurs niveaux; par des interactions avec le complexe ligand-récepteur, par différentes modifications post-traductionnelles du récepteur et des  $\beta$ arr et par l'action d'autres cofacteurs dépendants du type cellulaire [299]. Les modifications post-traductionnelles sont critiques pour la signalisation et le trafic des  $\beta$ arr. Les  $\beta$ arr1 et  $\beta$ arr2 sont constitutivement phosphorylées et nécessitent une déphosphorylation C-terminale pour cibler les récepteurs internalisés vers la clathrine. Cependant, la déphosphorylation de  $\beta$ arr n'est pas nécessaire pour la désensibilisation de la signalisation. La déphosphorylation de  $\beta$ arr après l'activation du récepteur est nécessaire pour une fonctionnalité complète, y compris l'internalisation du récepteur et la signalisation MAPK médiée par la  $\beta$ arr (voir section 1.2.4.2.3). L'ubiquitination de la  $\beta$ arr conduit à des complexes  $\beta$ arr/RCPG bien durables et à une activité MAPK prolongée. Elle est également nécessaire pour l'internalisation de plusieurs RCPG [300]. Différents modèles d'ubiquitination de la  $\beta$ arr (en particulier au niveau de la lysine en position 11 et celle en position 12) entraînent des changements dans le trafic des récepteurs et la capacité à échafauder les signalosomes [301]. La  $\beta$ arr à son tour agit comme adaptateur pour les ligases qui catalysent l'ubiquitination de certains RCPG, résultant en leur dégradation lysosomale. Les enzymes qui produisent la dé-ubiquitination régulent également la fonction des arrestines fournissant ainsi un mécanisme de coordination du recyclage des récepteurs et de leur resensibilisation [302]. D'autres

modifications signalées qui régulent la fonction de  $\beta$ arr sont la S-nitrosylation [303] et la SUMOylation (SUMO de l'anglais Small ubiquitin-like modifier), favorisant l'endocytose de nombreux RCPG [304].

#### 1.2.4.2.3 Signalisation médiée par la $\beta$ -arrestine

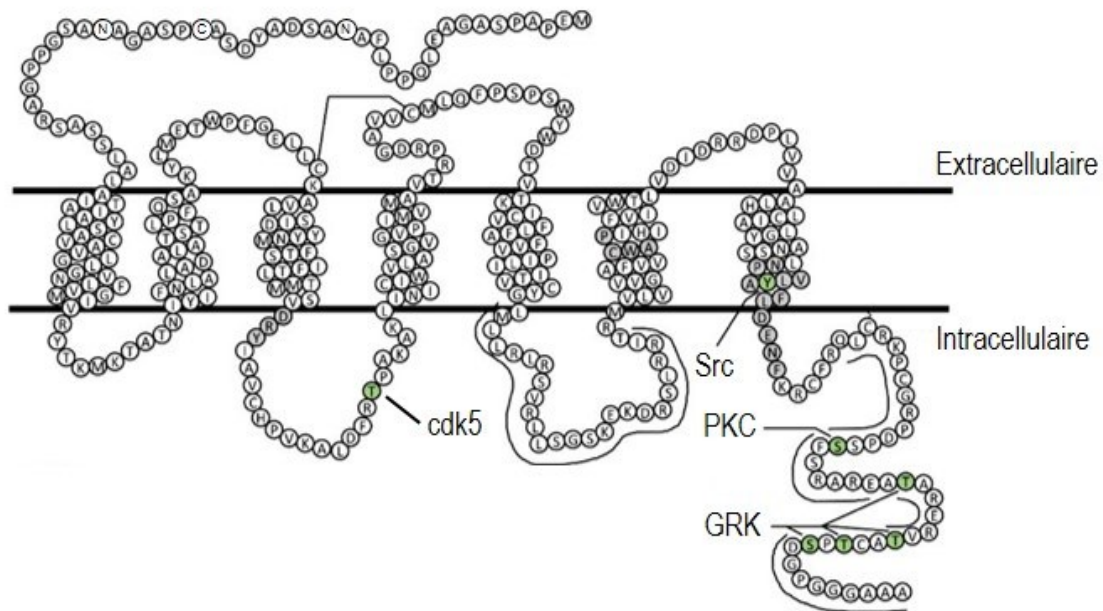
Les  $\beta$ arr contrôlent plusieurs événements cellulaires tels que la désensibilisation, l'endocytose ou l'activation de kinases. Il est maintenant approuvé que les  $\beta$ arr sont également capables d'initier d'autres voies de signalisation spatialement et temporellement distinctes de la signalisation médiée par les protéines G, donnant des conséquences cellulaires et physiologiques uniques. En effet, les  $\beta$ arr échafaudent les MAPKs y compris ERK1/2, JNK1/2 et p38, modulant plusieurs fonctions en aval telles que la croissance cellulaire, la survie, l'apoptose, la contractilité, la migration cellulaire et la réorganisation du cytosquelette [299]. La transactivation du récepteur EGFR est également régulée par les  $\beta$ arr, grâce à l'activation d'une métalloprotéase transmembranaire qui sépare le ligand EGF lié à la membrane de l'EGFR [305]. La  $\beta$ arr2 peut inhiber la signalisation médiée par le NF- $\kappa$ B par la stabilisation de I- $\kappa$ B $\alpha$ , un inhibiteur de NF- $\kappa$ B, prévenant sa phosphorylation et dégradation [306]. La  $\beta$ arr1 peut directement influencer les modifications épigénétiques par interaction nucléaire avec les acétylases et désacétylases des histones qui influencent la structure de la chromatine [307]. Il y a maintenant même des exemples de signalisation endosomale accrue des protéines G grâce à l'intervention de la  $\beta$ arr comme c'est le cas du récepteur de l'hormone parathyroïdienne de type 1 [308] et du récepteur de la vasopressine V2 [309], un effet qui est perdu avec l'inhibition de la  $\beta$ arr. Le  $\beta$ 2AR maintient également une conformation active qui peut signaler à travers les protéines G pour générer de l'AMPc à partir des endosomes [310]. Ces résultats suggèrent que le trafic des récepteurs vers les endosomes n'est pas nécessairement synonyme d'arrêt de la signalisation. Au contraire, les récepteurs au niveau des endosomes peuvent être capables d'activer encore les protéines G. Cette propriété est à l'encontre du paradigme classique des arrestines comme "arrêtant" la signalisation de la protéine G. Dans ce contexte, les études structurales ont révélé deux conformations uniques des complexes RCPG- $\beta$ arr: la conformation «queue» où la  $\beta$ arr est principalement couplée à la queue C-terminale du récepteur phosphorylé, et la conformation «noyau», où, en plus de l'extrémité C-terminale phosphorylée, la  $\beta$ arr est

engagée dans le noyau transmembranaire du récepteur. La conformation «queue» assure l'internalisation des récepteurs et la signalisation médiée par la  $\beta$ arr alors que la conformation «noyau» est responsable de la désensibilisation de la signalisation par la protéine G [311]. Récemment, il a été démontré que les RCPG de classe B forment un mégacomplexe avec la protéine G et la  $\beta$ arr [312]. En effet, le récepteur se lie simultanément à travers sa région centrale avec la protéine G et à travers sa queue C-terminale phosphorylée avec la  $\beta$ arr. Ce mégacomplexe définit la base physique de la signalisation soutenue des RCPG internalisés.

#### 1.2.4.2.4 Régulation de l'activité du récepteur opioïde delta par la $\beta$ -arrestine

L'activation du DOPr [85,248] ou sa phosphorylation par la PKC [264] induit le recrutement de  $\beta$ arr1 et/ou  $\beta$ arr2 à proximité du récepteur. Les sites d'interaction sur le récepteur ont été localisés dans l'IL3, plus précisément au niveau de la leucine à la position 235, de l'isoleucine à la position 259 et des deux sérines aux positions 249 et 255 et dans l'extrémité C-terminale au niveau de la glutamine à la position 331, de l'alanine à la position 372, des deux thréonines aux positions 358 et 361 et de la sérine à la position 363 [313,314] (figure 13). Dans ce contexte, les récepteurs tronqués au niveau C-terminal manquant les 15 derniers résidus démontrent une capacité réduite, mais pas abolie d'interaction avec la  $\beta$ arr1 [313], suggérant que la  $\beta$ arr1 peut interagir avec le DOPr en absence de phosphorylation de la queue C-terminale. Cette possibilité a ensuite été corroborée dans des études où on a muté les sites de phosphorylation sérine/thréonine C-terminaux du DOPr [315,248], confirmant le maintien de la capacité du récepteur muté à recruter la  $\beta$ arr1/2 d'une manière indépendante de sa phosphorylation C-terminale. L'équipe de Qiu et al. a démontré que bien que la phosphorylation ne soit pas essentielle pour le recrutement de la  $\beta$ arr, elle améliore spécifiquement l'interaction du DOPr avec la  $\beta$ arr2 [315]. La même étude a également montré que les deux  $\beta$ arr contribuaient de façon similaire à l'internalisation du DOPr sauvage et celui muté au niveau des sites de phosphorylation C-terminaux, alors que la  $\beta$ arr2 était principalement responsable de la désensibilisation du DOPr de type sauvage [315]. En revanche, une autre étude comparant la contribution de la  $\beta$ arr1/2 à l'internalisation du DOPr a conclu que seule la  $\beta$ arr2 médie l'internalisation du récepteur muté non phosphorylé [248]. L'association de la  $\beta$ arr1/2 avec la queue C-terminale du DOPr phosphorylé ou non a été corrélée avec des itinéraires post-

endocytiques distincts; les DOPrs dépourvus de sites de phosphorylation ont été préférentiellement ciblés vers la dégradation par  $\beta$ arr2, tandis que les récepteurs de type sauvage ont été partiellement recyclés vers la membrane plasmique via leur interaction avec l'une ou l'autre  $\beta$ arr [316]. Les auteurs ont noté qu'il n'est pas clair si le complexe récepteur non phosphorylé/ $\beta$ arr2 est plus stable que le récepteur phosphorylé/ $\beta$ arr1/2, mais si c'est le cas, cela peut expliquer ces divergences dans le trafic post-endocytaire du DOPr, vu que la stabilité de cette interaction récepteur/arrestine suffit pour réduire la cinétique du recyclage [317].



Sites d'interaction  $\beta$ arr:  
 IL3 : Leu235, Ile259, Ser249, Ser255  
 C-terminal : Gln331, Ala372, Thr358, Thr361, Ser363

Figure 13. Sites d'interaction du DOPr avec cdk5, Src, PKC, GRK et  $\beta$ arr.

Les sites de phosphorylation putatifs sont en vert. Les lignes noires entre la Cys121 dans la première boucle extracellulaire et la Cys198 dans la seconde boucle extracellulaire correspondent à un pont disulfure. Les lignes noires courbées dans la troisième boucle intracellulaire entre la Leu235 et Ile259 et celles au niveau C-terminal entre Gln331 et Ala372 correspondent aux sites d'interactions avec la  $\beta$ -arrestine ( $\beta$ arr).

Plusieurs études ont montré que différents ligands se distinguent considérablement dans leur capacité à recruter la  $\beta$ arr à proximité du DOPr [85,318,319]. Ceci a été expliqué par

plusieurs facteurs [47]. Premièrement, les différences d'efficacité intrinsèque de ces différents ligands pour l'activation de la protéine G impliquent différentes capacités à recruter [247] et activer les GRK [252], ce qui donne différents profils de phosphorylation du récepteur donc un recrutement différent de la  $\beta$ arr. Deuxièmement, la capacité de différents ligands du DOPr à stabiliser différentes conformations du récepteur (voir section 1.4) pourrait expliquer cette divergence d'interaction avec la  $\beta$ arr. En effet, une étude de la cinétique de dissociation DOPr/ $\beta$ arr suite à l'activation du récepteur par deux agonistes différents DPDPE ou SNC-80 a montré que le récepteur se sépare différemment de la  $\beta$ arr, selon le ligand par lequel il a été stimulé [85]. Le SNC-80 stabilise une conformation dans laquelle l'extrémité C-terminale du récepteur est très proche du domaine N-terminal du dimère  $G\beta\gamma$ , bloquant tous les partenaires d'interaction pour s'associer à ce complexe stable. Le DPDPE éloigne la queue C-terminale du dimère  $G\beta\gamma$ , ce qui entraîne le recrutement de la  $\beta$ arr2 vers le récepteur, mais pas au voisinage de la protéine  $G\gamma 2$ , donnant un complexe DOPr- $\beta$ arr2- $G\beta\gamma$  transitoire. La stabilité de l'interaction au sein du complexe a été associée à un recyclage réduit du récepteur et une désensibilisation marquée suite à son exposition au SNC-80, alors que le DPDPE favorise un recyclage efficace du récepteur qui conférerait une protection contre la désensibilisation. La capacité de recyclage du DOPr stimulé par le DPDPE a été corrélée avec un effet analgésique prolongé, contrairement au SNC-80 qui produit de la tolérance analgésique par défaut de recyclage [85]. De ce fait, l'interaction différentielle du DOPr avec la  $\beta$ arr2 détermine ses propriétés de recyclage et le profil de tolérance analgésique du ligand lui étant associé. Une étude récente a indiqué qu'une interaction stable entre les ROs et la  $\beta$ arr peut entraîner la sensibilisation de la signalisation du récepteur TRPV1 [320]. Le fait que cet effet était associé à l'administration de SNC-80, mais pas de ARM100390 [321] a été interprété comme une indication que les DOPrs occupés par SNC-80 pouvaient activer la signalisation du TRPV1 en agissant comme des pièges pour les  $\beta$ arr qui étaient associés de manière constitutive avec le canal.

### 1.3 Théorie des récepteurs

Comme nous l'avons démontré, le DOPr, comme tout RCPG, peut engager différentes voies de signalisation donnant des réponses cellulaires différentes. Devant une telle complexité



de voies qu'un récepteur puisse activer, les modèles pharmacologiques sont très pertinents pour comprendre la transduction de la signalisation cellulaire afin de prédire l'action d'une drogue sur un récepteur donné. En effet, l'approche optimale pour étudier le mécanisme d'action d'une drogue est d'étudier l'effet de diverses concentrations dans un système fonctionnel. La réponse qui en résulte peut ensuite être comparée à un modèle mathématique quantitatif. Si les données concordent avec le modèle, ce dernier peut alors prédire un des mécanismes d'action possibles de la drogue. Dans la prochaine section, nous allons alors présenter les modèles pharmacologiques les plus importants.

### 1.3.1 Les modèles analytiques

#### 1.3.1.1 Théorie de l'occupation

Appelée aussi le modèle de Clark-Gaddum-Stephenson, la théorie de l'occupation a été émise au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Selon cette théorie, l'effet pharmacologique serait proportionnel au pourcentage de récepteurs occupés et l'effet maximal serait obtenu pour 100 % de récepteurs occupés. En effet, Clark et Gaddum, s'inspirant du modèle de Langmuir décrivant la loi d'action de masse, émirent les hypothèses que la vitesse d'association d'un ligand sur un tissu est proportionnelle à la quantité de ligands en solution ainsi qu'à la quantité de récepteurs libres et que la vitesse de dissociation d'un ligand de son récepteur ne dépend que de la quantité du complexe ligand/récepteur. À l'équilibre, quand les deux vitesses sont égales, le rapport des constantes de dissociation sur association, aussi appelé affinité à l'équilibre, est égal à la concentration du ligand lorsque la moitié des sites sont occupés. Dans son étude initiale, Clark proposa de substituer la fraction du récepteur liée par la fraction de la réponse maximale d'un tissu suite au traitement par un ligand et c'est comme ça que l'effet de la drogue est directement proportionnel à la quantité de drogue liée au récepteur [322]. Stephenson a montré que cette théorie n'est pas exacte puisque l'effet maximal peut être obtenu sans que tous les récepteurs disponibles soient occupés. En général, l'occupation d'une faible proportion de récepteurs suffit pour obtenir l'effet maximum. Les récepteurs non impliqués dans l'effet pharmacologique sont dits récepteurs de réserve [323]. La réponse n'est pas alors linéairement proportionnelle au nombre de récepteurs occupés. Stephenson a aussi démontré que différents ligands peuvent donner des réponses maximales distinctes d'où la naissance de la notion de

l'efficacité du ligand. Ainsi on peut avoir des ligands qui démontrent une réponse partielle appelés agonistes partiels. Les ligands sans efficacité sont appelés les antagonistes. La théorie de l'occupation fut par la suite optimisée par d'autres groupes en incluant notamment une fonction décrivant la capacité du système à signaler et une constante d'efficacité intrinsèque du ligand [324]. Le modèle se formule alors comme suit :

$$\frac{E}{E_{max}} = f \left[ \frac{[L] \times \varepsilon [Rt]}{[L] + Kd} \right]$$

Où :

$E$  : Efficacité d'un ligand à activer un effet dans un système,

$E_{max}$  : Efficacité maximale,

$f$  : Fonction qui décrit l'efficacité du couplage entre le stimulus et le système pour produire l'effet,

$\varepsilon$  : Efficacité intrinsèque d'un agoniste pour activer une voie de signalisation,

$[L]$  : Concentration du ligand libre,

$[Rt]$  : Concentration totale du récepteur,

$Kd$  : Constante de dissociation du ligand pour le récepteur.

Dans ce modèle,  $\varepsilon$  et  $Kd$  sont des propriétés du ligand. Les paramètres  $f$  et  $[Rt]$  sont dépendants du système biologique étudié et doivent être déterminés pour pouvoir comparer l'effet des ligands dans différents systèmes biologiques.

### 1.3.1.2 Modèle opérationnel

Le modèle opérationnel, proposé par Black et Leff en 1983, représente une alternative au modèle de l'occupation [325]. Ces auteurs assument que l'effet de l'agoniste en fonction de la concentration se traduit toujours par une fonction hyperbolique. Grâce à cette fonction, la facilité de couplage du complexe ligand/récepteur (LR) à une voie de signalisation donnée se traduit par une constante de dissociation ( $Ke$ ) définissant la transduction du complexe agoniste-récepteur en effet pharmacologique.

$$\frac{E}{E_{max}} = \left[ \frac{[LR]}{[LR] + Ke} \right]$$

Où :

$E$  : Efficacité d'activation d'une voie de signalisation donnée,

$E_{max}$  : Efficacité maximale,

$[LR]$  : Concentration du complexe ligand/récepteur,

$Ke$  : Constante de couplage du complexe LR à une voie de signalisation donnée.

La version utile de l'équation du modèle opérationnel est obtenue en substituant l'équation avec la loi d'action de masse optimisée, afin de pouvoir visualiser les paramètres expérimentaux :

$$E = \frac{[L] \times [Rt] \times E_{max}}{[L]([Rt] + Ke)(Kd \times Ke)}$$

Afin de simplifier cette équation, les auteurs ont défini un paramètre pour l'efficacité par  $\tau$  qui représente la capacité intrinsèque de la molécule à induire une réponse et aussi l'efficacité du système à transformer la stimulation en une réponse cellulaire. Plus la valeur de  $\tau$  est élevée, plus le complexe LR peut activer une voie de signalisation dans un système donné. Aussi, bien que cette valeur varie d'un système à l'autre pour un agoniste, les valeurs relatives entre les agonistes restent constantes, ce qui représente un grand avantage par rapport au modèle de l'occupation, car ça permet de comparer l'efficacité relative des agonistes.

$$\tau = \frac{[Rt]}{Ke}$$

L'équation du modèle opérationnel devient alors :

$$\text{Réponse} = \frac{[L] \times \tau \times E_{max}}{\{[L] \times (1 + \tau) \times KA\}}$$

Où :

$KA$  : affinité fonctionnelle du ligand

L'affinité fonctionnelle  $KA$  est dérivée des données fonctionnelles et non celles obtenues des expériences de liaison. C'est un paramètre qui représente la capacité du ligand à interagir avec le ou les états du récepteur qui donnent la réponse d'intérêt [326,327].

Le modèle opérationnel utilise la cellule comme une enzyme virtuelle, où le complexe  $LR$  fonctionne comme substrat et la réponse tissulaire fonctionne comme le produit. La réponse peut alors être modélisée par l'équation de Michaelis-Menten :

$$\text{Réponse} = \frac{[LR] \times E_{max}}{[L] + Ke}$$

Black et Leff ont également produit une version du modèle qui tient en compte de la pente de la courbe dose/réponse (la pente représente l'efficacité du système pour traduire l'occupation des récepteurs en une réponse). Si cette pente  $n$  est différente de l'unité, l'équation devient alors :

$$\text{Réponse} = \frac{[LR]^n \times E_{max}}{[L]^n + K e^n}$$

La quantité de récepteurs activés est une fraction du nombre total des récepteurs et cette fraction est définie par le rapport  $\frac{[LR]^n}{[Rt]^n}$ .

La substitution de ces éléments dans l'équation du modèle opérationnel donne [324]:

$$\text{Réponse} = \frac{[L]^n \times \tau^n \times E_{max}}{[L]^n \times \tau^n + ([L] + KA)^n}$$

Cette méthode de mesure dépend alors simultanément du paramètre de position de la courbe (KA) et de la réponse maximale. Ainsi, en prenant les paramètres  $\tau$  et KA comme indicateurs de réponse aux drogues, le biais de ligands peut être déterminé par des efficacités relatives ( $\tau$ ) distinctes sur différentes voies, ainsi que par leur affinité différentielle pour le ou les récepteurs donnant la réponse d'intérêt (KA). Définissons ce que c'est le biais.

C'est un terme qui décrit un type spécifique d'événements de signalisation dans lequel différents ligands agissant sur le même récepteur peuvent donner différentes réponses en engageant différents partenaires de signalisation (pour plus de détails, voir section 1.4) [328]. Kenakin et Christopoulos [326] proposent que toutes les possibilités de signalisation soient envisagées en calculant un coefficient de transduction consolidé ( $\log(\tau/KA)$ ), qui décrit l'efficience avec laquelle un ligand évoque un effet particulier. Cette valeur numérique unique peut être utilisée pour comparer les ligands entre eux dans différentes réponses afin de déterminer s'ils présentent un biais et si oui, de quantifier son ampleur [326]. Cependant, il est important de noter qu'avec l'estimation de l'efficacité du ligand, les valeurs de  $\tau$  intègrent également des variables dépendantes du système [325]. Comme l'efficacité peut varier entre différentes réponses, ces variations doivent être prises en compte lors de l'estimation de l'amplitude du biais en utilisant des coefficients de transduction. Pour ce faire, les ratios des ligands d'essai  $\log(\tau/KA)$  sont normalisés par rapport à l'efficience d'un standard choisi, ce qui donne des coefficients de transduction normalisés ou des valeurs  $\Delta \log(\tau/KA)$ . Puisque le standard et les ligands sont affectés de la même manière par les mêmes facteurs de confusion

du système, les réponses normalisées annulent le biais du système.  $\Delta \log (\tau / K A)$  est calculé en soustrayant le coefficient de transduction du standard de celui du ligand d'essai. Les coefficients de transduction normalisés peuvent être utilisés pour comparer statistiquement les efficacités de signalisation des ligands dans différentes voies, et pour déterminer à quel point un ligand peut être plus efficace (ou moins efficace) pour induire une réponse dans une voie par rapport à d'autres. Cette comparaison est établie en soustrayant les coefficients de transduction normalisés pour chaque voie ( $\Delta \Delta \log (\tau / K A)$ ) afin d'établir le facteur de biais ( $10^{\Delta \Delta \log (\tau / K A)}$ ) [329]. Puisque les facteurs de biais résultent de comparaison des coefficients de transduction normalisés à un standard commun, le biais est toujours exprimé par rapport à cette norme et varie avec.

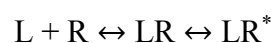
Pour conclure, cette méthode présente alors le grand avantage d'évaluer simultanément les paramètres de position et les réponses maximales et de quantifier le biais de façon indépendante des facteurs de confusion du système et de l'expérience [330]. C'est pour ces raisons que dans notre étude, nous avons utilisé le modèle opérationnel afin de quantifier de façon optimale le biais pour les agonistes du DOPr.

### 1.3.2 Les modèles mécanistiques

Le modèle opérationnel a été conçu pour faire des prédictions d'effet et simuler l'agonisme, mais il ne décrit pas spécifiquement le mécanisme d'action du médicament. D'autres modèles plus complexes ont été conçus pour ce faire. Pour les besoins de cette thèse, nous allons brièvement décrire ces modèles afin de montrer la progression qui a eu lieu avant d'arriver à la notion de sélectivité fonctionnelle définie plus bas. De plus amples informations sur tous ces modèles sont très bien décrites dans la récente revue de Kenakin [331].

#### 1.3.2.1 Modèle à deux étapes

Il a été établi en utilisant comme élément de base l'équation de la liaison d'action de masse avec deux variantes importantes, en particulier l'incorporation de la liaison en deux étapes et l'introduction de deux états du récepteur [332]. Si le ligand (L) se lie au récepteur (R) et le fait changer à la forme (R\*), le processus peut être décrit comme :



Où:

LR : représente un complexe intermédiaire inactif

LR\* : représente le complexe actif

Le ligand induit alors un changement conformationnel sur le récepteur qui donne la réponse du système. Cela se fait en deux étapes : tout d'abord le ligand forme un complexe intermédiaire inactif avec le récepteur (LR), ensuite, plus la vitesse du changement de conformation du récepteur est grande, plus la quantité du complexe LR\* sera grande et la réponse aussi. Un agoniste induit facilement la transformation conformationnelle du récepteur alors qu'un antagoniste en est incapable. Le modèle ne peut pas expliquer l'action des agonistes inverses, mais au moins, à l'époque, il a ouvert la nouvelle piste de changement conformationnel nécessaire pour la réponse.

#### 1.3.2.2 Modèle à deux états

Ce modèle propose que le récepteur soit en équilibre entre une conformation active et une conformation inactive selon une constante d'équilibre. Un agoniste possède une plus grande affinité pour la conformation active alors que l'agoniste inverse préfère la forme inactive. L'antagoniste n'a pas de préférence et lie les deux états de manière équivalente. Ainsi, les agonistes favorisent un déplacement de l'équilibre vers l'état actif, les agonistes inverses vers l'état inactif et les antagonistes ne changent pas l'équilibre à l'état basal [333].

#### 1.3.2.3 Modèle ternaire

Ce modèle, émis au début des années 80, était propre aux RCPG. Il a vu le jour suite à la découverte que les nucléotides de guanine pourraient affecter l'affinité des agonistes à travers des changements dans l'interaction entre les récepteurs et les protéines G. Cela suggère que la liaison se fait en deux étapes : liaison du ligand au récepteur et ensuite la complexation avec la protéine G [331]. Il existe alors un équilibre entre 4 états : un premier état constitué de l'agoniste, du récepteur inactif et de la protéine G dissociée (L+R<sub>i</sub>+G), un deuxième état constitué d'un complexe agoniste-récepteur inactif dissocié de la protéine G (LR<sub>i</sub>+G), un troisième constitué du complexe agoniste-récepteur actif dissocié de la protéine G (LR<sub>a</sub>+G) et finalement, un quatrième état constitué d'un seul complexe agoniste-récepteur actif-protéine G (LR<sub>a</sub>G) (figure

14). Ce modèle explique aussi l'activité constitutive du récepteur par engagement spontané de la protéine G par le récepteur.

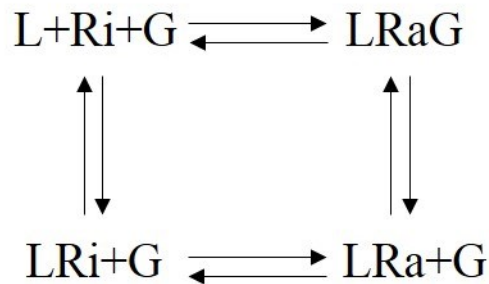


Figure 14. Modèle ternaire

L : ligand, Ri : récepteur inactif, Ra : récepteur actif, G : protéine G

Le modèle ternaire fut par la suite modifié pour y intégrer la notion d'activité basale du récepteur, ce qui explique l'action des agonistes inverses. Deux autres états ont vu le jour : un état constitué de l'agoniste, du récepteur activé et de la protéine G dissociée (LRa) et un état constitué du complexe récepteur activé-protéine G (RaG) (figure 15). Ce nouveau modèle donne naissance au complexe ternaire étendu [331].

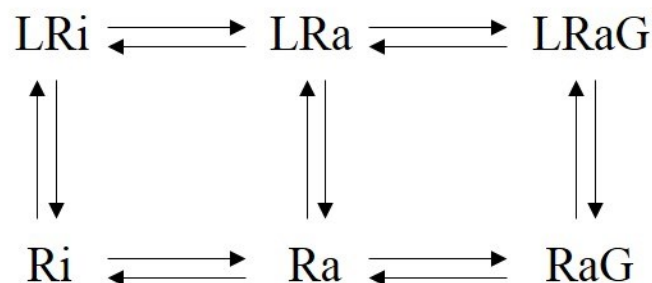


Figure 15. Modèle ternaire étendu

L : ligand, Ri : récepteur inactif, Ra : récepteur actif, G : protéine G

Ce modèle étendu ne permet pas d'obtenir les informations nécessaires pour comparer tous les types de ligands et c'est dans ce contexte que le complexe ternaire cubique a vu le jour,

permettant d'expliquer la possibilité au récepteur de lier la protéine G en présence d'antagonistes, en cas d'absence du ligand, ou en présence d'agonistes inverses. Les deux nouveaux états sont alors composés d'un complexe récepteur inactif-protéine G (RiG) et d'un complexe agoniste-récepteur inactif-protéine G (LRiG) (figure 16) [331].

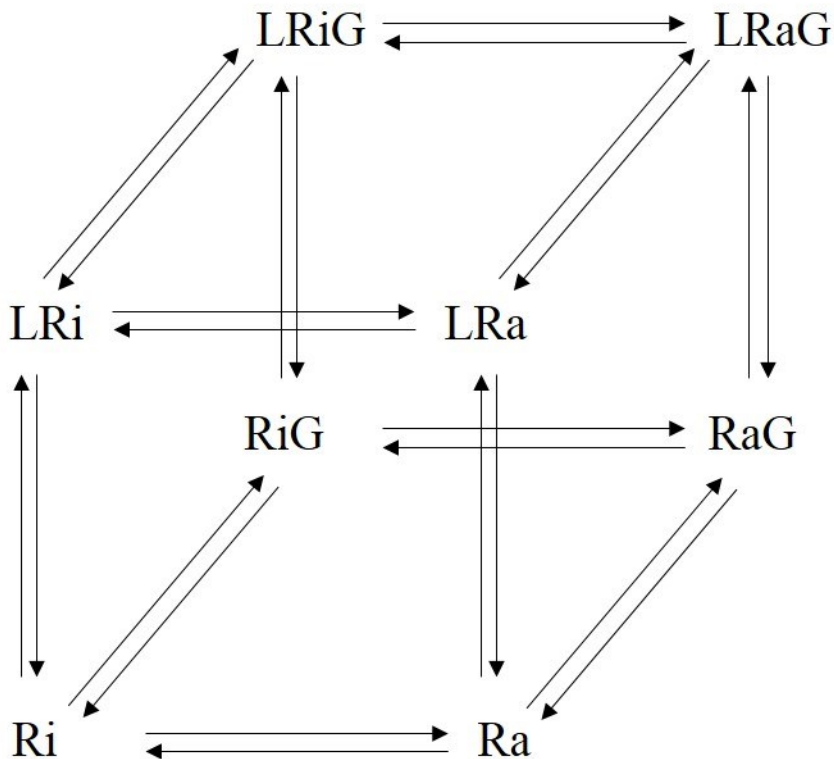


Figure 16. Modèle ternaire cubique

L : ligand, Ri : récepteur inactif, Ra : récepteur actif, G : protéine G

#### 1.3.2.4 Modèle probabiliste

Les modèles déjà cités représentent l'avantage d'en tirer une formule mathématique permettant de quantifier l'effet des différents ligands. Cependant, ils reposent sur la théorie que les RCPG ne possèdent qu'une seule conformation active responsable de tous les effets qu'un récepteur puisse donner. Le développement de différentes méthodes permettant de mesurer l'activité de différentes voies de signalisation, dépendante ou indépendante de l'activation de la protéine G, a donné naissance à un modèle élaboré à partir du calcul de probabilité et basé sur



la capacité de protéines d'adopter plusieurs conformations selon leur environnement [334]. En d'autres mots, le modèle probabiliste affirme que l'état du récepteur est représenté par une multitude de conformations différentes. La distribution de ces conformations est modifiée par la liaison d'un ligand, l'engagement de la protéine G et l'intervention des effecteurs. Un ligand stabilisant une distribution contenant des conformations plus actives ou plus de conformations actives par rapport à l'état basal est un agoniste pour la voie considérée. Un ligand stabilisant une distribution contenant des conformations moins actives ou en contenant moins sera un agoniste inverse. Un antagoniste ne change pas l'efficacité détectée sur une voie par rapport à l'efficacité basale. Ce modèle était fortement validé par de nombreuses études démontrant la présence de multiples conformations actives pour plusieurs RCPG [335-338] et a donné naissance durant la dernière décennie au nouveau concept pharmacologique de la sélectivité fonctionnelle des ligands [339].

#### **1.4 La sélectivité fonctionnelle**

Elle est définie par la capacité des ligands de stabiliser différentes conformations actives d'un récepteur qui sont sélectives pour certaines voies de signalisation ou de régulation sans activer l'ensemble des voies associées au récepteur [328] (figure 17). Cette capacité est déterminée par l'ensemble des interactions uniques que chaque complexe ligand-récepteur établit avec les effecteurs de ces signaux [339]. Elle est synonyme du biais ou de l'agonisme biaisé (défini à la section 1.3.1.2). Avec ce nouveau concept est née l'idée que l'identification de ligands sélectifs qui stabiliseraient spécifiquement certaines conformations de récepteurs pourrait permettre de cibler des voies de signalisation et donc d'obtenir les réponses pharmacologiques qui y sont associées. Ce nouveau paradigme est actuellement l'objet d'une attention considérable puisqu'il constitue théoriquement un moyen de dissocier les effets désirables d'un médicament de ses effets indésirables, à condition bien sûr, de connaître les signaux correspondant à chaque type de réponse [340].

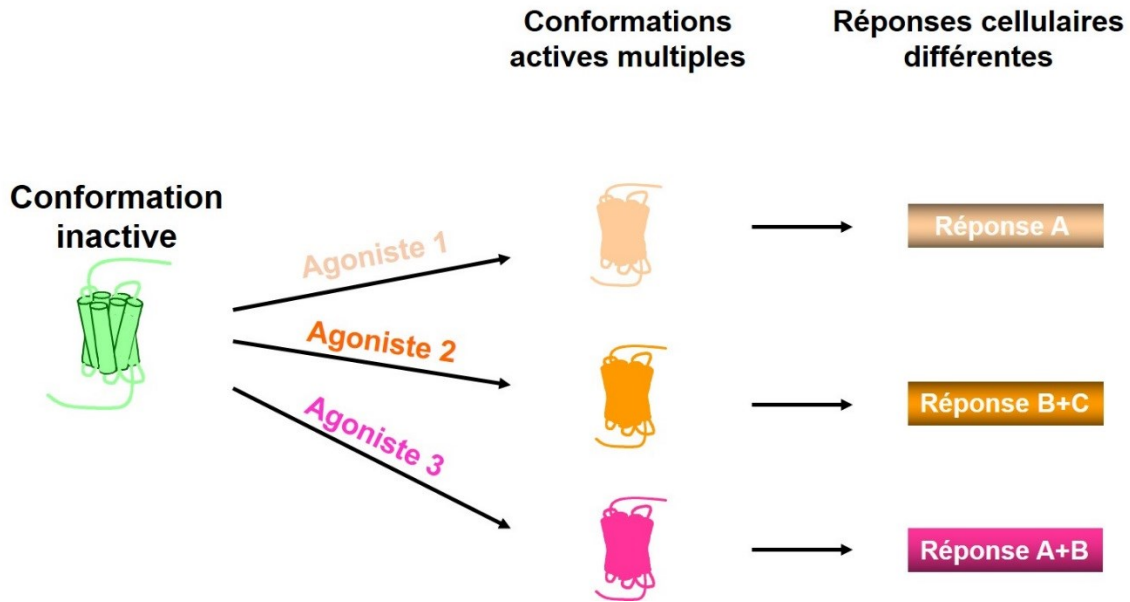


Figure 17. Sélectivité fonctionnelle.

Les conformations actives multiples du récepteur donnent des réponses cellulaires différentes.

L'approche expérimentale la plus fréquemment utilisée pour identifier l'agonisme biaisé des ligands opioïdes a été la comparaison des réponses induites par une seule concentration maximale efficace de différents agonistes [341,86,342]. Dans ce contexte, l'inversement de l'ordre des réponses maximales des ligands pour différents effets (par exemple signalisation vs internalisation) a souvent été interprété comme un biais. Ceci était le seul critère qui nous permet de tirer des conclusions sur l'existence d'un biais de ligands à partir des réponses maximales [343]. Quelles évidences de sélectivité fonctionnelle a-t-on pour le DOPr? L'agonisme biaisé a été mis en évidence en dévoilant les interactions uniques établies entre le récepteur activé par différents ligands et ses partenaires de signalisation en aval. Par exemple, la technologie de résonance des plasmons de surface a révélé que chaque complexe agoniste-DOPr présente des affinités distinctes pour différentes protéines  $G_{\alpha i/o}$  [344,345]. De même, la technique BRET a montré que les réarrangements conformationnels qui ont lieu à l'interface DOPr/protéine  $G_{\alpha}$  et ceux au sein des sous-unités de la protéine  $G_{\alpha\beta\gamma}$  sont spécifiques aux ligands et associés à des réponses en aval distinctes. Par exemple, l'activation du DOPr par SNC-80, DPDPE et morphine a réduit la distance entre la sous-unité  $G_{\alpha i1}$  et l'extrémité N-terminale de  $G_{\gamma}$ , mais les mêmes régions ont été séparées par le ligand TICP [346]. Bien que les premiers ligands aient inhibé la

production d'AMPC et favorisé l'activation de ERK, le TICP s'est comporté comme un agoniste inverse pour la voie de production d'AMPC et comme un agoniste dans la cascade MAPK [346,269]. Les mécanismes impliqués dans l'activation d'ERK par DPDPE et TIPP, un analogue de TICP, sont également différents. Alors que le DPDPE favorise la formation du complexe G $\beta\gamma$ -PLC $\beta$ 3-Src qui conduit à l'activation de MAPK via Raf-1, la stimulation par TIPP engage la  $\beta$ arr1/2 [215].

Le DOPr présente également, en dehors de la signalisation, des mécanismes de régulation (phosphorylation, internalisation...) spécifiques aux ligands. Les études de mutagenèse ont clairement établi que les différents agonistes peuvent phosphoryler le DOPr à différents domaines intracellulaires, ce qui implique que les récepteurs occupés par différents ligands exposent différents sites de phosphorylation aux kinases régulatrices [253,254]. Ainsi, le DPDPE et le SNC-80, stabilisant des conformations distinctes du récepteur au cours de sa désensibilisation (pour plus de détails, voir section 1.2.4.2.4) [85], différaient dans leur capacité à phosphoryler les résidus Ser/Thr en dehors de la queue C-terminale. En effet, le SNC-80 était le seul ligand capable de phosphoryler le mutant DOPr tronqué en C-terminal [347]. Bien que les résidus impliqués dans la réponse différentielle au DPDPE et au SNC-80 restent à déterminer, le troisième IL pourrait être un candidat probable puisqu'il contient des résidus Ser/Thr qui contribuent à la liaison à la  $\beta$ arr [313,314], une réponse qui est aussi distinctement engagée par les différentes conformations stabilisées par le DPDPE et le SNC-80 [85]. L'internalisation par les agonistes du DOPr a été comparée aux réponses protéines G dans les systèmes d'expression hétérologues [250] et les échantillons de cerveau *in vivo* [348]. Toutes ces études montrent qu'au moins un des ligands présente une internalisation minimale avec une signalisation maximale ou quasi maximale. Le déséquilibre observé a été interprété à plusieurs reprises comme un biais de ligand, mais la disproportion pourrait simplement être due à une amplification différente des réponses de signalisation et d'internalisation. Les agonistes partiels peuvent ainsi se comporter comme complets dans les systèmes amplifiés et les divergences peuvent être expliquées par une simple différence dans les efficacités des ligands, ce qui faussera l'évaluation du biais. Aussi, la disproportion systématique entre les effets maximaux ne permet pas de conclure sans ambiguïté si le déséquilibre est attribuable au ligand lui-même ou aux différences d'efficacité avec lesquelles le récepteur activé engage les étapes en aval soutenant la réponse (affinité fonctionnelle), comme déjà détaillé dans la section précédente. Encore une

fois, ces observations justifient notre utilisation de la méthode alternative du modèle opérationnel pour une mesure plus fiable du biais.

## 1.5 Trafic endocytyque et post-endocytyque

La tolérance à l'analgésie est reliée de façon étroite aux propriétés de trafic des ROs. Une meilleure compréhension des mécanismes à la base de ce trafic nous aidera à mieux comprendre les déterminants moléculaires de la perte de l'efficacité analgésique avec l'administration prolongée des opioïdes pour le développement rationnel de nouveaux opioïdes à activité prolongée. Dans la section suivante, nous explorerons d'abord le trafic endocytyque (internalisation) du DOPr. Ceci sera suivi d'un exposé des connaissances actuelles sur les propriétés du trafic post-endocytyque (recyclage).

### 1.5.1 Internalisation

La liaison de l'arrestine à la face cytoplasmique du récepteur occlut le site de liaison de la protéine G hétérotrimérique, empêchant son activation. D'autre part, l'arrestine lie le récepteur à des éléments de la machinerie d'internalisation, qui favorisent l'endocytose du récepteur et son transport subséquent vers des compartiments internes, appelés endosomes. En effet, les arrestines conduisent l'acheminement des récepteurs dans les puits recouverts de clathrine, une région spécifique de la membrane plasmique, via sa capacité à lier à la fois les RCPG et les protéines des puits recouverts de clathrine, à savoir la sous-unité  $\beta$  de la protéine adaptatrice de type 2 (AP2) et la chaîne lourde de la clathrine. Une fois que les RCPG sont concentrés dans ces puits, la scission des vésicules de la membrane plasmique implique l'action GTPase de la dynamine, qui est recrutée vers les puits entraînant l'internalisation du RCPG dans le compartiment endosomal [349]. L'internalisation peut être indépendante de la clathrine et fera intervenir les cavéoles, un type spécial de radeaux lipidiques contenant de petites invaginations (50-100 nanomètres) de la membrane plasmique en forme de flacons. Certains RCPG sont internalisés de façon indépendante de la dynamine, une protéine cytoplasmique à activité GTPasique associée à la clathrine facilitant la scission des vésicules à partir d'une membrane lipidique. Les petites protéines G de la famille Ras, Rab et ARF peuvent influencer la séquestration des RCPG [350]. De même, les modifications post-traductionnelles des

récepteurs, comme l'ubiquitination, la glycosylation et la palmitoylation affectent l'endocytose de certains RCPG.

La phosphorylation médiée par les GRKs favorise le recrutement de la  $\beta$ arr, entraînant l'accumulation du DOPr dans les puits recouverts de clathrine et son acheminement subséquent dans des endosomes après scission de la membrane par la dynamine [351,352]. La préincubation des cellules HEK293 exprimant de façon stable le DOPr avec les peptides DPDPE, DADLE ([D-Ala2, D-Leu5] enképhaline), deltorphine II ou les alcaloïdes comme le BW373U86 et l'étorphine aboutit à l'internalisation du récepteur, mais pas avec les alcaloïdes lévorphanol, morphine et oxymorphone [353,250]. Cette régulation différentielle du récepteur peut être due à des variations dans la capacité des agonistes à se lier au récepteur [353]. Au niveau des neurones de l'hippocampe et du striatum, le SNC-80 provoque une forte internalisation du DOPr alors que son dérivé proche, le ARM100390 ne le fait pas [348]. Il faut cependant noter que cette observation a été obtenue avec des souris transgéniques exprimant le DOPr étiqueté au GFP au niveau C-terminal. Une telle étiquette à une telle position pourrait affecter de façon considérable la liaison de la  $\beta$ arr et des autres protéines nécessaires pour l'internalisation dans la conformation stabilisée par l'ARM100390, donc ces observations sont à interpréter avec précaution. Le DOPr est aussi internalisé en réponse à une exposition prolongée à la dermenképhaline au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière de rat [354].

La mono-ubiquitination a été impliquée dans l'internalisation de certains RCPG. L'ubiquitination du DOPr n'est cependant pas essentielle pour son internalisation puisque la mutation exhaustive des résidus lysine cytoplasmiques (auxquels se lie l'ubiquitine) n'a pas inhibé l'endocytose du DOPr dans les cellules HEK293 [355]. Le domaine C-terminal du DOPr joue un rôle notable pour son internalisation. La troncature des 15 ou 37 derniers résidus du DOPr a complètement bloqué l'internalisation induite par le DPDPE dans les cellules CHO [356]. On a constaté cependant que l'étorphine et le DADLE ont été capables d'induire l'endocytose du DOPr tronqué dans les cellules HEK293 [357]. Par ailleurs, le DOPr portant des sites de phosphorylation mutés au niveau C-terminal n'est pas internalisé. Pour expliquer ces résultats, Whistler et al. ont suggéré que la queue C-terminale du DOPr peut servir comme «frein» dépendant de la phosphorylation, qui empêche l'interaction entre le DOPr et la  $\beta$ arr en l'absence d'agoniste [358]. La phosphorylation du DOPr par la GRK2 joue un grand rôle dans l'induction de son internalisation, dans différentes lignées cellulaires et avec différents agonistes

[359,356,352,360]. Cependant, l'équipe de Zhang et al. a démontré que le DOPr peut internaliser dans les cellules HEK293 de façon indépendante de la GRK2 [248]. L'inhibition de la protéine G par la PTX ne prévient pas l'internalisation du DOPr stimulé par le DPDPE dans les cellules de neuroblastomes de souris [361]. En revanche, dans les cellules HEK293 exprimant de façon stable le DOPr, le prétraitement à la PTX inhibe de 60% la capacité de l'agoniste DTLET à induire l'internalisation du récepteur [271]. L'équipe de Traynor et al. a démontré qu'au niveau des cellules HEK293, le DOPr peut être phosphorylé et internaliser de façon dépendante de la protéine G. Cependant une voie alternative indépendante de la protéine G et de la GRK2 existe [250]. En effet, cette équipe a démontré que l'internalisation du DOPr par le DPDPE a été ralentie en présence de PTX (toxine inhibant la protéine *Gai/o*), mais le taux d'internalisation a été le même au bout de 6h.

L'activation hétérologue de la PKC au niveau des cellules HEK293 stimule la phosphorylation du DOPr au niveau de la sérine à la position 344, induisant son internalisation dépendante de la  $\beta$ arr et la clathrine [264]. La capacité du DOPr de recruter la  $\beta$ arr sans être phosphorylé a été illustrée dans les essais où les sites de phosphorylation induite par l'agoniste ont été mutés [248]. Plusieurs études ont démontré l'implication de la  $\beta$ arr2 dans l'internalisation du DOPr. En effet, la déplétion de cette protéine régulatrice bloque son internalisation induite par le DPDPE dans les cellules HEK293 et sa surexpression l'augmente [248]. Ceci a été aussi démontré dans les cellules de fibroblastes embryonnaires de souris [315].

En conclusion, l'internalisation du DOPr est alors un phénomène qui peut être médiée par différents intervenants et dont les mécanismes varient selon le ligand activant le récepteur.

## 1.5.2 Trafic post-endocytaire

### 1.5.2.1 Propriétés de trafic du récepteur opioïde delta suite à son internalisation

Il y a de nombreuses années, il a été démontré que l'endocytose du DOPr aboutissait à la régulation négative des récepteurs en initiant leur délivrance vers les lysosomes pour la destruction protéolytique ultérieure [362]. Cette hypothèse a été fortement soutenue au cours des années, à la fois dans les modèles cellulaires et les neurones natifs [65,363]. Le DOPr internalisé engage un complexe protéique de tri endosomal appelé ESCRT (de l'anglais endosomal sorting complex required for transport). Ce complexe reconnaît les récepteurs

ubiquitinés et conduit leur acheminement vers la lumière des corps multivésiculaires (MVB), qui fusionnent plus tard avec les lysosomes [364]. Pour certains récepteurs, tels que l'EGFR, le transfert des récepteurs ubiquitinés vers la lumière de l'endosome est essentiel pour leur envoi vers les lysosomes. En effet, si l'ubiquitination de l'EGFR est abolie, les EGFR intériorisés recyclent de manière aberrante vers la membrane plasmique [365]. Les DOPr sont également ubiquitinés après leur activation par l'agoniste (dans la première boucle cytoplasmique par la protéine interagissant avec l'atrophine de type 4) et ils traversent les MVB typiques [366,367]. Cependant, contrairement à l'EGFR, ni l'ubiquitination du DOPr ni son transfert vers la lumière des MVB ne sont essentiels pour son acheminement subséquent aux lysosomes [367,355]. Des efforts étaient alors déployés pour comprendre le mécanisme de triage post-endocytaire du DOPr et dans ce contexte, il a été démontré que le DOPr interagit avec le GASP (protéine de triage associée aux RCPG) [368-370]. Le GASP est une protéine cytoplasmique exprimée dans plusieurs tissus et abondamment retrouvée dans le cerveau. Elle interagit de manière sélective avec un sous-ensemble de RCPG et module leur tri endocytaire vers les lysosomes en faisant intervenir la dysbindine : une protéine cytoplasmique qui intervient dans la biogenèse de structures spécialisées apparentées aux lysosomes. En effet, le GASP et la dysbindine relient certains RCPG à la machinerie ESCRT. Dans ce contexte, la dysbindine favorise le tri du DOPr vers les lysosomes et relie le GASP à la composante HRS de la machinerie ESCRT [369] et l'interférence avec l'interaction GASP-DOPr par mutation du récepteur ou surexpression d'un dominant négatif de GASP inhibe le trafic des récepteurs vers les lysosomes et favorise leur recyclage [370]. Le GASP se lie préférentiellement à la queue cytoplasmique du DOPr non ubiquitiné [370] et cette machinerie retient efficacement les DOPr dans la membrane limitant les endosomes. En conséquence, l'engagement du DOPr par le complexe GASP favorise la dégradation des récepteurs internalisés indépendamment de l'ubiquitination du récepteur ou de son transfert à la lumière des MVB. Ceci fournit effectivement une flexibilité supplémentaire dans l'itinéraire de trafic post-endocytaire du DOPr, permettant au récepteur de rester dans la membrane endosomale limitante pendant une période de temps prolongée par rapport à l'EGFR [371]. Il a été également démontré que l'inactivation génique du GASP abolit la tolérance analgésique aux cannabinoïdes comme le WIN55,212-2 [372], ce qui tisse un lien étroit entre les propriétés de trafic post-endocytaire et le développement de la tolérance analgésique.

Cependant, la régulation négative lysosomale n'est pas le seul devenir post-endocytaire du DOPr. Il varie plutôt en fonction de l'engagement du récepteur de différentes machineries de triage discrètes qui dictent spécifiquement le sort du récepteur suite à son internalisation. En effet, une fraction du DOPr internalisé recycle à la membrane plasmique, et le taux de recyclage du DOPr peut être assez important dans certains cas [373,363]. Généralement, le recyclage dépend de l'agoniste associé au récepteur et est favorisé par des périodes courtes de stimulation [85,374]. Les différentes conformations du récepteur stabilisées par différents ligands déterminent son interaction distincte avec des protéines de tirage spécifiques décidant de son sort vers la voie de recyclage ou bien celle de dégradation. L'association de la  $\beta$ arr1/2 avec les queues C-terminales du DOPr phosphorylées et non phosphorylées a été corrélée avec des itinéraires post-endocytiques distincts; les DOPrs dépourvus de ces sites de phosphorylation ont été préférentiellement ciblés par la  $\beta$ arr2 vers la voie de dégradation tandis que les récepteurs de type sauvage ont été partiellement recyclés vers la membrane plasmique via leur interaction avec les deux  $\beta$ arrs [316]. Ainsi, le trafic post-endocytaire du DOPr peut être régulé par la phosphorylation catalysée par la GRK2 ainsi que les différentes isoformes de la  $\beta$ arr. Aussi, comme déjà détaillé dans la section 1.2.4.2.4, la nature de l'association au sein du complexe DOPr/ $\beta$ arr2/G $\beta$  $\gamma$  a modulé la capacité de recyclage du récepteur. Les interactions distinctes avec la  $\beta$ arr constituent alors un mécanisme qui module le sort du récepteur vers la voie de recyclage ou ailleurs [85].

Les différences de triage du récepteur ont aussi été attribuées à une sensibilité spécifique des ligands aux enzymes de conversion de l'endothéline ECE2. Lorsque le récepteur est occupé par des peptides qui agissent comme des substrats de convertase comme la deltorphine II, il peut recycler à la membrane plasmique suite à sa libération après dégradation du ligand par cette peptidase favorisant sa resensibilisation. Ceci n'a pas été le cas pour le SNC-80 ou la leu-enképhaline (qui ne sont pas des substrats de l'ECE2), ce qui soutient le rôle d'ECE2 dans la modulation différentielle de la signalisation des ROs occupés par différents agonistes peptidiques [375]. En outre, bien que les drogues administrées de manière exogène et les opioïdes endogènes entraînent l'endocytose du DOPr *in vivo*, les récepteurs s'accumulent dans différents compartiments cellulaires [376]. Cette toute récente découverte de l'équipe de Mark Von-Zastrow a révélé, à l'aide d'une élégante approche utilisant un biocapteur génétiquement



codé de la forme active des ROs, que le MOPr et le DOPr activés par les ligands peptidiques endogènes produisent de la signalisation aussi bien au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau des endosomes après leur internalisation. Les drogues exogènes non peptidiques qui traversent la membrane plasmique produisent un schéma différent en activant de façon unique les ROs au niveau de l'appareil de Golgi somatique et dendritique [377]. Ainsi, le sort du DOPr semble être flexible et soumis à un contrôle différentiel par les ligands naturels et exogènes, à la fois dans les modèles de systèmes cellulaires et *in vivo*.

Plusieurs éléments de preuve suggèrent que l'engagement du DOPr de plusieurs machineries endosomiques ait de la signification physiologique. Premièrement, la machinerie GASP est soumise à un contrôle par des protéines de signalisation conventionnelles telles que les protéines G hétérotrimériques [378]. Deuxièmement, il existe des preuves que GASP contrôle divers processus de signalisation non canoniques, tels que la liaison à des facteurs de transcription spécifiques [379] ou la régulation de l'autophagie [368]. Troisièmement, en conservant les récepteurs dans les membranes endosomales sans leur transfert dans la lumière de l'endosome, la machinerie GASP pourrait également supporter une signalisation des protéines G plus conventionnelle initiée au niveau de la membrane limitant les endosomes, les évidences de signalisation endosomale sont de plus en plus décrites pour plusieurs RCPG [380,381,310,382]. Ceci est aussi corroboré par la toute récente publication de l'équipe de Mark Von-Zastrow citée un peu plus haut [377].

#### 1.5.2.2 Voies de recyclage et propriétés moléculaires sous-jacentes

Jusque-là, nous avons rapporté certains éléments (peu nombreux) contribuant au trafic post-endocytaire du DOPr. On en sait beaucoup moins sur l'itinéraire précis suivi par le récepteur suite à son internalisation et son évolution à travers le réseau endosomal. Plusieurs voies de recyclage sont impliquées dans le trafic post-endocytaire des RCPG. Les RCPG internalisés se lancent dans un itinéraire long et tortueux. Ils sont amenés avec ou sans  $\beta$ arr au niveau des endosomes. Les récepteurs de la famille A tels que le  $\beta$ 2AR et le MOPr interagissent faiblement avec la  $\beta$ arr et recyclent rapidement à la membrane plasmique, alors que les récepteurs de classe B, y compris les récepteurs d'hormones peptidiques tels que le récepteur de la vasopressine de type 2 (V2R) et le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (PTHrP)

présentent une liaison plus forte et plus stable avec la  $\beta$ arr et subissent une endocytose soutenue avec une faible capacité de recyclage [383]. Les endosomes ou plus correctement, le réseau endosomal, est un réseau tubulovésiculaire très élaboré et dynamique qui contrôle le traitement et le triage des protéines. Les endosomes mûrissent de l'état précoce à l'état tardif, se caractérisant par le recrutement et la présence de la petite GTPase Rab5 pour les endosomes précoces, Rab7 pour les endosomes tardifs et Rab4 ou 11 pour les endosomes de recyclage rapide et lent, respectivement [383]. La maturation des endosomes et le trafic du RCPG à travers ce réseau impliquent l'acidification de la lumière de l'endosome. Le triage spatio-temporel des RCPG est crucial pour déterminer la durée et l'ampleur de la signalisation endosomale ainsi que pour la préservation de l'homéostasie du récepteur [382]. Plusieurs destinations s'offrent au récepteur suite à son engagement dans le réseau endosomal: (1) la voie de recyclage rapide à partir des endosomes précoces (2) la voie de recyclage lent via le réseau du trans-Golgi (TGN), ces deux voies conduisent à la resensibilisation du récepteur au niveau de la surface cellulaire (3) la voie lysosomale responsable de sa dégradation, entraînant une régulation négative du récepteur au niveau de la membrane plasmique et une désensibilisation prolongée du récepteur (figure 18). Le sort du récepteur dépend de sa capacité à être reconnu par des adaptateurs moléculaires distincts qui les relient aux différents complexes de triage assemblés à la surface des endosomes [383]. Dans ce qui suit, nous allons décrire les différentes voies de recyclage connues, en clarifiant les différents partenaires définissant chacune d'elles.

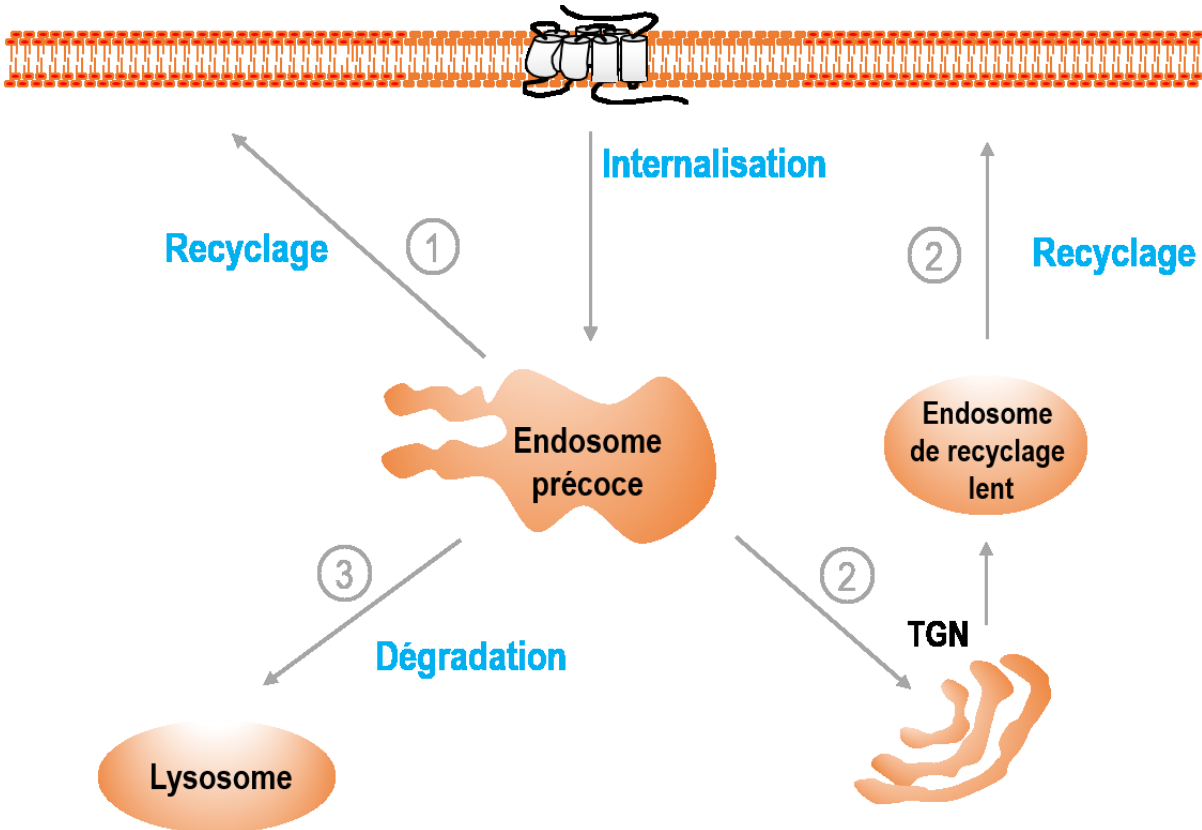


Figure 18. Voies post-endocytiques des RCPG

Plusieurs destinations s'offrent au récepteur suite à son internalisation : (1) la voie de recyclage rapide à partir des endosomes précoces (2) la voie de recyclage lent via le réseau du trans-Golgi (TGN) et (3) la voie lysosomale responsable de sa dégradation.

#### 1.5.2.2.1 Le recyclage rapide des récepteurs couplés aux protéines G à partir des endosomes précoces

Pour ce type de recyclage, le complexe ASRT (Actine-SNX27-Rétromère-Tubules) apparaît parmi les régulateurs principaux [384]. C'est un complexe multiprotéique composé de SNX27 et de la partie du rétromère reconnaissant le cargo (voir définition du rétromère dans la section 1.5.2.2.2.1), qui fonctionnent en association avec l'actine via le complexe WASH (de l'anglais Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homolog) pour organiser l'assemblage des tubules sur les endosomes précoces, dans lesquels les protéines cargo sont réintégrées dans la membrane plasmique par des intermédiaires de recyclage [385]. Le complexe WASH active la polymérisation de l'actine au niveau des endosomes [386]. Le SNX27 possède un domaine

PX liant les lipides qui l'ancre à la surface des endosomes [387]. Il contient également un domaine PDZ lui permettant d'interagir avec de nombreuses protéines membranaires, y compris les RCPG. En même temps, le domaine PDZ sert de site de liaison au Vps26 qui, à son tour, stabilise et améliore les interactions SNX27-PDZ avec les protéines cargo [388]. De cette manière, le SNX27 fonctionne comme un «sélecteur de cargo» pour le complexe de trafic ASRT (figure 19). L'inhibition de SNX27 ou de la partie du rétromère reconnaissant le cargo par des ARN interférents a conduit à une réduction du recyclage du PTHR et/ou de sa disponibilité à la surface cellulaire. Paradoxalement, en dépit de la régulation négative du récepteur, l'inhibition de l'ASRT coïncidait avec une signalisation AMPc élevée dans endosomes des cellules HEK293 [389] et dans les ostéoblastes [390,391]. Ensemble, ces études impliquent que le complexe ASRT fonctionne comme un «frein moléculaire» pour contrôler la signalisation du PTHR au niveau des endosomes. Ce mécanisme a aussi été établi pour le  $\beta$ 2AR. En effet, il a été établi que l'ARRDC3 (protéine contenant le domaine arrestine de type 3), une protéine auxiliaire au complexe ASRT et un membre de la famille des arrestines visuelles et des protéines apparentées à Vps26, prolonge l'occupation endosomale et la signalisation AMPc du  $\beta$ 2AR [392]. Bien que plus de travaux soient nécessaires pour apprécier l'ensemble des protéines qui peuvent se croiser avec le réseau ASRT, il semble qu'en plus de sa fonction canonique pour diriger les récepteurs dans les tubules de recyclage, le complexe ASRT est capable d'intégrer la terminaison de la signalisation des RCPG au niveau des endosomes avec le triage post-endocytique.

Le recyclage rapide vers la membrane plasmique peut également se faire de façon indépendante du complexe ASRT. Cette hypothèse est basée sur l'observation que les récepteurs mutés au niveau de leur motif de liaison PDZ recyclent à la même vitesse que le récepteur naïf [383]. Cette voie fonctionne par un ou plusieurs mécanismes distincts. Une possibilité est que le SNX27 est remplacé par d'autres protéines adaptatrices du PDZ. Aussi, les GTPases de la famille Rab4 sont présentes sur la membrane des endosomes précoces où elles assurent le recyclage rapide dépendant ou indépendant de l'ASRT (figure 19). Le Rab4 assure le recyclage rapide de plusieurs RCPG des endosomes précoces vers la membrane plasmique, y compris le GPR40 [393], le récepteur de bradykinine de type II [394], le récepteur de l'ADP P2Y12 [395], le récepteur dopaminergique D2 [396], le  $\beta$ 2AR [397], le MOPr [398] et les récepteurs de l'ocytocine [399]. Nous définirons cette classe de GTPases dans la section 1.5.2.2.3.1.

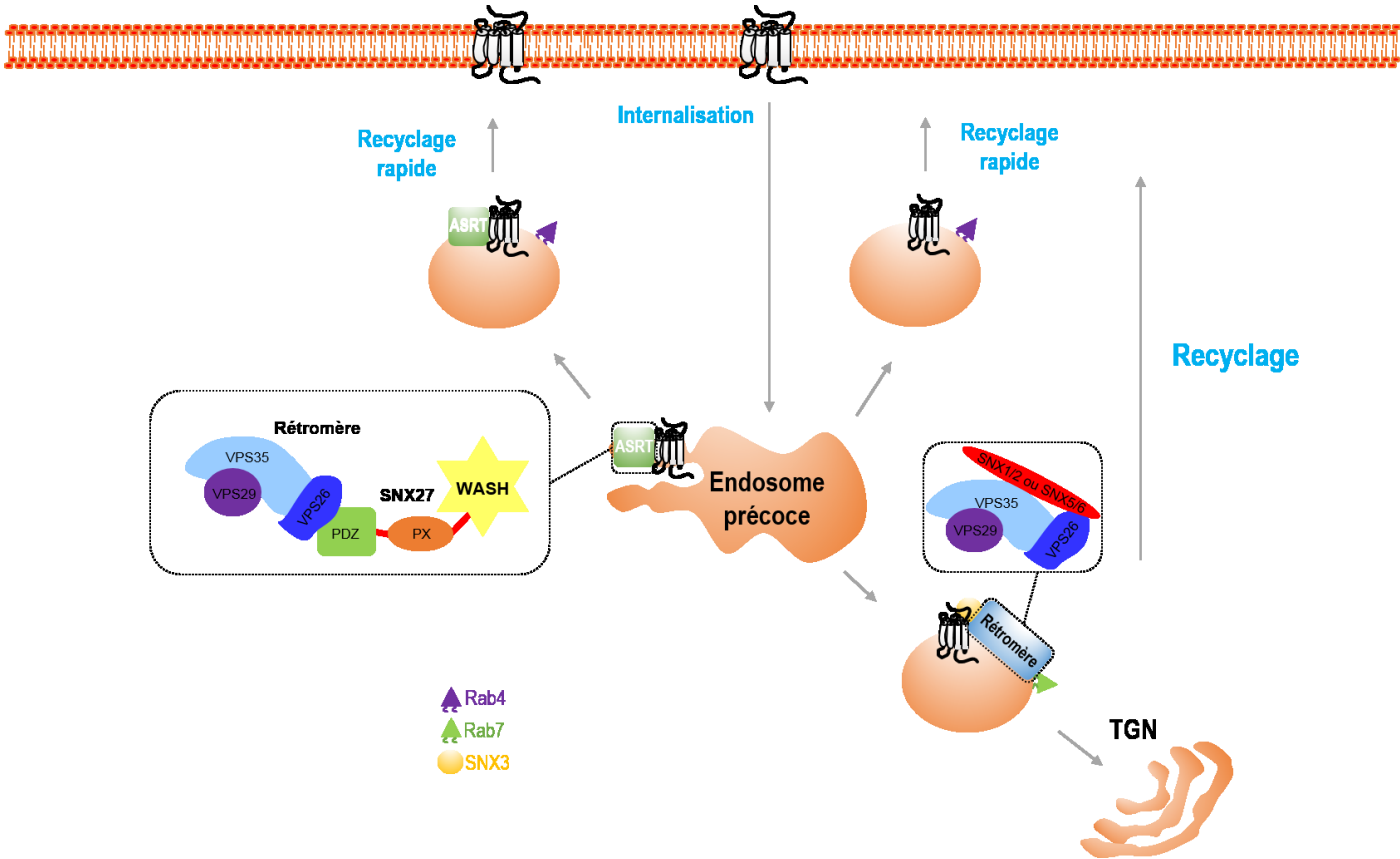


Figure 19. Recyclage à partir des endosomes précoces

Lors de l'activation induite par le ligand, les RCPG sont internalisés dans les endosomes précoces pour le triage. À ce niveau, les RCPG contenant des motifs de liaison PDZ C-terminaux sont reconnus par des protéines adaptatrices contenant le domaine PDZ telles que SNX27, qui travaille en conjonction avec le rétromère et le complexe WASH (voir l'inset à gauche). Après le tri, les récepteurs sont emballés dans des tubules de recyclage qui émanent et bourgeonnent à partir des membranes des endosomes précoces. Ces intermédiaires de recyclage transportent les RCPG vers la membrane plasmique, ce qui conduit à une resensibilisation au niveau de la surface cellulaire. Le recyclage des RCPG à la membrane plasmique à partir des endosomes précoces peut se faire via trois itinéraires de trafic différents : recyclage des endosomes précoces vers la membrane plasmique via le complexe ASRT, recyclage vers la membrane indépendamment du complexe ASRT avec intervention de la GTPase Rab4 ou transport rétrograde des endosomes vers le TGN puis vers la membrane plasmique en faisant intervenir le rétromère (voir l'inset à droite) ainsi que le Rab7 et le SNX3 dans certains cas.

#### 1.5.2.2.2 Recyclage via le réseau trans-Golgi

Il a été établi que le récepteur de type 2A de la somatostatine et le récepteur de chimiokine CCR5 progressent vers le TGN à partir des endosomes précoces [400] pour ensuite recycler à la surface cellulaire. Ainsi, le TGN est impliqué dans le trafic rétrograde et le

recyclage de certains RCPG internalisés. Dans ce qui suit, nous allons décrire les différentes étapes menant au recyclage membranaire à travers le TGN à savoir le transport rétrograde (il sera décrit brièvement, n'étant pas un des objectifs de l'étude), la fusion des vésicules avec le TGN et la biogenèse des transporteurs.

#### 1.5.2.2.2.1 Transport rétrograde

Le trafic rétrograde par lequel les protéines membranaires sont triées et transportées des endosomes au TGN est régulé principalement par le rétromère. Chez l'humain, le rétromère est un complexe protéique pentamérique composé d'un sous-complexe formé de deux SNX (de l'anglais Sorting Nexin) : (SNX1 et SNX2 ou SNX5 et SNX6) et d'une sous unité trimérique VPS (de l'anglais Vacuolar Protein Sorting) : (Vps26/Vps29/Vps35) (figure 19) [401]. Bien que le dimère SNX soit requis pour le recrutement du rétromère à la membrane endosomale et sa remodulation pour la formation de tubules et de vésicules, la fonction de liaison aux protéines cargo est attribuée au trimère Vps26/Vps29/Vps35 par la liaison de la sous-unité Vps35 à diverses protéines incluant le M6PR (récepteur du mannose-6-phosphate), le wntless (récepteur du WNT) et la sortiline [402]. Le SNX3 peut également jouer un rôle dans le transport rétrograde du Wntless et avec Rab7, participe au recrutement du rétromère [403] (figure 19).

#### 1.5.2.2.2.2 Fusion des vésicules avec le réseau trans-Golgi

Elle est principalement médiée par au moins deux types de molécules de liaison: les golgines et le complexe d'attache GARP (Golgi-Associated Retrograde Protein) [404]. Différentes golgines régulent la fusion de différents types de vésicules. Par exemple, la golgine GCC88 est requise pour la récupération du TGN38 et le GCC185 est nécessaire pour le transport rétrograde de la toxine Shiga. De plus, la structure spiralée des golgines leur permet de se lier avec de nombreuses GTPases Rab; GCC88 a montré des interactions avec Rab6, Rab19 et Rab30 au Golgi, et GCC185 avec Rab15 sur les endosomes précoces et Rab9 sur les endosomes tardifs [404]. Cette capacité suggère que les golgines peuvent servir non seulement comme protéines d'attache, mais aussi comme plate-forme pour le recrutement de plusieurs effecteurs impliqués dans le trafic rétrograde en aval. Le complexe GARP est composé de quatre sous-unités, y compris Vps51, 52, 53 et 54 et régule le processus de fusion en favorisant l'assemblage

du complexe SNARE. Le recrutement de GARP au TGN fait intervenir le Rab6. Il n'est pas clair si les golgines et GARP travaillent séparément ou ils coopèrent d'une manière ou d'une autre dans le processus de fusion rétrograde. Néanmoins, les deux rattachent les vésicules au TGN, ce qui amène le complexe SNARE vésiculaire au voisinage du complexe SNARE de la membrane du TGN. Les interactions entre les complexes SNARE amarrent les deux membranes conduisant à la fusion des deux compartiments [404].

#### 1.5.2.2.2.3 Biogenèse des transporteurs au niveau du réseau trans-Golgi

Une fois au niveau du Golgi, les stades séquentiels de la biogenèse des transporteurs incluent le tri et la ségrégation du cargo dans les domaines d'exportation tubulaires, l'extrusion de ces domaines le long des microtubules à l'aide de moteurs moléculaires et la fission tubulaire pour la génération de vésicules qui seront alors acheminées en dehors du TGN. Chacune de ces étapes implique une machinerie à plusieurs composantes, dont seulement certaines ont été identifiées à ce jour [405]. Nous allons détailler ces différents stades de biogenèse des transporteurs en précisant les acteurs les mieux connus de chaque étape.

##### 1.5.2.2.2.3.1 Tri et ségrégation du cargo

Les petites GTPases de la famille du facteur de ribosylation de l'ADP (ARF) sont des régulateurs principaux de la structure et de la fonction du complexe de Golgi et elles sont impliquées dans plusieurs voies de sortie du TGN. Une fois activé par des facteurs d'échange nucléotidiques spécifiques, ARF1 favorise le recrutement de complexes protéiques cytosoliques capables de reconnaître les motifs de triage du cargo et de fixer la clathrine, fonctionnant ainsi comme un adaptateur entre le cargo et la clathrine [406]. Il a récemment été montré que la clathrine était impliquée dans le transport entre le TGN et la membrane plasmique [407]. De nombreux adaptateurs d'ARF sont présents au TGN. On peut en citer la PLD, les protéines adaptatrices AP1-4 intervenant dans le triage du cargo et les protéines GGA (de l'anglais Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein family) qui ciblent les protéines vers le TGN et permettent leur dissociation de certaines membranes et leur interaction avec le ARF activé [408]. De ce fait, ARF est responsable du tri et de la ségrégation physique du cargo dans les différents domaines du TGN, la première étape qui favorise l'évolution du cargo au sein du TGN avant d'arriver à la porte de sortie [406].

#### 1.5.2.2.3.2 Extrusion le long des microtubules

L'ARF activé recrute et active aussi l'actine [409]. L'actine fait partie du complexe dynamine/actine/cortactine, toutes recrutées par l'ARF activé. Ce complexe assure un rôle clé dans la fission des vésicules tout au long de leur progression au sein du TGN. La petite GTPase CDC42A est une régulatrice de la polymérisation de l'actine qui se lie au complexe de Golgi lors de l'activation d'ARF. Dans le complexe de Golgi, la CDC42A régule la dynamique d'un groupe local de courts filaments d'actine et à travers cet effet contrôle la polarisation des marqueurs du trafic, en plus du transport vers les membranes basolatérales et apicales dans les cellules épithéliales. Dans ces cellules, le trafic du M6PR du TGN vers les endosomes tardifs repose sur HIP1R, une protéine qui interagit avec la cortactine et assure l'interface entre la clathrine et la machinerie de polymérisation de l'actine [410]. Pour supporter encore plus ce rôle de la dynamique de l'actine au niveau du TGN, les agents qui dépolymérisent l'actine inhibent le transport basolatéral et apical à partir du TGN [411], comme le fait la cytochalasine D [412]. La kinase LIMK1 liée à CDC42 réside dans le Golgi des neurones et régule la polymérisation d'un groupe local d'actine grâce à l'interaction avec la cofiline. Cette machinerie assure alors le trafic de plusieurs protéines, particulièrement au niveau des neurones [413]. On peut alors bien noter les différences et similitudes des mécanismes de trafic à travers le TGN selon le type de cellules étudiées (cellules épithéliales versus neurones), à prendre donc en considération lors des études mécanistiques. La kinase LIMK1 a été impliquée dans le transport du DOPr du TGN vers la membrane comme mentionné dans la section 1.1.4.2. Ce transport du DOPr implique également le recrutement de ROCK, une sérine/thréonine kinase qui assure la phosphorylation de LIMK résultant en son activation [414]. Les agonistes des DOPr activent la cofiline à travers le ROCK, le LIMK et la  $\beta$ arr1 pour réguler la polymérisation de l'actine. Ceci contrôle la fonction du récepteur, telle qu'évaluée par l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants induite par l'agoniste du DOPr dans les neurones des DRG. Les agonistes des NOPr influencent de manière similaire la fonction de ce récepteur à travers la machinerie ROCK/LIMK/ $\beta$ -arr1. L'importance fonctionnelle de cette cascade a été démontrée *in vivo* où les effets fonctionnels des agonistes du DOPr ou NOPr ont été améliorés en absence de  $\beta$ arr1 ou réduits en inhibant ROCK [63]. Détaillons plus cette observation pour le DOPr.

Dans les conditions normales, la liaison de l'agoniste sur le DOPr engendre l'activation de la cofiline via la voie ROCK/LIMK. Cependant, comme la  $\beta$ arr1 est associée à LIMK et à



l'une des phosphatases de cofiline SSL [415], une activation accrue, mais locale de la cofiline se produit. Cela se traduit par une séparation contrôlée des filaments d'actine pour réguler la stabilité d'un sous-ensemble de filaments dans le TGN. Ceci contrôle le taux de DOPrs exportés du Golgi vers la membrane cellulaire pour permettre une réponse limitée à un agoniste tel que le SNC-80 (figure 20). En l'absence de  $\beta$ arr1, le SNC-80 active de manière similaire le LIMK par la voie ROCK, mais sans le contrôle régulateur de  $\beta$ arr1, la cofiline n'est pas déphosphorylée et activée par SNC-80 [416]. Cela augmente la stabilité de l'actine et entraîne une exportation accrue des DOPrs vers la membrane plasmique, augmentant leur fonction (figure 20). Cette voie peut être bloquée en inhibant ROCK. En prévenant l'activation de cette voie induite par l'agoniste, l'activation d'un sous-ensemble de filaments d'actine dans le Golgi ne se produit pas et les récepteurs supplémentaires ne sont pas libérés vers la membrane cellulaire. Sans cette activation, l'effet fonctionnel de l'agoniste est limité [63].

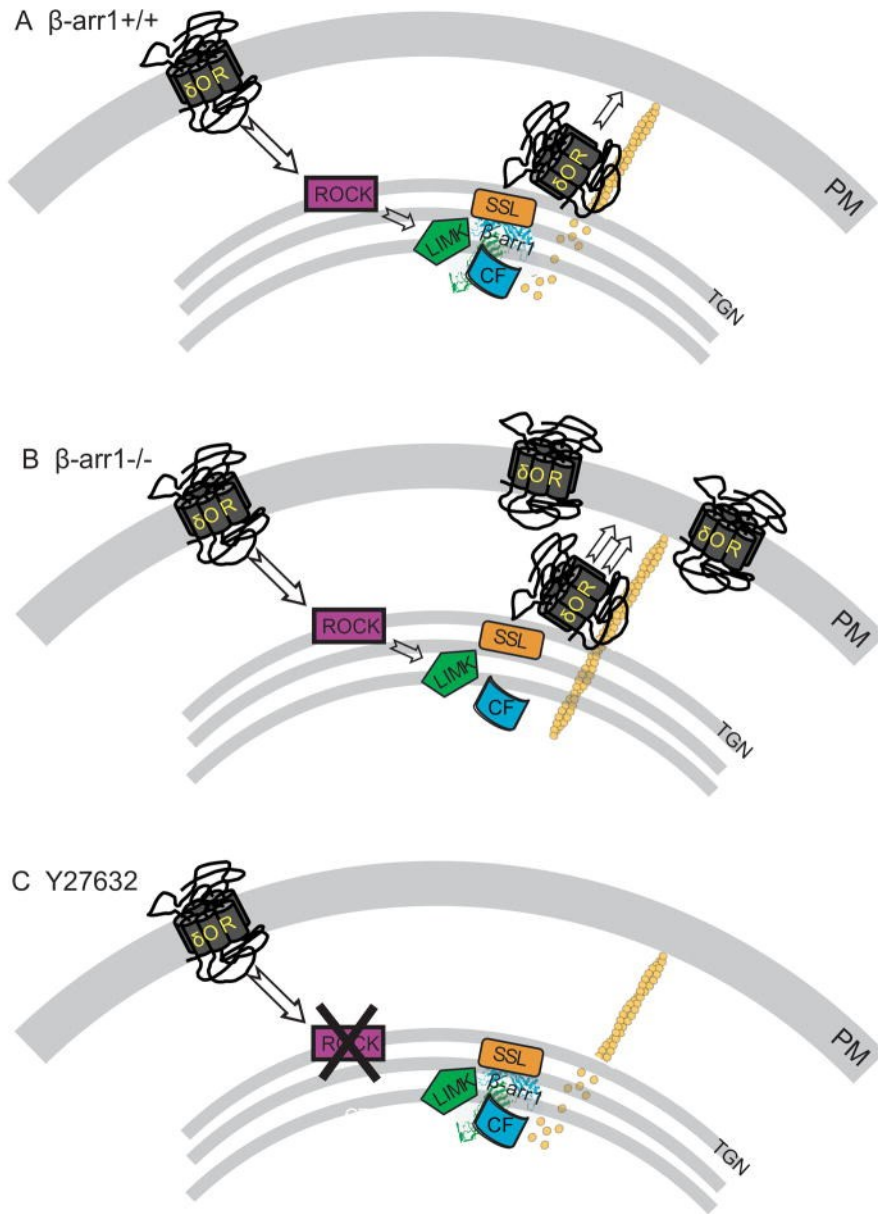


Figure 20. Régulation de la fonction du DOPr

A.  $\beta\text{-arr1}^{+/+}$ : Dans les neurones contenant la  $\beta\text{arr1}$ , l'agoniste SNC-80 se lie au DOPr et active ROCK. Comme  $\beta\text{arr1}$  est associée à LIMK et à l'une des phosphatases, éventuellement SSL dans le TGN, elle active la cofiline pour augmenter la dépolymérisation des filaments d'actine et réguler la libération du DOPr vers la membrane. B.  $\beta\text{arr1}^{-/-}$ . Sans le contrôle inhibiteur de  $\beta\text{arr1}$ , LIMK phosphoryle et inactive la cofiline. Cela laisse les polymères d'actine stables en place pour permettre la libération du DOPr non régulée, mais agoniste-dépendante à la membrane plasmique. C. Y27632. L'inhibition de la phosphorylation de LIMK par ROCK (en appliquant son inhibiteur Y27632) empêche l'activation de cette voie par le DOPr et sa libération induite par l'agoniste à la membrane cellulaire. Figure adoptée de [63].

#### 1.5.2.2.3.3 Fission tubulaire

En plus de l'actine, l'ARF1 activé recrute la protéine kinase D (PKD), qui est une sérine/thréonine kinase nécessaire pour la biogenèse des transporteurs assurant le trafic entre le TGN et la surface cellulaire [417,418]. Ici, nous décrirons surtout la suite séquentielle d'évènements résultant en la fission tubulaire médiée par la PKD, car c'est l'un des mécanismes qui a été le plus étudié. Parmi les transporteurs dont la biogenèse est dépendante de la PKD, on peut citer la myosine II, Rab6a, Rab8a et la synaptotagmine II [419]. La PKD se lie au DAG du TGN et favorise la production du phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) en activant la phosphatidylinositol-4-kinase III $\beta$ . Le PI4P recrute des protéines telles que la protéine de liaison à l'oxystérol de type I (OSBP) et la protéine de transport de céramide (CERT) qui contrôlent les niveaux de sphingolipide et de stérol au TGN. Le transport de céramide par le CERT vers le TGN augmente la production locale et la concentration en DAG. Une fois la concentration cruciale de DAG atteinte, l'OSBP et le CERT se dissocient du TGN suite à leur phosphorylation par la PKD et le DAG est séquentiellement converti en acide phosphatidique (PA) et lyso-phosphatidique (LPA) suite à l'action de PLD et PLA2, respectivement. Par conséquent, l'effet de la PKD activée au niveau du TGN est la production séquentielle des lipides modifiés DAG, PA et LPA qui sont nécessaires à la fission membranaire pour générer des transporteurs spécifiques assurant le trafic du cargo vers la surface cellulaire [420]. En d'autres termes, le recrutement de PKD au TGN initie les événements qui créent et régulent la croissance des domaines d'exportation au TGN. Le PI4P, le DAG et le PA jouent des rôles clés dans les événements par lesquels le domaine d'exportation contenant la PKD est séparé du TGN, générant ainsi un transporteur de cargo.

#### 1.5.2.2.3 Autres partenaires et mécanismes de recyclage

Dans ce qui suit, nous présenterons d'autres partenaires de recyclage et processus physiologiques qui sont importants pour la compréhension de l'évolution du cargo (RCPG ou autres) au sein du réseau endosomal.

##### 1.5.2.2.3.1 Les GTPases de la famille Rab

###### 1.5.2.2.3.1.1 Généralités

Les protéines Rabs représentent la plus grande branche de la superfamille des petites

GTPases et il y a 66 gènes Rab dans le génome humain. Ils oscillent entre les états liés au GDP et au GTP, qui sont facilités par les facteurs d'échange du nucléotide guanine (GEF) et les protéines activatrices de la GTPase (GAP), et fonctionnent comme des commutateurs moléculaires dans la régulation du trafic intracellulaire dans toutes les cellules eucaryotes. Chaque protéine Rab cible un organite distinct et spécifie une étape de transport le long des voies exocytaires, endocytaires et de recyclage ainsi que la diaphonie entre ces voies. Ce ciblage membranaire nécessite une isoprénylation post-traductionnelle des deux résidus Cystéine au niveau ou près de l'extrémité C-terminale de chaque Rab ainsi que le facteur GEF au niveau de la membrane cible [421]. En outre, le facteur de déplacement du GDP (GDF) facilite leur ciblage vers les endosomes. Lors de l'association avec la membrane, le GEF catalyse l'échange de nucléotides et le Rab activé lié au GTP interagit alors avec les effecteurs et s'emballe dans des vésicules de transport pour médier la formation et le mouvement des vésicules et leur fusion avec le compartiment cible. Le cycle fonctionnel du Rab est complété par hydrolyse du GTP catalysée par les GAP et le recyclage vers le compartiment initial par l'inhibiteur de la dissociation du GDP. Les GEF et les GAP sont recrutés sur des organites distincts selon la composition en protéines et lipides caractéristique de chaque organite pour faciliter l'établissement des domaines fonctionnels du Rab sur la membrane.

Le grand nombre de protéines Rabs reflète la complexité du système de transport intracellulaire essentiel pour la localisation et la fonction des protéines membranaires et sécrétoires telles que les hormones, les facteurs de croissance et les récepteurs. Ainsi, les protéines Rabs sont apparues comme des régulateurs importants de la transduction du signal, la croissance cellulaire et la différenciation. L'altération de l'expression et/ou de l'activité Rab a été impliquée dans plusieurs maladies allant des troubles neurologiques et métaboliques jusqu'au cancer [421].

#### 1.5.2.2.3.1.2 Maturation endosomale

Des travaux antérieurs ont distingué des domaines membranaires distincts pour la liaison de Rab5, Rab4 et Rab11 au niveau des endosomes précoces [178] et, dans un arrangement similaire, les domaines Rab7 et Rab9 dans les endosomes tardifs [422]. Bien que la ségrégation des composantes de recyclage puisse être considérée avec une quasi-certitude comme un partage

et un transfert séquentiel des molécules à travers un continuum membranaire divisé en domaines marqués par des Rabs appropriés jusqu'à ce qu'elles soient physiquement séparées par fission, il demeure un sujet de débat comment l'envoi vers les endosomes tardifs se déroule. Se produit-il par des intermédiaires assurant le transport du cargo entre les endosomes? Ou bien, cela peut-il se produire par une maturation de l'endosome par conversion de Rab5 en Rab7? L'étude menée par l'équipe de Rink et al concilie les deux modèles concurrents [423]. La taille des vésicules, la concentration du cargo et l'emplacement des organites dans la cellule (périnucléaire ou périphérique) peuvent dicter cette maturation endosomale. Une étude antérieure a également suggéré que le pH de l'endosome dans la lumière pourrait y jouer un rôle [424]. On pourrait également envisager que l'interaction du Rab5 avec Rab4 et Rab11 via des effecteurs sur la même membrane pourrait continuer à envoyer des signaux inhibiteurs indiquant que l'endosome n'est pas prêt à passer au stade Rab7 [425]. De plus, les endosomes subissent un remodelage membranaire compliqué avec la formation de vésicules intraluminales (VI) et d'invaginations qui séquestrent les constituants membranaires lors de la génération des corps multivésiculaires riches en VI [426]. Peut-être que de tels changements déterminent que l'endosome serait prêt à recevoir Rab7 et à éliminer de manière synchrone tous ses Rab5. Dans ce contexte, le complexe Sand1/Mon1-Ccz1 est un GEF pour Rab7, mais un effecteur en amont du Rab5. En tant que tel, il est recruté par Rab5-GTP à la membrane endosomale pour l'activation du Rab7. Avec le déplacement de Rabex5 (un domaine Vps9 contenant le GEF de Rab5) de la membrane, Rab5-GTP subit une hydrolyse du GTP et se convertit en Rab5-GDP qui est retiré de la membrane par le GDI (inhibiteur de la dissociation des nucléotides guanosine), conduisant à la conversion des endosomes précoces marqués par Rab5 aux endosomes tardifs marqués par Rab7. Ce processus nécessite le recrutement par Rab5 d'un facteur d'échange nucléotidique (hVPS39/Vam6) contenu dans le complexe VPS/HOPS interagissant avec Rab7 (HOPS de l'anglais homotypic fusion and vacuole protein sorting). Dans le réseau endosomal tardif, il existe une cascade Rab9-BLOC3-Rab32/Rab38 où Rab9-GTP recrute BLOC3 à la membrane pour fonctionner comme un GEF pour l'activation de Rab32/Rab38, des GTPases qui coopèrent avec la machinerie omniprésente de biogenèse des lysosomes pour synthétiser des organites spécialisés liés aux lysosomes.

### 1.5.2.2.3.1.3 Organisation fonctionnelle des GTPases de la famille Rab

Contrairement aux GEF recrutés par les Rabs en amont, les GAP peuvent être recrutés par un Rab en aval pour inhiber leur activité. La combinaison de GEF et de GAP recrutés dans un tel mode par les Rabs en amont et en aval peut affiner efficacement la fonction des Rabs et faciliter la transition des compartiments précoces vers les tardifs pendant le transport intracellulaire. Les Rabs peuvent interagir avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs membranaires pour faciliter leur transport dans des vésicules. Pour les besoins de cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement aux Rabs qui font progresser le cargo à travers les compartiments endosomaux.

Le Rab7 assure le transport de RGS4 des endosomes tardifs vers le TGN [427]. Dans ce contexte, le RGS4 interagit directement avec la queue C-terminale du DOPr afin de moduler sa signalisation [428]. Le Rab7 assure le recrutement du rétromère vers les endosomes pour transporter le M6PR vers le TGN [429]. Il constitue alors un élément essentiel pour le transport rétrograde des endosomes précoces vers le TGN. Il faut cependant noter que le Rab7 a aussi été impliqué dans le transport du cargo des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et des endosomes tardifs vers les lysosomes (figure 21). En effet, la surexpression de Rab7 facilite le transport du récepteur de l'angiotensine II vers les lysosomes et sa dégradation subséquente [430]. Ceci a été également démontré pour le récepteur à chimiokines CXCR2 [431]. Le Rab7 assure en plus la liaison des vésicules de transport aux compartiments cibles via le recrutement de l'effecteur HOPS qui interagit avec les protéines du complexe SNARE (SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor) pour assurer la fusion membranaire.

Le Rab9 facilite le recrutement du cargo dans les vésicules de transport dérivées des endosomes tardifs vers le TGN [432-434] (figure 21). Cependant, on en sait peu sur le mécanisme et les répercussions fonctionnelles de l'interaction entre le Rab9 et les RCPG. À notre connaissance, une seule étude a montré une implication du Rab9 dans la régulation de la fonction d'un RCPG. En effet, il a été établi que le récepteur  $\alpha$ 1-adrénergique interagit avec le Rab9 [435] pour moduler son transfert vers les endosomes tardifs à partir des endosomes précoces et participer à sa désensibilisation [436]. Une autre étude a montré que le récepteur LGR5 (de l'anglais Leucine-Rich G protein-coupled receptor-5) progresse vers les compartiments marqués par Rab7 et Rab9 suite à son internalisation [437]. En dehors des RCPG, le Rab9 facilite le transport rétrograde du M6PR vers le TGN via son effecteur TIP47 (de

l'anglais tail-interacting protein of 47kD) [438]. Le M6PR achemine les hydrolases lysosomales du TGN aux endosomes tardifs puis retourne au TGN à l'aide du complexe Rab9/TIP47. Le TIP47 reconnaît les domaines cytoplasmiques des M6PR et les conditionne dans des vésicules de transport naissantes [438]. Cet effecteur de Rab9 est indispensable pour son acheminement vers le TGN à partir des endosomes tardifs [439]. Le TIP47 se lie directement au Rab9, ce qui améliore aussi l'affinité du TIP47 pour le domaine cytoplasmique du M6PR [440].

Le Rab11 régule le transit du cargo des endosomes précoces au TGN [441] et du TGN vers la membrane plasmique [442] (figure 21). Il a été trouvé en association avec les membranes du TGN, les vésicules post-Golgi et les endosomes de recyclage lent. Il régule le trafic de plusieurs RCPG, y compris le  $\beta$ 1AR, les récepteurs du thromboxane A2, le récepteur sensible au calcium, le récepteur de bradykinine B2, le récepteur aux cannabinoïdes de type 2 (CB2), le récepteur à chimiokines CXCR2 et le récepteur de la transferrine [436,443,444]. Outre le transport vésiculaire, le Rab11 est également connu pour interagir avec l'actine et les protéines des microtubules telles que les myosines, les kinésines et les dynéines pour faciliter le mouvement des vésicules de transport sur le cytosquelette [421].

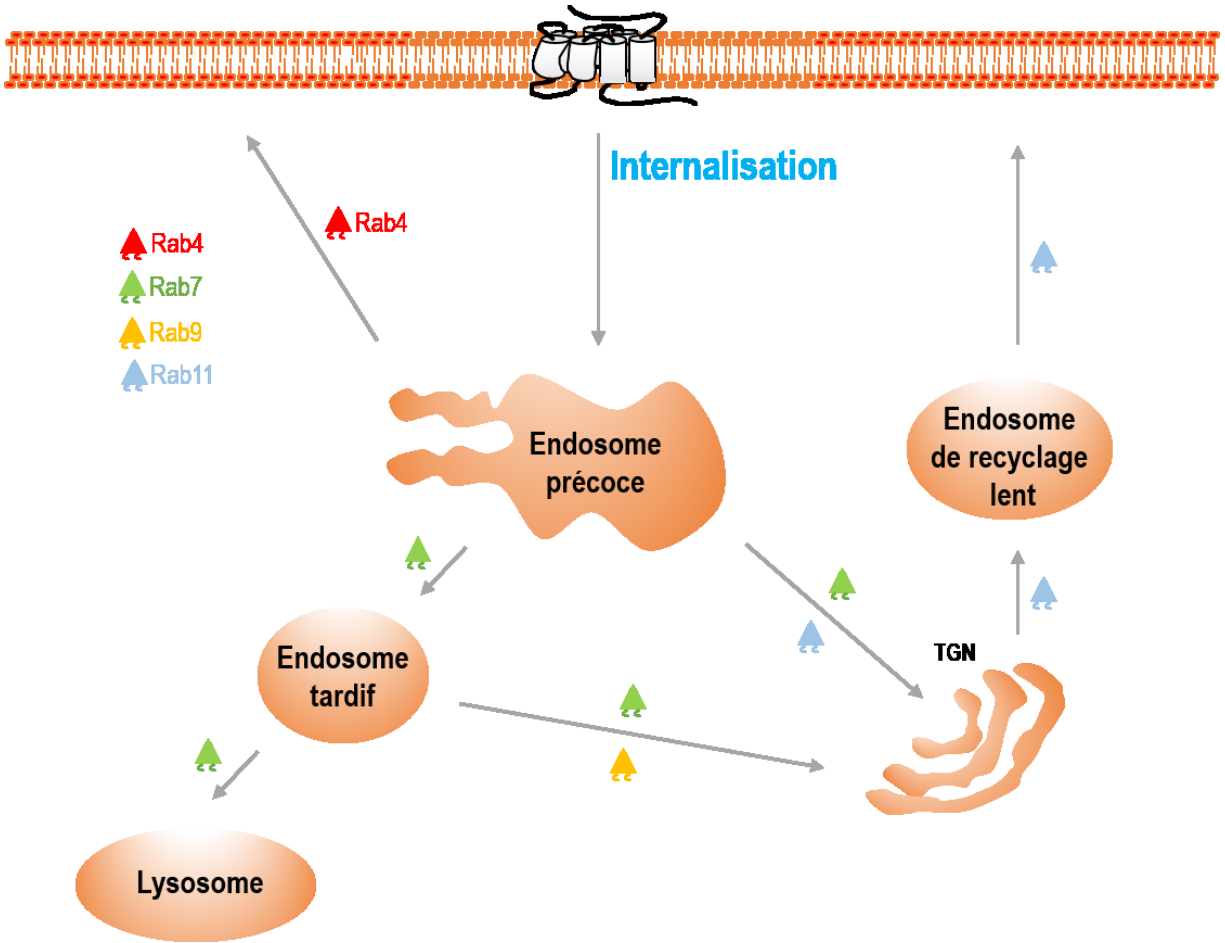


Figure 21. Organisation fonctionnelle des Rabs

Le Rab4 assure le recyclage rapide des récepteurs à partir des endosomes précoces vers la membrane plasmique. Le Rab7 facilite le transport du cargo des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et le TGN et des endosomes tardifs vers les lysosomes et le TGN. Le Rab9 récupère le cargo des endosomes tardifs vers le TGN et le Rab11 régule le transit du cargo des endosomes précoces au TGN et du TGN vers la membrane plasmique en passant par les endosomes de recyclage lent.

#### 1.5.2.2.3.2 Formation des vésicules intraluminales et processus de rétrofusion

Si on s'intéresse aux VI c'est par ce qu'il a été démontré à plusieurs reprises que le DOPr se dirige vers les endosomes tardifs suite à son internalisation [445,367,370]. Aussi, par microscopie électronique, le DOPr a été visualisé en association avec les membranes des VI des corps multivésiculaires [366]. Nous avons mentionné dans la section 1.5.2.2.3.1.2 que la formation des VI constitue un signal pour que l'endosome passe d'un stade précoce à un stade plus tardif. Les corps multivésiculaires contenant les VI mûrent ou se détachent des



endosomes précoces pour former ultérieurement les endosomes tardifs [403]. Le mécanisme conduisant la déformation des endosomes précoces en une grande structure sphérique et sa désorientation de la voie de recyclage et de transport rétrograde reste mal compris. Cependant, il semble que les patches d'actine nucléés sur les endosomes précoces conduisent ce remodelage via la protéine de liaison aux lipides ANXA2 dans un processus qui dépend aussi des protéines liant l'actine et du complexe HOPS [403]. Le tri des récepteurs ubiquitinés dans les VI est initié par le phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP), un phosphoinoside généré par la phosphatidylinositol-3-kinase Vps34, qui est elle-même un effecteur de la GTPase Rab5 [446]. Aussi, la machinerie ESCRT est composée de cinq complexes majeurs, y compris les complexes ESCRT-0, -I, -II, -III et Vps4 agissant de façon séquentielle et chaque complexe joue un rôle distinct dans la formation et le désassemblage des VI [447]. La sous-unité HRS (de l'anglais hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) du complexe ESCRT-0 est recrutée vers les endosomes précoces par l'intermédiaire de son domaine de liaison au PIP et se lie à son tour aux récepteurs ubiquitinés. Après son association avec l'endosome, ESCRT-0 recrute ESCRT-I qui est impliqué dans le tri du cargo en raison de son affinité de liaison à l'ubiquitine. Ensemble, ESCRT-0 et ESCRT-I servent d'échafaudage initial pour l'assemblage ultérieur des autres sous-unités ESCRT. En effet, ESCRT-I se lie à ESCRT-0 et recrute ESCRT-II, agissant ainsi comme un pont entre ESCRT-0 et ESCRT-II. L'invagination de la membrane des VI est obtenue grâce à l'activité synergique de ESCRT-0, -I et -II avec d'autres protéines régulatrices impliquées dans la liaison à la membrane et le tri du cargo. À ce stade, les molécules ubiquitinées commencent à subir la deubiquitination et sont ensuite emballées dans les VI. ESCRT-III est recruté grâce à l'action d'ESCRT-II et contribue au bourgeonnement des VI et éventuellement à la fission de ces dernières de la membrane endosomale. Le complexe VPS4 contribue au désassemblage d'ESCRT et à l'internalisation des VI (figure 22) [404].

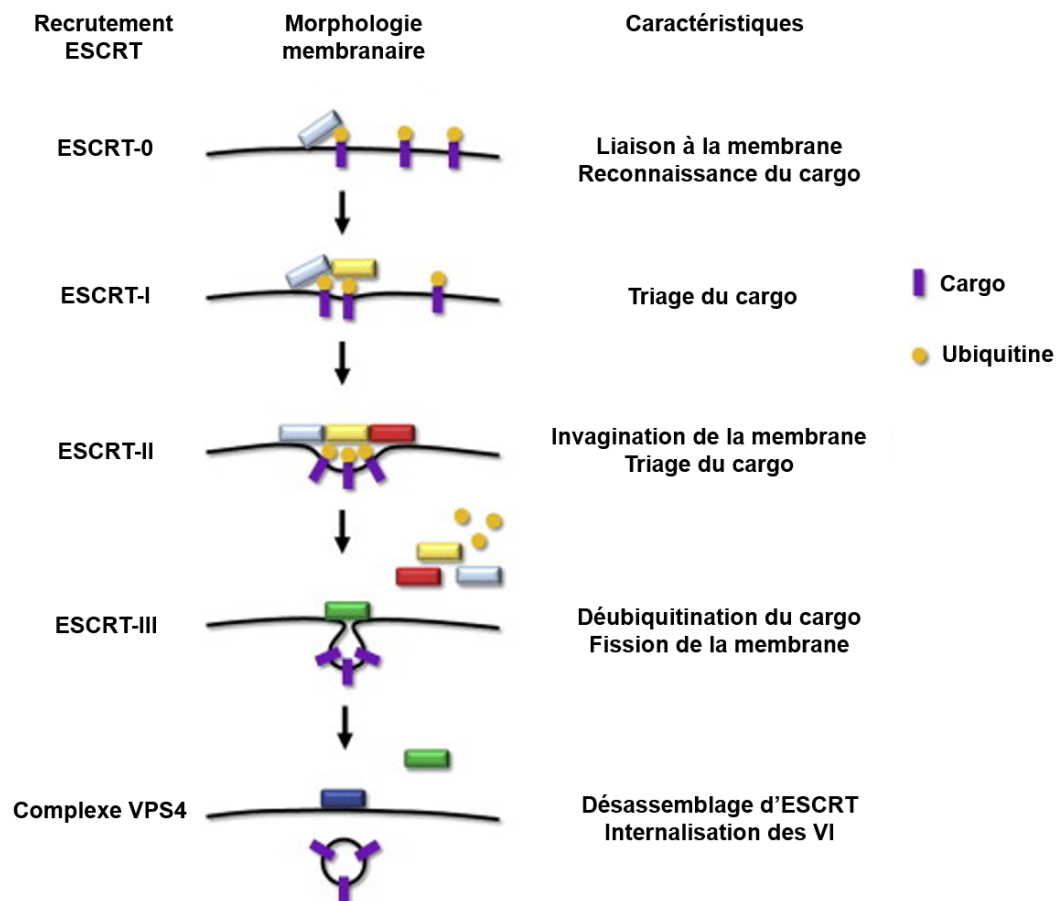


Figure 22. Formation de vésicules intraluminales et triage du cargo dans ces vésicules

Les endosomes tardifs contiennent plusieurs vésicules intraluminales dans leur lumière. Le diagramme représente le chargement du cargo et la formation d'une vésicule intraluminaire contrôlés par la présence de la machinerie ESCRT fonctionnelle au niveau de l'endosome. Le recrutement par étapes des sous-unités d'ESCRT est aligné avec le changement de la morphologie membranaire ainsi que les caractéristiques clés se produisant à chaque étape. Figure modifiée de [404].

Les membranes des endosomes tardifs contiennent des quantités élevées de l'acide phospholipidique non conventionnel lysobisphosphatidique (LBPA). Le LBPA possède la capacité intrinsèque de déformer les membranes et de participer à la formation des VI. Il interagit directement avec la protéine associée à l'ESCRT: ALIX (de l'anglais ALG-2-interacting Protein X) pour assurer cette fonction. En plus de la sous-unité HRS qui initie le

processus, d'autres adaptateurs, y compris ALIX, peuvent recruter des protéines de cargo dans les VI. ALIX est composé d'un domaine N-terminal responsable de sa localisation endosomale et d'un domaine central qui est composé de deux faisceaux prolongés de trois hélices formant des bras allongés qui se rabattent en forme de «V». Ce domaine C-terminal interagit avec la majorité des protéines liant ALIX aux différents processus cellulaires. Les parties N et C-terminales sont reliées par un domaine formé de deux bobines enroulées. Puisque ALIX peut lier les bicouches contenant le LBPA [448], la protéine peut fonctionner comme un capteur et un régulateur de la courbure membranaire. Des études antérieures *in vivo* ont montré que les membranes contenant du LBPA et ALIX jouent un rôle dans le tri des protéines et des lipides et leur exportation des membranes intraluminales de l'endosome tardif vers d'autres destinations cellulaires comme la membrane plasmique, le TGN ou les exosomes, ailleurs que les lysosomes [449]. En particulier, les membranes contenant du LBPA régulent l'exportation du cholestérol vers la membrane plasmique à partir des endosomes tardifs. D'autre part, l'interférence avec les fonctions du LBPA et d'ALIX inhibe la libération du facteur létal de l'anthrax et des capsides du virus de la stomatite vésiculaire dans le cytoplasme [447]. Une question pertinente se pose : comment LBPA et ALIX, reconnus pour assurer la formation des VI et le recrutement du cargo vers ces vésicules, assurent aussi le transport dans le sens inverse; c'est-à-dire des VI vers une autre destination cellulaire différente des lysosomes. Il a été établi que ce transport se base sur le processus de rétrofusion, c'est-à-dire que les VI vont se diriger vers la membrane limitante des endosomes tardifs avec laquelle ils vont fusionner et libérer le cargo hors de ces endosomes. LBPA et ALIX assurent alors à la fois les mécanismes de fission et de rétrofusion des VI (figure 23) [450,447,451]. Ce processus pourrait bien être couplé à la machinerie HRS/ESCRT responsable du tri vers les endosomes multivésiculaires, puisque la rétrofusion des vésicules avec la membrane limitante dépend de la sous-unité ESCRT-I: Tsg101 [451]. Pour le triage du cargo dans les VI et sa dégradation subséquente, ALIX interagit avec SNX3 et les composantes du complexe ESCRT (y compris le HRS et l'ESCRT-II). Pour la rétrofusion, ALIX interagit avec le LBPA permettant le recyclage du cargo et son envoi hors de la voie de dégradation (figure 24). Alix fonctionne alors comme un régulateur de la courbure membranaire à l'interface entre la voie ESCRT et la dynamique membranaire dépendante du LBPA.

Récemment, il a été démontré qu'ALIX régule la fonction de certains RCPG comme le

récepteur activé par la protéase PAR1 (récepteur activé par la protéase de type 1) en se liant au motif YPX3L via son domaine V central pour assurer la dégradation lysosomale du récepteur de façon indépendante de l'ubiquitine [452]. ALIX régule également le tri lysosomal indépendant de l'ubiquitine du récepteur purinergique P2Y1 via le motif YPX3L [453]. Ces résultats confirment la fonction du motif YPX3L en tant que séquence de ciblage lysosomal pour les RCPG et démontrent qu'ALIX intervient dans la dégradation indépendante de l'ubiquitine de certains RCPG. Les endosomes tardifs représentent donc une autre station de triage dans le système endosomique. Les VI et leur cargo, peuvent être emballés dans les lysosomes pour être dégradés, mais le cargo peut également être acheminé vers d'autres destinations que les lysosomes s'il échappe les VI.

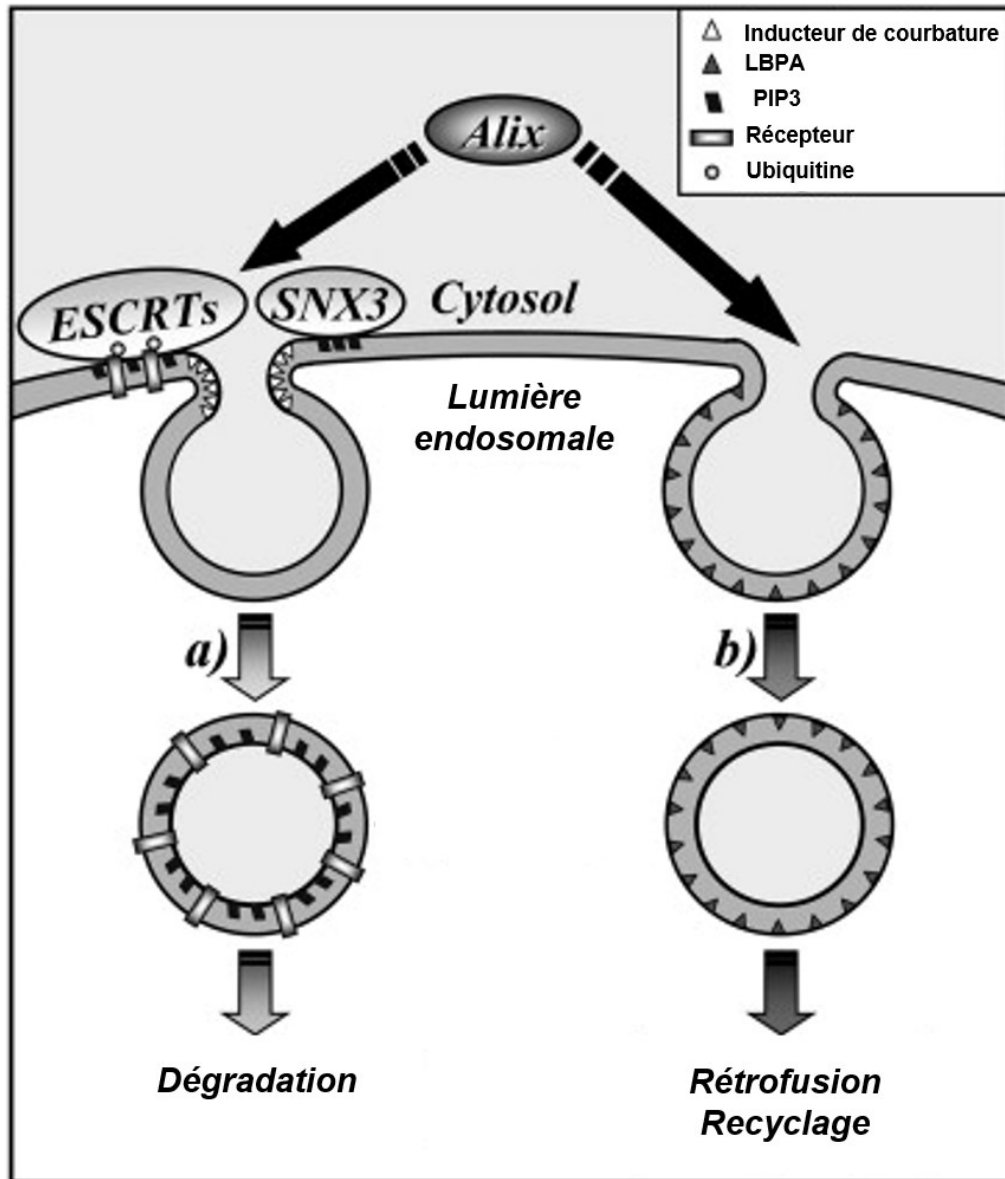


Figure 23. Le double rôle d'Alix dans la formation des vésicules intraluminales.

La protéine cytosolique Alix peut interagir avec la machinerie ESCRT et peut donc réguler la formation des vésicules intraluminales dépendante d'ESCRT (a). Le phosphatidylinositol-3-Phosphate (PIP3) contrôle cette voie via des interactions avec des composants clés, notamment Hrs, SNX3 et ESCRT-II, et est présent à la fois dans la membrane limitante endosomale et dans les membranes intraluminales. Alix peut également contrôler la formation des vésicules intraluminales dans les endosomes tardifs, peut-être en tant que régulateur négatif, par son interaction avec le LBPA, qui est indiqué sur la membrane endosomale limitante et dans les membranes intraluminales (b).

## 1.6 Tolérance à l'analgésie

Les différentes propriétés de signalisation et de trafic des ROs influencent de façon considérable la survenue de la tolérance à l'analgésie. Dans les sections suivantes, nous définirons la tolérance analgésique et montrerons les liens qui existent entre certaines propriétés de régulation des ROs et cette tolérance.

### 1.6.1 Définition

La tolérance est définie comme une réduction de l'effet après une administration répétée du médicament qui entraîne une perte de la puissance de la drogue visualisée par un déplacement pharmacologique de la courbe dose-réponse vers la droite (Figure 24) [454]. Le développement et la magnitude de la tolérance dépendent de l'interaction de la drogue avec les récepteurs, la dose et la fréquence d'administration. La tolérance n'est pas toujours remarquable, et de nombreux médecins affirment que la tolérance analgésique peut simplement être surmontée en augmentant la dose thérapeutique d'opioïde pour maintenir l'effet attendu ou en mettant en œuvre la rotation des opioïdes. Cependant, cela n'est pas toujours possible parce que d'autres effets, tels que la constipation, peuvent limiter l'observance du patient. La réduction de la motilité intestinale subit une tolérance minimale par rapport aux autres effets secondaires tels que la sédation et la nausée. En effet, les  $\beta$ arrs permettent la persistance des effets gastrointestinaux au fil du temps donc s'opposent à la tolérance [455]. Cette action permissive est médiée par l'activation d'ERK et la transcription du CREB, et l'inhibition de cette cascade prévient la constipation due à un traitement chronique à la morphine [456]. En dehors de la persistance des effets secondaires gastrointestinaux, la prise en charge des patients tolérants aux opioïdes lors d'épisodes de soin aigu représente également un grand défi auprès des fournisseurs de soins de santé parce que ces patients nécessitent une durée d'hospitalisation plus longue et un taux plus élevé de réadmission après 30 jours, en tenant compte du risque de mortalité et de comorbidité [457]. Aussi, l'augmentation de la dose d'opioïdes peut précipiter ou exacerber l'hyperalgésie induite par les opioïdes définie par l'augmentation de la sensibilité à la douleur suite à la prise prolongée des opiacés. Cette hyperalgésie contribue à son tour à la diminution de l'effet analgésique et peut être mal diagnostiquée comme une douleur induite par la progression de la maladie. De ce fait, la tolérance représente de nos jours un des effets

indésirables les plus redoutables liés à l'utilisation prolongée des opioïdes vu son impact sur l'index thérapeutique, l'observance du traitement et le développement de la dépendance physique et psychologique.

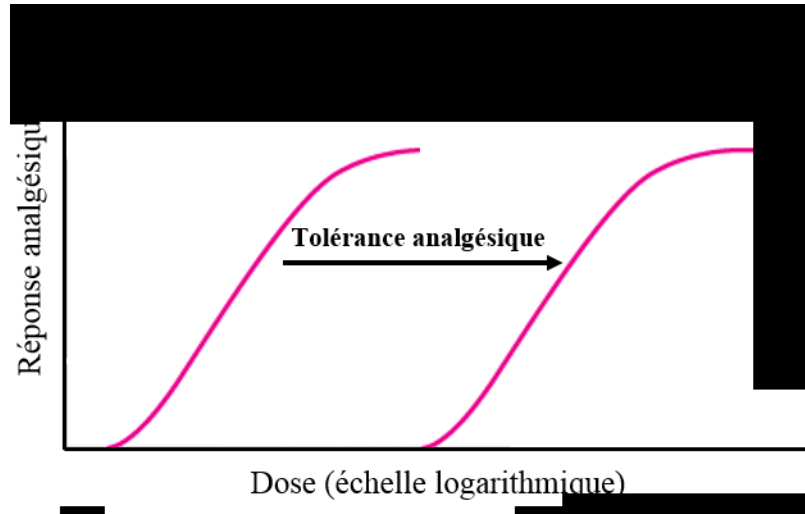


Figure 24 : Déplacement de la courbe dose-réponse vers la droite en cas de tolérance analgésique.

### 1.6.2 Mécanismes sous-jacents

La tolérance peut être d'origine pharmacocinétique ou pharmacodynamique. La tolérance pharmacocinétique a lieu par exemple par augmentation du métabolisme de la drogue, appelée aussi tolérance métabolique. La tolérance pharmacodynamique représente l'ensemble des adaptations mises en œuvre contre le mécanisme d'action de la drogue afin de contrecarrer une réponse cellulaire excessive. Ces adaptations ont lieu à différents niveaux d'organisation cellulaire et peuvent aller des adaptations moléculaires au niveau du récepteur jusqu'à la modification des circuits et réseaux neuronaux en passant par l'ensemble des changements qui se produisent au niveau cellulaire. Pour les besoins de cette thèse, nous allons nous concentrer sur les aspects pharmacodynamiques moléculaires reliés au développement de la tolérance analgésique.

#### 1.6.2.1 Mécanismes moléculaires de la tolérance à l'analgésie

Un des mécanismes moléculaires de la tolérance le plus connu et le plus étudié est la désensibilisation du RO. C'est la perte de la capacité du récepteur de répondre aux stimuli

endogènes et aux drogues. Comme déjà expliquée au premier chapitre, la désensibilisation du récepteur peut survenir suite à sa phosphorylation par différentes kinases, son découplage fonctionnel de la protéine G, son internalisation et finalement son triage post-endocytaire favorisant sa dégradation. Plusieurs preuves de la littérature démontrent un lien étroit entre les différents mécanismes de la désensibilisation et la survenue de tolérance analgésique [458-460], d'autant plus que les différents agonistes ayant différents profils de tolérance analgésique impliquent des mécanismes distincts de désensibilisation des ROs. Pour n'en citer qu'un seul exemple, on avait noté une diminution de la tolérance analgésique au fentanyl, mais pas à la morphine (deux agonistes du MOPr utilisés en clinique) chez les souris qui n'expriment pas la GRK3 (kinase qui phosphoryle les ROs engendrant leur désensibilisation) [460]. Nous allons surtout détailler le rôle de l'internalisation dans la survenue de la tolérance vu qu'il a été controversé si cette étape de la désensibilisation affecte positivement ou négativement la tolérance, et vu que la  $\beta$ arr est la protéine clé de l'endocytose, commençons alors par définir son implication dans la survenue de tolérance.

#### 1.6.2.1.1 Le rôle complexe de la $\beta$ -arrestine dans la tolérance

Suite à l'observation que les souris dépourvues de  $\beta$ arr2 présentent une tolérance atténuée à la morphine [458], une pléthore d'études démontrant l'implication des arrestines dans la désensibilisation et la tolérance aux opioïdes a vu le jour. Les agonistes du MOPr et DOPr, quel que soit leur potentiel à produire l'internalisation, induisent de la tolérance à l'analgésie [86,461]. Le mécanisme classique par lequel les arrestines affectent la tolérance se base sur le blocage de la signalisation de la protéine G et l'induction de l'endocytose, comme déjà détaillé plus haut. Cependant, la signalisation atténuée ou la tolérance cellulaire est la somme de plusieurs processus comprenant: désensibilisation du récepteur, resensibilisation, internalisation suivie de recyclage ou régulation négative, synthèse *de novo* du récepteur ainsi que son envoi subséquent vers la membrane cellulaire. Une modification par les arrestines à n'importe quel point de la machinerie régulatrice du récepteur pourrait influencer la tolérance. En effet, en tant que membre des complexes protéiques à multiples facettes, les arrestines jouent un rôle important dans la signalisation des ROs indépendamment de la désensibilisation, de la resensibilisation et de l'internalisation des récepteurs induites par les ligands. Par exemple, la



$\beta$ arr1 et la  $\beta$ arr2 contrôlent l'actine en se liant à la cofiline et à sa kinase inactivatrice, LIMK, comme déjà cité, ce qui contrôle le taux d'exportation des ROs vers la membrane cellulaire. De plus, un complexe Src/ $\beta$ arr2 régule la signalisation constitutive du MOPr indépendante du ligand [462]. Dans ce complexe, l'arrestine limite l'activité Src en maintenant cette tyrosine kinase dans un état inactif. Ensemble, ces interactions démontrent que les arrestines régulent la fonction des ROs dans le cadre de complexes d'échafaudage catalytiquement actifs.

Les agonistes opioïdes peuvent recruter différemment des cascades de signalisation dépendantes de l'arrestine pour réguler la tolérance d'une manière biaisée par le ligand et le tissu. Par exemple, la tolérance analgésique à la morphine est atténuée en l'absence de  $\beta$ arr2, alors que celle du fentanyl ne l'est pas, bien que les deux agonistes soient capables de recruter la  $\beta$ arr2. La  $\beta$ arr2 dans le côlon est impliquée dans la tolérance au DAMGO ([D-Ala(2),N-Me-Phe(4),Gly(5)-ol]-enképhaline), mais pas celle au fentanyl ou à l'étorphine, bien que les trois agonistes induisent l'internalisation du MOPr [463]. Il a été également constaté que JNK2 peut réguler la tolérance pour le MOPr, et que le recrutement de cette kinase peut être dépendant ou pas de l'arrestine, en fonction de l'agoniste utilisé [464].

Les arrestines sont aussi impliquées dans la tolérance aux agonistes du DOPr. En effet, la stabilité de l'interaction au sein du complexe DOPr/G $\beta$  $\gamma$ / $\beta$ arr2 a été associée à un recyclage réduit du récepteur, une désensibilisation marquée et la survenue de tolérance au SNC-80, contrairement au DPDPE qui favorise un recyclage efficace du récepteur le protégeant de la désensibilisation avec absence de développement de tolérance vue une stabilité moindre du complexe DOPr/G $\beta$  $\gamma$ / $\beta$ arr2 (étude déjà citée). D'autre part, les arrestines sont la clé du biais pour déclencher différentes cascades de signalisation intracellulaires et des résultats fonctionnels divergents [215]. Aussi, il a été démontré que les agonistes du DOPr à forte internalisation comme SNC-80 recrutent préférentiellement la  $\beta$ arr1, entraînant une désensibilisation du DOPr et une tolérance analgésique [63,465]. Au contraire, les agonistes du DOPr à faible taux d'internalisation recrutent préférentiellement la  $\beta$ arr2 et l'invalidation génétique de  $\beta$ arr1 n'affecte pas le phénotype de tolérance. En effet, pour les agonistes ARM390 et JNJ20788560 (faiblement internalisant), la  $\beta$ arr2 facilite le taux de resensibilisation du récepteur. L'invalidation génétique de la  $\beta$ arr2 a entraîné une tolérance accrue aux agonistes du DOPr à faible taux d'internalisation et a réduit les taux de resensibilisation du récepteur [465]. Ces données révèlent un rôle des arrestines dans la régulation de la resensibilisation des

récepteurs, bien qu'elles soient traditionnellement considérées pour leur rôle dans la médiation de la désensibilisation. Les mécanismes de désensibilisation et de resensibilisation par des agonistes opioïdes faiblement internalisant sont actuellement inconnus, mais il a été spéculé que les complexes contenant la  $\beta$ arr2 atténuent le recrutement de phosphatases pertinentes pour la resensibilisation MOPr et en facilitent celles nécessaires pour la resensibilisation au DOPr [454].

Vue la contribution de la  $\beta$ arr au développement de la tolérance, on a développé des drogues qui déclenchent préférentiellement les réponses liées à la protéine G plutôt que le recrutement de la  $\beta$ arr. On s'attendait à un meilleur profil d'effets secondaires avec ces molécules [466]. Des essais cliniques ont été menés pour le TRV130, un agoniste du MOPr qui provoque un recrutement très faible de l'arrestine. Au stade préclinique, le TRV130 a produit une bonne analgésie et causé moins de dysfonctionnement gastro-intestinal et de dépression respiratoire que la morphine [467]. À la fin de la phase 3 de l'essai clinique, ses propriétés analgésiques ont été confirmées à toutes les doses [468], mais l'amélioration souhaitée des effets secondaires n'a pas été atteinte quand on a administré des doses analgésiques complètes. La méthodologie utilisée dans le développement du TRV130 suscite certaines critiques qui devraient aider à comprendre les causes de cette première tentative échouée. En effet, le biais de signalisation entre les deux voies (protéine G vs  $\beta$ arr) a été surveillé dans les cellules HEK293 sans tenir compte du fait que les GRK, régulateurs essentiels du recrutement de la  $\beta$ arr, sont exprimés à des niveaux beaucoup plus bas que dans les neurones (lieu d'action de la drogue). L'omission de ce facteur conduit à une sous-estimation systématique des réponses neurales dépendantes de la  $\beta$ arr. En effet, le recrutement de la  $\beta$ arr2 par le TRV130 a été augmenté de façon significative quand les cellules HEK293 ont été transfectées avec la GRK2. La surexpression de GRK2 a également renforcé le recrutement de la  $\beta$ arr2 par PZM21, un nouvel agoniste du MOPr qui provoque aussi un recrutement très faible de l'arrestine. Comme le TRV130, PZM21 présentait moins d'effets secondaires gastro-intestinaux et respiratoires que la morphine dans les modèles précliniques [469,467], mais puisque son profil de recrutement de  $\beta$ arr est similaire à TRV130, les avantages cliniques possibles ne peuvent pas être supérieurs à ceux du TRV130. Ces résultats démontrent clairement l'importance de la considération du contexte cellulaire lors de l'analyse des résultats. Les déterminants moléculaires de la réponse entre les systèmes hétérologues et les neurones peuvent être très divergents d'où l'importance de l'évaluation de tous ces paramètres dans le contexte biologique adéquat afin d'éliminer un

éventuel biais du système.

#### 1.6.2.1.1.1 Internalisation et tolérance analgésique

L'équipe de Pradhan a démontré qu'une injection unique de SNC-80 produit l'internalisation *in vivo* du DOPr suivie de la survenue de tolérance à l'analgésie [348]. Une dose équianalgésique d'ARM390 produit une faible internalisation du récepteur et ne donne pas un changement dans la réponse analgésique, ce qui tisse un lien entre l'internalisation et le développement de tolérance analgésique, vu que l'internalisation était considérée comme un processus qui se produit en amont de la dégradation lysosomale du récepteur. Toutefois, cette observation s'est mise en doute avec l'observation que la deltorphine II, qui provoque une forte internalisation du DOPr [250], ne produit pas de la tolérance analgésique [470]. Une des explications qui a été émise pour répondre à cette divergence était le triage différentiel du DOPr, une fois internalisé, vers différentes destinations suite à sa stimulation par SNC-80 ou la deltorphine II. En effet, il a été démontré dans des lignées cellulaires immortalisées [471] et dans les neurones [85] que le SNC-80 ne parvient pas à recycler le DOPr suite à son internalisation. Aussi, l'administration *in vivo* de SNC-80 a provoqué une accumulation intracellulaire du récepteur pendant 4 heures durant lesquelles la tolérance analgésique était maximale [348]. Par contre, l'internalisation par les analogues de la deltorphine est associée à un recyclage du DOPr et à la resensibilisation de la signalisation [374]. Une autre preuve qui nourrit la controverse du lien étroit entre l'internalisation et la tolérance était l'observation que DPDPE et SNC-80, bien qu'internalisant le DOPr de façon similaire, produisaient différents profils de tolérance analgésique (comme déjà détaillés) [85]. De ce fait, un récepteur ayant la capacité de se faire recycler à la membrane plasmique après son internalisation pourra être resensibilisé et produire de nouveau de la signalisation, ce qui réduira la tolérance analgésique. Par contre, le récepteur qui s'accumule en intracellulaire ou se dirige vers les lysosomes pour y être dégradé produira de la désensibilisation prolongée et de la tolérance. L'internalisation à elle seule ne peut pas alors expliquer ce qui est en rapport avec la survenue de tolérance vu que les conséquences fonctionnelles de cette étape peuvent être totalement divergentes. L'évaluation du devenir post-endocytaire est alors d'une importance accrue. Les facteurs de triage des RO vers la voie de recyclage ou de dégradation sont multiples. Cela inclut si l'agoniste est substrat

ou non de la convertase ECE2 qui dégrade l'agoniste peptidique permettant la libération du récepteur et son recyclage membranaire [375] (voir section 1.5.2.1). Aussi, la stabilisation des récepteurs dans des conformations dépendantes des agonistes pourrait favoriser ou non son interaction avec les protéines de triage comme le GASP. Cette notion est corroborée par les données qui supportent que le DOPr adopte différentes conformations qui sont différemment modulées par le Src, définissant sa capacité ou son défaut à recycler [472].

Toutes ces observations soulignent que la tolérance à l'analgésie est un phénomène complexe qui est défini par plusieurs mécanismes sous-jacents et qu'une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation et de trafic des ROs est nécessaire pour le développement rationnel d'opioïdes ayant une activité analgésique prolongée.

## **2 Hypothèse et objectifs**

L'hypothèse générale de cette thèse est la suivante : la sélectivité fonctionnelle des ligands du DOPr détermine les différentes propriétés de trafic du récepteur à l'origine de la capacité différentielle de ces ligands à produire la tolérance analgésique *in vivo*. Pour tester cette hypothèse, nous avons débuté par la caractérisation des propriétés de signalisation et des déterminants moléculaires de l'endocytose du DOPr stimulé par différents ligands au niveau de deux systèmes biologiques distincts : les cellules HEK293 et les neurones, afin d'évaluer la nature du biais qui en résulte. Étant donné que les propriétés d'internalisation ne dictent pas universellement les profils de tolérance, nous nous sommes intéressés au trafic post-endocytique du récepteur, à savoir son recyclage à la membrane plasmique pour établir comment l'itinéraire post-endocytique du DOPr protège contre le développement de la tolérance à l'analgésie.

### **2.1 Caractérisation des propriétés de signalisation et des déterminants moléculaires de l'endocytose du récepteur opioïde delta stimulé par différents ligands**

Cette étude a été effectuée à la suite de la mise en évidence que les ligands du DOPr ne produisent pas tous le même profil de tolérance analgésique et que cette divergence a été attribuée en partie à différentes propriétés d'internalisation du DOPr [348,473] et à un biais de réponse qui favorise la signalisation versus l'internalisation [474,348]. Ce type de biais a été proposé comme un outil de criblage des agonistes du DOPr ayant des actions analgésiques de plus longue durée. Pour y arriver, il faut alors quantifier le biais de façon rationnelle et de le corrélérer avec les propriétés analgésiques des différents agonistes. Au cours de cette étude, nous avons alors étudié les caractéristiques de signalisation et d'internalisation du DOPr stimulé par cinq ligands différents. Le but en était de mettre en évidence et de calculer le biais en appliquant de nouveaux outils de quantification spécifiquement développés à cet effet afin de présenter de bons candidats opioïdes qui favorisent l'analgésie prolongée.

## **2.2 Établissement de l'itinéraire post-endocytaire du récepteur opioïde delta suite à sa stimulation par le D-Pen (2,5)-enképhaline et de son rôle dans la prévention de survenue de la tolérance analgésique**

Cette étude fait suite à la découverte que malgré l'interaction du DOPr avec le GASP l'envoyant vers la voie de dégradation [370], le récepteur peut aussi échapper à cette voie et se rediriger vers la membrane plasmique en fonction du ligand lui étant associé, ce qui permet sa resensibilisation et la prévention du développement de la tolérance analgésique [85,373]. Le but de cette étude était alors d'établir les déterminants moléculaires du recyclage du DOPr suite à son internalisation et d'évaluer si cet itinéraire confère une protection contre la survenue de la tolérance analgésique *in vivo*.

## 3 Résultats

### 3.1 Première publication

#### 3.1.1 Introduction et mise en contexte du premier article

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont été effectuées afin de mieux saisir les mécanismes à la base de la tolérance analgésique et une des notions qui a été assez abordée est celle de l'agonisme biaisé. Cette notion a suscité un intérêt considérable, car théoriquement, elle fournit un moyen de séparer les actions souhaitées (analgésie) des effets indésirables (tolérance) des analgésiques opioïdes. Les ligands biaisés peuvent ainsi constituer un puissant moyen pour la découverte de nouveaux opioïdes ayant une action analgésique plus prolongée. Cependant, pour exploiter pleinement cette opportunité, il faut éventuellement être en mesure d'identifier avec confiance les ligands d'intérêt. Le développement de nouveaux outils de quantification du biais [326,327] a non seulement rendu cette identification possible, mais devrait aussi nous permettre de vérifier les nouvelles hypothèses sur le type de réponses (signalisation + régulation) responsables de l'analgésie et la tolérance aux opioïdes. Comme déjà mentionné ci-haut, parmi les hypothèses émises pour expliquer la divergence entre les ligands à développer l'analgésie et/ou la tolérance était l'observation que les ligands donnant un biais de réponse qui favorise la signalisation par rapport à l'internalisation produisent une action analgésique durable. Selon cette hypothèse, l'internalisation du récepteur pourrait l'engager dans le processus de dégradation lysosomale responsable de la survenue de la tolérance analgésique. Ce biais de signalisation versus internalisation serait donc un excellent critère pour le criblage de nouveaux analgésiques à action durable. C'est donc dans ce contexte que nous avons décidé de mettre en évidence ce biais pour différents ligands du DOPr (certains de ces ligands ayant différentes propriétés à induire la tolérance analgésique), en appliquant les nouveaux outils pharmacologiques développés au cours de la dernière décennie.

Pour aborder ce défi, nous avons tout d'abord utilisé les cellules HEK293 afin d'étudier les propriétés de signalisation du DOPr en évaluant les changements du taux d'AMPC induits par cinq différents ligands (DPDPE, SNC-80, TIPP, UFP-512 et morphine). Nous avons choisi ces cinq ligands vu qu'ils diffèrent de point de vue structure (peptidique et non peptidique), efficacité (agoniste complet et partiel) et sélectivité pour le DOPr (agoniste moins sélectif et très sélectif) afin d'éventuellement déceler certaines spécificités liées à ces différentes propriétés

(voir Tableau I de l'introduction). Nous avons également étudié la magnitude et les mécanismes d'internalisation du DOPr au niveau des cellules HEK293 en utilisant la technique ELISA (dosage immuno-enzymatique sur support solide). Les valeurs d'efficacité ( $\tau$ ) et d'affinité (KA) ont été estimées à partir des données fonctionnelles et le biais a été calculé à partir des coefficients d'efficience ( $\log \tau / KA$ ). Cette approche représente mieux les données par rapport à l'estimation du biais en comparant uniquement les réponses maximales (approche classique). Les coefficients  $\log (\tau / KA)$  indiquent que dans les cellules HEK293, le SNC-80 et l'UFP-512 étaient significativement plus efficaces dans l'inhibition de la voie de l'AC que l'internalisation du DOPr en les comparant au DPDPE. Ce type de sélectivité fonctionnelle est alors présent pour les agonistes complets et partiels.

La morphine ne favorise pas l'endocytose du MOPr dans les cellules immortalisées, mais elle le fait dans les neurones du noyau accumbens [475]. Cette observation démontre que l'internalisation des ROs peut être spécifique des cellules et c'est pour cette raison que nous avons évalué les caractéristiques d'internalisation au niveau des neurones, lieu d'action des opioïdes. Nous avons alors cultivé des neurones corticaux, où par immunofluorescence, nous avons évalué les propriétés d'endocytose du DOPr par les ligands de l'étude afin de déceler une éventuelle spécificité liée au contexte cellulaire. Nous avons trouvé que les déterminants moléculaires de l'internalisation étaient différents entre les cellules HEK293 et les neurones. En effet, alors que la  $\beta$ arr s'implique dans l'internalisation du DOPr dans les deux systèmes biologiques, la GRK2 et la PKC n'étaient requises que dans le contexte neuronal. Aussi, l'inversion de l'ordre d'efficacité entre les agonistes dans l'essai cyclase et l'internalisation dépendante de la  $\beta$ arr dans les neurones indique que ces réponses étaient spécifiques du ligand.

À notre connaissance, cette étude est la première à fournir une preuve quantitative que les agonistes du DOPr peuvent présenter un biais de signalisation par rapport à l'internalisation. Ces preuves de sélectivité fonctionnelle confirment encore une fois que le DOPr peut adopter plusieurs conformations actives en fonction du ligand.

### 3.1.2 Article 1



**“LIGAND- AND CELL-DEPENDENT DETERMINANTS OF INTERNALIZATION  
AND cAMP MODULATION BY DELTA OPIOID RECEPTOR (DOPr) AGONISTS”**

by

Iness Charfi<sup>1,2</sup>, Karim Nagi<sup>1,2</sup>, Ouissame-Mnie-Filali<sup>1,2</sup>, Dominic Thibault<sup>2,3</sup>, Gianfranco Balboni<sup>4</sup>, Peter W. Schiller<sup>2,5</sup>, Louis-Eric Trudeau<sup>2,3</sup> and Graciela Pineyro<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> Sainte-Justine Hospital Research Center, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada.

<sup>3</sup> Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central.

<sup>4</sup> Department of Life and Environment Sciences, University of Cagliari, Italy.

<sup>5</sup> Laboratory of Chemical Biology and Peptide Research, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>6</sup> Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada.

Cell Mol Life Sci. 2014 Apr;71(8):1529-46. PMID: 24022593

**Corresponding author:**

Graciela Pineyro

Centre de Recherche du CHU Ste-Justine,

3175, Cote Ste-Catherine, Bureau 2722

Montréal, (Québec), H3T 1C5

TEL (514) 345-4931 poste 6289

FAX (514) 345-4801

[graciela.pineyro.filpo@umontreal.ca](mailto:graciela.pineyro.filpo@umontreal.ca)

## **ABSTRACT**

Signaling bias refers to G protein-coupled receptor ligand ability to preferentially activate one type of signal over another. Bias to evoke signaling as opposed to sequestration has been proposed as a predictor of opioid ligand potential for generating tolerance. Here we measured whether delta opioid receptor agonists preferentially inhibited cyclase activity over internalization in HEK cells. Efficacy ( $\tau$ ) and affinity (KA) values were estimated from functional data and bias was calculated from efficiency coefficients ( $\log \tau/KA$ ). This approach better represented the data as compared to alternative methods that estimate bias exclusively from  $\tau$  values. Log ( $\tau/KA$ ) coefficients indicated that SNC-80 and UFP-512 promoted cyclase inhibition more efficiently than DOPr internalization as compared to DPDPE (bias factor for SNC-80: 50 and for UFP-512: 132). Molecular determinants of internalization were different in HEK293 cells and neurons with  $\beta$ arrs contributing to internalization in both cell types, while PKC and GRK2 activities were only involved in neurons. Rank orders of ligand ability to engage different internalization mechanisms in neurons were compared to rank order of E max values for cyclase assays in HEK cells. Comparison revealed a significant reversal in rank order for cyclase E max values and  $\beta$ arr-dependent internalization in neurons, indicating that these responses were ligand-specific. Despite this evidence, and because kinases involved in internalization were not the same across cellular backgrounds, it is not possible to assert if the magnitude and nature of bias revealed by rank orders of maximal responses is the same as the one measured in HEK cells.

## **Keywords:**

Biased agonism, Functional selectivity, Analgesic tolerance, Trafficking, Operational model

## **Abbreviations:**

PBS Phosphate-buffered saline  
BSA Bovine serum albumin  
DOPr D-opioid receptor  
DPDPE [D-Pen(2), D-Pen(5)]-enkephalin  
SNC-80 (1)-4-[( $\alpha$ R)- $\alpha$ -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide  
TIPP H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH  
UFP-512 H-Dmt-Tic-NH-CH(CH<sub>2</sub>-COOH)-Bid  
Emax Maximal effect  
GPCR G protein-coupled receptor  
HEK Human embryonic kidney  
PKC Protein kinase C  
GRK G protein-coupled receptor kinase  
 $\beta$ arr  $\beta$ arrestin  
ARM390 AR-M100390  
ADL5859 N,N-diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl) benzamide  
ADL5747 N,N-diethyl-3-hydroxy-4-(spiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl) benzamide  
cAMP Cyclic adenosine monophosphate  
EC50 Term half maximal effective concentration  
BRET Bioluminescence resonance energy transfer  
5-HT4R 5-Hydroxytryptamine receptor 4  
PMA Phorbol 12-myristate 13-acetate

## **Notes**

Iness Charfi, Sainte-Justine Hospital Research Center, 3175, Cote, Ste-Catherine, Bureau 2722, Montreal, QC H3T 1C5, Canada. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada.

Karim Nagi, Sainte-Justine Hospital Research Center, 3175, Cote, Ste-Catherine, Bureau 2722, Montreal, QC H3T 1C5, Canada. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada.

Ouissame Mnie-Filali, Sainte-Justine Hospital Research Center, 3175, Cote, Ste-Catherine, Bureau 2722, Montreal, QC H3T 1C5, Canada. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada.

Dominic Thibault, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada. Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Montreal, Canada.

Gianfranco Balboni, Department of Life and Environment Sciences, University of Cagliari, Cagliari, Italy.

Peter W. Schiller, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada. Laboratory of Chemical Biology and Peptide Research, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, QC, Canada.

Louis-Eric Trudeau, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada. Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Montreal, Canada.

Graciela Pineyro, Sainte-Justine Hospital Research Center, 3175, Cote, Ste-Catherine, Bureau 2722, Montreal, QC H3T 1C5, Canada. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada. Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada.

### **Aknowledgements**

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to GP [311997]; from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to GP [MOP 79432], PWS [MOP 89716] and LET [MOP-106556]. PWS was also supported by the National Institutes of Health (NIH) [DA004443]. IC and KN hold a studentship from Ste-Justine Hospital Research Center and DT held a CIHR salary award. The authors would also like to thank Dr. Arthur Christopoulos for his insightful and helpful comments on curve fitting using the operational model.

## **Introduction**

Most clinically available opiates act upon mu opioid receptors (MOPr) to elicit powerful analgesic actions. However, despite their uncontested efficacy in alleviating acute severe pain, MOPr agonists are much less effective for the treatment of chronic pain syndromes [1]. These limitations have driven attention to other receptors, in particular delta opioid receptors (DOPr), which are currently viewed as promising targets for the development of novel opiate analgesics for chronic pain management [2–4]. Within this context, DOPr agonist potential for generating tolerance constitutes a limitation for their use as long-acting opioid analgesics [5, 6].

Remarkably, not all DOPr agonists produce the same degree of tolerance [5, 7, 8] and some of these differences have been attributed to distinct trafficking profiles of the different ligands [9]. For example, administration of SNC-80 ((1)-4-[( $\alpha$ R)- $\alpha$ -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide) triggered marked in vivo DOPr sequestration and acute tolerance while poorly internalizing agonists like ARM390, ADL5747 (N,N-diethyl-3-hydroxy-4-(spiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide), and ADL5859 (N,N-diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl) benzamide) did not induce a rapid loss of analgesic actions [7, 10]. Despite marked differences in internalization and distinct potential for generating acute analgesic tolerance, some of these ligands display a similar ability to produce maximal G protein activation [7] or cAMP accumulation [11], which has led to the suggestion that certain DOPr agonists may display a response bias that favors signaling over internalization. Moreover, the observation that acute tolerance induced by non-internalizing DOPr agonists is less than that produced by internalizing ones has fueled the notion that the proposed bias could be a means for screening/identifying DOPr agonists with longer-lasting analgesic actions.

Essential to this type of screening is the capacity to quantify bias. By applying novel analytical tools specifically developed to this purpose [12, 13], here we show that in HEK293 cells, SNC-80 and UFP-512 [H-Dmt-Tic-NH-CH(CH<sub>2</sub>-COOH)-Bid] were significantly more efficient in promoting cyclase inhibition than DOPr internalization as compared to DPDPE ([D-Pen(2), D-Pen(5)]-enkephalin). However, molecular determinants of internalization were different in HEK293 cells and neurons, raising the question as to whether bias involving internalization responses would be maintained across cellular backgrounds.

## **Materials and Methods**

### **DNA constructs**

Murine DOPRs tagged with the Flag epitope at the N-terminus were kindly provided by Dr. M. von Zastrow (University of California at San Francisco) and have been described elsewhere [14]. Constructs encoding human DOPR fused to yellow green fluorescent protein (YFP) were generated as described before [8].  $\beta$ arr2-Luc and  $\beta$ arr319–418 were a generous gift from Dr. Bouvier (Université de Montréal, Canada).

### **Cell culture and transfections**

#### *Immortalized cell lines*

Internalization and cAMP accumulation assays to establish signaling bias of DOPr agonists were carried out in HEK293 cells stably expressing Flag-DOPr. Monoclonal cell lines expressing the receptor were produced using Lipofectamine (Invitrogen, Carls-bad, CA, USA) to transfect 6  $\mu$ g of DNA/100 mM Petri dish. Cells were then selected with G418 (500  $\mu$ g/ml) and a clone expressing 1 pmol/mg protein was used [15]. Cells were grown and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 1,000 U/ml penicillin, 1 mg/ml streptomycin, and 2 mM glutamine, in a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. For the experimental series evaluating the effect of dominant negative  $\beta$ arr ( $\beta$ arr319–418) [16] on DOPr internalization,  $\beta$ arr319–18 (9  $\mu$ g) or empty vector pcDNA3 (9  $\mu$ g) were cotransfected with DOPr (3  $\mu$ g) to yield similar membrane expression of receptors as in stable cell lines. siRNA GRK2 (Smart pool, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were introduced into DOPr-expressing cells (25 pmol/well in 24-well plates) using Dharma-FECT1 according to the manufacturer's specifications. In experiments in which PKC activity was blocked by chelerythrine (4  $\mu$ M), the drug was introduced into the incubation medium 10 min prior to DOPr agonists and remained present until the end of the experiment. In experiments in which PMA was used to stimulate PKC activity, the phorbol ester was introduced at a concentration of 500 nM 60 min before agonist addition, and allowed to remain in the medium until the end of the experiment.

*Primary neuronal cultures* were used for immunofluorescence assays to assess ligand-induced DOPr internalization in neurons. Cultures were prepared from rat postnatal prefrontal cortex (P0–P2) using a procedure adapted from a previously described method [17]. Briefly, pups were cryo-anaesthetized, their brains rapidly removed and transferred into ice-cold

dissociation solution (NaSO<sub>4</sub> 90 mM; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 mM; MgCl<sub>2</sub> 5,8 mM; CaCl<sub>2</sub>; HEPES 10 mM; glucose 20 mM; pH 7,4). The prefrontal cortex was dissected and digested in papain solution (20 U/ml; 40 min at 37 °C) following which the product was passed through Pasteur pipettes of progressively decreasing diameter for mechanical dissociation. The suspension obtained was centrifuged, cells resuspended and diluted to a density of 2.5 million/ ml before plating on glass coverslips precoated with collagen/poly-L-lysine (each at 0.1 mg/ml). Cells were cultured in neurobasal A medium supplemented with B27 (4 %), 100 U/ml penicillin–streptomycin, Glutamax (2 %) and fetal bovine serum (10 %) for 24 h. At this time, coverslips were transferred from their home dish to a six-well plate containing 2 ml of neurobasal A medium/well and transfected with Flag-DOPrs (8 µg of DNA/well) by means of a modified calcium phosphate transfection protocol [18]. Briefly, a calcium phosphate/DNA precipitate was formed in HEPES buffered saline (pH 7.03) and was added drop-wise to the neurobasal A medium. After 30 min of transfection, neurons were washed in Hank's balanced salt solution and returned to their original culture medium. For siRNA experiments, cells were transfected 24-h post-SFDOPr transfection with βarr siRNA or GRK2 siRNA (100 and 75 pmol/35 mm dish, respectively) using Lipofectamine as indicated by the manufacturer. GRK2 siRNA was from Thermo Fisher Scientific and for βarr1/2 knock down primers and oligonucleotides were designed as previously described [19]. In both cases, knockdown was verified by Western-blot analysis. For experiments in which PKC was blocked by chelerythrine (4 µM), the drug was introduced 10 min prior to DOPr agonists and allowed to remain present throughout the experiment.

### **Evaluation of DOPr trafficking**

#### *ELISA-based assays*

Measurement of surface-expressed receptors and quantification of receptor internalization was assessed using an ELISA-based method adapted from a previously published protocol [15]. HEK293 cells stably expressing Flag-DOPrs were seeded at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells/well and grown on 24-well polylysine-coated plates for 48 h. Unless otherwise specified, on the day of the experiment cells were exposed to increasing concentrations of different ligands (0–100 µM) for 30 min before internalization was stopped by addition of cold PBS (phosphate-buffered saline). After three PBS washes, cells were fixed for 15 min at 4 °C in paraformaldehyde (3 %) and non-specific binding was blocked by incubation with PBS/BSA 1 %/CaCl<sub>2</sub> 1 mM at RT for 30 min. Cells were subsequently incubated with anti-FLAG M1

antibody (1:1,000; Sigma-Aldrich) for 1 h (RT), washed three times and incubated with peroxidase-conjugated (HRP) anti-mouse antibody (1:5,000; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) for 30 min. After extensive washing, 200  $\mu$ l of the HRP substrate o-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA FASTTM OPD, Sigma-Aldrich) was added to each well. The reaction was allowed to proceed for 8 min and stopped using 50  $\mu$ l of 3 N HCl. An amount of 200  $\mu$ l of the mix was then transferred to a 96-well plate for optical density (OD) evaluation at 492 nm in a microplate reader (Victor3; PerkinElmer, Waltham, MA, USA). OD readings corresponded to the signal generated by receptors at the cell surface. The amount of surface receptors internalized following exposure to agonists was calculated by subtracting OD obtained in the presence of agonist from the one obtained in its absence. Results were expressed as % of receptors initially present at the membrane according to the following calculation:  $100 \times (\text{OD}_{\text{Basal}} - \text{OD}_{\text{Stimulated}})/(\text{OD}_{\text{Basal}})$  where  $\text{OD}_{\text{Basal}}$  and  $\text{OD}_{\text{Stimulated}}$  correspond to the signal obtained in absence or presence of agonist, respectively [10].

#### *Immunofluorescence (IF) microscopy*

Immunocytochemistry experiments were carried out 2 days after transfection as previously described [8]. Briefly, labeling of surface Flag-DOPrs was done by introducing  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mouse anti-Flag M1 antibody (1:100; Sigma) to the incubation medium 30 min prior to vehicle (DMSO 0.01 %) or agonists (10  $\mu$ M). Following treatments of different durations (15–120 min), neurons were washed in  $\text{Ca}^{2+}$ -free phosphate buffered solution (PBS) ( $3 \times 1$  min, at 37 °C). These washes made it possible to remove treatment drugs as well as antibody bound to surface receptors, thus ensuring that only Flag-DOPrs that had been internalized and protected from washes, conserved first antibody labeling [20]. Cells were then fixed with 4 % PFA and permeabilized in PBS/0.1 % triton. Non-specific sites were blocked with PBS/BSA 1 % (10 min at RT) and neurons then exposed to secondary antibody (donkey anti-mouse Alexa-488; 1:1,000; Molecular Probes). All images were acquired using a Prairie Technologies point-scanning confocal except for Fig. 5, where the microscope used was an Olympus FluoView 1,000 confocal system. Mean cytosolic labeling intensity was quantified in cells that had been exposed to vehicle or agonist for 60 min, using ImageJ software according to a previously described method [8]. Briefly, nuclear integrated intensity was subtracted from the integrated intensity present within the perimeter of the neuron soma. The resulting value was divided by the area comprised between the nuclear and outer perimeters of the cell to yield mean



cellular intensity. Nuclear fluorescence was considered as the background, and its mean intensity subtracted from the quotient described above.

### **cAMP accumulation**

cAMP accumulation assays were carried out according to a previously described protocol [21], [3H]ATP and [3H] cAMP were separated by sequential chromatography on Dowex exchange resin and aluminum oxide columns. cAMP produced was estimated by calculating the ratio of [3H]cAMP/([3H]ATP + [3H]cAMP) in each sample.

### **BRET assays**

BRET assays for  $\beta$ arr2 recruitment were conducted using a modified version of a previous protocol [8]. Briefly, HEK293 cells grown in 100 mM Petri dishes were transfected with:  $\beta$ arr2-Luc (0.2  $\mu$ g) and DOPr-YFP (6  $\mu$ g). Experiments were carried out 2 days after transfection. At this time, cells were kept at 37 °C and exposed to vehicle or DOPr agonists (1  $\mu$ M) for 5 min. For experiments assessing PKC activity, cells were pretreated with PMA (500 nM) for 60 min prior to exposure to ligands. Treatment was stopped by washing cells with ice-cold phosphate-buffered solution (PBS) following which they were transferred to 96-well plates (white Optiplate; PerkinElmer Life Sciences) and BRET measures obtained in a Victor3 plate reader (PerkinElmer Life Sciences) 5 min after manual addition of coelenterazine h. Plates were then introduced into a Victor3 plate reader (PerkinElmer Life Sciences) and BRET measures were determined by calculating the ratio of light emitted by YFP (520–550 nm) over the light emitted by Rluc (440–480 nm). BRET values were then corrected by subtracting the background signal (detected when Rluc-tagged constructs were expressed without acceptor) from the BRET signal detected in cells coexpressing both Rluc and YFP (Net BRET).

### **Western blot**

Two days after siRNA transfection, neurons or HEK293 cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % triton X100, 0.25 % deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml Aprotinin, PI 1X, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> et 1 mM NaF). Following centrifugation at 10,000 rpm for 30 min, the supernatant containing membranes and cytosol was recovered. GRK2 and  $\beta$ arr resolved in SDS-PAGE were then transferred (50 mA, 16 h, Bio-Rad Mini-Trans Blot apparatus) from the gels onto nitrocellulose (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). GRK2 polyclonal antibody (SRC2: sc-18; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) and  $\beta$ arr antibody (a generous gift from Dr. S. Laporte, McGill University) were used at a

dilution of 1:200 and 1:1,000 to determine, respectively, the amount of total GRK2 and of  $\beta$ arr present in cells transfected with siRNA or scrambled controls. Secondary anti-rabbit horse-radish-conjugated antibody was used at 1:20,000 dilution (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Chemiluminescence detection reagent (GE Healthcare) was used to reveal blotted proteins and images of immunoreactive bands were acquired with MCID (Imaging Research Inc, Canada).

### **Curve fitting**

Concentration response curves describing modulation of cAMP production or DOPr internalization were obtained for five different agonists. In a first series of analyses, curves were generated with GraphPad 5 using the four parameter logistic function  $y = a + (b - a)/(1 + 10(\log EC_{50} - x).c)$  and fixing the slope parameter  $c$  at the value of one or allowing it to freely vary ( $y \rightarrow$  measured response,  $a \rightarrow$  minimal asymptote,  $b \rightarrow$  maximal asymptote,  $a-b \rightarrow E_{max}$ ). In every case, data were best fit by the equation with slope fixed at one. Concentration response curves were also analyzed with the operational model of agonism [22] to obtain efficacy ( $\tau$ ) and functional affinity (KA) values that were then used in the calculation of  $\log(\tau/KA)$  for the calculation of bias [13]. Curve fitting was done using the equation:  $y = basal + (E_{max} - basal)/1 + [(10\log KA + x)/(10\log \tau + x)]^n$ , where basal corresponds to the response observed in the absence of agonist;  $E_{max}$  is the maximal response of the system; KA denotes agonist affinity for the receptor state(s) mediating the response;  $\tau$  describes agonist efficacy;  $x$  corresponds to the logarithm of molar concentration of agonist and  $n$  is the slope of the function which links occupancy to response. System parameters ( $n$  and  $E_{max}$ ) were estimated from curves generated by full agonists DPDPE and SNC-80, where the only constraint imposed was for each of these values to be shared by both ligands. Estimates for cyclase dose–response curves were  $E_{max}$ : 75 and  $n$ : 0.72. Estimates for internalization curves were  $E_{max}$ : 64 and  $n$ : 1.1. These values were then used as system parameters to simultaneously fit curves for all ligands (Prism5 operational model “partial agonist”), yielding corresponding  $\tau$  and KA values for each agonist except the standard, DPDPE.  $\tau$  and KA values for DPDPE were obtained from depletion assays in which dose–response curves were generated in cells expressing progressively lower amounts of receptors (Prism5 operational model: receptor depletion).  $E_{max}$  and  $n$  values used to fit curves in depletion mode were the same as above. Pooled standard error values were calculated as in Gregory et al. [23]:  $pooled\ SE = \sqrt{(S.E._1)^2 + (S.E._2)^2}$ .

## **Results**

### ***Establishing evidence of ligand bias in DOPr-mediated responses***

Many MOPr and DOPr agonists display an “imbalance” in their ability to promote maximal signaling and regulatory responses [24–26]. However, the bases for this imbalance remain a matter of active investigation, in particular the extent to which biased agonism may contribute to poor sequestration by agonists that effectively engage signaling [7, 26]. To address this question, we used HEK293 cells to compare cAMP modulation and sequestration induced by five different DOPr agonists. Dose–response curves for these responses and corresponding Emax (maximal effect) and potency (EC50) values appear in Fig. 1 and Tables 1 and 2. Data presented therein indicate that maximal responses (Emax) by DPDPE and SNC-80 were significantly larger than those evoked by morphine, UFP-512, and TIPP, both in cyclase and internalization assays. However, Emax values for partial agonists were not proportional across the two responses. On the one hand, the three partial agonists inhibited cAMP production displaying responses that ranged between 30 and 80 % of maximal inhibition induced by the standard DPDPE (Tables 1, 2). On the other hand, morphine induced no significant sequestration ( $p = 0.2136$ ;  $n = 11$ ) while internalization by UFP-512 and TIPP was significant ( $p < 0.01$ ;  $n = 9–10$ ) but only reached ~10 % of the response induced by DPDPE (Fig. 1b). As shown in Supplementary Fig. 1, insufficient incubation time could not have accounted for the small magnitude of internalization by partial agonists, since kinetic experiments indicated that at the time at which dose–response curves were obtained (30 min) sequestration had attained its plateau.

One of the favored explanations for the observed “disproportion” in the magnitude of signaling and internalization Emax values is the existence of ligand bias [26]. However, disproportion without a reversal in the rank order of maximal response may admit alternative interpretations since Emax values depend not only on ligand properties but also on system determinants such as total receptor number, maximal response allowed by the system, and the efficiency with which the stimulus imparted by an active receptor couples to the response of interest [27]. Based on these considerations, it is possible that a more efficient stimulus–response coupling and/or the saturation of maximal response in cyclase assays could have resulted in partial agonists (UFP-512, TIPP, and morphine) displaying “disproportionately” higher Emax values in cyclase than in internalization assays.

The operational model proposed by Black and Leff [22] provides a means of estimating relative drug efficacies while controlling for the above-mentioned confounders and, at the same time, allows quantifying the bias across different responses [12, 13]. Quantification is achieved by calculating two operational parameters from dose–response curves: (1) ligand efficacy ( $\tau$  to induce each of the responses of interest and (2) “functional affinity” (KA), which describe the tendency of the agonist to interact with receptor state(s) mediating the response [12, 13]. According to this conception of the operational model, bias may result from a ligand displaying distinct relative efficacies ( $\tau$ ) at different pathways and/or from its differential affinity for the receptor state(s) mediating these effects. Whatever the combination, all possibilities are contemplated by calculating a transduction coefficient  $\tau/KA$ , which describes the efficiency with which a drug evokes a particular response. We have used this approach to measure signaling versus internalization bias for the different DOPr agonists.

Operational parameters derived from cAMP accumulation and internalization assays are shown in Tables 3 and 4. Within the context of the operational model, parameters obtained from cyclase dose–response curves indicate that the efficacy with which UFP-512 ( $\tau = 0.35 \pm 0.07$ ) and morphine ( $\tau = 0.44 \pm 0.26$ ) activated the receptor to inhibit cAMP production was not different from each other, but UFP-512 displayed much higher affinity for the receptor state(s) mediating this effect ( $\log KA_{UFP} = -8.82 \pm 0.18$ ,  $\log KA_{MOPr} = -5.02 \pm 0.36$ ; Tables 3, 4). Thus, despite displaying similar efficacies, UFP-512 had a larger transduction coefficient than morphine [ $\log (\tau/KA)_{UFP} = 9.16 \pm 0.20$ ,  $\log (\tau/KA)_{MOPr} = 5.46 \pm 0.45$ ; Tables 3, 4]. Taking  $\log (\tau/KA)$  coefficients as an indicator of drug efficiency to inhibit cAMP production [12], morphine’s coefficient was the lowest while that of UFP-512 did not differ from those of DPDPE and SNC-80 (Tables 3, ,4).4). Also note that although TIPP efficacy was much lower than that of DPDPE, differences in apparent affinities accounted for the fact that TIPP’s transduction coefficient was not different from that of this full agonist (Tables 3, 4). Internalization responses were also analyzed by means of the operational model, except for morphine where absence of internalization prevented the calculation of meaningful operational parameters. For the remaining ligands,  $\tau$  values allowed to distinguish two groups of drugs in which DPDPE/SNC-80 displayed higher efficacy for internalization than UFP-512/TIPP (Tables 3, 4). However, differences in KA accounted for the fact that the transduction coefficient

for SNC-80 [ $\log(\tau/\text{KA})$ :  $5.51 \pm 0.50$ ] was not different from that of UFP-512 [ $\log(\tau/\text{KA})$ :  $5.90 \pm 0.24$ ] and was lower than that of TIPP [ $\log(\tau/\text{KA})$ :  $6.83 \pm 0.33$ ]. Conversely, despite not differing at the level of their  $\tau$  values, distinct functional affinities ( $\log \text{KASNC} = -4.28 \pm 0.38$ ,  $\log \text{KADPDPE} = -6.12 \pm 0.11$ ) determined that transduction coefficients were also different for the two full agonists [ $\log(\tau/\text{KA})_{\text{SNC}} = 5.51 \pm 0.50$ ,  $\log(\tau/\text{KA})_{\text{DPDPE}} = 6.85 \pm 0.13$ ; Tables 3, 4].

To estimate ligand bias from transduction coefficients it is necessary to correct for possible differences in the efficiency with which the receptor itself couples to the different responses. For this purpose,  $\tau/\text{KA}$  values need to be “normalized” to the same standard across responses of interest [12, 13]. Here the standard used was DPDPE and relative  $\log(\tau/\text{KA})$  values are shown in Table 5. Comparison of normalized coefficients indicated that SNC-80 and UFP-512 were respectively 50 and 132-fold more efficient in generating cyclase than internalization as compared to DPDPE. These values confirm that despite the marked imbalance in their internalization  $E_{\text{max}}$ , both agonists preferentially activate signaling over sequestration when compared to DPDPE.

### ***DOPr internalization in neurons***

Regulatory proteins that control opioid receptor internalization are not the same across different cell types and this variation could influence not only the efficiency of stimulus response coupling but also the signaling molecules with which the receptor interacts to produce internalization. As a consequence, cellular background could influence both the magnitude of response and the molecular determinants of internalization. To determine whether these considerations were relevant to DOPr agonists, we compared magnitude and mechanisms of ligand-induced internalization in HEK293 cells and cultured neurons, which are more akin to the cellular background where DOPr agonists produce their analgesic effects. Internalization in neurons was assessed by transfecting rat cortical neurons with Flag-DOPrs and labeling surface receptors prior to treating them with ligand concentrations that supported maximal internalization in HEK293 cells (10  $\mu\text{M}$ ). At the end of different incubation periods, receptors remaining at the membrane were stripped of the labeling antibody such that only DOPrs protected by internalization were subsequently revealed by immunofluorescence labeling. As shown in Fig. 2a, neurons that were exposed to vehicle displayed modest intracellular labeling, which is consistent with low levels of constitutive internalization. Treatment with different

ligands induced progressive increase in intracellular immunoreactivity, with marginal increment beyond 60 min exposure to the agonist. Consequently, internalization was quantified following 60-min treatment with different ligands (Fig. 2b). Internalization by DPDPE and SNC-80 were similar, and significantly higher than responses by UFP512, morphine, and TIPP, whose respective magnitudes were  $62 \pm 4$ ,  $49 \pm 3$ , and  $47 \pm 3$  % of the effect by DPDPE. Thus, at a concentration of 10  $\mu$ M, the difference in internalization between full and partial agonists became less pronounced, a behavior that could be explained by a more effective stimulus–response coupling in neurons than in HEK cells.

***Mechanisms involved in DOPr internalization are cell-dependent***

Internalization is a complex cellular response usually determined by multiple signals. In the case of DOPr, these signals include G protein-coupled receptor kinases (GRKs) [28], PKCs [29, 30], and  $\beta$ arrrs [28, 31, 32] whose expression may vary across different cell types [33, 34]. Hence, we were interested in finding out if and to what extent distinct cellular backgrounds influenced the type of regulatory protein contributing to ligand-dependent DOPr internalization.

Implication of neuronal  $\beta$ arrrs was assessed by silencing their expression (Fig. 3a). As shown in Fig. 3b (inset), neurons expressed  $\beta$ arr1 and  $\beta$ arr2, both of which were down-regulated by siRNA transfection. As a result, sequestration by a maximal effective concentration of different agonists was reduced by ~30–60 % (Fig. 3a, b), indicating that all of them relied upon  $\beta$ arr function for effective internalization.  $\beta$ arr implication in ligand-induced internalization of DOPr was also assessed in HEK293 cells by means of a construct corresponding to the C-terminal region of  $\beta$ arr1. This fragment binds to clathrin at the same site as endogenous  $\beta$ arrrs, acting as a dominant negative mutant on the internalization function of  $\beta$ arr1 and  $\beta$ arr2 [16], both of which were expressed in HEK293 cells (Fig. 3c, inset). Expression of the dominant negative construct inhibited DOPr sequestration by SNC-80 and DPDPE (Fig. 3c), indicating their ability to also engage  $\beta$ arr function in this cell background. Because of the small magnitude of internalization by partial agonists, the effects of dominant  $\beta$ arr constructs were not assessed for these ligands. However, all five agonists were tested in BRET (bioluminescence resonance energy transfer) assays to determine their ability to induce  $\beta$ arr2 recruitment. As shown in Fig. 3d, and in keeping with internalization responses, only ligands that induced significant recruitment of  $\beta$ arr2 triggered maximal DOPr sequestration.

$\beta$ arr recruitment to GPCRs (G protein-coupled receptors) is modulated by phosphorylation [35]. In the case of DOPr, GRKs [36–38] and PKCs [30] both enhance  $\beta$ arr-dependent internalization of the receptor. Here we observed that siRNA silencing of neuronal GRK2 reduced intracellular accumulation of immunoreactivity by ~50–70 %, depending on the agonist used (Fig. 4a, b). In contrast, GRK2 silencing had no effect on sequestration triggered by DPDPE or SNC-80 in HEK293 cells (Fig. 4c), although the same kinase was actively involved in the internalization of another GPCR. Indeed, GRK2 participated in 5-HT<sub>4</sub> receptor internalization, as indicated by the fact that silencing of this kinase blocked 5-HT<sub>4</sub>R (5-hydroxytryptamine receptor 4) internalization by its endogenous ligand (membrane 5-HT<sub>4</sub> receptors internalized by 5-HT in HEK293 cells + scrambled siRNA:  $41.5 \pm 0.5$  %; in HEK293 cells + GRK2 siRNA:  $31.8 \pm 1.6$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 3$ ).

PKC contribution to DOPr internalization was assessed using chelerythrine as a universal PKC inhibitor [39]. In neurons, chelerythrine (4  $\mu$ M) reduced internalization by ~40–70 %, and this effect was significant for 10  $\mu$ M concentrations of all ligands, except morphine (Fig. 5a, b). In HEK293 cells, the same chelerythrine treatment did not modify maximal internalization by SNC-80 or DPDPE (10  $\mu$ M), although it reduced the sequestration rate of the latter (KCTL  $0.08 \pm 0.01$ /min; KCHEL  $0.05 \pm 0.01$ ;  $p = 0.011$ ;  $n = 4$ ; Fig. 5c). To further determine a possible contribution of PKC to DOPr internalization in HEK293 cells, dose–response curves for DPDPE and SNC-80 were completed in presence and absence of chelerythrine (4  $\mu$ M). There was no effect on internalization by DPDPE (Fig. 5d) and a left-shift in the case of SNC-80 (Fig. 5e), implying that inhibition of PKC activity enhanced internalization by this agonist. The reason for this left-shift is not clear, but a possible explanation could be that PKC inhibition could have released DOPr from an interaction that interfered with its recognition by “internalizing proteins” such as  $\beta$ arrs. Independent of the reason for the observed shift, the data confirm that inhibition of PKC activity did not block DOPr internalization, ratifying that this type of kinase does not actively contribute to DOPr sequestration by either agonist in HEK293 cells.

Phosphorylation by GRK2 requires DOPr activation by an agonist [40, 41] while PKC produces heterologous phosphorylation of the receptor [30]. However, both mechanisms can influence each other since pre-activation of PKCs may enhance DOPr internalization by subsequent agonist stimulation [30]. Data shown above indicated that both types of kinases

contributed to DOPr sequestration in neurons but not in HEK293 cells, even if GRK2 was present and active in the latter. It was therefore of interest to determine whether enhancing PKC activity in HEK293 cells could recruit additional internalization mechanisms to produce similar magnitude of internalization as in neurons. To evaluate this possibility, HEK293 cells were treated with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (500 nM; 60 min) to then assess changes in ligand-induced  $\beta$ arr2 recruitment and internalization. Activation of typical and novel PKC isoforms by the phorbol ester [42, 43] increased  $\beta$ arr2 recruitment (Fig. 6a) and DOPr internalization (Fig. 6b), confirming PKC as heterologous modulator of DOPr endocytosis. However, increase in internalization was quite modest, particularly for partial agonists, indicating that the neuronal internalization phenotype could not be recreated by simply increasing basal PKC activity levels.

Statistical analysis of data obtained in neurons indicated a significant interaction between the magnitude of sequestration promoted by each ligand and the extent to which  $\beta$ arr, GRK2, and PKC contributed to agonist-promoted internalization (Figs. 3b, 4b, 4b, and 5b). The presence of this interaction implies that agonists differ in their ability to engage the different regulatory proteins. To better appreciate these differences, we calculated the percentage of maximal agonist-induced internalization that could be blocked by silencing the function of  $\beta$ arr, GRK2 and PKC. The results of these calculations are shown in Fig. 7, where it can be appreciated that GRK2 contribution to DOPr internalization was not different among ligands (Fig. 7a), while a greater proportion of the internalization produced by UFP-512 relied on PKC as compared to morphine (Fig. 7b). Ligands also differed in their ability to engage  $\beta$ arr-mediated internalization, with UFP-512 being more effective than DPDPE, and TIPP more so than morphine (Fig. 7c). Rank order of ligand ability to engage the different responses were compared among themselves and to  $E_{max}$  values obtained in cAMP assays (Fig. 7d). A significant reversal in rank order was only observed for cyclase  $E_{max}$  in HEK cells as compared to ligand ability to engage  $\beta$ arr-dependent internalization in neurons. Although this observation does not exclude possible ligand-specific responses for GRK2 or PKC, the data are consistent with the notion that cAMP inhibition in HEK cells and  $\beta$ arr-mediated internalization in neurons are mediated by distinct receptor states.



## **Discussion**

Results obtained in this study revealed a measurable bias in the efficiency with which DOPr agonists engaged cyclase versus internalization responses in HEK293 cells. The data also indicated that molecular determinants of DOPr sequestration were different in HEK cells and neurons, and comparison of maximal responses showed that cyclase inhibition in HEK cells and  $\beta$ arr-dependent internalization in neurons did not follow the same rank order, implying that these effects were agonist-specific.

Numerous studies have established that DOPr may adopt different active conformations [44, 45], which differ in their signaling and regulatory properties [8, 14, 46]. The challenge now is to determine whether these functional differences may be exploited for therapeutic purposes. Answering this question requires not only the identification of novel, functionally selective molecules but also the ability to accurately quantify bias among different responses. Such a requirement has prompted the development of novel analytical tools (reviewed by Kenakin and Christopoulos [13]), several of which share the operational model of Black and Leff [22] as a common basis. However, the different methods for calculating bias make distinct assumptions with respect to the way the ligand, the receptor, and its signaling partners influence each other [12, 13, 47]. One of the methods assumes that: (1) conformations stabilized by different ligands may distinctively recognize/activate specific intracellular signaling partners and (2) interaction of the receptor with different signaling proteins may distinctively modify its affinity for different agonists [12, 13]. An alternative quantification approach also admits that ligand-specific conformations may distinctively engage different signaling partners, but assumes independence between ligand affinity for the receptor and receptor association with cellular proteins that support different signals [47]. In keeping with this assumption, the latter method provides the operational model with fixed affinity values and only uses operational efficacies to measure whether a ligand displays bias in producing two responses [47]. Such an approach has been successfully applied to reveal a significant bias in endomorphin-2's efficacy to induce G protein activation versus  $\beta$ arr2 recruitment [48]. In the present study, we opted for the model which allows ligand affinity for the receptor to be influenced by its signaling partner(s) [13]. As a consequence, "functional affinity" or  $K_A$  values were calculated as one of the parameters of the dose-response curve, yielding an estimate of the agonist's affinity to bind receptor

conformation(s) mediating each of the responses. The values obtained indicated that  $K_{AcAMP}$  for DPDPE, SNC-80, UFP-512, and TIPP were lower than corresponding  $K_{A_{intern}}$  values (Supplementary Table 1), implying that these ligands would better recognize the receptor complex that is responsible for cyclase modulation than the one in which the receptor is associated with cellular mediators of internalization. Actually, when cyclase and internalization data for the different agonists were assumed to share a fixed affinity value for both responses, only cyclase data points could be reasonably fit by the model (Supplementary Fig. 2), confirming that a single affinity state could not account for functional responses assessed in this study. The aspect of ligand diversity that is captured by allowing the receptor to adopt distinct ligand affinities for different responses was incorporated into the calculation of bias by comparing transduction coefficients ( $\tau/K_A$ ) instead of operational affinities for each of the functional readouts.

Comparison of normalized transduction coefficients for cAMP inhibition and DOPr internalization in HEK293 cells showed that SNC-80 and UFP-512 displayed a significant bias towards cyclase signaling as compared to DPDPE. The fact that UFP-512 was more efficient in inhibiting cAMP production than inducing internalization confirms the notion that some partial agonists at opioid receptors may display signaling versus internalization bias [49, 50]. Perhaps more surprising was the fact that SNC-80 was also found to display similar bias as the partial agonist. In fact, when compared to ARM100390, SNC-80 had been characterized as a functionally selective ligand which preferentially induces internalization over signaling [7]. Different reasons could explain divergent observations between the two reports. First, the signaling response monitored in each of the studies was different, focusing on GTPS binding in one study and cyclase modulation in the other. Second, the two reports compared SNC-80 to different standards, namely ARM100390 and DPDPE. Third, quantification of internalization was different, relying on kinetic parameters in one study [7] and endpoint measurements in the other. Finally, cellular backgrounds used in both studies were different, with the present study measuring bias in HEK293 cells and that of Pradhan et al. [7] monitoring responses in brain tissue and cultured neurons.

Evidence presented herein indicates that neither the magnitude of maximal internalization by partial agonists nor the signals mediating ligand-induced internalization were conserved across cellular backgrounds. Indeed, although  $\beta$ arr implication was a common

element in HEK293 cells and neurons, PKC and GRK2 contributed to ligand internalization capacity only in neurons. Since GRK2 was present and active in the sequestration of another HEK293-expressed receptor, it is possible that key determinants for its participation in DOPr internalization were either absent or occluded in this cellular background. Hence, if bias is considered the result of distinct interactions between ligand-specific receptor conformations and cellular proteins that determine response [51–53], the very existence of internalization signals that are present in neurons and not in HEK cells would imply that bias described for one cell type need not persist in another. This limitation is not necessarily exclusive to heterologous systems versus neurons, since molecular determinants of internalization need neither be the same across all neuronal populations expressing opioid receptors [7, 33].

Ligand ability to stabilize/recognize distinct receptor conformations constitutes the molecular basis of bias [24, 51]. As heterologous DOPr regulators, PKCs phosphorylate the receptor at a fixed residue (Ser344-independent), regardless of its occupancy [30]. As such, PKCs would not be expected to translate ligand-dependent conformational diversity into ligand-specific responses. On the other hand, GRK2 is recruited to agonist-occupied receptors [41, 54] where it may discriminate ligand-specific receptor states [55] and establish phosphorylation patterns [56] that transfer this diversity to downstream internalization such as  $\beta$ arrs [57, 58]. GRK2 contribution to maximal internalization in neurons did not differ among agonists, preventing us from establishing a distinct rank order in ligand ability to engage this mechanism. On the other hand, ligand rank order to promote  $\beta$ arr-dependent internalization and cAMP inhibition were reversed for DPDPE and UFP-512 as well as for morphine and TIPP. These differences cannot be simply explained by saturation of maximal responses or by differential amplification. Thus, despite the fact that they do not provide a quantitative estimation of bias, they are indicative of ligand-specific ability to modulate cyclase versus DOPr internalization in neurons.

In summary, we have provided quantitative evidence that DOPr agonists may display signaling versus internalization bias, and demonstrated that this type of functional selectivity is present in full and partial agonists. We have also shown that DOPr internalization mechanisms are cell-dependent and established that  $\beta$ arr-dependent internalization in neurons and inhibition of cAMP production were ligand-specific.

## **References**

1. Dworkin RH. Introduction: recommendations for the diagnosis, assessment, and treatment of neuropathic pain. *Am J Med.* 2009;122(10 Suppl):S1–S2. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.04.004.
2. Gaveriaux-Ruff C, Nozaki C, Nadal X, Hever XC, Weibel R, Matifas A, Reiss D, Filliol D, Nassar MA, Wood JN, Maldonado R, Kieffer BL. Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain.* 2011;152(6):1238–1248. doi: 10.1016/j.pain.2010.12.031.
3. Fraser GL, Gaudreau GA, Clarke PB, Menard DP, Perkins MN. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br J Pharmacol.* 2000;129(8):1668–1672. doi: 10.1038/sj.bjp.0703248.
4. Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnell D, Beaudet A. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain.* 2003;101(1–2):199–208.
5. Nagi K, Pineyro G. Regulation of opioid receptor signalling: implications for the development of analgesic tolerance. *Mol Brain.* 2011;4:25. doi: 10.1186/1756-6606-4-25.
6. Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol.* 2011;22(5–6):405–414. doi: 10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c.
7. Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS ONE.* 2009;4(5):e5425. doi: 10.1371/journal.pone.0005425.
8. Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, Amraei M, Chabot-DOPre AJ, Millecamps M, Stone LS, Pineyro G. Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *J Neurosci.* 2012;32(14):4827–4840. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012.

9. Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(10):581–590. doi: 10.1016/j.tips.2011.06.008.
10. Nozaki C, Le Bourdonnec B, Reiss D, Windh RT, Little PJ, Dolle RE, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. Delta-opioid mechanisms for ADL5747 and ADL5859 effects in mice: analgesia, locomotion, and receptor internalization. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342(3):799–807. doi: 10.1124/jpet.111.188987.
11. Marie N, Landemore G, Debout C, Jauzac P, Allouche S. Pharmacological characterization of AR-M1000390 at human delta opioid receptors. *Life Sci.* 2003;73(13):1691–1704.
12. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(3):193–203. doi: 10.1021/cn200111m.
13. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(3):205–216. doi: 10.1038/nrd3954.
14. Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller PW, Pineyro G. Internalization and SRC activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7808–7816. doi: 10.1074/jbc.M411695200.
15. Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, Huard K, Paquin-Gobeil M, Pineyro G. Src promotes delta opioid receptor (DOPr) desensitization by interfering with receptor recycling. *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):147–163. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00308.x.
16. Krupnick JG, Santini F, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32507–32512.
17. Fasano C, Thibault D, Trudeau LE. Culture of post-natal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci.* 2008;Chapter 3(Unit 3.21) doi: 10.1002/0471142301.ns0321s44.

18. Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron*. 1998;20(4):727–740.
19. Thibault D, Albert PR, Pineyro G, Trudeau LE. Neurotensin triggers dopamine D2 receptor desensitization through a protein kinase C and beta-arrestin1-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9174–9184. doi: 10.1074/jbc.M110.166454.
20. Vargas GA, Von Zastrow M. Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37461–37469. doi: 10.1074/jbc.M401034200.
21. Pineyro G, Azzi M, deLean A, Schiller PW, Bouvier M. Reciprocal regulation of agonist and inverse agonist signaling efficacy upon short-term treatment of the human delta-opioid receptor with an inverse agonist. *Mol Pharmacol*. 2005;67(1):336–348. doi: 10.1124/mol.104.004549.
22. Black JW, Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1983;220(1219):141–162.
23. Gregory KJ, Sexton PM, Tobin AB, Christopoulos A. Stimulus bias provides evidence for conformational constraints in the structure of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2012;287(44):37066–37077. doi: 10.1074/jbc.M112.408534.
24. Pineyro G, Archer-Lahlou E. Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cell Signal*. 2007;19(1):8–19. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.05.026.
25. Molinari P, Vezzi V, Sbraccia M, Gro C, Riitano D, Ambrosio C, Casella I, Costa T. Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin interactions. *J Biol Chem*. 2010;285(17):12522–12535. doi: 10.1074/jbc.M109.059410.
26. Groer CE, Schmid CL, Jaeger AM, Bohn LM. Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J Biol Chem*. 2011;286(36):31731–31741. doi: 10.1074/jbc.M111.248310.
27. Stephenson RP. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother*. 1956;11(4):379–393.

28. Zhang X, Wang F, Chen X, Chen Y, Ma L. Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. *J Neurochem.* 2008;106(2):781–792. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05431.x.
29. Liu JG, Anand KJ. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001;38(1–2):1–19.
30. Xiang B, Yu GH, Guo J, Chen L, Hu W, Pei G, Ma L. Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *J Biol Chem.* 2001;276(7):4709–4716. doi: 10.1074/jbc.M006187200.
31. Marie N, Aguila B, Allouche S. Tracking the opioid receptors on the way of desensitization. *Cell Signal.* 2006;18(11):1815–1833. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.03.015.
32. Qiu Y, Loh HH, Law PY. Phosphorylation of the delta-opioid receptor regulates its beta-arrestins selectivity and subsequent receptor internalization and adenylyl cyclase desensitization. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22315–22323. doi: 10.1074/jbc.M611258200.
33. Raehal KM, Schmid CL, Groer CE, Bohn LM. Functional selectivity at the mu-opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacol Rev.* 2011;63(4):1001–1019. doi: 10.1124/pr.111.004598.
34. Schmid CL, Bohn LM. Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation. *Pharmacol Ther.* 2009;121(3):285–293. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.11.005.
35. Gurevich VV, Gurevich EV. Custom-designed proteins as novel therapeutic tools? The case of arrestins. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12:e13. doi: 10.1017/S1462399410001444.
36. Hasbi A, Allouche S, Sichel F, Stanasila L, Massotte D, Landemore G, Polastron J, Jauzac P. Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;293(1):237–247.
37. Trapaidze N, Keith DE, Cvejic S, Evans CJ, Devi LA. Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *J Biol Chem.* 1996;271(46):29279–29285.

38. Zhang J, Ferguson SS, Law PY, Barak LS, Caron MG. Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin. *J Recept Signal Transduct Res.* 1999;19(1–4):301–313. doi: 10.3109/10799899909036653.
39. Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172(3):993–999.
40. Bradbury FA, Zelnik JC, Traynor JR. G protein-independent phosphorylation and internalization of the delta-opioid receptor. *J Neurochem.* 2009;109(5):1526–1535. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06082.x.
41. Li J, Xiang B, Su W, Zhang X, Huang Y, Ma L. Agonist-induced formation of opioid receptor-G protein-coupled receptor kinase (GRK)-G beta gamma complex on membrane is required for GRK2 function in vivo. *J Biol Chem.* 2003;278(32):30219–30226. doi: 10.1074/jbc.M302385200.
42. Wang JP, Raung SL, Tsao LT, Hsu MF, Lin CN. Blockade of protein kinase C is involved in the inhibition by cycloheterophyllin of neutrophil superoxide anion generation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;355(5):551–558.
43. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishi-zuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospho-lipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1982;257(13):7847–7851.
44. Salamon Z, Hraby VJ, Tollin G, Cowell S. Binding of agonists, antagonists and inverse agonists to the human delta-opioid receptor produces distinctly different conformational states distinguishable by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Pept Res.* 2002;60(6):322–328. (pii: 2o1060)
45. Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M, Pineyro G. Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem.* 2008;283(22):15078–15088. doi: 10.1074/jbc.M707941200.



46. Xu C, Hong MH, Zhang LS, Hou YY, Wang YH, Wang FF, Chen YJ, Xu XJ, Chen J, Xie X, Ma L, Chi ZQ, Liu JG. Serine 363 of the  $\delta$ -opioid receptor is crucial for adopting distinct pathways to activate ERK1/2 in response to stimulation with different ligands. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 24):4259–4270. doi: 10.1242/jcs.073742.
47. Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, Dewire SM, Violin JD, Lefkowitz RJ. Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Mol Pharmacol.* 2011;80(3):367–377. doi: 10.1124/mol.111.072801.
48. Rivero G, Llorente J, McPherson J, Cooke A, Mundell SJ, McArthur CA, Rosethorne EM, Charlton SJ, Krasel C, Bailey CP, Henderson G, Kelly E. Endomorphin-2: a biased agonist at the mu-opioid receptor. *Mol Pharmacol.* 2012;82(2):178–188. doi: 10.1124/mol.112.078659.
49. Martini L, Whistler JL. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(5):556–564. doi: 10.1016/j.conb.2007.10.004.
50. Alvarez VA, Arttamangkul S, Dang V, Salem A, Whistler JL, Von Zastrow M, Grandy DK, Williams JT. Mu-Opioid receptors: ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization, and internalization. *J Neurosci.* 2002;22(13):5769–5776. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2002-02.2002.
51. Kenakin T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol.* 2007;72(6):1393–1401. doi: 10.1124/mol.107.040352.
52. Kenakin TP. Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2012;165(6):1659–1669. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01749.x.
53. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(1):1–13. doi: 10.1124/jpet.106.104463.
54. Breton B, Lagace M, Bouvier M. Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor, G $\alpha$ 11 $\beta$ 1 $\gamma$ 2, and GRK2. *FASEB J.* 2010;24(12):4733–4743. doi: 10.1096/fj.10-164061.

55. Zimmerman B, Beautrait A, Aguila B, Charles R, Escher E, Claing A, Bouvier M, Laporte SA. Differential beta-arrestin-dependent conformational signalling and cellular responses revealed by angiotensin analogs. *Sci Signal*. 2012;5(221):ra33. doi: 10.1126/scisignal.2002522.
56. Okura T, Varga EV, Hosohata Y, Navratilova E, Cowell SM, Rice K, Nagase H, Hraby VJ, Roeske WR, Yamamura HI. Agonist-specific down-regulation of the human delta-opioid receptor. *Eur J Pharmacol*. 2003;459(1):9–16. (pii: S0014299902028236)
57. Tarrant TK, Rampersad RR, Esserman D, Rothlein LR, Liu P, Premont RT, Lefkowitz RJ, Lee DM, Patel DD. Granulocyte chemotaxis and disease expression are differentially regulated by GRK subtype in an acute inflammatory arthritis model (K/BxN) *Clin Immunol*. 2008;129(1):115–122. doi: 10.1016/j.clim.2008.06.008.
58. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7805–7817. doi: 10.1074/jbc.M109.091173.

## **Figure legends**

**Figure 1. Dose–response curves showing ligand-induced changes in cAMP accumulation and receptor internalization.** **a** cAMP inhibition and **b** DOPr internalization were monitored in Flag-DOPr HEK293 cells. Inhibition in cAMP production was expressed as % change with respect to non-treated cells, and corresponds to mean  $\pm$  SEM of 6–9 independent experiments carried out in triplicate. DOPr sequestration was expressed as % of receptors present at the membrane before exposure to drugs for a period of 30 min. Values represent mean  $\pm$  SEM of 9–12 independent experiments carried out in triplicate. The main panels and insets, respectively, show dose–response curves generated by means of three parameter logistic equation or operational model as described in the Materials and methods section. Statistical analyses using two-way ANOVA showed an effect of drug ( $p < 0.0001$ ), and effect of concentration ( $p < 0.0001$ ) and an interaction ( $p < 0.0001$ ) both for cAMP and internalization assays. Subsequent comparisons by one-way ANOVA with Bonferroni correction indicated a significant effect of concentration for all drugs for both responses except for morphine in internalization assays. Detailed comparisons among drugs are provided in Tables 1 and 2.

**Figure 2. Internalization in neurons.** **a** Cortical neurons in primary cultures expressing Flag-DOPr were labeled at the surface prior to exposure to different ligands (10  $\mu$ M) for the indicated times. At the end of treatments, antibody bound to surface receptors was stripped and cells processed for visualization of intracellular labeling. A representative example from three independent time course experiments is shown. **b** Histograms correspond to mean intracellular labeling intensity quantified in neurons that were exposed to agonists or vehicle for 1 h and represent mean  $\pm$  SEM of 13–14 independent experiments. Internalization data were analyzed by means of one-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. # $p < 0.001$  as compared to vehicle; \*\*\*  $p < 0.001$

**Figure 3.  $\beta$ arrs are involved in DOPr internalization in neurons and HEK293 cells.** **a** Mean intracellular immunoreactivity was quantified (**b**) in neurons transfected with  $\beta$ arr specific or scramble siRNA and treated as above (60 min;  $n = 4$ ). Two-way ANOVA revealed effect of drug ( $p < 0.0001$ ), of siRNA ( $p < 0.0001$ ), and an interaction ( $p < 0.0001$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p <$

0.01; \*\*\*  $p < 0.001$  using Bonferroni post hoc tests to compare  $\beta$ arr-siRNA to scramble. Inset shows efficacy of  $\beta$ arr1/2 knock down. **c** HEK293 were exposed to SNC-80 or DPDPE as indicated, and sequestration expressed as % of receptors present at the membrane before exposure to agonists ( $n = 4$ ). Two-way ANOVA revealed effect of time ( $p < 0.0001$ ), DNMT- $\beta$ arr ( $p < 0.0001$ ) and a time  $\times$  DNMT- $\beta$ arr interaction ( $p < 0.0001$ ) for both agonists. Inset shows the presence of both  $\beta$ arr subtypes in HEK293 cells. **d** BRET measures were taken in HEK293 cells expressing DOPr-YFP and  $\beta$ arr2-Luc. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM of net BRET values ( $n = 10$ ). One-way ANOVA followed by Bonferroni correction revealed: \*  $p < 0.001$  as compared to vehicle; # $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$

**Figure 4. GRK2 is required for DOPr internalization in neurons but not in HEK293 cells.** **a** Neuronal expression of GRK2 was silenced by means of siRNA and the day of the experiment internalization was assessed as in previous figures. **b** Histograms correspond to mean intracellular immunoreactivity quantified in neurons transfected with specific or scrambled siRNA and exposed to different agonists. Results represent mean  $\pm$  SEM of five independent experiments. Data were analyzed by means of two-way ANOVA, which revealed an effect of drug ( $p < 0.0001$ ), siRNA ( $p < 0.0001$ ), and an interaction ( $p < 0.0001$ ). The significance of the effect of GRK2 silencing on internalization induced by different ligands was assessed by means of Bonferroni post hoc tests. \*  $p < 0.001$ . Inset shows effectiveness of GRK2 knockdown in neurons. **c** HEK293 cells stably expressing Flag-DOPr were transfected with indicated siRNAs, and internalization measured following incubation with SNC-80 or DPDPE. Results represent mean  $\pm$  SEM of four independent experiments carried out in triplicate. Two-way ANOVA analysis revealed an effect of time ( $p < 0.0001$ ) for both agonists. Inset shows effectiveness of GRK2 knockdown in HEK293 cells

**Figure 5. PKC activity contributes to DOPr internalization in neurons but not in HEK293 cells.** **a** Cortical neuron cultures expressing Flag-DOPr were exposed to chelerythrine (4  $\mu$ M) or vehicle and indicated ligands (10  $\mu$ M) as before. **b** Histograms correspond to mean intra-cellular immunoreactivity in the presence or absence of chelerythrine ( $n = 4$ ). Two-way ANOVA revealed an effect of drug ( $p < 0.0001$ ), chelerythrine ( $p < 0.0001$ ) and an interaction ( $p = 0.0012$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  following Bonferroni post hoc tests. As specified in the Materials and methods section, the microscope used in this series was different

from the one used in previous figures. **c** HEK293 cells stably expressing Flag-DOPr were exposed to chelerythrine as above and internalization measured following incubation with SNC-80 or DPDPE. Data were normalized to maximum observed in the absence of chelerythrine and correspond to mean  $\pm$  SEM of four experiments. Two-way ANOVA analysis revealed an effect of time ( $p < 0.0001$ ) for both agonists and a chelerythrine effect for DPDPE ( $p < 0.001$ ). Dose-response curves for **d** DPDPE and **e** SNC-80 were completed in cells treated with chelerythrine (4  $\mu$ M) or vehicle as indicated. Data were analyzed by two-way ANOVA revealing an effect of concentration ( $p < 0.001$ ;  $n = 3$ ) for DPDPE and an effect of concentration ( $p < 0.001$ ), of chelerythrine ( $p < 0.01$ ) and an interaction ( $p < 0.05$ ;  $n = 3$ ) for SNC-80.

**Figure 6. PKC activation produced an increase in  $\beta$ arr2 recruitment and DOPr internalization in HEK293 cells.** **a** HEK293 cells transiently expressing DOPr-YFP and  $\beta$ arr2-Luc were pretreated with PMA (500 nM) for 60 min prior to exposure to the indicated ligands (1  $\mu$ M) for 5 min and obtaining BRET readings. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of agonist-induced changes in net BRET and correspond to five independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by means of two-way ANOVA revealing an effect for PMA ( $p < 0.0001$ ) and ligands ( $p < 0.0001$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$  using post hoc Bonferroni comparisons. **b** HEK293 cells stably expressing Flag-DOPr were exposed to PMA as above and exposed to different agonists for the indicated periods of time. Internalization was expressed as % of receptors present at the membrane before exposure to agonist and represent mean  $\pm$  SEM of 4–5 independent experiments carried out in triplicate. Statistical analysis by two-way ANOVA revealed an effect for PMA ( $p < 0.0001$ ), for ligands ( $p < 0.0001$ ) and an interaction ( $p < 0.0001$ ). Post hoc Bonferroni comparisons indicated a significant effect of PMA on each agonist ( $p < 0.05$ ), except for morphine.

**Figure 7. Ligand rank order is not conserved for cAMP  $E_{max}$  values and  $\beta$ arr-dependent internalization in neurons.** The proportion of ligand-induced DOPr internalization that was blocked by interfering with the activity of neuronal  $\beta$ arr, PKC or GRK2 was calculated to establish the following rank orders: **a** ligand ability to engage GRK-2-dependent internalization ( $n = 5$ ), **b** ligand ability to engage PKC-dependent internalization ( $n = 4$ ), and **c**  $\beta$ arr-dependent-internalization ( $n = 4$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of the percentage of internalization blocked by interfering with the activity of each of the regulatory proteins. Data

were analyzed by means of one-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons and results appear in the figure. **d** Rank order of ligand Emax values in cyclase assays (n = 7–9). Results are expressed as in Tables 1 and 2, which also show details of statistical comparisons.

### **Supplementary figure legends**

#### ***Supplementary figure 1.***

***Time course of DOPr internalization in HEK cells.*** HEK293 cells stably expressing Flag-DOPr were exposed to different agonists (10  $\mu$ M) for the indicated time periods. Internalization was expressed as % of receptors present at the membrane before exposure to agonist and represent mean  $\pm$  SEM of 10 independent experiments carried out in triplicate. Statistical analysis by two way ANOVA revealed an effect for drug ( $p < 0.0001$ ), for time ( $p < 0.0001$ ) and an interaction ( $p < 0.0001$ ). Post-hoc Bonferroni comparisons indicated a significant effect of time for all drugs ( $p < 0.01$ ), except morphine.

#### ***Supplementary figure 2.***

***A single affinity state could not account for cyclase and internalization responses of DOPr agonists.*** (A) cAMP accumulation and (B) DOPr internalization data were fit with the operational model as described in the methodology section, except that  $K_A$  values for the agonists were fixed from published references as follows:  $K_{A_{SNC-80}}$ : 5,75 nM;  $K_{A_{UFP512}}$ : 100 pM;  $K_{A_{MOR}}$ : 213.80 nM;  $K_{A_{TIPP}}$ : 1.29 nM and  $K_{A_{DPDPE}}$ : 12.02 nM.

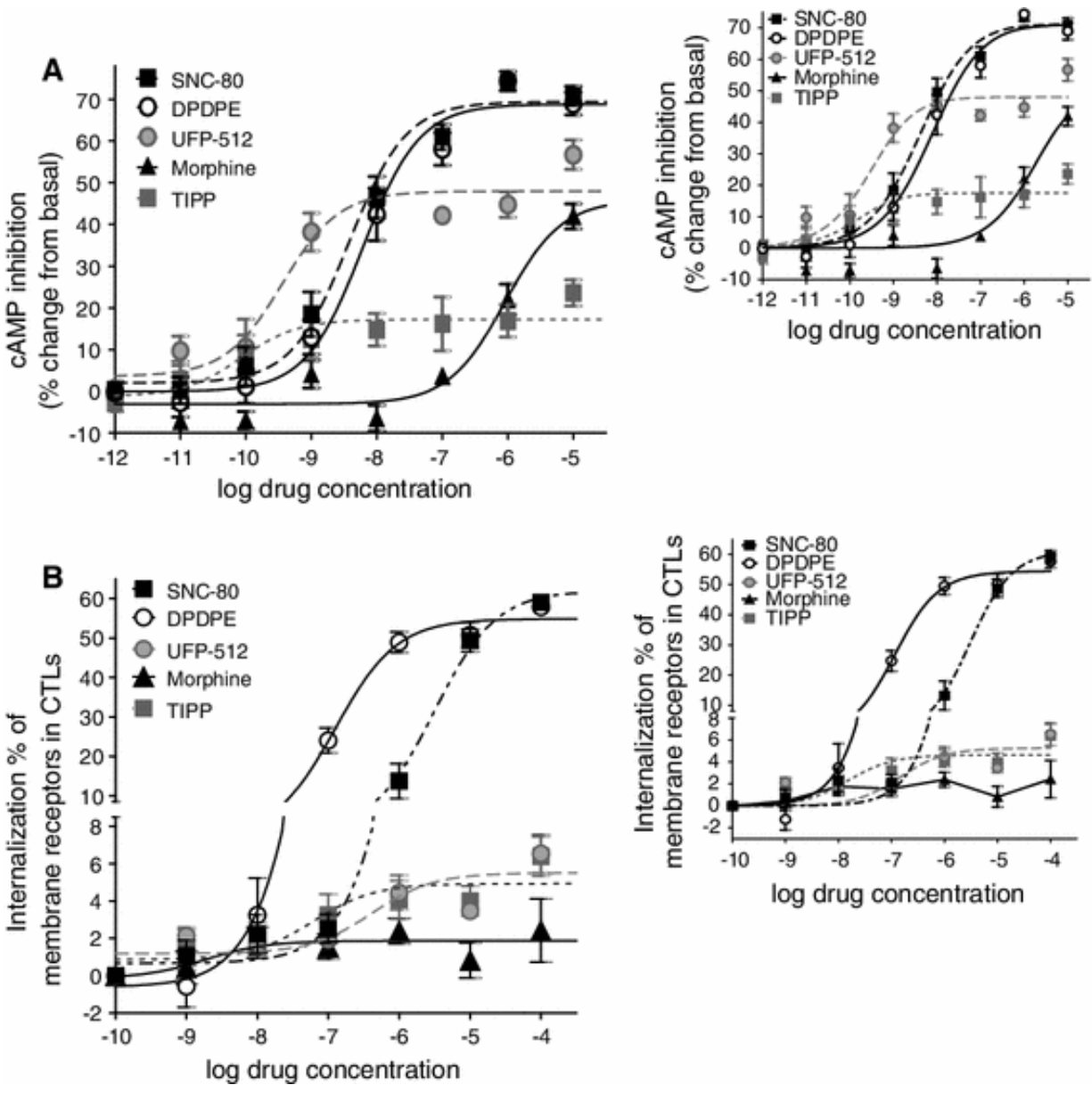
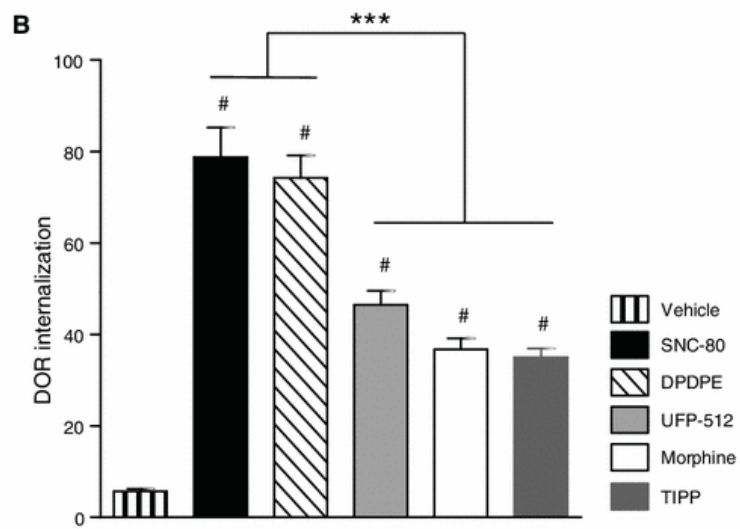
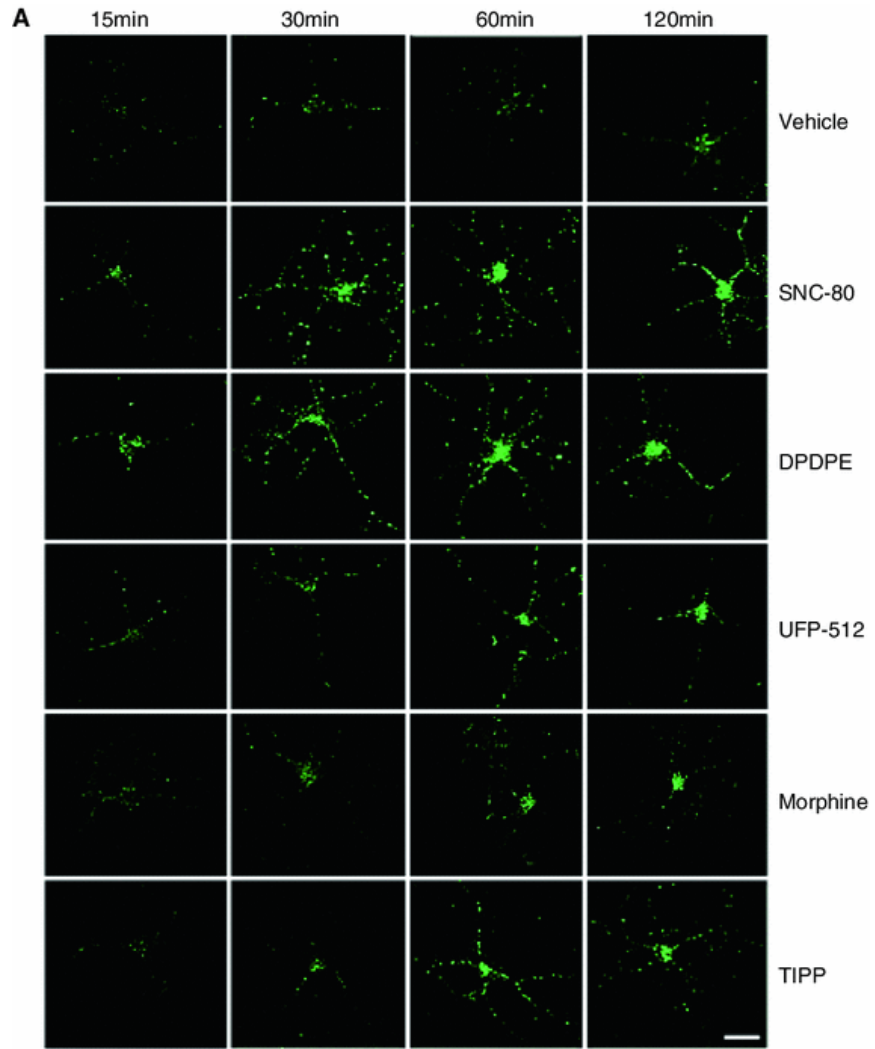


Figure 1



**Figure 2**



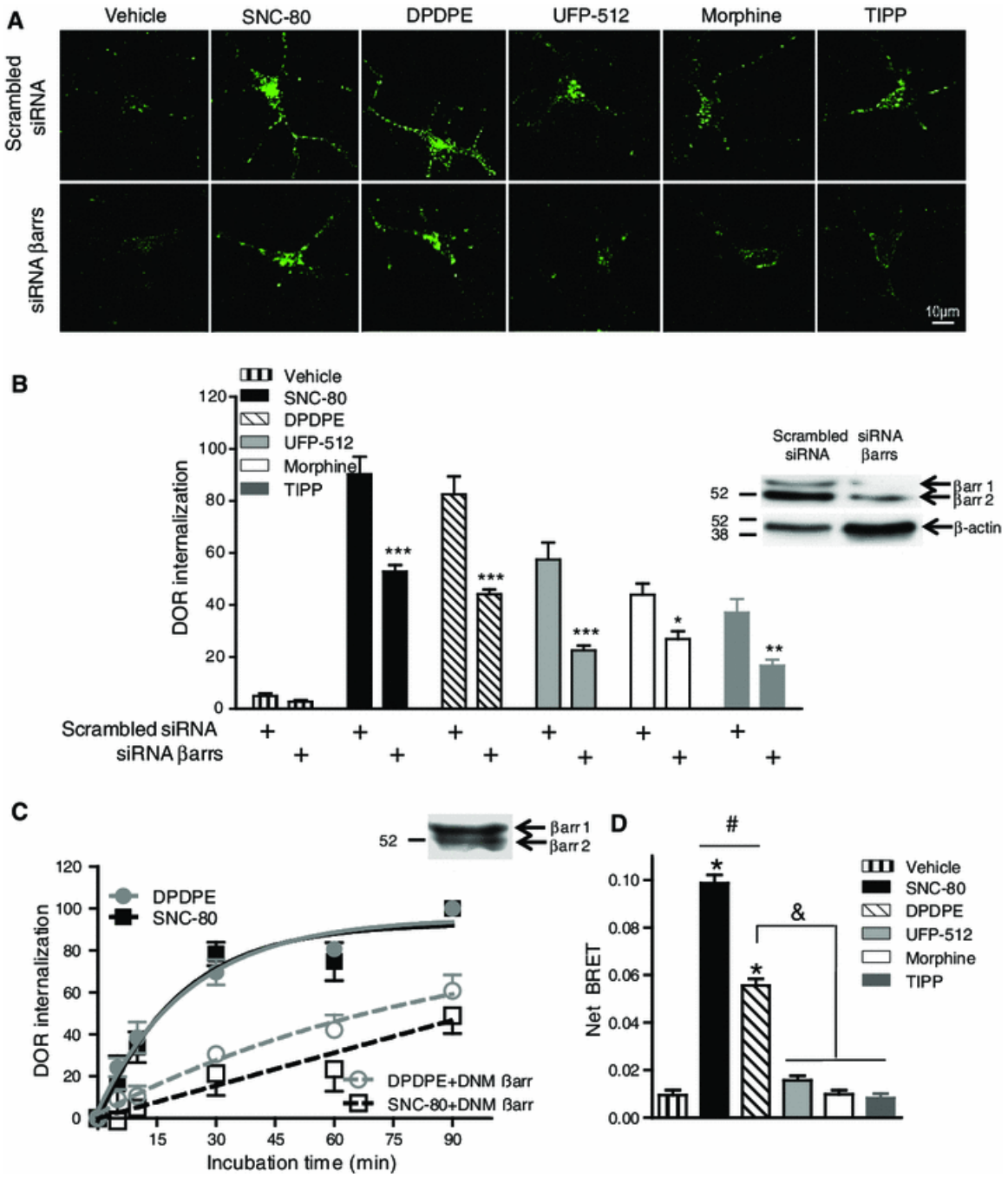
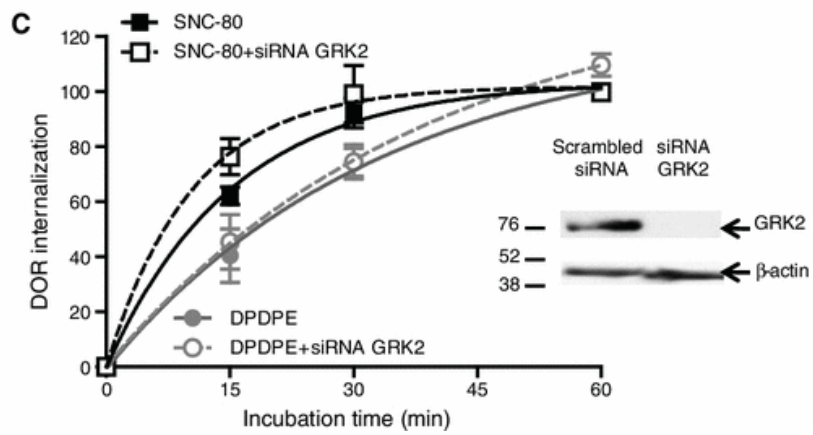
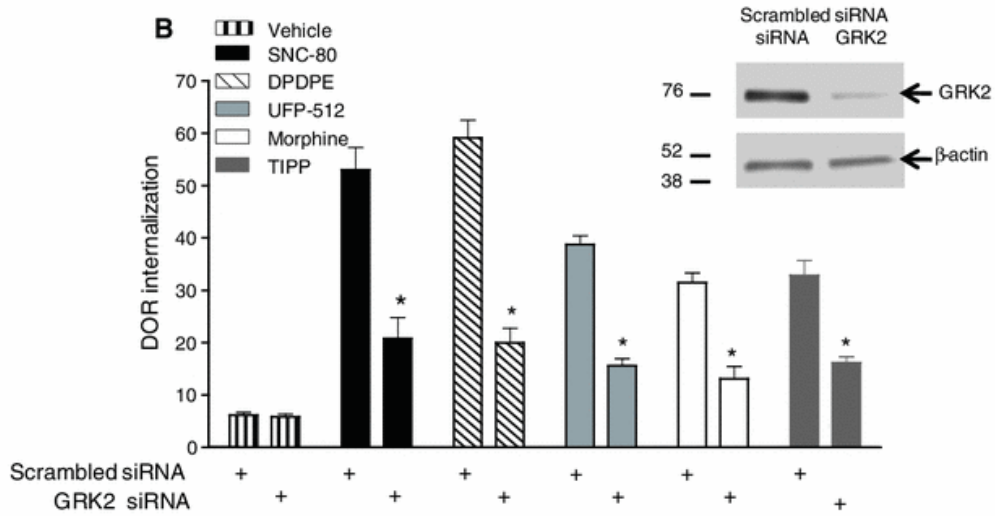
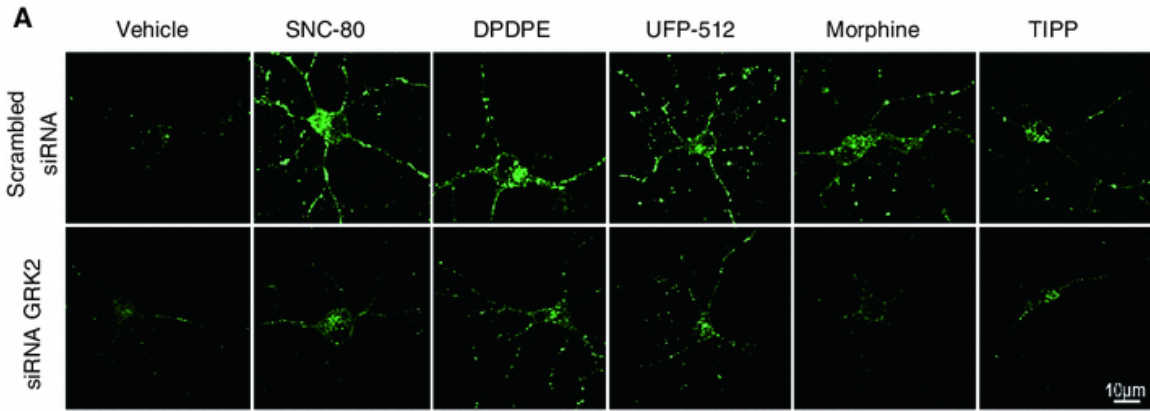


Figure 3



**Figure 4**

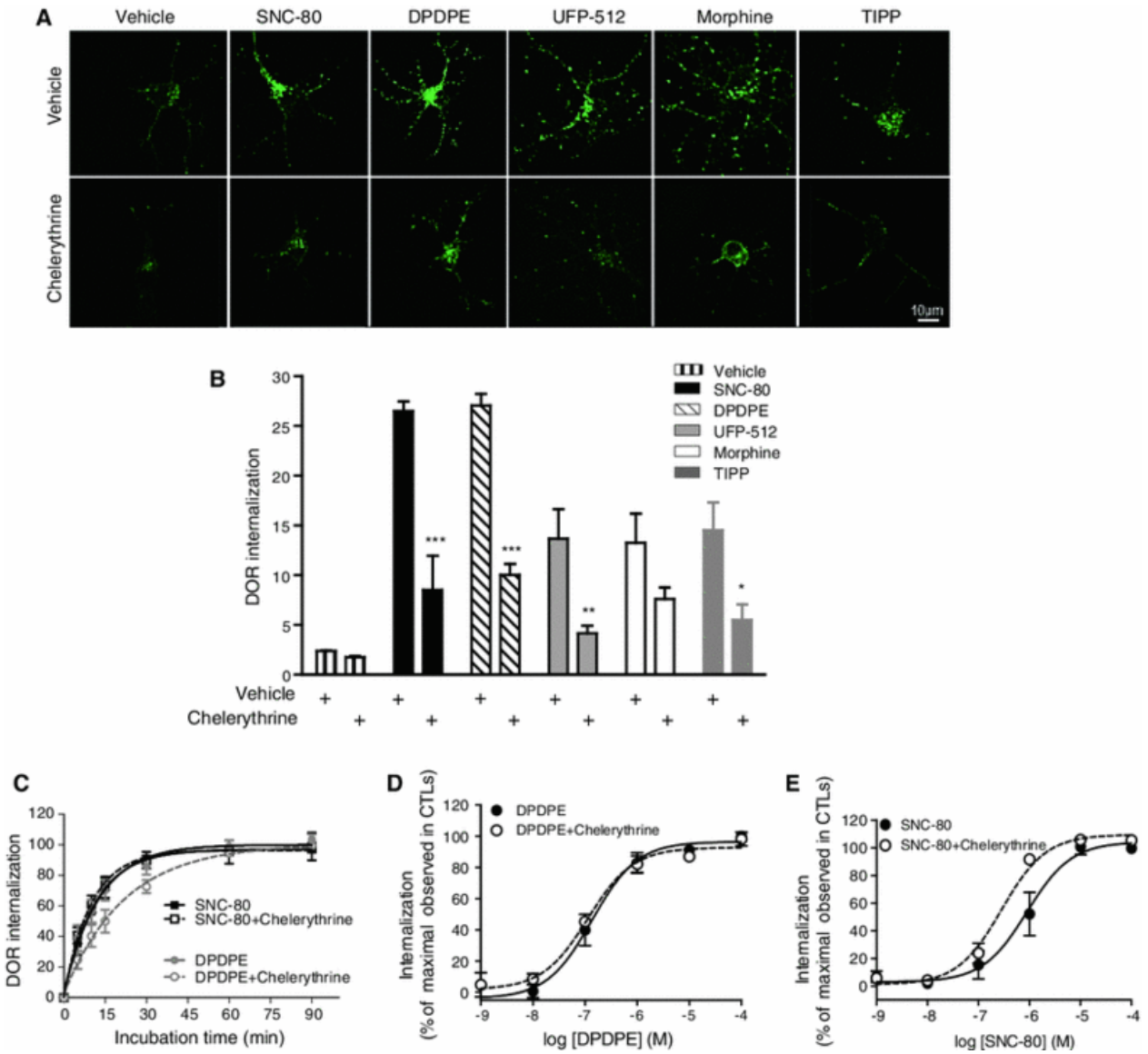


Figure 5

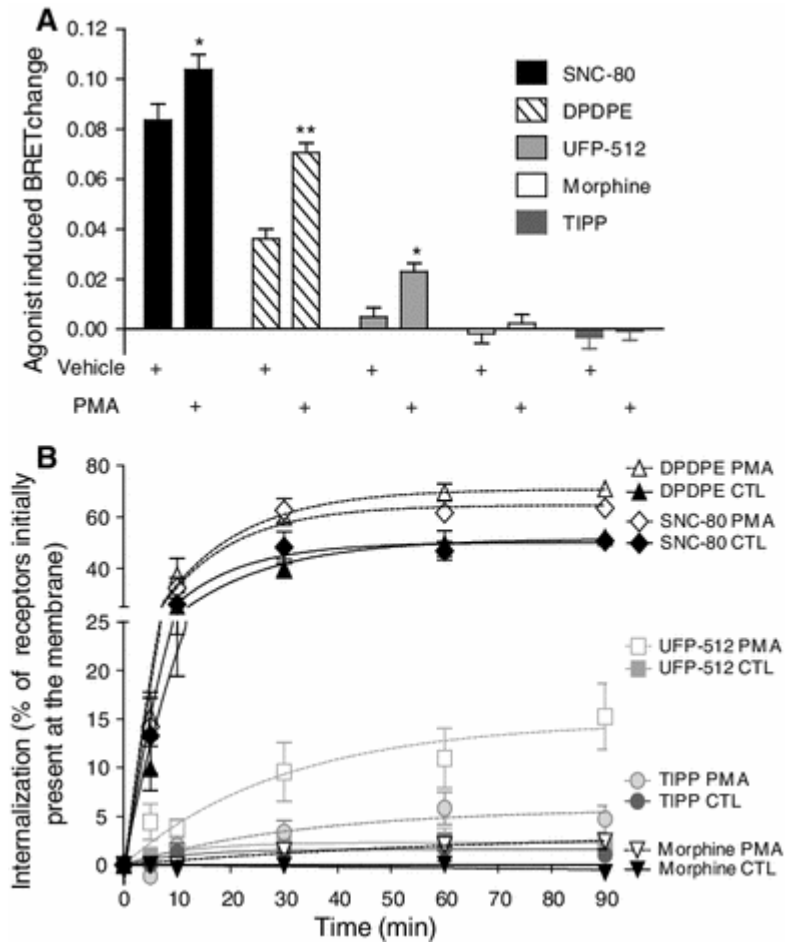


Figure 6

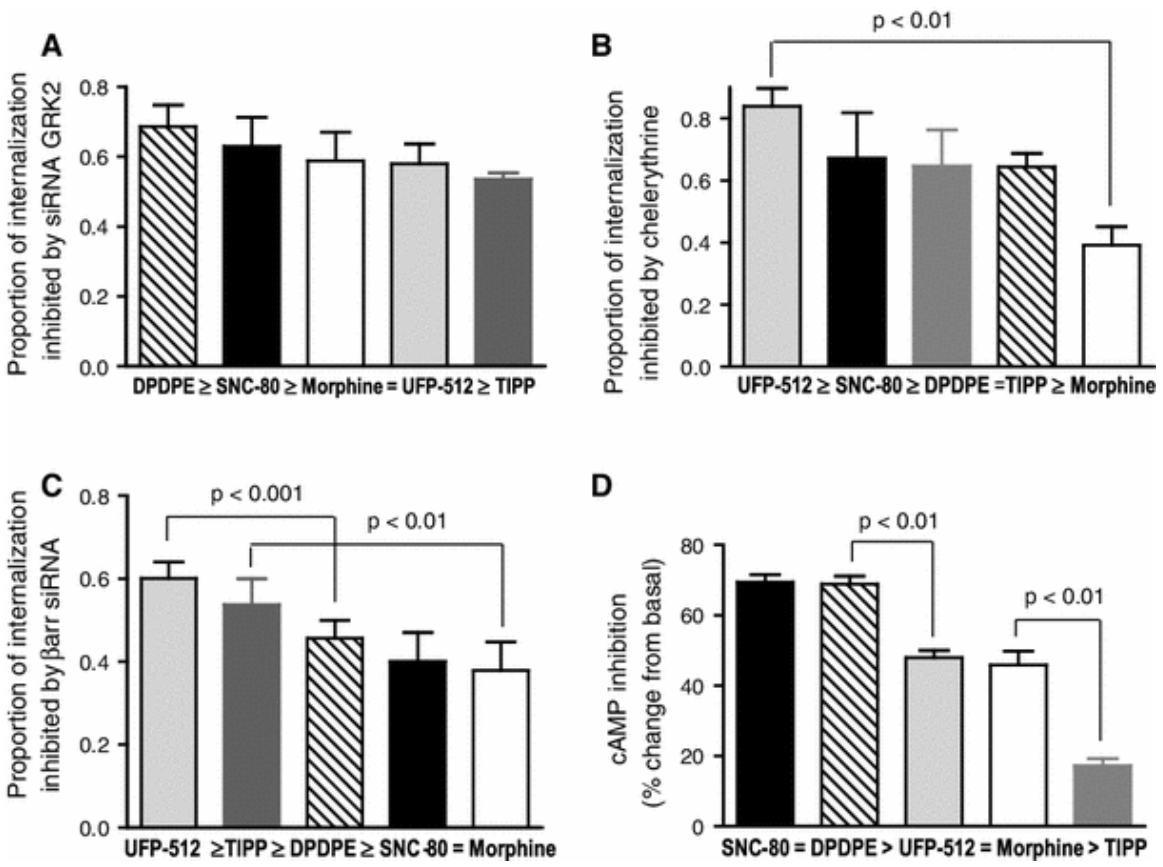


Figure 7

**Table 1.** Potency (EC50) and maximal response (Emax) displayed by DOR agonists in cAMP accumulation assays carried out in HEK293 cells.

<b>cAMP inhibition</b>		
	<b>log EC50 ± SEM (M)</b>	<b>Emax ± SEM</b>
<b>SNC-80 (n=9)</b>	<b>-8.43 ± 0.11<sup>a,b</sup></b>	<b>69.42 ± 2.12<sup>g,h</sup></b>
<b>DPDPE (n=8)</b>	<b>-8.22 ± 0.11<sup>c,d</sup></b>	<b>68.82 ± 2.31<sup>ij</sup></b>
<b>UFP-512 (n=7)</b>	<b>-9.44 ± 0.19<sup>e</sup></b>	<b>47.97 ± 2.06<sup>k</sup></b>
<b>Morphine (n=7)</b>	<b>-6.04 ± 0.14<sup>f</sup></b>	<b>45.86 ± 3.98<sup>l</sup></b>
<b>TIPP (n=7)</b>	<b>-10.1 ± 0.46</b>	<b>17.23 ± 2.00</b>

Statistical comparisons among drugs done using one way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. *Log EC50 comparisons:* <sup>a</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.001; <sup>b</sup> SNC-80 vs Morphine p<0.001; <sup>c</sup> DPDPE vs UFP-512 p<0.001; <sup>d</sup> DPDPE vs Morphine p<0.001; <sup>e</sup> UFP-512 vs TIPP p<0.001 and <sup>f</sup> Morphine vs TIPP p<0.001. *Emax comparisons:* <sup>g</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.01; <sup>h</sup> SNC-80 vs Morphine p<0.001; <sup>i</sup> DPDPE vs UFP-512 p<0.01; <sup>j</sup> DPDPE vs Morphine p<0.001; <sup>k</sup> UFP-512 vs TIPP p<0.001 and <sup>l</sup> Morphine vs TIPP p<0.001.

**Table 2.** Potency (EC50) and maximal response (Emax) displayed by DOR agonists in internalization assays carried out in HEK293 cells.

<b>Internalization</b>		
	<b>log EC50 ± SEM (M)</b>	<b>Emax ± SEM</b>
SNC-80 (n=12)	-5.51 ± 0.08 <sup>a,b,c</sup>	62.0 ± 2.3 <sup>d,e,f</sup>
DPDPE (n=11)	-6.90 ± 0.08	54.9 ± 1.59 <sup>g,h</sup>
UFP-512 (n=10)	-6.38 ± 0.32	5.5 ± 0.5
Morphine (n=11)	N/A	N/A
TIPP (n=9)	-7.21 ± 0.45	4.9 ± 0.6

Statistical comparisons among drugs done using one way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. *Log EC50 comparisons:* <sup>a</sup> SNC-80 vs DPDPE p<0.001; <sup>b</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.05 and <sup>c</sup> SNC-80 vs TIPP p<0.001. *Emax comparisons:* <sup>d</sup> SNC-80 vs DPDPE p<0.05; <sup>e</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.001; <sup>f</sup> SNC-80 vs TIPP p<0.001; <sup>g</sup> DPDPE vs UFP-512 p<0.001 and <sup>h</sup> DPDPE vs TIPP p<0.001. N/A: not applicable, minimal effect by morphine prevented meaningful curve fitting.

**Table 3.** Operational parameters describing DOR agonist responses in cAMP accumulation assays carried out in HEK293 cells.

<b>cAMP inhibition</b>			
	<b>log KA ± SEM (M)</b>	<b>log Tau ± SEM</b>	<b>log (Tau/KA) ± SEM</b>
SNC-80 (n=9)	-6.58 ± 0.43 <sup>a,b,c</sup>	1.77 ± 0.39 <sup>h,ij</sup>	8.35 ± 0.58 <sup>o</sup>
DPDPE (n=8)	-6.38 ± 0.13 <sup>d,e,f</sup>	1.62 ± 0.12 <sup>k,l,m</sup>	8.00 ± 0.18 <sup>p</sup>
UFP-512 (n=7)	-8.82 ± 0.18 <sup>g</sup>	0.35 ± 0.07	9.16 ± 0.20 <sup>q</sup>
Morphine (n=7)	-5.02 ± 0.36	0.44 ± 0.26 <sup>n</sup>	5.46 ± 0.45 <sup>r</sup>
TIPP (n=7)	-9.51 ± 0.46	-0.71 ± 0.09	8.80 ± 0.47

Statistical comparisons among drugs done using one way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. *Log KA comparisons:* <sup>a</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.001; <sup>b</sup> SNC-80 vs Morphine p<0.05; <sup>c</sup> SNC-80 vs TIPP p<0.001; <sup>d</sup> DPDPE vs UFP-512 p<0.001; <sup>e</sup> DPDPE vs Morphine p<0.05; <sup>f</sup> DPDPE vs TIPP p<0.001; <sup>g</sup> UFP-512 vs Morphine p<0.001. *Log Tau comparisons:* <sup>h</sup> SNC-80 vs TIPP p<0.001; <sup>i</sup> SNC-80 vs Morphine p<0.01; <sup>j</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.01; <sup>k</sup> DPDPE vs Morphine p<0.05; <sup>l</sup> DPDPE vs UFP-512 p<0.05; <sup>m</sup> DPDPE vs TIPP p<0.001 and <sup>n</sup> Morphine vs TIPP p<0.05; *Log (Tau/KA) comparisons:* <sup>o</sup> SNC-80 vs Morphine p<0.001; <sup>p</sup> DPDPE vs Morphine p<0.001; <sup>q</sup> UFP-512 vs Morphine p<0.001 and <sup>r</sup> Morphine vs TIPP p<0.001.



**Table 4.** Operational parameters describing DOR agonist responses in internalization assays carried out in HEK293 cells.

<b>Internalization</b>			
	<b>log KA <math>\pm</math> SEM (M)</b>	<b>log Tau <math>\pm</math> SEM</b>	<b>log (Tau/KA) <math>\pm</math> SEM</b>
SNC-80 (n=12)	-4.28 $\pm$ 0.38 <sup>a,b,c</sup>	1.23 $\pm$ 0.33 <sup>e,f</sup>	5.51 $\pm$ 0.50 <sup>i,j</sup>
DPDPE (n=11)	-6.12 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	0.72 $\pm$ 0.07 <sup>g,h</sup>	6.85 $\pm$ 0.13
UFP-512 (n=10)	-6.85 $\pm$ 0.23	-0.95 $\pm$ 0.04	5.90 $\pm$ 0.24
Morphine (n=11)	N/A	N/A	N/A
TIPP (n=9)	-7.83 $\pm$ 0.33	-1.00 $\pm$ 0.04	6.83 $\pm$ 0.33

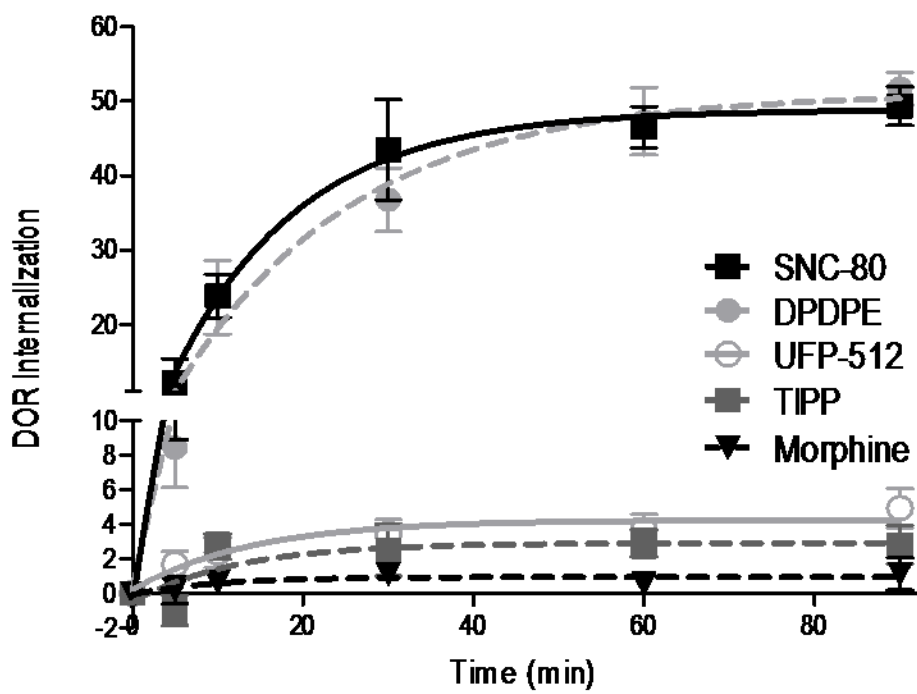
Statistical comparisons among drugs done using one way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. *Log KA comparisons:* <sup>a</sup> SNC-80 vs DPDPE p<0.01; <sup>b</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.001; <sup>c</sup> SNC-80 vs TIPP p<0.001 and <sup>d</sup> DPDPE vs TIPP p<0.01. *Log Tau comparisons:* <sup>e</sup> SNC-80 vs UFP-512 p<0.001; <sup>f</sup> SNC-80 vs TIPP p<0.001; <sup>g</sup> DPDPE vs UFP-512 p<0.001 and <sup>h</sup> DPDPE vs TIPP p<0.001. *Log Tau /KA comparisons:* <sup>i</sup> SNC-80 vs DPDPE p<0.01 and <sup>j</sup> SNC-80 vs TIPP p<0.05. N/A: not applicable, minimal effect by morphine prevented meaningful curve fitting.

**Table 5. cAMP inhibition and internalization coefficients for DOR agonists. \***

	Normalized cyclase coefficients	Normalized internalization coefficients	Bias factor	p value <sup>#</sup>
	$\Delta \log (\text{Tau}/\text{KA}) \pm \text{SEM}$	$\Delta \log (\text{Tau}/\text{KA}) \pm \text{SEM}$		
SNC-80	$0.36 \pm 0.61$ (n=9)	$-1.34 \pm 0.50$ (n=12)	1.70	0.04
DPDPE	$0.00 \pm 0.25$ (n=8)	$0.00 \pm 0.14$ (n=11)		
UFP-512	$1.17 \pm 0.27$ (n=7)	$-0.95 \pm 0.24$ (n=10)	2.12	<0.0001
Morphine	$-2.53 \pm 0.48$ (n=7)	N/A (n=11)	N/A	N/A
TIPP	$0.81 \pm 0.50$ (n=7)	$-0.02 \pm 0.34$ (n=9)	0.82	0.17

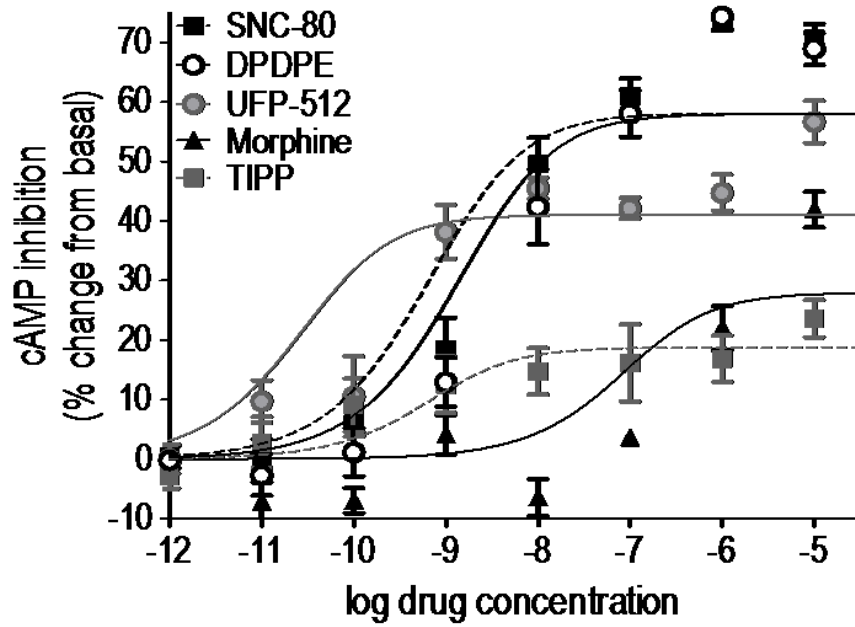
\* DPDPE was used as the standard

# Statistical comparisons of transduction coefficients across assays were done using two-tailed Student's *t* test.

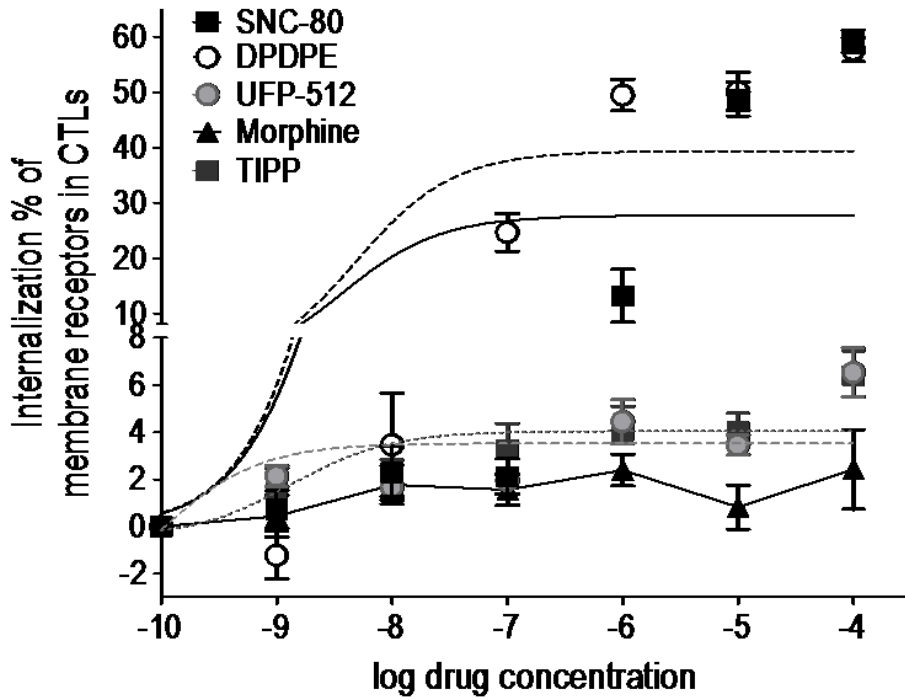


Supplementary figure 1

A



B



Supplementary figure 2

**Supplementary Table 1. Statistical comparison of functional affinities (KA) calculated from cyclase and internalization responses by different DOR agonists**

	cAMP inhibition	Internalization		
	log KA $\pm$ SEM		log KA $\pm$ SEM	p values <sup>†</sup>
SNC-80 (n=9)	-6.58 $\pm$ 0.53	SNC-80 (n=12)	-4.28 $\pm$ 0.33	< 0.001
DPDPE (n=8)	-6.38 $\pm$ 0.13	DPDPE (n=11)	-6.12 $\pm$ 0.11	ns
UFP-512 (n=7)	-8.82 $\pm$ 0.18	UFP-512 (n=10)	-6.85 $\pm$ 0.23	< 0.001
TIPP (n=6)	-9.51 $\pm$ 0.46	TIPP (n=9)	-7.84 $\pm$ 0.33	< 0.01

<sup>†</sup> KA values were compared by means of two-way ANOVA. Analysis revealed an effect of drug ( $p < 0.0001$ ), an effect of response ( $p < 0.0001$ ) and an interaction ( $p < 0.05$ ). p values shown in the table correspond to subsequent comparisons by means of Bonferroni post-hoc tests.

**Supplementary table 1**

## 3.2 Deuxième publication

### 3.2.1 Introduction et mise en contexte du deuxième article

Dans le premier article, nous avons étudié l'internalisation du DOPr vu qu'elle a prédit dans certaines études le potentiel de l'agoniste à induire une tolérance analgésique *in vivo*. Cependant, la tolérance analgésique ne semble pas être toujours corrélée à l'internalisation des ROs. En effet, la valeur prédictive de l'internalisation peut également être influencée par le fait que les DOPrs internalisés par différents ligands ne suivent pas nécessairement le même trafic post-endocytaire [85,374]. Plusieurs observations démontrent que la relation entre l'internalisation et la tolérance n'est pas linéaire. Tout d'abord, l'internalisation n'a pas toujours été liée à l'arrêt de la signalisation, d'autant plus qu'on démontre davantage la capacité des RCPG à signaler à partir des endosomes [476,477]. En outre, la deltorphine II est plus efficace que le SNC-80 pour induire l'internalisation du DOPr [477], mais contrairement à ce dernier, elle n'induit pas le développement de tolérance analgésique [470]. Aussi, d'après le premier article, le DPDPE induit une internalisation du DOPr similaire à celle médiée par le SNC-80 et pourtant ce dernier produit plus de tolérance analgésique que le DPDPE [85]. La différence majeure entre le DPDPE et la deltorphine II d'une part, et le SNC-80 d'autre part est que les DOPrs activés par les deux premiers ligands recyclent efficacement vers la membrane plasmique, tandis que ceux activés par le SNC-80 sont ciblés vers la voie de dégradation [85,471,374]. Ces observations démontrent clairement la relation étroite entre le recyclage et la tolérance analgésique. Une meilleure compréhension des caractéristiques de recyclage du DOPr et de ses mécanismes moléculaires sous-jacents est alors nécessaire pour le développement rationnel d'analgésiques opiacés à efficacité prolongée.

Traditionnellement, l'ubiquitination était considérée comme le seul signal de triage des récepteurs en dehors de la voie de recyclage pour les engager dans le processus de dégradation. Plus récemment, on a découvert de nouveaux mécanismes de triage qui dirigent les RCPG ubiquitinés vers la surface [478] ou qui supportent l'envoi des récepteurs non ubiquitinés vers les lysosomes [355]. Pour le DOPr, le GASP module un de ces mécanismes en l'excluant de la voie de recyclage [370]. Puisque le DOPr est capable de recycler à la membrane plasmique suite à son internalisation, nous nous sommes intéressés à savoir comment les DOPrs internalisés, traditionnellement connus pour se diriger vers la voie de dégradation, peuvent encore être

recyclés. Une telle découverte sera mise en valeur si elle est corrélée avec le profil de tolérance analgésique, ce qui la rendra exploitable pour le développement rationnel de nouveaux médicaments, et c'est exactement ce que nous avons effectué dans ce deuxième article. Encore une fois, l'étude a été effectuée au niveau des cellules HEK293 et des neurones afin d'évaluer si le contexte cellulaire affectait les mécanismes de recyclage du DOPr.

Nous avons donc commencé par l'établissement de l'itinéraire post-endocytaire du DOPr stimulé par le DPDPE. Nous avons choisi cet agoniste, car il permet le recyclage du DOPr et n'induit pas le développement de tolérance analgésique, comme déjà mentionné ci-haut. En utilisant la technique ELISA (dosage immuno-enzymatique sur support solide) dans les cellules HEK293 et l'immunofluorescence dans les neurones, nous avons démontré que ni le Rab4 ni le rétromère n'ont contribué au recyclage du DOPr dans les deux systèmes biologiques étudiés, suggérant l'implication des compartiments cellulaires plus profonds dans le trafic post-endocytaire du récepteur. Nous avons établi que le DOPr recycle des endosomes tardifs vers la membrane plasmique en passant par le TGN en faisant intervenir la protéine ALIX et le complexe de récupération Rab9/TIP47. Aussi, nos observations indiquent qu'au niveau des neurones, la polymérisation de l'actine et l'activité de ROCK-II étaient nécessaires pour que les DOPrs regagnent la membrane plasmique à partir du TGN et que l'activité de la PKD était spécifiquement requise pour le recyclage du DOPr dans les cellules HEK293 où la polymérisation de l'actine et le ROCK-II ne semblaient pas y jouer un rôle.

D'autre part, l'interférence avec l'itinéraire établi a précipité la tolérance à l'analgésie, indiquant que le recyclage du récepteur à partir des compartiments liés à la dégradation contribue au maintien de la réponse analgésique aux agonistes du DOPr *in vivo*. À notre connaissance, cette étude est la première à détailler le trajet de recyclage du DOPr et à démontrer un lien direct entre le recyclage du récepteur à partir de ces compartiments et la prévention de survenue de la tolérance analgésique. Tous ces résultats soulignent la pertinence de l'étude du trafic post-endocytaire des ROs dans le processus de criblage des nouvelles drogues.

### 3.2.2 Article 2

***“DELTA OPIOID RECEPTORS RECYCLE TO THE MEMBRANE AFTER SORTING  
TO THE DEGRADATION PATH”***

By

Iness Charfi<sup>1</sup>, Khaled Abdallah<sup>2</sup>, Louis Gendron<sup>2</sup> and Graciela Pineyro<sup>3</sup>

1. Department of Pharmacology, Université de Montréal, Canada, H3T 1J4.
2. Department of Pharmacology-physiology, Université de Sherbrooke, Canada, J1H 5N4.
3. Department of Psychiatry, Université de Montréal, Canada, H3T 1J4.

Cell Mol Life Sci. 2018 Jun;75(12):2257-2271. Epub 2017 Dec 29. PMID: 29288293

**Correspondence to:** [graciela.pineyro.filpo@umontreal.ca](mailto:graciela.pineyro.filpo@umontreal.ca)

Telephone number: 514-345-4931#6289

**Author Contributions** I.C and G.P conceived the project and wrote the manuscript. I.C performed all of the experiments except those of Fig 6 (done by K.A). L.G and K.A conceived and analyzed animal studies.

Users may view, print, copy, and download text and data-mine the content in such documents, for the purposes of academic research.

**Acknowledgments**

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [Grants RGPIN-2015-05213 (to L.G.) and 311997 (to G.P.)] and the Canadian Institutes of Health Research [Grants MOP 123399 and MOP 136871 (to L.G.); MOP 79432 and MOP 324876 (to G.P.)]. L.G. is the recipient of a Chercheur-boursier Senior and I. C. of a doctoral award from the Fonds de la Recherche du Québec-Santé. The authors thank L. Posa for technical assistance in production of supplementary fig 5c and Dr. P. Dallaire for expert advice on statistical analyses.

**Competing Interest Statement:** The authors declare no competing financial and no financial interests.



**Abstract**

Soon after internalization delta opioid receptors (DOPrs) are committed to the degradation path by G protein-coupled receptor (GPCR)-associated binding protein (GASP). Here we provide evidence that this classical post-endocytic itinerary may be rectified by downstream sorting decisions which allow DOPrs to regain to the membrane after having reached late endosomes (LE). The LE sorting mechanism involved ESCRT accessory protein Alix and the TIP47/Rab9 retrieval complex which supported translocation of the receptor to the TGN, from where it subsequently regained the cell membrane. Preventing DOPrs from completing this itinerary precipitated acute analgesic tolerance to the agonist DPDPE, supporting the relevance of this recycling path in maintaining the analgesic response by this receptor. Taken together these findings reveal a post-endocytic itinerary where GPCRs that have been sorted for degradation can still recycle to the membrane.

**Keywords:** delta opioid receptor, recycling, analgesic tolerance, trans-Golgi network, Rab9/TIP47 complex, Alix.

## Introduction

Displaying both higher efficacy for chronic pain management and a better side effects profile than analgesics activating mu opioid receptors (MOPr), delta opioid receptor (DOPr) ligands have emerged as an attractive alternative for pain treatment [1,2]. On the other hand, analgesic tolerance remains a real concern associated with DOPr agonists, justifying considerable efforts to understand how this side effect develops [3-5]. Efficacy to induce DOPr sequestration has been proposed as a predictor of agonist tendency to induce *in vivo* analgesic tolerance [2,5]. This hypothesis is supported by observations indicating that internalized DOPrs are rapidly committed to the degradation path both in immortalized cell lines [6,7] and in native neurons [8]. At the same time, and despite consistent reports of DOPrs being sorted for degradation [8], these receptors are also known to regain the membrane [9], resensitize [10], and agonists that support recycling produce minimal tolerance [3].

Sorting of cargo to the degradation path relies upon the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT). The complex recognizes ubiquitinated receptors on the limiting membrane of early endosomes (EE) and transfers them into intraluminal vesicles (ILVs) of budding multivesicular bodies (MVBs). From there degradative cargo progresses to late endosomes (LEs) and lysosomes (LYS) [11]. Traditionally, ubiquitination was considered the single sorting signal capable of excluding receptors from bulk recycling and committing them to this degradation path [12]. More recently additional sorting machineries have emerged which either direct ubiquitinated GPCRs back to the surface [13] or that support lysosomal targeting of non-ubiquitinated receptors [14,15]. One of such sorting devices is the GPCR-associated binding protein-1 (GASP1) [7]. This cytoplasmic protein binds to the carboxy-tail of DOPrs [7], dopamine D2 receptors [16] and cannabinoid CB1 receptors [17] excluding them from recycling even before the ESCRT machinery comes into play [6,18].

In the present study we were interested in finding out how internalized DOPrs that are subject to GASP-1 action [7,18], can still recycle to the membrane. Results obtained showed that neither Rab4-dependent carriers nor the retromer contributed to DOPr recycling in neurons or immortalized cell-lines. Instead, recycling DOPrs relied on the ALG-2-interacting Protein X (ALIX) and the Rab9/TIP47 retrieval complex, to regain the membrane from LEs via the trans-golgi-network (TGN). Furthermore, agents that prevented DOPrs from completing this itinerary

also precipitated analgesic tolerance, indicating that a recycling path originating from degradation-related compartments contributes to maintaining the *in vivo* analgesic response to DOPr activation.

## **Results**

### ***DOPr recycling to the membrane is blocked by interfering with Rab7 but not retromer action***

It is well documented that DOPrs are sorted to the LYS upon internalization [7], but they are also known to recycle back to the surface [3,9]. Here we were interested in establishing the mechanism that supports membrane recovery of internalized DOPrs. To address this question we monitored DOPr trafficking in cortical neuron cultures. Thus, in the first series of measures, Flag-DOPrs were labeled with primary antibody at the neuron's surface, cultures were exposed to DPDPE (10  $\mu$ M, 60 min) or vehicle (0.05% DMSO) and at end of treatment cultures were washed to remove drugs as well as antibody that remained bound to non-internalized receptors. After wash a set of these neurons was immediately processed to specifically reveal intracellular immunoreactivity corresponding either to constitutive (vehicle) or DPDPE-induced internalization of surface-labelled DOPrs (Fig 1a). Another group of neurons was allowed to recover 60 min in the absence of ligand (Fig 1a) before revealing intracellular immunoreactivity. In-keeping with previous observations [3], mean intracellular labeling density was less in cultures that were allowed to recover from DPDPE treatment than in neurons that were fixed immediately after treatment ( $41.88 \pm 2.6\%$  reduction;  $p < 0.0001$ ;  $n = 18$ ; Fig 1b), indicating that receptors that had been internalized by DPDPE left the intracellular compartment upon removal of the agonist. In parallel, and so as to confirm that at least part of the receptors leaving the cytoplasm relocated to the membrane, immunoreactivity of recovered cells was assessed in non-permeabilized neurons so as to specifically reveal DOPrs that had regained the surface (Fig 1a). Consistent with recycling, surface labeling was present in neurons in which Flag-DOPrs had been internalized by the agonist but practically absent in neurons where receptors had been constitutively internalized (Fig 1c). These changes in intracellular and surface labeling density were subsequently monitored so as to trace a “functional itinerary” for recycling DOPrs.

Recycling cargo may first exit the endosomal compartment from a network of tubules where structures decorated with Rab4 and Rab5 or Rab4 and Rab11 respectively support fast and slow recycling [19]. The possibility that DOPr recycling involved these structures was ruled by the observation that recovery from DPDPE treatment caused similar changes in intracellular and surface labeling in neurons transfected with a dominant-negative mutant of Rab4

(Rab4N121I) [20] and its empty vector (Supplementary Fig. 1a and Supplementary Table 1). This same mutant was also without effect in HEK cells, where similar proportion of internalized receptors recycled to the membrane whether Rab4N121I was transfected or not (Supplementary Fig. 1b).

Cargo that is not recycled through the tubular network is progressively sorted to degradation [21], a mechanism which effectively operates on DOPrs [18]. However, DOPrs could be rescued back to the membrane before entering the degradation path through coordinated action of Rab7 [22] and the retromer [23], which together retrieve cargo from the endosomal compartment to the TGN. Hence, to determine whether recycling DOPrs left the endosomal compartment at this sorting station, we assessed consequences of interfering either with Rab7 or retromer function. We first observed that in neurons transfected with the inactive Rab7 mutant (Rab7N125I), DOPrs internalized by DPDPE remained trapped within the cytoplasm during recovery from treatment, as indicated by similar intracellular labeling density in agonist-treated neurons which were allowed to recover from agonist exposure ( $45.3 \pm 2.6$  arbitrary units) and those that were fixed immediately after internalization ( $47.8 \pm 2.5$  arbitrary units;  $p > 0.05$ ;  $n = 18$ ; Fig. 2a). Moreover, neurons expressing inactive Rab7 also failed to display increase in Flag-DOPr surface labeling (Fig. 2a and Supplementary Table 1), confirming that interfering with Rab7 function prevented internalized DOPrs from recycling to the surface.

Rab7 contributes to recruit the retromer's cargo selective complex (VPS26/VPS29/VPS35) to the endosomal membrane. Hence to establish the specific contribution of the retromer to DOPr recycling, VPS35 was silenced. Interestingly, and despite visible depletion of VPS35 by siRNA, DOPr recycling was not affected, as indicated by two complementary observations: *i*) the proportion of intracellular labeling lost during recovery from DPDPE exposure was similar in neurons transfected with scrambled- and VPS35-siRNA (% reduction of intracellular fluorescence:  $48.28 \pm 5.4\%$  in scrambled-siRNA;  $58.31 \pm 4.4\%$  in VPS35 siRNA,  $n = 18$ ,  $p = 0.16$ ; Fig. 2b, and *ii*) independent of VPS35 silencing DOPr labeling reappeared at the membrane upon removal of the agonist (Fig. 2b and Supplementary Table 1). This lack of effect of VPS35 silencing on membrane recovery of DOPrs was in stark contrast with the inhibition of  $\beta$ 2ARs recycling (Supplementary Fig. 2a and 2b, Supplementary Table 1), which are known to regain the membrane through a mechanism requiring the retromer's cargo selective complex [24]. Moreover, transfecting mutant Rab7N125I or silencing

expression of VPS35 in HEK cells had similar effects on DOPr recycling as observed in neurons, the Rab7 mutant reducing membrane recovery of internalized receptors by ~49% (Supplementary Fig. 2c), and VPS35 silencing producing no effect (Supplementary Fig. 2d). Thus, observations obtained in two different cell types indicated that DOPr recycling required Rab7 but not the retromer.

### ***DOPr recycling to the membrane requires the LE to TGN retrieval complex Rab9/TIP47***

Because inactive Rab7 mutants block cargo progression from EEs to Les [25,26], inhibition of DOPr recycling by Rab7N125I implies that receptors must progress to LE to regain the membrane. To corroborate this notion, we determined whether retrieval mechanisms which normally rescue LE cargo from lysosomal degradation could possibly contribute to surface recovery of internalized DOPrs. One of such mechanisms involves the Rab9-TIP47 complex which retrieves manose-6-phosphate receptors (M6PRs) in LEs to the TGN [27,28]. Therefore, we started by assessing how individual silencing of each component influenced DOPr recycling. We observed that the proportion of intracellular immunoreactivity that disappeared from the neuron cytoplasm during recovery from DPDPE treatment dropped from  $40 \pm 5\%$  in scrambled-transfected controls, to  $25.5 \pm 4\%$  in cultures transfected with Rab9-siRNA ( $n=18$ ,  $p=0.0364$ ; Fig. 3a), while recovery of membrane labeling was concomitantly reduced by Rab9 silencing (Fig. 3a, Supplementary Table1). Silencing of TIP47, the cytoplasmic effector of Rab9 [27], similarly reduced DOPr recycling in neurons (Fig. 3a, Supplementary Table1), and silencing of both partners also interfered with membrane recovery of internalized DOPr in HEK cells (Figure 4a and 4b), pointing to the Rab9-TIP47 complex as a conserved player in DOPr recycling.

DOPrs that arrive to LEs are located for the most part in ILVs [6, 18]. Their location in the LE lumen brings up the question how do DOPrs become available at the limiting membrane for recovery by the cytoplasmic Rab9-TIP47 complex. It is well documented that ILVs and the limiting endosomal membrane normally undergo iterative cycles of fission and back-fusion [29] regulated by lyso-bis-phosphatidic acid (LBPA) and the ESCRT accessory protein ALIX [30]. Hence, it stands to reason that DOPrs in ILVs may rely on back-fusion for their recycling to the membrane. To verify this possibility, we assessed whether DOPr recycling was modified by interfering with ALIX's expression. Consistent with our reasoning, silencing ALIX left intracellular Flag-DOPr immunoreactivity trapped within the neuron cytoplasm (Fig 3b),

prevented the receptor from reappearing at the neuron's surface after recovery from DPDPE treatment (Supplementary Table1) and also reduced maximal DOPr recycling in HEK cells (Fig. 4c).

### ***Recycling DOPrs reach the membrane from the TGN***

Having established that DOPr recycling relies on a mechanism which normally retrieves non-signaling cargo from LEs to the TGN, we then sought to determine whether recycling DOPrs reached the membrane from this compartment. First, we used confocal microscopy to assess the distribution of internalized DOPrs in relation to a resident TGN protein, TGN46. We observed that immediately after DPDPE treatment was finished, DOPrs in the neuron soma colocalized with TGN46 (Supplementary Fig. 3a).

TGN cargo traffics to the surface through carriers that bud from trans-golgi cisternae and are guided to the membrane by means of the cytoskeleton [31]. Since TGN budding and carrier fission are temperature-sensitive [32], we first assessed if allowing rat cortical neurons to recover from DPDPE exposure at 20°C rather than 37°C would influence DOPr recycling. Reducing temperature to 20°C during recovery from DPDPE treatment caused internalized Flag-DOPrs to remain trapped within the cytoplasm while the amount of labelling reappearing at the membrane was reduced (Fig. 5a, Supplementary Table 1). This was not the case for internalized MOPrs (supplementary Fig. 4a, Supplementary Table 1), which unlike DOPrs reach the surface from superficial compartments [33].

From a biochemical standpoint, carrier formation at the TGN relies upon ADP ribosylation factor 1 (ARF1) [31], which in neurons recruits and activates effectors such as actin polymerization factors [34]. In keeping with this mechanism and further supporting the idea that recycling DOPrs regain the membrane from the TGN, transfection with an inactive ARF1-T31N mutant (Fig. 5b) or treatment with actin polymerization blocker cytochalasin D (10 µM; Fig. 6a) [35], prevented internalized DOPrs from leaving the neuron cytoplasm and regaining the surface (Fig. 5b, Fig. 6a and supplementary Table 1) during recovery from DPDPE treatment. It has also been documented that actin-dependent fission of TGN carriers in neurons requires LIMK1 activity [36] and that in the TGN this kinase is activated via Rho-associated coiled-coil containing protein kinase-II (ROCK-II) [37]. When introduced during recovery from DPDPE treatment ROCK inhibitor Y27632 [38] (10 µM) caused internalized receptors to remain trapped

within the neuron soma (Fig. 6b) and accumulate with TGN46 (Supplementary Fig. 3b). Admittedly, decrease in temperature, ARF1 inactivation and interfering with actin polymerization may each affect other pathways in addition to TGN to membrane transport, but their shared ability to interfere with surface recovery of DOPrs allows to conclude that these receptors take the TGN export route on their way to the membrane.

Interestingly, and despite being sensitive to temperature block (Supplementary Figs. 5a and 5b) as observed in neurons, DOPr recycling in human HEK cells was neither modified by Y-27632 (10  $\mu$ M; Supplementary Fig. 5c) or cytochalasin D (10  $\mu$ M; Supplementary Fig. 5d). On the other hand, recycling in HEK cells was sensitive to CID755673 (20  $\mu$ M), a blocker of carrier biogenesis by protein kinase D [35] (Supplementary Fig. 5e), which was without effect in rat neuron cultures (Supplementary Fig. 4b). Hence, while the core mechanism which retrieved DOPrs from LEs to the TGN was conserved across cell types, translocation of the receptor from the TGN to the membrane was cell-type specific, depending on actin and ROCK activity in neurons and PKD in HEK cells.

Finally, because analgesic responses are directly influenced by ligand ability to support DOPr recycling [3,4], it was of importance to determine whether the described recycling itinerary was relevant to *in vivo* DPDPE responses. To address this issue, the antiallodynic effect of two equal and consecutive doses of DPDPE (2 x 10 nmol; i.t.) were assessed in rats that were injected either with Y-27632 (20  $\mu$ g/ 20  $\mu$ l; i.t.) or saline prior to the agonist. The increase in threshold for mechanical allodynia that was observed after the first DPDPE injection was similar in rats pretreated with saline or ROCK inhibitor Y-27632 (Fig. 7). In contrast, the second DPDPE injection induced analgesia in rats that had received saline but failed to do so in animals treated with Y-27632.



## Discussion

By targeting receptors for degradation or directing them back to the membrane, post-endocytic sorting may considerably influence receptor signaling. For GPCRs this sorting step has been traditionally associated with structures originating in early endosomal compartments and, once the decision taken the receptor in question is thought as committed *either* to recycling *or* degradation. Here we report a sorting scheme where DOPrs that are sorted to the degradation path [6-8] can be retrieved from LEs to the TGN, from where they recycle to the membrane completing an itinerary that is necessary for a sustained analgesic response. The core machinery retrieving DOPrs from LE to TGN was conserved in HEK cells and neurons, but TGN-membrane targeting relied upon cell type-specific mechanisms.

Several of our observations indicate that DOPr recycling takes place after sorting for degradation. First, Rab4 and retromer-dependent mechanisms (VPS35) that are classically associated with cargo recovery before sorting to ILVs [20,23,26], did not take part in DOPr recycling. Second, observations obtained with an inactive Rab7 mutant additionally pointed to LEs as the site where DOPrs were redirected back to the membrane. Indeed, Rab7 has been proposed as a mechanism of progression from early to late endosomal compartment [22,39]. Studies using inactive forms of Rab7 (e.g.: Rab7N125I) [26,40] and more recently siRNA silencing studies [41], have shown that interfering with Rab7 activity traps cargo typically destined to LEs within structures labeled with EE markers. Thus inhibition DOPr recycling by Rab7N125 is consistent with these observations, and indicates that receptors must progress from EEs to LEs before they can regain the membrane. The lack of effect of VPS35 silencing additionally excluded the possibility of DOPrs being sorted for recycling before progressing into MVBs. Finally, DOPr recycling required Rab9 and TIP47, both of which rescue M6PRs to the TGN before LEs fuse with LYS [27,28]. While Rab9 mediates the actual transport of vesicles from LE to the TGN [42], TIP47 helps stabilize [43] and maintain active Rab9 on the LE membrane [44]. Reciprocally, direct interaction with Rab9 is responsible, at least in part, for TIP47 recruitment to the endosome [44], all of which explain how silencing of either protein may functionally interfere with DOPr recycling from LEs. M6PRs were previously shown to directly interact with TIP47 [27] through sequences that are absent in DOPrs. However, direct DOPr-TIP47 interaction through other residues cannot be excluded.

Together with Rab9/TIP47, DOPr recycling required the ESCRT accessory protein ALIX [29,30,45]. Relying on ALIX for recycling is in marked contrast with the role this protein has in sorting PAR1 receptors into ILVs and directing them to degradation [45]. However, in addition to sorting cargo into ILVs, ALIX has other functions [29,46]. One of such roles is supporting back fusion of ILVs to the endosomal limiting membrane, a mechanism that is used by different pathogens to enter the cytoplasm after traveling concealed within ILVs [47]. It is possible then that similar to these infection agents DOPrs in ILVs rely upon ALIX's back-fusion properties to regain the limiting membrane and become once again available for Rab9/TIP47 retrieval and translocation to the TGN. Figure 8 shows a schematic representation of the proposed recycling path. The mechanism of how a cytoplasmic protein like ALIX, with no access to LE lumen, may promote the fusion of ILVs with the endosomal limiting membrane remains to be fully understood. A possibility that has been previously suggested is that by binding to LBPA and ESCRT-III on the cytoplasmic leaflet ALIX may reorganize the composition of the luminal portion of the endosomal bilayer, increasing the probability of ILV docking [29]. Another, not necessarily exclusive possibility is that ALIX could divert DOPrs away from LEs into a non-degradative compartment from where they can be retrieved by the Rab9/TIP47 complex and recycle back to the membrane. This possibility is reinforced by recent observations indicating that ALIX redirects non-ubiquitinated, stress-stimulated EGFRs away from the canonical degradation path and into melanosome precursors [46]. Ligand-activated EGFRs lacking all lysine residues were similarly sorted into these multilaminar structures that do not fuse with LYS, suggesting that absence of ubiquitination could serve as a diversion signal recognized by ALIX [46]. DOPrs resemble stress-activated EGFRs in the sense that they can be sorted into ILVs without ubiquitination [6].

LEs normally function as sorting platforms for M6PRs [48] and for the endopeptidase furin [49], but this compartment had not been previously associated with GPCR recycling to the cell surface. ALIX and the Rab9/TIP47 complex were essential for DOPr recycling both in HEK cells and neurons, indicating a conserved mechanism of LE retrieval for this GPCR. On the other hand, PKD activity was specifically required for DOPr recycling in HEK cells while recycling of neuronal receptors relied upon actin polymerization. Mechanisms of TGN to membrane export are multiple and distinctively engaged depending on cell type and specific membrane domains to which cargo is destined [31]. In neurons ROCK-II, LIMK1 and cofilin

locally organize a specialized set of actin filaments which support routing of TGN cargo to the membrane [36,37]. Our observations that actin polymerization (rather than PKD activity) and ROCK-II activity were required for neuronal DOPrs to recycle to the membrane is consistent with such mechanisms of TGN to membrane transport and in-keeping with a recent report where ROCK-II, LIMK1 and cofilin modulation of the actin cytoskeleton were required for DOPrs to exert sustained  $Ca_v2$  channel modulation in DRG neurons [50].

In addition to blocking recycling, interfering with ROCK activity precipitated acute analgesic tolerance to DPDPE, pointing to the functional relevance of the described recycling itinerary in maintaining the analgesic response to the agonists. Previous studies showing marked analgesic tolerance for the non-recycling ligand SNC-80 [3,8] but not for DPDPE, support an inverse relation between DOPr recycling and ligand potential for inducing tolerance [3]. Ligand-specific patterns of recycling have been attributed to differences in ligand susceptibility to endosomal peptidases [4] and to differential stability of DOPr- $\beta$ arr2 association [3]. In light of the present results it is tempting to speculate that the sustained  $\beta$ arr2 association to DOPrs could prevent organization of a recycling complex between Rab9/TIP47 and the receptor.

In summary, our findings show that retrieval mechanisms which normally rescue non-signaling cargo from imminent lysosomal degradation can also operate on signaling GPCRs. By acting in series with the ESCRT machinery, the Rab9/TIP47 retrieval complex allowed DOPrs that had progressed well into the degradation path to translocate to the TGN, from where they regained the membrane, an itinerary that prevented acute analgesic tolerance.

## Methods

### DNA constructs, cell culture and transfections

#### *DNA constructs*

Murine DOPrs, murine MOPrs and human  $\beta$ 2ARs tagged with Flag epitope at the N terminus [7,51] were kindly provided by Dr. M. von Zastrow (University of California at San Francisco, San Francisco, CA). Rab4-N121I-GFP [20] and Rab7-N125I-GFP [25] were gifts from Dr. T. Hebert (McGill University, Montreal, Quebec) and ARF1T31N-HA was provided by Dr. A. Claing (University of Montreal, Montreal, Quebec) [52].

#### *Primary neuronal cultures*

Primary neuronal cultures were prepared from rat postnatal prefrontal cortex (P0-P2) as previously described [3]. Briefly, pups were cryoanaesthetized, brains removed and transferred into ice-cold dissociation solution (NaSO<sub>4</sub> 90mM; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30mM; MgCl<sub>2</sub> 5.8mM; CaCl<sub>2</sub> 0.25mM; HEPES 10mM; glucose 20mM; pH 7.4). Prefrontal cortex was dissected, digested in papain solution (20U/ml; 40min at 37°C and the product passed through Pasteur pipettes of progressively decreasing diameter for mechanical dissociation. The suspension obtained was centrifuged, cells were then resuspended and diluted to a density of 2.5 million/ml, before being plated on glass coverslips pre-coated with collagen/polyL-lysine (each at 0.1mg/ml). Culture proceeded in supplemented Neurocell medium (B27 4%; 100U/ml penicillin–streptomycin; Glutamax 2%; FBS 10%) for 24h. Coverslips were then transferred to a six-well plate containing 2ml of Neurocell medium/well and transfected with indicated receptor, dominant negative Rab or ARF1 DNA constructs, using a calcium phosphate transfection protocol as previously described [3]. For siRNA experiments, neurons were transfected with ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA (100pmol/well, Dharmacon) as indicated by manufacturer, 24h after DNA transfection, using Dharmafect (Dharmacon) as transfection agent. Experiments were carried out 72h post siRNA transfection and knockdown was verified by Western-blot analysis as described in Nagi et al, 2015 [53].

#### *Immortalized cell lines*

HEK293 cells (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 2mM L-glutamine (Multicell). Clones stably expressing Flag-DOPr, Flag-MOPr and Flag-  $\beta$ 2ARs were generated using G418 at 500 $\mu$ g/ml

as selection agent, as previously described (Invitrogen) [54]. ON-TARGETplus SMARTpool siRNA was transfected onto stable cell-lines at 30-80% confluence in 6 (100pmol) or 24 (25pmol) well plates using Dharmafect, 24h post plating and 72h before experimentation. For transient expression of recombinant protein, transfections were done 48h before the experiment using polyethylenimine (Polysciences) according to a previously published protocol [55].

### **Immunofluorescence**

#### *Labeling and quantification of DOPr trafficking in neurons*

Immunolabeling of surface receptors for quantification of trafficking was done as previously described [3]. Briefly, Flag-DOPrs, Flag-MOPrs or Flag- $\beta$ 2ARs cultures were incubated at 37°C with Neurocell medium containing Ca<sup>2+</sup>-dependent mouse anti-Flag M1 antibody (1:100; Sigma). After 30 min incubation with the antibody, vehicle (0.05% DMSO in Neurocell) or agonist (DPDPE, DAMGO (10 $\mu$ M), or isoproterenol (1 $\mu$ M)) were added to the medium for 60min at the end of which cultured neurons were washed once in calcium-free PBS and then in PBS, all at 37°C. Half of the cultures were immediately fixed with 4% PFA, permeabilized with PBS/0.1%Triton (20 min at RT), blocked with PBS/BSA 1% (10min at RT) and incubated with secondary antimouse Alexa 488-conjugated donkey antibody (1:1000; Invitrogen, A21202). The other half of cultured neurons were allowed to recover for 60 min in the absence of ligand before a second round of calcium-free PBS wash was completed before fixation, permeabilization and incubation with secondary antibody. This procedure ensured removal of the antibody bound to Flag-DOPrs still present at the surface, and the exclusive labeling of receptors that were retained intracellularly after internalization or recovery [56]. Another set of neurons was similarly treated with agonist or vehicle and then allowed to recover for 60 min. At this time, they were fixed and incubated with secondary without permeabilization, so as to exclusively reveal Flag-DOPrs that reappeared at the surface during recovery from internalization. Recycling was thus established by taking two independent measures: *i*) cytoplasmic labeling density (CLD) lost during recovery from treatment and *ii*) difference in surface labeling density (SLD) between neurons that were allowed to recover from constitutive (vehicle) or agonist-induced internalization. A schematic representation of the experimental design is provided in Fig 1a.

Cytoplasmic and surface labeling densities were quantified with ImageJ using a previously described method [57], with small modifications [3]. Thus, total CLD was obtained by measuring fluorescence intensity within the region confined between the external and nuclear perimeters (Supplementary figure 6a), and dividing this value by the corresponding area. Total SLD was defined by calculating the ratio of fluorescence measured within internal and external perimeters of surface-labeled neurons (Supplementary figure 6b), and the corresponding area. Nuclear labeling density (fluorescence within nuclear perimeter/nuclear area) was considered background, and subtracted from total density values just described. Contours defining each of the regions of interest were first drawn on brightened images, and once the trace completed brightness was reset to acquisition conditions, so as to quantify fluorescence intensity. Images were acquired with a FluoView 1000 confocal laser-scanning microscope (Olympus) using a 60X objective. Gain was set for each independent experiment, using calibration slides. These consisted of vehicle- or DPDPE-treated cultures processed for intracellular labelling. Calibration was done by adjusting gain so as to minimize saturation in the internalization slide while still being able to visualize intracellular labeling in the vehicle slide. Once the parameters were set they were kept constant across all conditions in the same experiment, to ensure that differences in labelling density represented differences in receptor density.

For experiments in which neurons were treated with cytochalasin D (10 $\mu$ M) or Y-27632 (10 $\mu$ M) (Selleckchem, product number # S1049), treatment drugs were introduced immediately after agonist washout and remained present in the incubation medium throughout recovery. CID755673 (20 $\mu$ M) was introduced 24h before the day of experiment and remained present throughout internalization and recovery process. In neurons where Flag-DOPr were co-expressed with dominant negative mutants, the receptor was revealed using antimouse Alexa 594-conjugated goat antibody (1:1000; RT; 60min, Invitrogen, A11005). Rab4-N121I-GFP and Rab7-N125I GFP-tagged mutants were directly visualized while ARF1-T31N-HA was labeled with rabbit anti-HA primary antibody (1:500, Santa Cruz, sc-805) and antirabbit Alexa 488-conjugated goat antibody (Invitrogen, A11034).

#### *DOPr co-localization with compartment markers in neurons*

Flag-DOPr were labeled with anti-Flag M1 antibody (1:500; Sigma) and then processed as above, in order to reveal receptors internalized in vehicle or DPDPE-treated cultures (10 $\mu$ M, 60min), which were allowed to recover (60 min) or not from vehicle or agonist exposure.

Neurons were then fixed, permeabilized, and blocked with PBS/BSA 1% before incubation for 60 min at RT with antibody for TGN46 (rabbit, 1:1000, Millipore). Cultures were then washed 3 times in PBS and secondary, Alexa-conjugated antibodies (1:1000) were added to reveal TGN46 and Flag-DOPrs. Colocalization images were acquired using an SP8 HyVolution point scanning confocal microscope at 60X magnification.

#### *DOPr co-localization in HEK cells*

Membrane Flag-tagged DOPrs were labelled with first antibody as above, followed by introduction of vehicle or DPDPE (1 $\mu$ M; 37 °C) for 30 minutes. Treatment was stopped by ice-cold washes with normal or calcium-free PBS to exclusively label either membrane DOPrs or receptors that had been internalized. Cells were then fixed with 3% PFA (15min, RT), permeabilized with 0.1% Triton X-100 (15min) and blocked in PBS/BSA1%. Corresponding fluorescence-conjugated secondary antibody Alexa 594 (1:1000; RT; 60min) was added. Rab4-N121I and Rab7-N125I GFP-tagged mutants were directly visualised. Images were acquired using a FluoView 1000 confocal laser-scanning microscope (Olympus) using a 60X objective.

#### *Quantification of DOPr trafficking in HEK293 cells*

The amount of receptors recycling to the surface was assessed using a previously published ELISA-based method [3]. HEK293 cells expressing Flag-DOPrs, Flag-MOPrs or Flag- $\beta$ 2ARs were grown on 24-well polylysine-coated plates. One hour before inducing internalization with a single dose of DPDPE, DAMGO or Isopreterenol (1 $\mu$ M; 30min), protein synthesis was blocked with 10 $\mu$ M cycloheximide that remained present throughout the duration of the assay. At the end of the internalization period, the agonist was removed by washing three times with DMEM at 37°C. Cells were allowed to recover at either 37°C or 20°C in agonist-free medium (DMEM/HEPES/cycloheximide) for the indicated time periods. In experiments assessing the effects of different blockers on recycling these were introduced upon agonist removal and allowed to remain present throughout recovery. Experiments were stopped by addition of cold PBS, cells fixed for 15min at 4°C in PFA (3%), followed by blocking of non-specific binding with PBS/BSA 1%/CaCl<sub>2</sub> 1mM at RT for 30min. Cells were subsequently incubated with anti-FLAG M1 antibody (1:1000) for 1h (RT), washed three times and incubated with peroxidase-conjugated (HRP) anti-mouse antibody (1:5000; Amersham Biosciences) for 30min. After extensive washing, 200 $\mu$ l of the HRP substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride (*SIGMA FAST*<sup>™</sup> *OPD*, Sigma-Aldrich) was added to each well. The reaction

was allowed to proceed for 8 min and stopped using 50µl of 3N HCl. 200µl of the reaction mix was evaluated for optical density (OD) at 492nm in a microplate reader (Victor3; PerkinElmer). OD readings correspond to the signal generated by receptors at the cell surface. Wells that had more than 30% cell loss during experiment were excluded from the analysis. The total amount of surface receptors internalized by agonist ( $I_T$ ) was calculated by subtracting OD obtained in the presence of agonist from the OD obtained in the absence of agonist. The amount of internalized receptors that recycled back to the surface were calculated by subtracting the OD value for surface receptors remaining after recycling from the OD remaining after internalization for each condition, and expressed as percentage of  $I_T$ .

### **Animal procedures and behavioral measures**

#### *Animals*

Adult male Sprague-Dawley (SD) rats, weighing 175-200g, were purchased from Charles River laboratories (St Constant, Qc, Canada) and housed in a controlled environment on a 12h dark/light cycle with a free access to food and water. All procedures were approved by the animal care ethic committee of the Université de Sherbrooke (protocol number # 234-14) and conducted according to policies and directives of the Canadian Council on Animal Care and the International Association for the Study of Pain guidelines for pain research on animals.

#### *Inflammatory Pain*

Unilateral inflammation was induced by intra-plantar administration of 100µl emulsified complete Freund's adjuvant (CFA) into the right hind paw of SD rats under brief isoflurane anesthesia. CFA was prepared by emulsion of equivalent volume of oil (Calbiochem, catalog number #344289) and 0.9% sterile saline solution. The volume injected contained approximately 50µg of lyophilized bacterial membrane (*Mycobacterium butyricum*). Pre-established exclusion criteria included: i) abnormal paw edema or inflammation, necrosis, scar formation; ii) absence of CFA-induced mechanical allodynia at baseline; iii) more than 10% loss in body weight and iv) premature death.

Two animals were excluded in this study, one died before testing the other failed to show CFA-induced allodynia. The experimenter was not blinded to treatment or outcome, but was unaware of the cellular results which precluded any expectation about behavioural outcome.

#### *Von Frey filament test*



Animals were acclimatized to plexiglas enclosures and the mesh floor 1-3 days prior to behavioral testing. Animals were randomly divided into two groups before the first habituation period. 50% mechanical paw withdrawal thresholds were assessed before and 72h after CFA administration using Von Frey hair filaments as described in Chaplan et al., 1994 [58] [479] [479] [479] [478] [478] [479] [478] [477] [476] [477] [477] [477] [476] [474] [473] [473] [472] [472] [472] [472] [472] [472] [471] [471] [471] [471] [471] [471] [469] [468] [467] [467] [467] [469] [469] [467] [466] [467] [467]. Animals were then injected intrathecally either with the selective ROCK1 inhibitor Y-27632 at a dose of 20 $\mu$ g/20 $\mu$ l or sterile saline solution. Two hours later, they were intrathecally injected with 10nmol DPDPE alone or mixed with Y-27632 (20 $\mu$ g) in a 20 $\mu$ l final volume, following which they were tested with Von Frey hair filaments every 15 minutes during. Once threshold levels returned to pre-treatment values rats received a second *i.t.* administration of DPDPE at the same dose as the first injection to evaluate tolerance development.

### Statistical analyses

*Neurons.*- Analyses were done in 'R' [59]. Comparisons in surface labeling between neurons that were allowed to recover from agonist treatment vs neurons recovered from exposure to vehicle (0.05% DMSO) were done by two-tailed, non-paired Student's *t* test ('R code': `t.test(data values~treatment, data=u[u$gene==g,], paired=F, alternative="two.sided)`). Differences in intracellular labeling were analyzed by ANOVA, using Tukey's for post-hoc comparisons. One-way ANOVA was used when the effect of different treatments introduced during recovery was assessed ('R code': `v <- aov(formula = data values ~treatment, data=u[u$gene==g,]); tk<-TukeyHSD(v)`). When the effect of silencing different trafficking proteins was determined, two-way ANOVA was used. ('R code': `v <- aov(formula = data values ~ treatment * siRNA silencing effect, data = u[u$gene == g, ]); tuk<-TukeyHSD(v)`).

*HEK cells.*- For kinetic curves, data were fit by nonlinear regression, and parameters describing curves for different conditions were compared with 'extra sum of squares F test' using Graphpad 6. For comparisons of single time points (e.g.:  $\beta$ 2AR recycling  $\pm$  siRNA VPS35) or for two time points (e.g.: DOPr recycling  $\pm$  siRNA TIP47; DOPr recycling  $\pm$  siRNA Rab9) two-tailed, non-paired Student's *t* test or ANOVA two-way were respectively used.

## References

1. Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2011) Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol* 22 (5-6):405-414. doi:10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c
2. Gendron L, Cahill CM, von Zastrow M, Schiller PW, Pineyro G (2016) Molecular Pharmacology of delta-Opioid Receptors. *Pharmacological reviews* 68 (3):631-700. doi:10.1124/pr.114.008979
3. Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, Amraei M, Chabot-Dore AJ, Millecamps M, Stone LS, Pineyro G (2012) Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (14):4827-4840. doi:10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012
4. Gupta A, Fujita W, Gomes I, Bobeck E, Devi LA (2015) Endothelin-converting enzyme 2 differentially regulates opioid receptor activity. *British journal of pharmacology* 172 (2):704-719. doi:10.1111/bph.12833
5. Pradhan AA, Walwyn W, Nozaki C, Filliol D, Erbs E, Matifas A, Evans C, Kieffer BL (2010) Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor *in vivo*: two paths toward analgesic tolerance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (49):16459-16468. doi:10.1523/JNEUROSCI.3748-10.2010
6. Henry AG, White IJ, Marsh M, von Zastrow M, Hislop JN (2011) The role of ubiquitination in lysosomal trafficking of delta-opioid receptors. *Traffic* 12 (2):170-184. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01145.x
7. Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, Von Zastrow M (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297 (5581):615-620. doi:10.1126/science.1073308
8. Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2009) *In vivo* delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PloS one* 4 (5):e5425. doi:10.1371/journal.pone.0005425
9. Trapaidze N, Gomes I, Bansinath M, Devi LA (2000) Recycling and resensitization of delta opioid receptors. *DNA and cell biology* 19 (4):195-204. doi:10.1089/104454900314465
10. Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, Huard K, Paquin-Gobeil M, Pineyro G (2009) Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (1):147-163. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00308.x
11. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD (2011) The ESCRT pathway. *Developmental cell* 21 (1):77-91. doi:10.1016/j.devcel.2011.05.015
12. Jacob C, Cottrell GS, Gehringer D, Schmidlin F, Grady EF, Bunnett NW (2005) c-Cbl mediates ubiquitination, degradation, and down-regulation of human protease-activated receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 280 (16):16076-16087. doi:10.1074/jbc.M500109200
13. Lauffer BE, Melero C, Temkin P, Lei C, Hong W, Kortemme T, von Zastrow M (2010) SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J Cell Biol* 190 (4):565-574. doi:10.1083/jcb.201004060
14. Hislop JN, Marley A, Von Zastrow M (2004) Role of mammalian vacuolar protein-sorting proteins in endocytic trafficking of a non-ubiquitinated G protein-coupled receptor to

- lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 279 (21):22522-22531. doi:10.1074/jbc.M311062200
15. Tanowitz M, Von Zastrow M (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 277 (52):50219-50222. doi:10.1074/jbc.C200536200
16. Cho DI, Zheng M, Min C, Kwon KJ, Shin CY, Choi HK, Kim KM (2013) ARF6 and GASP-1 are post-endocytic sorting proteins selectively involved in the intracellular trafficking of dopamine D(2) receptors mediated by GRK and PKC in transfected cells. *British journal of pharmacology* 168 (6):1355-1374. doi:10.1111/bph.12025
17. Tappe-Theodor A, Agarwal N, Katona I, Rubino T, Martini L, Swiercz J, Mackie K, Monyer H, Parolaro D, Whistler J, Kuner T, Kuner R (2007) A molecular basis of analgesic tolerance to cannabinoids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (15):4165-4177. doi:10.1523/JNEUROSCI.5648-06.2007
18. Rosciglione S, Theriault C, Boily MO, Paquette M, Lavoie C (2014) Galphas regulates the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Nature communications* 5:4556. doi:10.1038/ncomms5556
19. Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149 (4):901-914
20. van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70 (5):729-740
21. Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E, Stenmark H (2002) Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nature cell biology* 4 (5):394-398. doi:10.1038/ncb791
22. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122 (5):735-749. doi:10.1016/j.cell.2005.06.043
23. Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS (2007) Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Molecular and cellular biology* 27 (3):1112-1124. doi:10.1128/MCB.00156-06
24. Temkin P, Lauffer B, Jager S, Cimermanic P, Krogan NJ, von Zastrow M (2011) SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature cell biology* 13 (6):715-721. doi:10.1038/ncb2252
25. Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A (1995) Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131 (6 Pt 1):1435-1452
26. Press B, Feng Y, Hoflack B, Wandinger-Ness A (1998) Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol* 140 (5):1075-1089
27. Diaz E, Pfeffer SR (1998) TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 93 (3):433-443
28. Lombardi D, Soldati T, Riederer MA, Goda Y, Zerial M, Pfeffer SR (1993) Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *The EMBO journal* 12 (2):677-682
29. Bissig C, Gruenberg J (2014) ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol* 24 (1):19-25. doi:10.1016/j.tcb.2013.10.009

30. Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Faure J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F, Gruenberg J (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303 (5657):531-534. doi:10.1126/science.1092425
31. De Matteis MA, Luini A (2008) Exiting the Golgi complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 9 (4):273-284. doi:10.1038/nrm2378
32. Ladinsky MS, Wu CC, McIntosh S, McIntosh JR, Howell KE (2002) Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments. *Molecular biology of the cell* 13 (8):2810-2825. doi:10.1091/mbc.01-12-0593
33. Tanowitz M, von Zastrow M (2003) A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. *The Journal of biological chemistry* 278 (46):45978-45986. doi:10.1074/jbc.M304504200
34. Cao H, Weller S, Orth JD, Chen J, Huang B, Chen JL, Stamnes M, McNiven MA (2005) Actin and Arp1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nature cell biology* 7 (5):483-492. doi:10.1038/ncb1246
35. Wakana Y, van Galen J, Meissner F, Scarpa M, Polishchuk RS, Mann M, Malhotra V (2012) A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *The EMBO journal* 31 (20):3976-3990. doi:10.1038/emboj.2012.235
36. Salvarezza SB, Deborde S, Schreiner R, Campagne F, Kessels MM, Qualmann B, Caceres A, Kreitzer G, Rodriguez-Boulan E (2009) LIM kinase 1 and cofilin regulate actin filament population required for dynamin-dependent apical carrier fission from the trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell* 20 (1):438-451. doi:10.1091/mbc.E08-08-0891
37. Camera P, da Silva JS, Griffiths G, Giuffrida MG, Ferrara L, Schubert V, Imarisio S, Silengo L, Dotti CG, Di Cunto F (2003) Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nature cell biology* 5 (12):1071-1078. doi:10.1038/ncb1064
38. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S (1999) An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 5 (2):221-225. doi:10.1038/5587
39. Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M, Spang A (2010) Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141 (3):497-508. doi:10.1016/j.cell.2010.03.011
40. Vitelli R, Santillo M, Lattero D, Chiariello M, Bifulco M, Bruni CB, Bucci C (1997) Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *The Journal of biological chemistry* 272 (7):4391-4397
41. Girard E, Chmiest D, Fournier N, Johannes L, Paul JL, Védie B, Lamaze C (2014) Rab7 is functionally required for selective cargo sorting at the early endosome. *Traffic* 15 (3):309-326. doi:10.1111/tra.12143
42. Kucera A, Bakke O, Progida C (2016) The multiple roles of Rab9 in the endolysosomal system. *Communicative & integrative biology* 9 (4):e1204498. doi:10.1080/19420889.2016.1204498
43. Ganley IG, Carroll K, Bittova L, Pfeffer S (2004) Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Molecular biology of the cell* 15 (12):5420-5430. doi:10.1091/mbc.E04-08-0747
44. Aivazian D, Serrano RL, Pfeffer S (2006) TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J Cell Biol* 173 (6):917-926. doi:10.1083/jcb.200510010

45. Dores MR, Chen B, Lin H, Soh UJ, Paing MM, Montagne WA, Meerloo T, Trejo J (2012) ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J Cell Biol* 197 (3):407-419. doi:10.1083/jcb.201110031
46. Tomas A, Vaughan SO, Burgoyne T, Sorkin A, Hartley JA, Hochhauser D, Futter CE (2015) WASH and Tsg101/ALIX-dependent diversion of stress-internalized EGFR from the canonical endocytic pathway. *Nature communications* 6:7324. doi:10.1038/ncomms8324
47. Le Blanc I, Luyet PP, Pons V, Ferguson C, Emans N, Petiot A, Mayran N, Demaurex N, Faure J, Sadoul R, Parton RG, Gruenberg J (2005) Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nature cell biology* 7 (7):653-664. doi:10.1038/ncb1269
48. Pfeffer SR (2009) Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS letters* 583 (23):3811-3816. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.075
49. Chia PZ, Gasnereau I, Lieu ZZ, Gleeson PA (2011) Rab9-dependent retrograde transport and endosomal sorting of the endopeptidase furin. *Journal of cell science* 124 (Pt 14):2401-2413. doi:10.1242/jcs.083782
50. Mittal N, Roberts K, Pal K, Bentolila LA, Fultz E, Minasyan A, Cahill C, Pradhan A, Conner D, DeFea K, Evans C, Walwyn W (2013) Select G-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and beta-arrestin 1 pathway. *Cell Rep* 5 (4):1010-1021. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.015
51. Cao TT, Mays RW, von Zastrow M (1998) Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *The Journal of biological chemistry* 273 (38):24592-24602
52. Boulay PL, Schlienger S, Lewis-Saravalli S, Vitale N, Ferbeyre G, Claing A (2011) ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene* 30 (36):3846-3861. doi:10.1038/onc.2011.100
53. Nagi K, Charfi I, Pineyro G (2015) Kir3 channels undergo arrestin-dependant internalization following delta opioid receptor activation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (18):3543-3557. doi:10.1007/s00018-015-1899-x
54. Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller PW, Pineyro G (2005) Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *The Journal of biological chemistry* 280 (9):7808-7816. doi:10.1074/jbc.M411695200
55. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16):7297-7301
56. Vargas GA, Von Zastrow M (2004) Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor. *The Journal of biological chemistry* 279 (36):37461-37469. doi:10.1074/jbc.M401034200
57. Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Laustriat D, Cao YQ, Basbaum AI, Dierich A, Vonesh JL, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2006) Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (25):9691-9696. doi:10.1073/pnas.0603359103
58. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53 (1):55-63
59. team Rc (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical

Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

## Figure legends

### ***Figure 1. Quantification of DOPr recycling in neurons***

Cortical neurons transfected with Flag-DOPrs were incubated with primary antibody prior to exposure to either vehicle (0.05% DMSO) or DPDPE (10  $\mu$ M, 60 min). By the end of treatment drug or vehicle were washed-out and antibody bound to remaining surface receptors stripped. At this time one set of cultured neurons was immediately processed for intracellular or surface labeling (no recovery) to respectively reveal internalized receptors appearing in the intracellular compartment or disappearing from the surface. Another set of neurons similarly exposed to drug/vehicle were allowed to recover 60 min in the absence of ligand (recovery) before exclusively revealing internalized receptors that remained trapped in the cytoplasm during recovery from treatment or receptors that regained the surface. Dotted white lines delimit regions of interest that were quantified. Scale bar, 50  $\mu$ m (**a**). Histograms show intracellular labeling density  $\pm$  SEM (arbitrary units) in neurons labeled immediately after treatment, or neurons that were allowed to recover (n=18 neurons cultured from pups in three different litters). Corresponding scatter plots in red show sample dispersion. Statistical significance was established by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test which revealed that intracellular labeling following internalization and recovery were different among themselves and from labeling in vehicle-exposed neurons (p<0.0001) (**b**). Histograms and corresponding scatter plots show surface labeling density following 60 min recovery from exposure to DPDPE or vehicle (arbitrary units, n=18). Statistical comparison using non-paired, Student's *t* test (**c**).

### ***Figure 2. DOPr recycling is independent of the retromer's cargo selective complex but blocked by inactive Rab7***

Cortical neurons were transfected with Flag-DOPrs (red) and pcDNA3 or Rab7N125I (green) as indicated, treated and processed as in Fig 1. Upper panels show images illustrating intracellular labeling immediately after end of indicated treatment, lower panels show intracellular and surface labeling in DPDPE-treated cells that were allowed to recover (60 min) in the absence of agonist. Scatter plots and histograms (mean  $\pm$  SEM; n=18) correspond to intracellular labeling density in neurons processed immediately after DPDPE treatment, and neurons that were allowed to recover from DPDPE exposure as indicated. Comparisons by two-

way ANOVA followed by Tukey's posthoc test revealed significant reduction of intracellular labeling following recovery in neurons transfected with pcDNA3 (\*\*p < 0.001) but not in Rab7N125I-transfected cells. Scale bar, 50  $\mu$ m (**a**). Cortical neuron cultures transfected with Flag-DOPrs and either scrambled (Scr-) or VPS35 siRNA, were labeled, treated and processed as above to produce scatter plots and histograms (mean  $\pm$  SEM; n=18) corresponding to intracellular and surface labeling density. Comparisons by two-way ANOVA followed by Tukey's posthoc test revealed significant reduction of intracellular labeling following recovery in scrambled and VPS35 siRNA conditions (\*\*\* p < 0.0001; n=18) (**b**).

***Figure 3. The Rab9/TIP47 retrieval complex and ESCRT accessory protein ALIX allow DOPrs to recycle back to the membrane in neurons***

Cortical neuron cultures transfected with Flag-DOPrs, scrambled-, Rab9 or TIP47 siRNA were labeled and treated as described in Fig 1. Scatter plots and histograms (mean  $\pm$  SEM, n=18) show intracellular labeling density obtained immediately after DPDPE treatment or following recovery from agonist exposure. Comparisons by two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test revealed that following recovery from DPDPE treatment intracellular labeling was reduced in neurons transfected with scrambled (\*\*\*p<0.0001) but not with Rab9 siRNA (p = 0.0952), nor TIP47 siRNA (p = 0.7349) (**a**). Cortical neuron cultures transfected with Flag-DOPrs and either scrambled (Scr-) or ALIX siRNA, were labeled, treated and processed as above to produce scatter plots and histograms (mean  $\pm$  SEM; n=18) corresponding to intracellular labeling density. Comparisons by two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test revealed significant reduction of intracellular labeling following recovery in scrambled (\*\*\* p < 0.0001) but not ALIX siRNA-transfected cultures (p = 0.4793) (**b**).

***Figure 4. DOPr recycling by Rab9/TIP47 and ALIX is conserved in HEK293 cells***

HEK293 cells expressing Flag-DOPr were transfected with scrambled-, Rab9- (**a**) or TIP47-siRNA (**b**), and recycling evaluated following 30 min and 60 min recovery from DPDPE treatment. Results were expressed as % of maximal recycling observed in scrambled-transfected controls, and correspond to mean  $\pm$  SEM (n=6). Two-way ANOVA followed by Tukey's



comparisons revealed an effect of Rab9 siRNA ( $p = 0.0041$ ) and an effect of TIP47 siRNA ( $p = 0.0217$ ). HEK293 cells expressing Flag-DOPr were transfected with scrambled or ALIX siRNA and recycling was evaluated. Results were expressed as % of maximal recycling observed in scrambled-transfected controls and correspond to mean  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). Curves were fit to one phase exponential kinetics and plateaux for scrambled and ALIX siRNA conditions were compared using ‘extra sum of squares F test’ revealing a significant difference: plateau scrambled =  $94.08 \pm 9.12$ , plateau ALIX siRNA =  $66.97 \pm 6.87$ ,  $p = 0.0462$ ) (**c**).

***Figure 5. DOPrs recycle to the membrane from the TGN.***

Cortical neuron cultures transfected with Flag-DOPrs were first labeled and then treated with DPDPE (10  $\mu$ M, 60 min) as in previous figures. At the end of treatment cells were either immediately processed for intracellular labeling (upper panel) or allowed to recover from treatment (60 min) either at 37°C or 20°C before revealing intracellular or surface labeling as indicated in lower panels. Scatter plots and histograms show intracellular labeling density (mean  $\pm$  SEM;  $n=18$ ) obtained immediately after treatment or following recovery (60 min) as indicated. One-way ANOVA, followed by Tukey’s comparisons revealed that there was a significant loss of intracellular labeling in cells that recovered from treatment at 37°C but not in those that recovered at 20°C as indicated in the figures (**a**). Cortical neurons were transfected with Flag-DOPrs (red) and pcDNA3 or ARF1-T31N (green) and exposed to vehicle or DPDPE as before. Scatter plots and histograms (mean  $\pm$  SEM;  $n=18$ ) represent intracellular labeling density in neurons processed immediately after treatment, or neurons that were allowed to recover. Statistical comparisons by two way ANOVA followed by Tukey’s posthoc test revealed significant reduction of intracellular labeling following recovery in pcDNA3 (\*\* $p < 0.001$ ) but not ARF1-T31N-transfected cells.

***Figure 6. Actin and ROCK activity are required for DOPr recycling in neurons***

Cortical neuron cultures were labeled, treated and processed as in previous figures and allowed to recover from DPDPE treatment in presence or absence of cytochalasin D (10  $\mu$ M; n=18) (**a**) or Y-27632 (20  $\mu$ g/20  $\mu$ l; n=18) (**b**). Scatter plots and histograms (mean  $\pm$  SEM; n=18) below correspond to intracellular labeling density obtained immediately after treatment or following recovery (60 min) from agonist exposure. Statistical comparisons were completed using one-way ANOVA followed by Tukey's posthoc test which revealed a significant loss of intracellular labeling in cells that recovered from treatment in the absence of inhibitor but not in those that recovered in presence of cytochalasin D (**a**) or Y-27632 (**b**). Statistics shown on the corresponding figures.

***Figure 7. Rock inhibitor Y-27632 precipitates acute tolerance to DPDPE-mediated analgesia.***

Mechanical allodynia was induced by intraplantar administration of CFA 72 hs before the experiment. On the day of the experiment rats received an i.t. injection of saline or Y-27632 (20  $\mu$ g/20  $\mu$ l) ( $\blacktriangle$ ) followed by a second injection of saline or Y-27632 ( $\blacktriangle$ ) immediately before DPDPE administration (i.t., 10 nmoles) ( $\star$ ). Mechanical thresholds were assessed immediately after DPDPE injection and then every 15 min until return to baseline and, at this time, animals were administered a second identical dose of DPDPE. Results correspond to pressure withdrawal threshold (mean  $\pm$  SEM) for rats injected with saline + DPDPE (n=8) or with Y-27632 + DPDPE (n=7). Statistical comparisons by two-way ANOVA revealed an effect of time (p<0.0001); an effect of Y-27632 pre-treatment (p<0.0001) and an interaction (p = 0.0033). Post-hoc comparisons with Bonferroni correction revealed differences after the second injection of DPDPE in saline and Y-27632-treated groups as indicated in the figure (\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

***Figure 8. Schematic representation of proposed recycling itinerary for DOPrs.***

After internalization GASP-1 excludes DOPrs from the recycling machinery originating at EEs, and the ESCRT complex sorts them into ILVs. By promoting back-fusion of ILVs, ESCRT accessory protein ALIX allows DOPrs to regain the limiting membrane of MVBs/LEs. At the limiting membrane DOPrs become available for translocation by the Rab9/TIP47 retrieval complex which transports them to the TGN. DOPrs then reach the membrane in carriers whose fission from the TGN is cell type-dependent.

### Supplementary figure legends

#### ***Supplementary Figure 1. DOPrs do not rely upon Rab4-dependent transport to regain the membrane.***

Cortical neurons were transfected with Flag-DOPrs (red) and pcDNA3 or Rab4N121I (green) as indicated, treated with vehicle (0.05% DMSO) or DPDPE (10  $\mu$ M, 60 min) and processed as in figure 1. Upper panels show intracellular labeling immediately after end of indicated treatment, lower panels show images for intracellular and surface labeling in DPDPE-treated cells that were allowed to recover (60 min) in the absence of agonist. Scatter plots and histograms correspond to intracellular labeling density (mean  $\pm$  SEM; n=18) in neurons labeled immediately after DPDPE treatment, and neurons that were allowed to recover from DPDPE exposure. Statistical comparisons by two-way ANOVA followed by Tukey's posthoc test revealed reduction in intracellular labeling following recovery both in cells transfected with pcDNA3 and Rab4N121I (\*\*p<0.0001). Scale bar, 50  $\mu$ m (**a**). HEK293 cells were co-transfected with Flag-DOPrs and pcDNA3 or Rab4N121I, exposed to DPDPE (1  $\mu$ M, 30 min) and recycling assessed upon removal of the agonist. Results were expressed as % of maximal recycling observed in vector-transfected controls, and correspond to mean  $\pm$  SEM (n=4). Curves were fit to one phase exponential kinetics and plateaux for pcDNA3 and Rab4N121I were compared using 'extra sum of squares F test' which revealed no significant difference among conditions: plateau pcDNA3= 92.09  $\pm$  14.91, Plateau Rab4N121I= 94.29  $\pm$  10.62, p = 0.8994. (**b**).

***Supplementary Figure 2. DOPr recycling in HEK cells is blocked by inactive Rab7 but not VPS35, which nonetheless blocks  $\beta$ 2ADR receptor recycling in neurons and HEK cells.***

Cortical neuron cultures were transfected with Flag- $\beta$ 2ARs and either scrambled (Scr-) or VPS35 siRNA. The day of the experiment they were labeled, treated with isoproterenol (1  $\mu$ M; 60 min) or vehicle (0.05% DMSO) and processed as in previous figures. Upper panels show intracellular labeling immediately after end of indicated treatment, lower panels show images for intracellular and surface labeling in isoproterenol-treated cells that were allowed to recover (60 min) in the absence of agonist. Scatter plots and histograms (mean  $\pm$  SEM; n=18) represent intracellular labeling density in neurons processed immediately after treatment, or neurons that were allowed to recover. Statistical comparisons by two-way ANOVA followed by Tukey's posthoc test revealed significant reduction of intracellular labeling following recovery in neurons transfected with scrambled (\*\*\*)p<0.0001) but not VPS35 siRNA **(a)**. HEK293 cells stably expressing Flag- $\beta$ 2ARs were transfected with either scrambled or VPS35 siRNA, were treated with isoproterenol (1  $\mu$ M; 30 min) and recycling assessed upon removal of the agonist. Results were expressed as % of maximal recycling observed in scrambled-transfected controls after 60 min recovery from agonist exposure (mean  $\pm$  SEM; n=6). Statistical comparison using two-tailed Student's *t* test; p = 0.0039 **(b)**. HEK293 cells were co-transfected with Flag-DOPrs and pcDNA3 or Rab7N125I, exposed to DPDPE (1  $\mu$ M, 30 min) and recycling assessed upon removal of the agonist. Results were expressed as % of maximal recycling observed in vector-transfected controls (mean  $\pm$  SEM; n=5). Curves were fit to one phase exponential kinetics and plateaux for pcDNA3 and Rab7N125I were compared using 'extra sum of squares F test' to reveal an effect of inactive Rab7: plateau pcDNA3= 99.8  $\pm$  22.22, plateau Rab7N125I= 49.7  $\pm$  17.97, p < 0.0001. **(c)**. Recycling was assessed in HEK293 cells expressing Flag-DOPr and transfected with scrambled or VPS35 siRNA and DPDPE (1  $\mu$ M, 30 min). Results correspond to mean  $\pm$  SEM (n=6). Curves were fit to one phase exponential kinetics and plateaux for scrambled or VPS35 siRNA compared using 'extra sum of squares F test' to reveal no effect of VPS35 silencing: plateau scrambled= 101.5  $\pm$  19.2, plateau VPS35 siRNA= 73.72  $\pm$  9.2, p= 0.1705 **(d)**.

***Supplementary Figure 3. DOPrs colocalize with TGN46 in neurons***

Neurons transfected with Flag-DOPrs were treated with DPDPE (10 $\mu$ M; 60 min) or vehicle (0.05% DMSO) and either immediately processed (**a**) or allowed to recover in presence or absence of ROCK inhibitor Y27632 (10  $\mu$ M) (**b**) before revealing DOPr (red) and endogenous TGN46 (green). Insets: show DOPr colocalization with TGN46 for corresponding conditions.

***Supplementary Figure 4. MOPr recycling in neurons is not affected by temperature and DOPr recycling in neurons is insensitive to PKD inhibitor CID755673.***

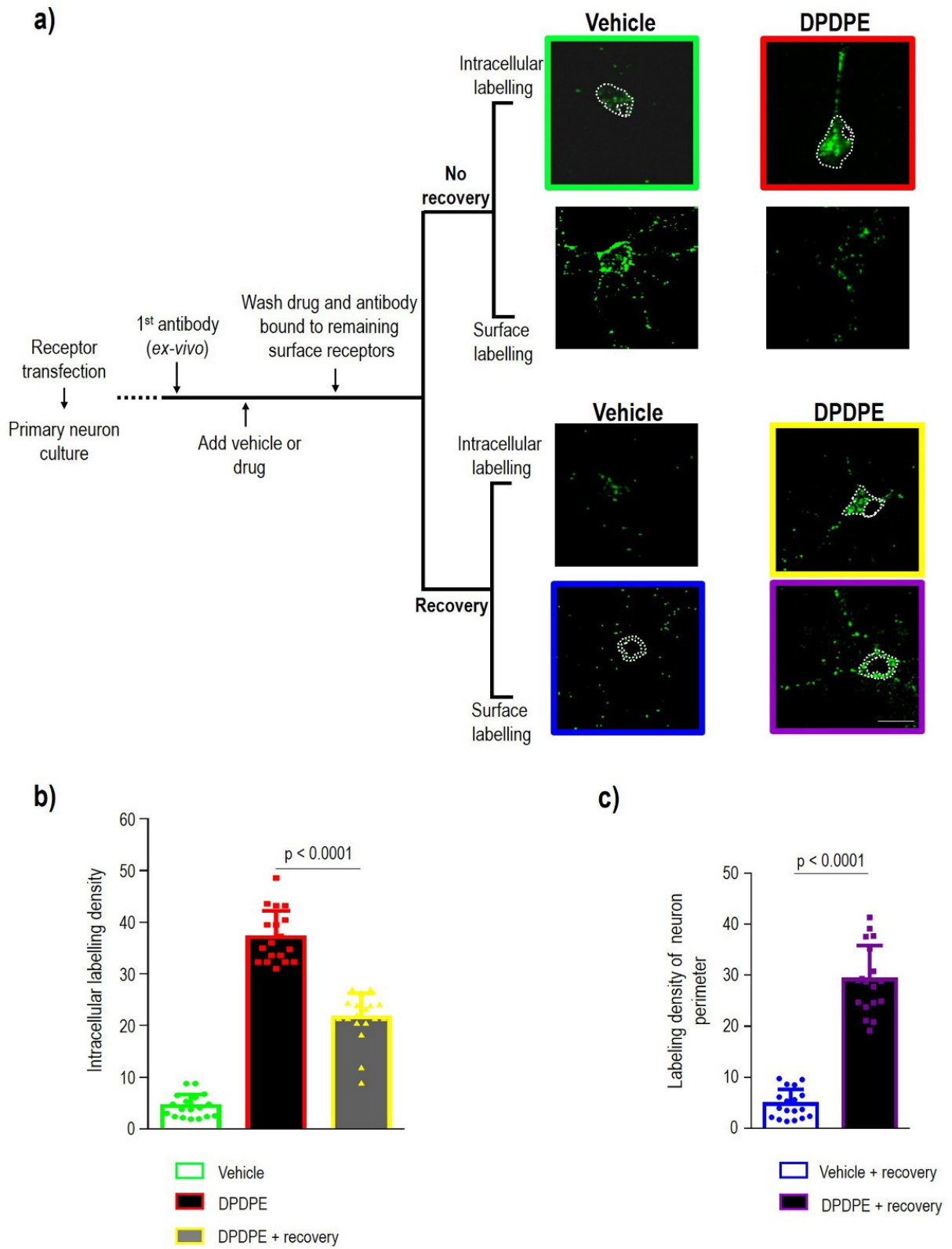
Cortical neuron cultures transfected with Flag-MOPrs were then labelled at the membrane with first antibody and exposed to DAMGO (10  $\mu$ M; 60 min). At the end of treatment cells were immediately processed for visualization of intracellular labeling or allowed to recover from treatment (60 min) at 37°C or 20°C before revealing intracellular or surface labeling. Scatter plots and histograms below correspond to intracellular labeling (mean  $\pm$  SEM; n=18) as indicated. One-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparisons was used for statistical analysis and results are shown in the figure (**a**). Cortical neurons transfected with Flag-DOPrs were pretreated or not with CID755673 (20  $\mu$ M) for 24hs. On the day of the experiment the medium was changed for one with freshly prepared blocker and neurons were exposed to DPDPE (10  $\mu$ M; 60 min) or vehicle (0.05% DMSO). At the end of treatment, they were immediately processed or allowed to recover from treatment (60 min) before revealing intracellular or surface labeling. Scatter plots and histograms correspond to intracellular labeling density (mean  $\pm$  SEM; n=18) as indicated. Statistical comparisons by two-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons revealed significant reduction of intracellular labeling following recovery in cells exposed or not to CID755673, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.0001. Scale bar, 50  $\mu$ m.

***Supplementary Figure 5. DOPr recycling in HEK cells is sensitive to temperature block and to PKD inhibitor CID755673.***

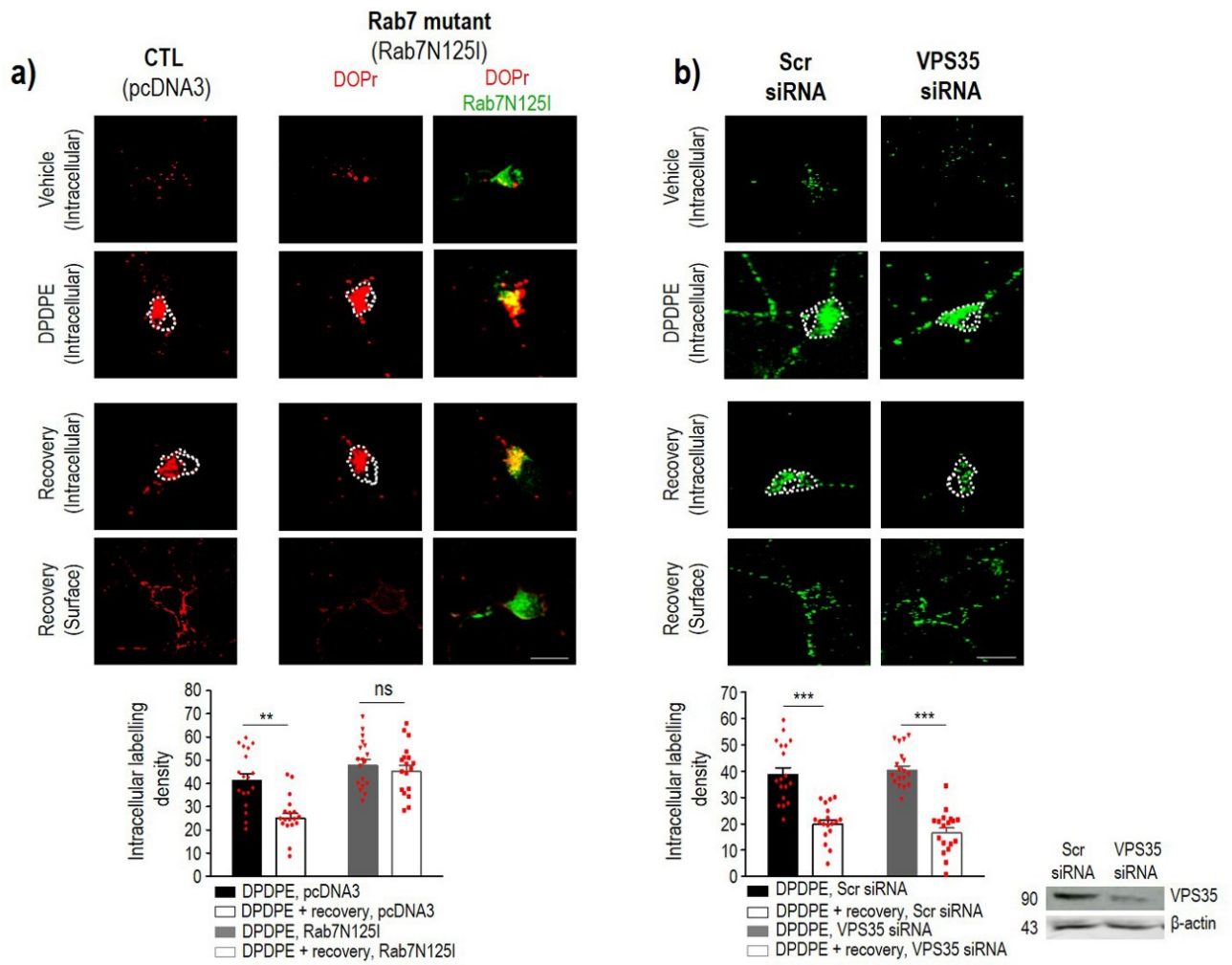
HEK293 cells expressing Flag-DOPr (**a**) or Flag-MOPr (**b**) were treated with corresponding agonist as indicated (1  $\mu$ M; 30 min), and recycling evaluated at 37°C or 20°C. Curves were fit to one phase exponential kinetics and time constant obtained at different temperatures compared using ‘extra sum of squares F test’. Comparisons revealed an effect of temperature for Flag-DOPrs (time constant 37°C=  $0.047 \pm 0.01$ , time constant 20°C=  $0.001 \pm 0.01$ ,  $p < 0.0001$ ; n=5) but not Flag-MOPr (time constant 37°C=  $0.038 \pm 0.02$ , time constant 20°C=  $0.028 \pm 0.01$ ,  $p = 0.6680$ ; n=3). HEK293 cells expressing Flag-DOPr were treated with DPDPE (1  $\mu$ M; 30 min) and recycling was evaluated in control cells and cells exposed to Y-27632 (10  $\mu$ M) (**c**) or Cytochalasin D (10  $\mu$ M) (**d**) during recovery. Another set of cells was pretreated or not with CID755673 (20  $\mu$ M) for 24 hs before recycling experiment was carried out (**e**). Curves were fit to one phase exponential kinetics and corresponding plateaux were compared using ‘extra sum of squares F test’. There was no effect of Y-27632 (plateau CTL=  $91.5 \pm 6.5$ , plateau Y-27632 =  $86.9 \pm 8.4$ ,  $p = 0.7188$ ; n=6) or Cytochalasin D (plateau CTL=  $107.1 \pm 8.6$ , plateau Cytochalasin D =  $102.4 \pm 12.9$ ,  $p = 0.0920$ ; n=6) but the analysis revealed an effect of PKD inhibitor for CID755673 (plateau CTL=  $100 \pm 5.5$ , plateau CID755673 =  $69.8 \pm 5.6$ ,  $p = 0.0104$ ; n=3).

***Supplementary Figure 6. Definition of region of interest for quantification of intracellular and surface labeling.***

Total cytoplasmic labeling density (CLD) was obtained by measuring fluorescence intensity within the region confined between the external (white) and nuclear perimeters (yellow) and dividing this value by the corresponding area (**a**). Total surface labeling density (SLD) was defined by measuring fluorescence within internal (yellow) and external (white) perimeters of surface-labeled neurons and dividing this value by the corresponding area (**b**). Nuclear labeling density (fluorescence within nuclear perimeter/nuclear area) was considered background.



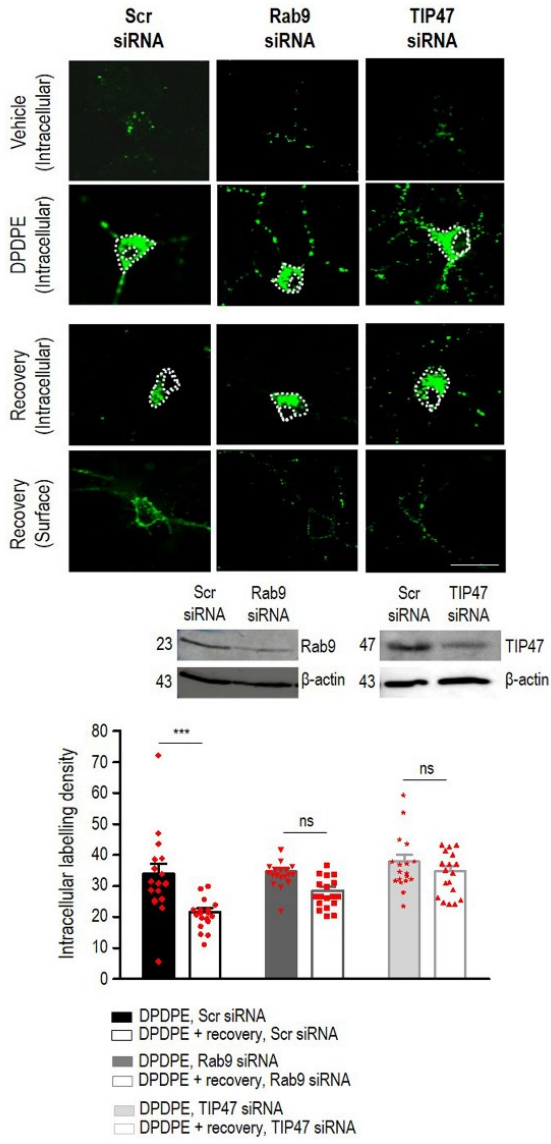
**Figure 1**



**Figure 2**



a)



b)

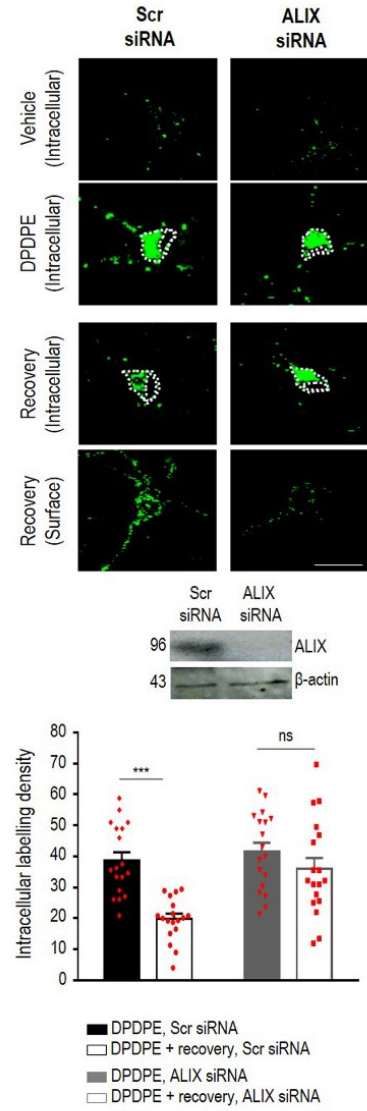
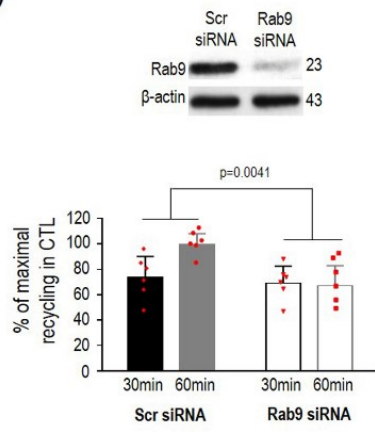
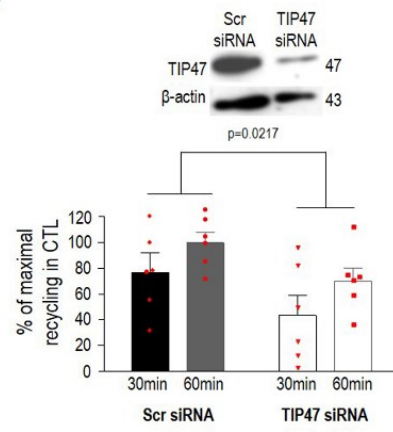


Figure 3

a)



b)



c)

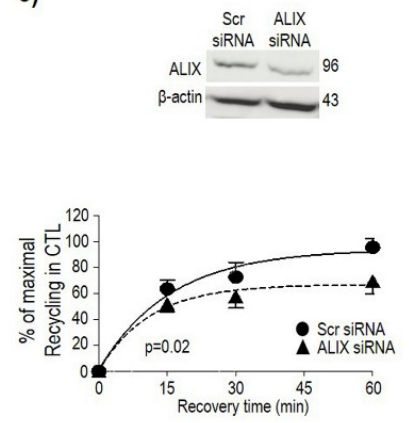
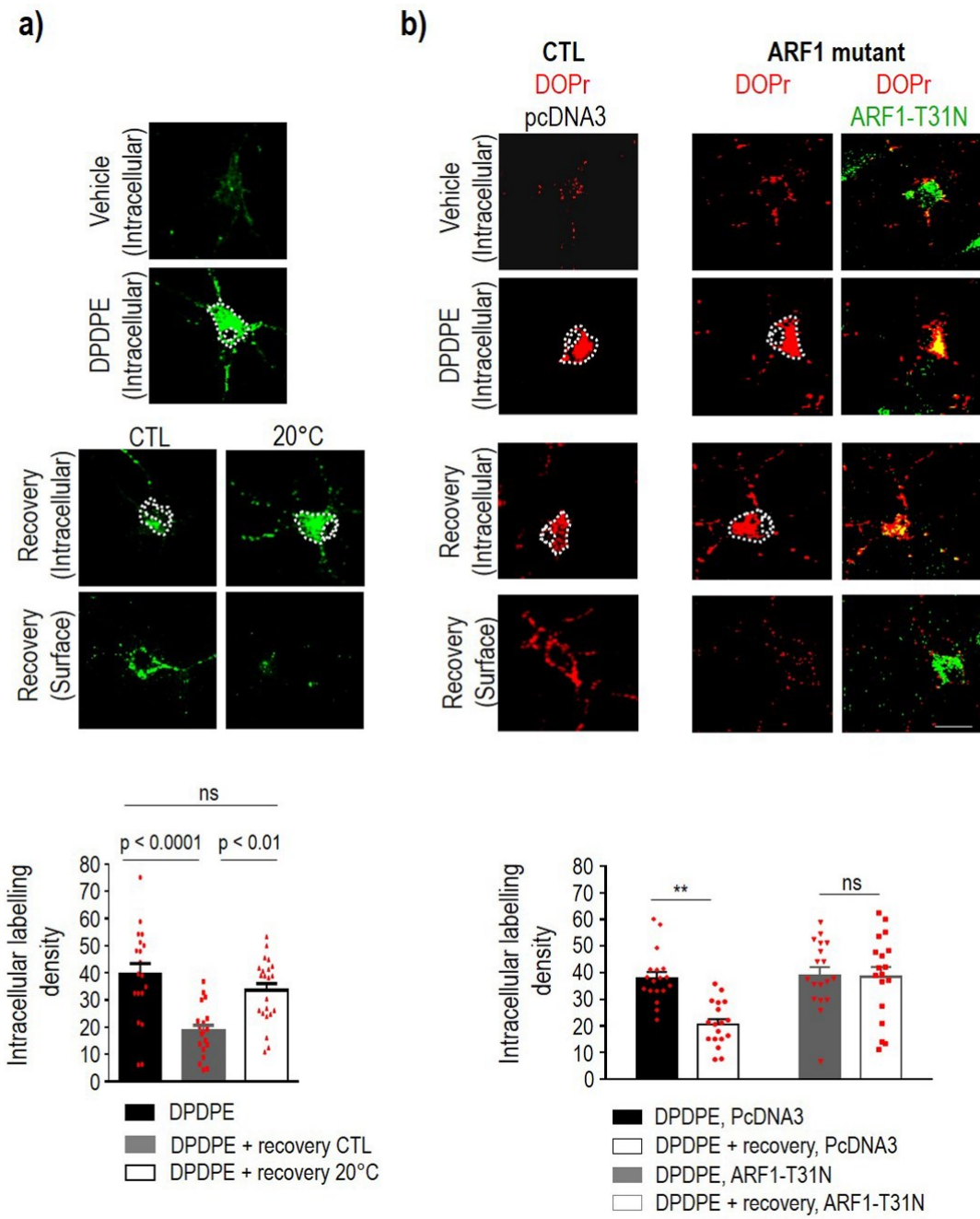
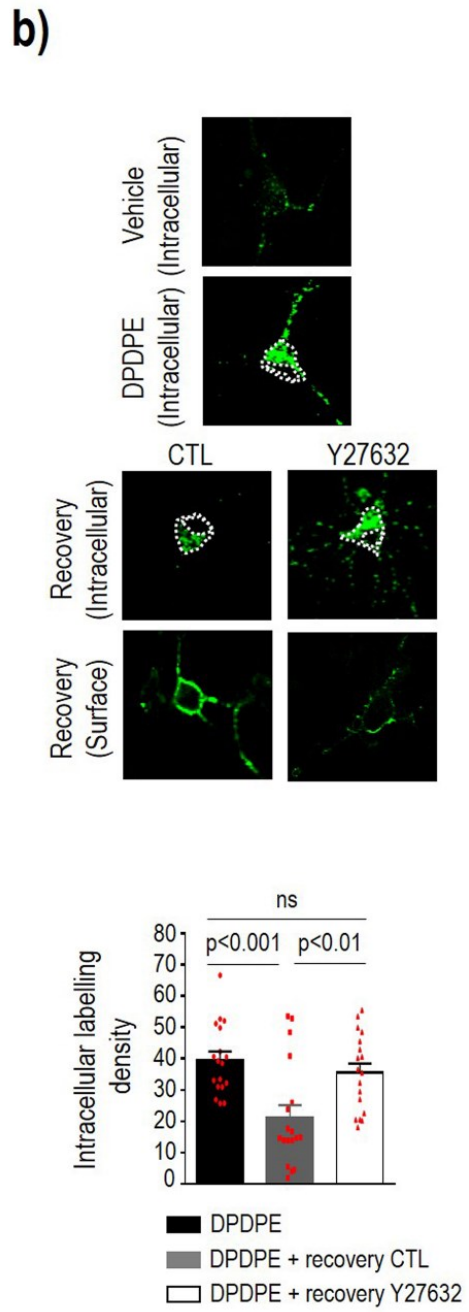
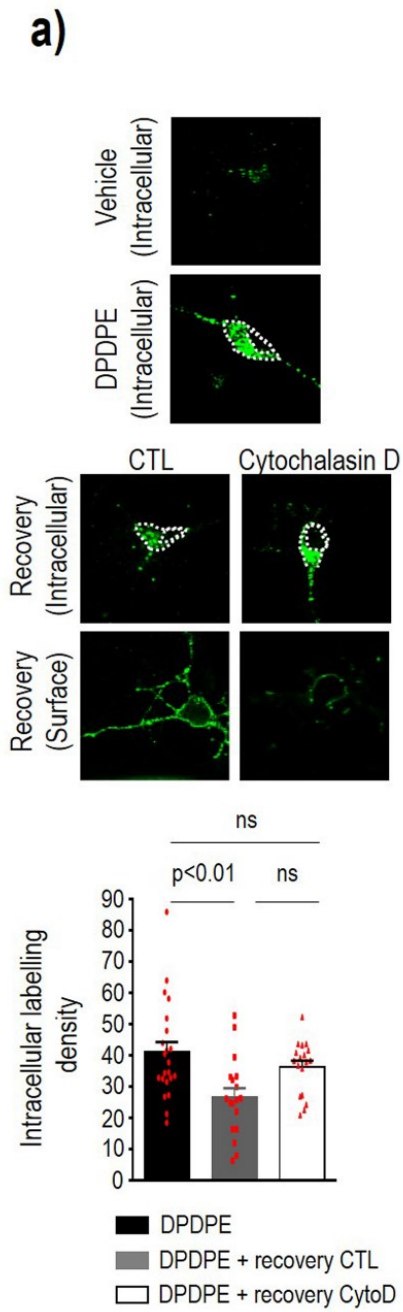


Figure 4



**Figure 5**



**Figure 6**

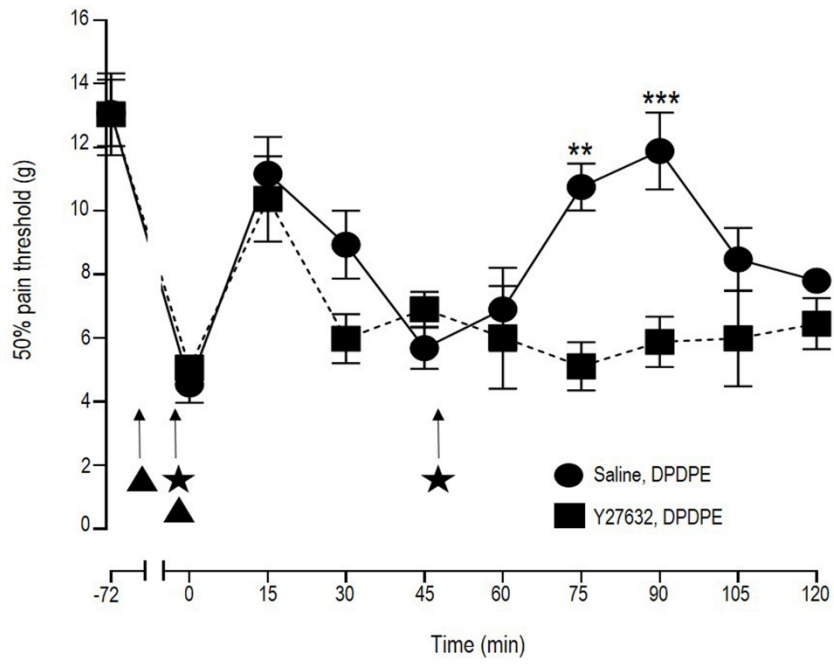


Figure 7

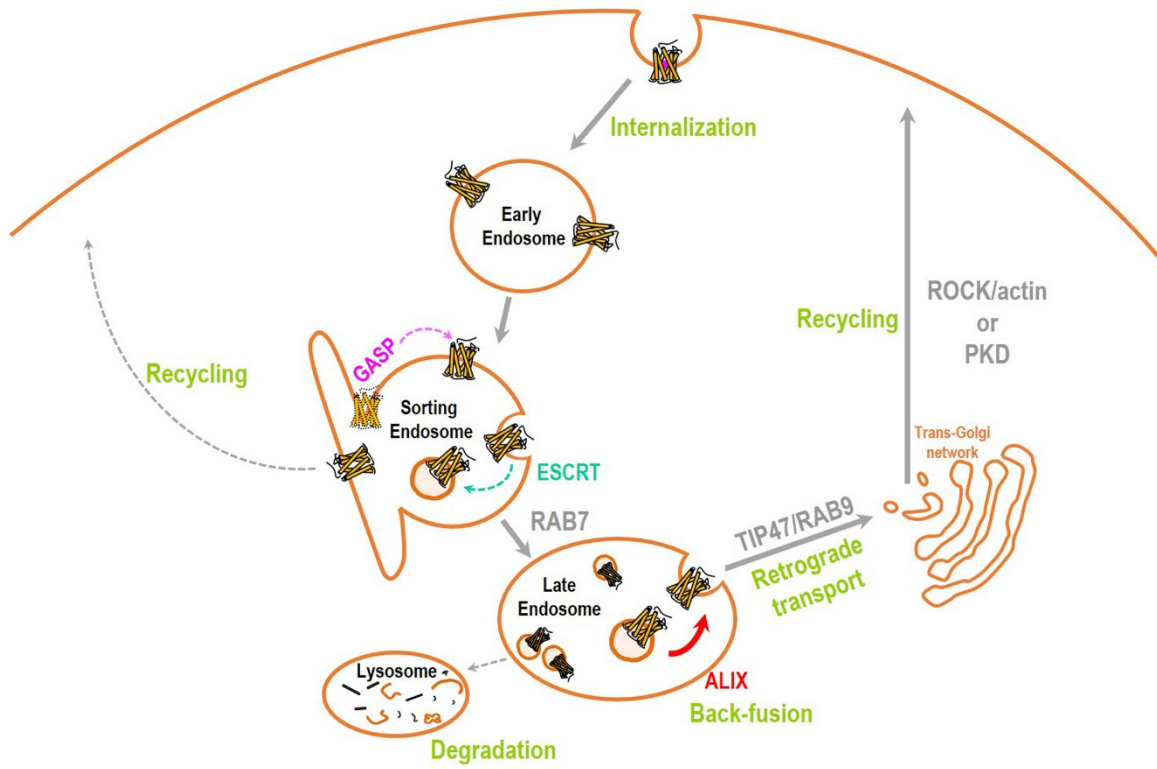
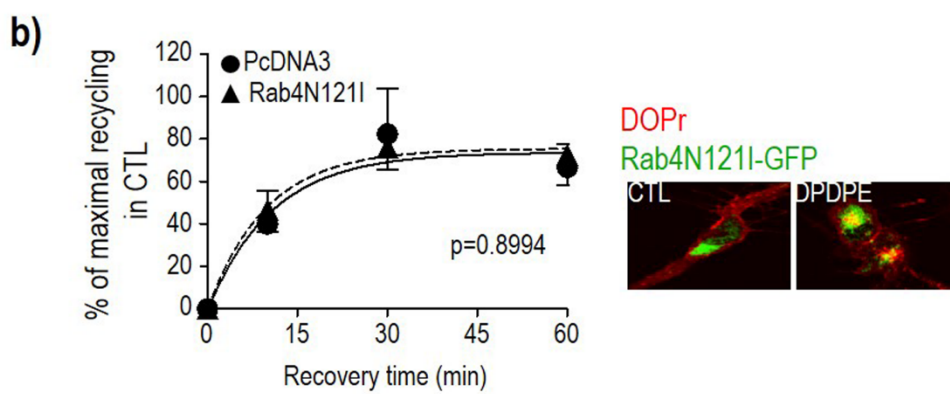
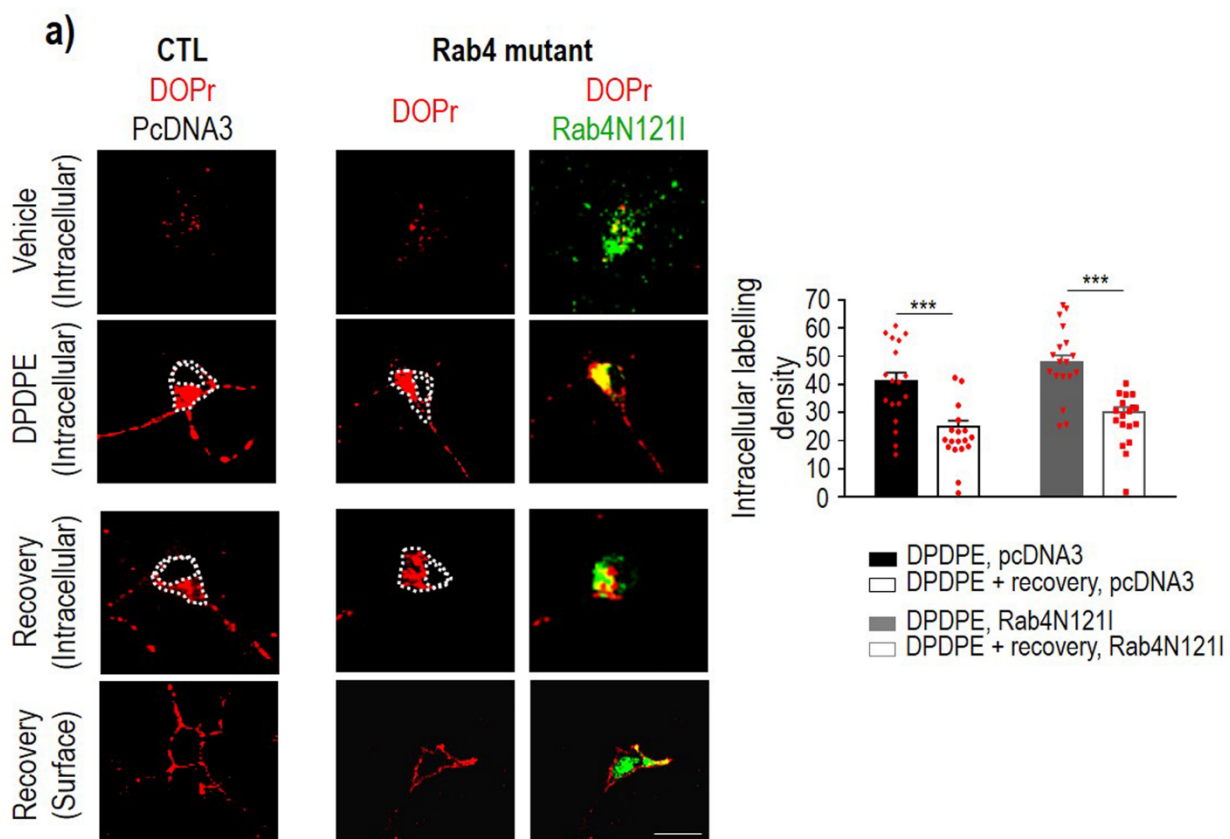


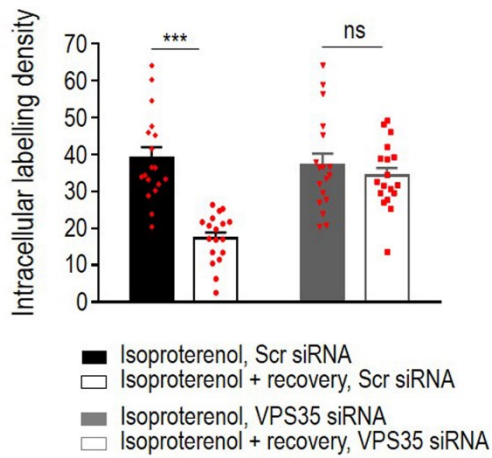
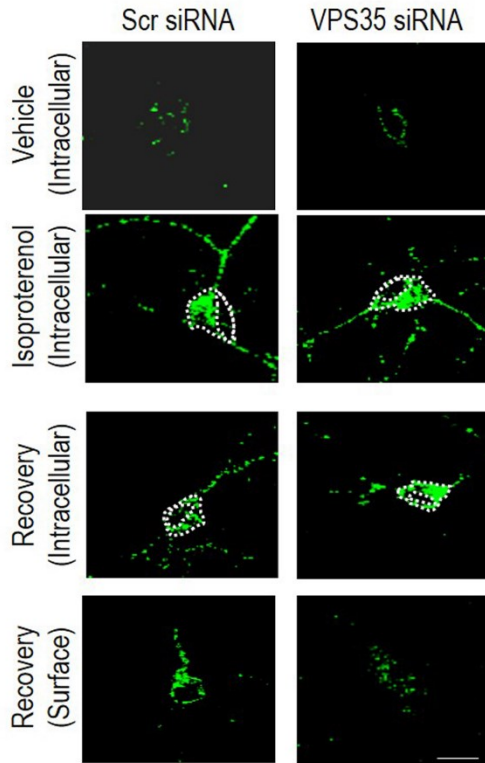
Figure 8



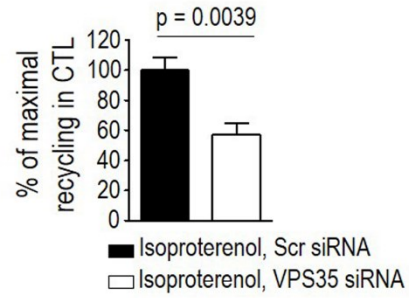
Supplementary figure 1



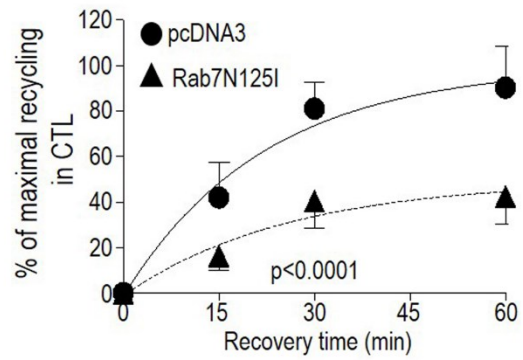
a)



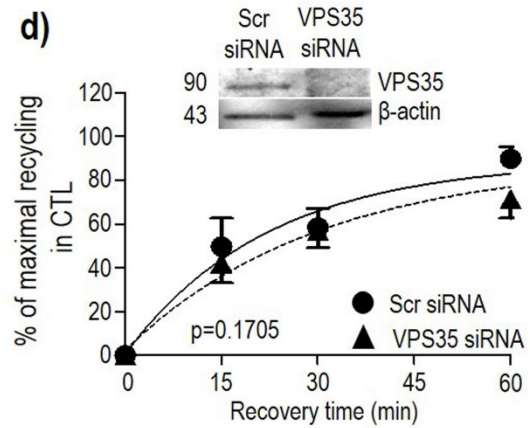
b)



c)

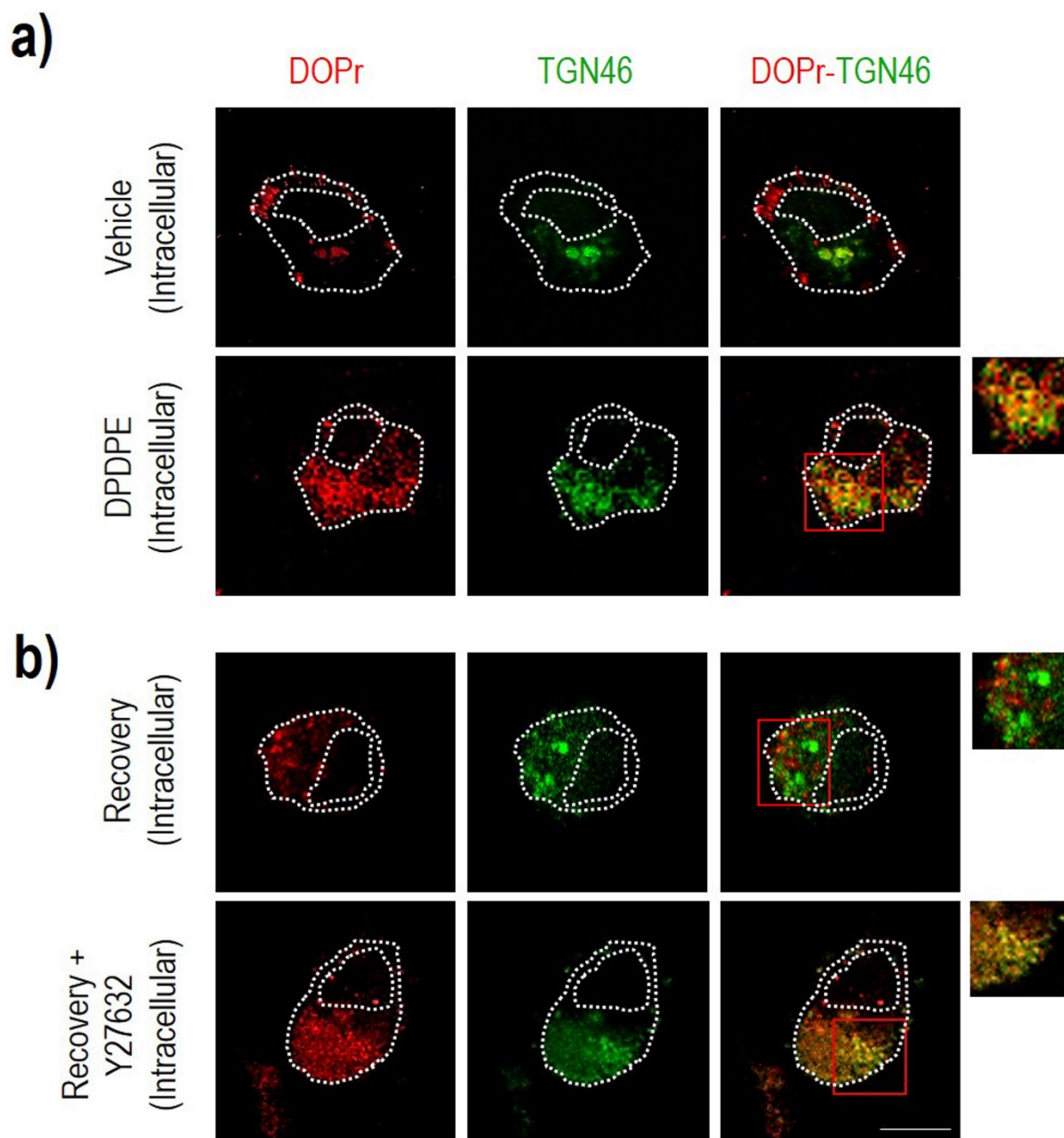


d)

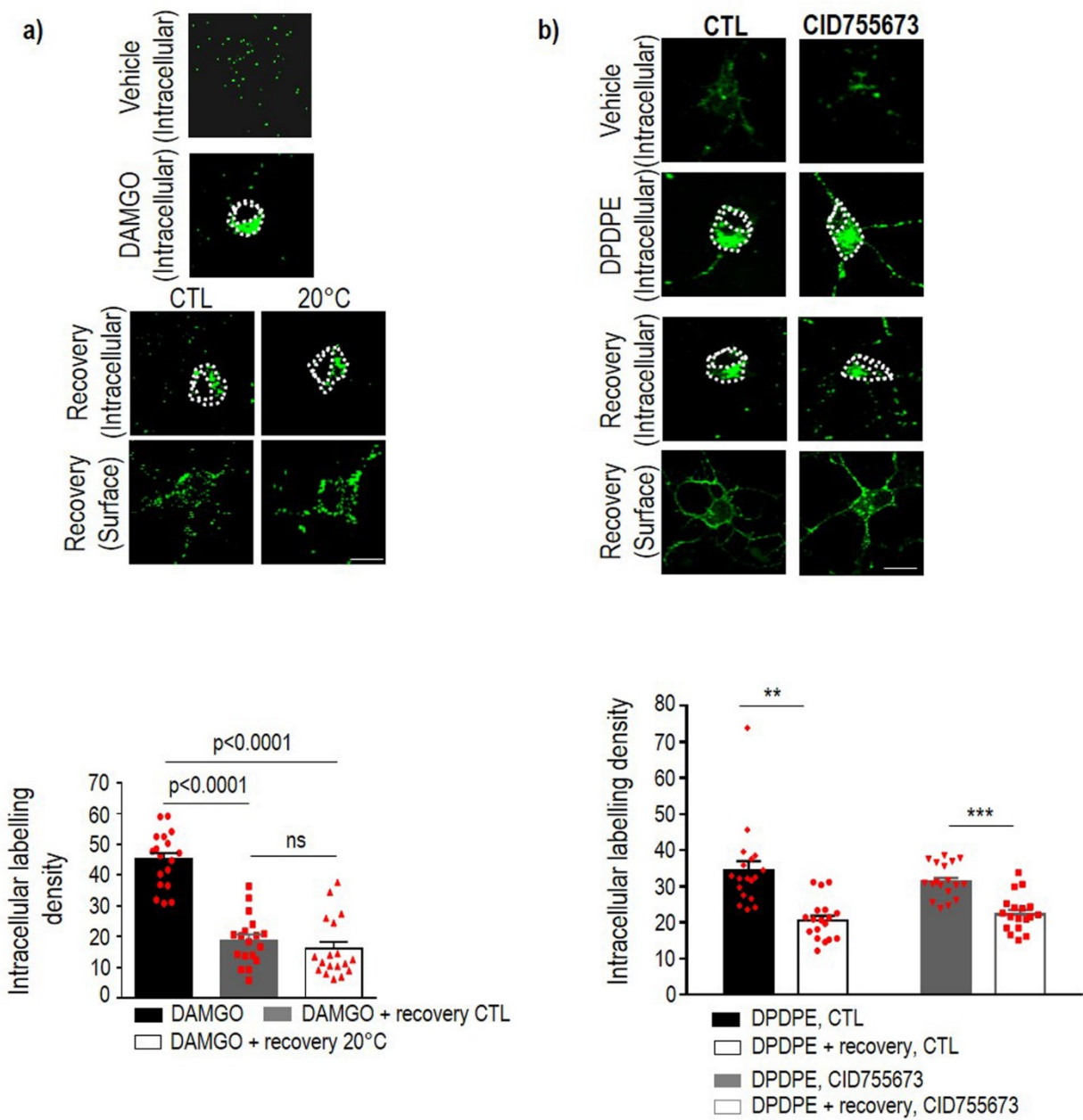


Supplementary figure 2

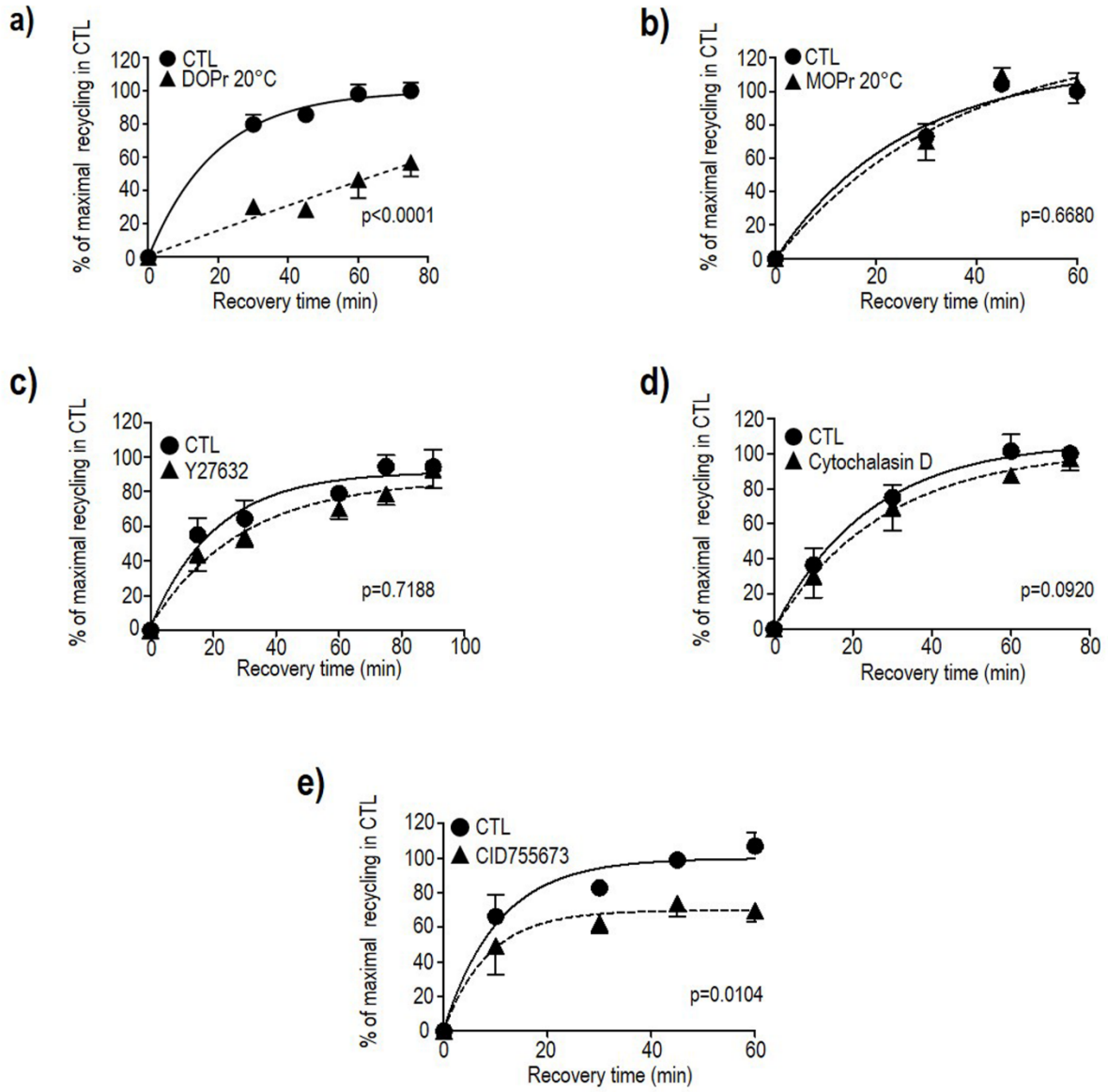




Supplementary figure 3



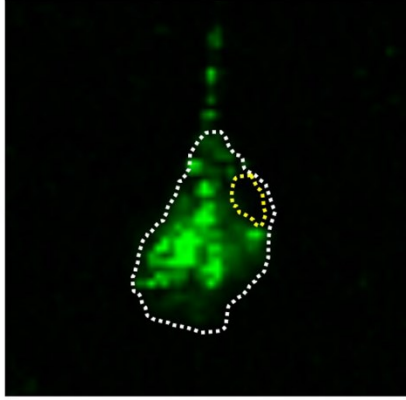
Supplementary figure 4



Supplementary figure 5

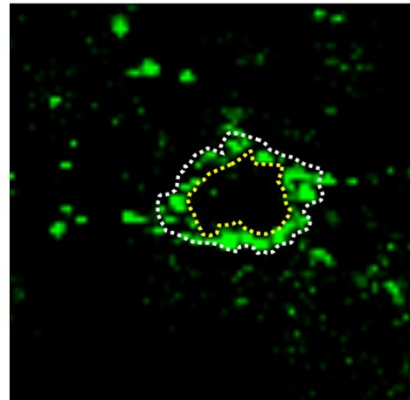
a)

Definition of region of interest for  
quantification of intracellular  
labelling



b)

Definition of region of interest for  
quantification of surface labelling



Supplementary figure 6

**Supplementary Table1: Quantification of fluorescence density at the membrane after recovery (arbitrary units)**

			Membrane intensity after recovery				
			Control		Intervention		
	Receptor	Intervention	Mean	SEM	Mean	SEM	p value (n=18)
<b>Figure 2</b>	(DOPr)	Rab7N125I	31.69	2.26	14.33	1.43	1.03.10 <sup>-8</sup>
	(DOPr)	VPS35 siRNA	23.80	2.85	25.38	1.92	0.6490
<b>Figure 3</b>	(DOPr)	RAB9 siRNA	27.00	0.95	14.80	0.80	3.39.10 <sup>-8</sup>
	(DOPr)	TIP47 siRNA	24.38	2.13	8.94	0.63	9.57.10 <sup>-7</sup>
	(DOPr)	ALIX siRNA	23.73	3.81	12.09	2.95	0.0216
<b>Figure 5</b>	(DOPr)	20°C	27.43	2.60	7.95	1.34	5.3.10 <sup>-7</sup>
	(DOPr)	ARF1-T31N	22.71	2.65	13.29	1.82	0.0064
<b>Figure 6</b>	(DOPr)	Cytochalasin D	29.97	2.72	15.43	2.30	0.0002
	(DOPr)	Y-27632	28.46	3.68	3.96	0.60	3.63.10 <sup>-7</sup>
<b>Supp. Figure 1</b>	(DOPr)	Rab4N121I	33.81	2.42	31.71	2.08	0.5150
<b>Supp. Figure 2</b>	(β2ARs)	VPS35 siRNA	25.11	2.93	11.74	2.86	0.0025
<b>Supp. Figure 4</b>	(MOPr)	20°C	21.69	2.21	20.62	2.18	0.7310
	(DOPr)	CID755673	18.46	1.56	19.29	1.01	0.3210

## 4 Discussion

Nos travaux ont démontré que les propriétés d'internalisation du DOPr dépendent des ligands et de l'environnement biologique dans lequel ils sont exprimés et qu'il existe un biais mesurable pour la modulation de l'AMPC versus internalisation pour certains agonistes du DOPr. Aussi, nous avons établi que le recyclage du DOPr à partir des compartiments liés à la dégradation le protège contre la survenue de tolérance analgésique. Ces informations fournissent des éléments pertinents pour le processus de criblage de nouveaux opioïdes ayant une activité analgésique durable.

### 4.1 Mise en évidence du biais des ligands dans les réponses médiées par le récepteur opioïde delta

Plusieurs agonistes du MOPr et du DOPr présentent un «déséquilibre» dans leur capacité à engager les voies de signalisation et de régulation [480,319,481]. La détection du biais a souvent été établie en comparant l'efficacité de différents ligands à travers au moins deux voies de signalisation ou de régulation en utilisant une seule concentration maximale efficace. Une inversion de l'ordre d'efficacité des ligands entre les voies étudiées indiquait que le récepteur stabilisait différentes conformations, vu qu'une seule conformation active du récepteur ne peut pas représenter cette inversion [343]. Cependant, bien qu'étant assez spécifique, cette façon d'identifier les agonistes biaisés peut ne pas être suffisamment sensible. Par exemple, si le biais est donné par une inversion dans l'ordre des puissances, une sous-estimation du biais a lieu quand on prend en considération uniquement les valeurs de l'efficacité maximale. Idéalement, il faudra inclure simultanément les paramètres de position et les réponses maximales. En outre, la méthode devrait permettre une quantification significative du biais indépendamment des facteurs de confusion du système et du test. Kenakin et Christopoulos ont utilisé le modèle opérationnel de Black et Leff (1983) pour mettre au point un outil analytique répondant à toutes ces exigences [326,482,327]. Nous avons alors utilisé ce modèle en prenant en compte que l'affinité du ligand pour le récepteur peut être influencée par son (ses) partenaire (s) de signalisation. En conséquence, les valeurs de "l'affinité fonctionnelle" ou  $K_A$  ont été calculées à partir des courbes dose-réponse pour chacune des réponses étudiées traduisant l'affinité de l'agoniste pour lier la (les) conformation (s) du récepteur responsable (s) de chaque réponse.

Nous avons trouvé que les ligands DPDPE, SNC-80, UFP-512 et TIPP reconnaissent mieux la (les) conformation (s) du récepteur responsable (s) de la modulation de la voie cyclase que celle (s) associée(s) à l'internalisation, en comparant les valeurs de KA entre les deux réponses pour tous ces ligands. Ceci souligne l'intérêt de mesure de cette affinité pour chacune des réponses étudiées. Le biais a été mis en évidence en comparant les coefficients de transduction ( $\log \tau/KA$ ) normalisés au standard DPDPE pour chacune des voies examinées. Le modèle opérationnel a également été utilisé pour démontrer que l'endomorphine 2 (ligand du MOPr) démontre un biais significatif pour l'activation de la protéine G par rapport au recrutement de la  $\beta$ arr2. Cependant, dans cette étude, les auteurs ont employé la méthode proposée par Rajagopal et collaborateurs [483] qui utilise le modèle opérationnel avec une valeur d'affinité fixe obtenue des essais de liaison et supposée être la même pour toutes les réponses. En conséquence, la comparaison repose uniquement sur les différences d'efficacité ( $\tau$ ) pour mesurer le biais. Nous avons alors fait l'exercice de fixer la même valeur de KA pour les essais d'accumulation d'AMPC et d'internalisation. Seules les données de la voie cyclase pouvaient être raisonnablement ajustées par ce modèle confirmant qu'une seule affinité ne représente pas adéquatement les réponses médiées par le DOPr et que certains aspects de la diversité des ligands sont mieux représentés en permettant au récepteur d'avoir des affinités fonctionnelles distinctes pour différentes réponses.

Nous avons également comparé les valeurs d'Emax (effet maximal) pour les différents ligands de l'étude dans les deux voies et cette comparaison n'a révélé aucune disproportion entre l'internalisation maximale et l'inhibition de l'AMPC induite par le DPDPE ou le SNC-80, mais l'inhibition relative de la cyclase par l'UFP-512 était beaucoup plus élevée que sa réponse d'internalisation. À partir de ces données, aucun biais n'est prévu pour le DPDPE ou le SNC-80, mais les différences d'Emax pour les réponses médiées par l'UFP-512 sont interprétées comme une inhibition préférentielle de la cyclase par rapport à l'internalisation.

En revanche, l'estimation du biais à partir des coefficients de transduction indique que l'UFP-512 et le SNC-80 sont capables d'engager préférentiellement la voie d'AMPC par rapport à l'internalisation. Le biais de l'UFP-512 est principalement déterminé par une faible efficacité d'internalisation et une affinité fonctionnelle élevée pour l'inhibition de la cyclase. Le biais du SNC-80 est associé à sa faible affinité pour la (les) conformation(s) du récepteur produisant son internalisation, une propriété qui aurait été négligée en ne comparant que les réponses

maximales. La mise en évidence d'un biais pour certains ligands confirme encore une fois que le DOPr peut adopter différentes conformations actives qui diffèrent dans leurs propriétés de signalisation et de régulation. Ceci est en accord avec les études précédentes démontrant de la sélectivité fonctionnelle pour les ligands du DOPr [85,269,215]. Le fait que l'UFP-512 est plus efficace pour inhiber la production d'AMPc que d'induire l'internalisation confirme les observations relatives aux agonistes partiels du MOPr qui ont démontré un biais de signalisation par rapport à l'internalisation [341,484]. Des études *in vivo* ont démontré que le SNC-80 présente un biais pour l'internalisation (cinétique en temps réel par microscopie confocale) par rapport à la signalisation (mesurée par l'étude de l'activation de la protéine G), ce qui explique son potentiel à engendrer de la tolérance analgésique [348]. Ceci est en contradiction avec les résultats de notre étude. Toutefois, les différences entre les deux études dans les voies de signalisation étudiées, le standard utilisé, les méthodes de quantification de l'internalisation et du biais et l'environnement cellulaire, peuvent expliquer cette divergence. Notre étude a également souligné que le SNC-80 produit un biais pour la signalisation par rapport à l'internalisation en le comparant au DPDPE, et pourtant il produit plus de tolérance que ce dernier. La notion de la prévention de la survenue de la tolérance en optant pour les ligands favorisant la signalisation par rapport à l'internalisation est alors à interpréter avec précaution, vu qu'elle ne constitue pas un critère absolu prédictif de cet effet secondaire. Une considération de toutes les caractéristiques engendrées par la drogue (signalisation qui donne l'analgésie, internalisation, trafic post-endocytaire) et une prise en compte du contexte cellulaire (neurones versus systèmes hétérologues) définiraient la façon optimale pour estimer le potentiel de l'opioïde à induire la tolérance.

## **4.2 Les propriétés d'internalisation du récepteur opioïde delta dépendent de l'environnement biologique dans lequel ils sont exprimés**

La nature du système biologique étudié affecte non seulement le biais (comme mentionné dans la section précédente), mais également les mécanismes d'internalisation du DOPr stimulé par différents ligands. Nous avons comparé l'internalisation du DOPr stimulé par les cinq ligands de l'étude dans les cellules HEK293 et les neurones, de point de vue magnitude et mécanismes moléculaires sous-jacents. Nous avons trouvé qu'au niveau des cellules HEK293,



la morphine n'induit pas de séquestration significative du récepteur alors que l'internalisation par UFP-512 et TIPP était significative, mais atteignait seulement ~ 10% de la réponse induite par DPDPE. Au niveau des neurones, nous avons trouvé que la magnitude d'internalisation par DPDPE et SNC-80 était similaire, et significativement plus élevée que les réponses induites par UFP-512, morphine et TIPP, dont les amplitudes respectives étaient de  $62 \pm 4$ ,  $49 \pm 3$  et  $47 \pm 3\%$  de l'effet du DPDPE. Ainsi, la différence d'internalisation entre les agonistes complets (DPDPE et SNC-80) et partiels (UFP-512, morphine et TIPP) devient moins prononcée dans les neurones. Ceci peut s'expliquer par le fait que le couplage stimulus-réponse est plus efficace dans les neurones que dans les cellules HEK293. D'un point de vue mécanistique, nous avons trouvé que la  $\beta$ arr contribue à l'internalisation des DOPr dans les cellules HEK293 et les neurones alors que la GRK2 et la PKC n'interviennent que dans les neurones. Ces observations concordent avec les études antérieures démontrant l'implication de la  $\beta$ arr, la GRK2 et la PKC dans la régulation de l'activité du DOPr dans d'autres systèmes biologiques [485,264,316]. La différence des mécanismes d'internalisation entre les deux systèmes biologiques confirme que les protéines régulatrices qui contrôlent l'internalisation des ROs ne sont pas les mêmes pour les différents types de cellules. En effet, il a été déjà démontré que l'expression de ces protéines peut varier entre différents types de cellules [342,486]. Cette variation pourrait influencer non seulement l'efficacité du couplage réponse-stimulus (magnitude d'internalisation), mais aussi la nature des molécules de signalisation avec lesquelles le récepteur interagit pour produire l'internalisation.

Le défaut d'implication de la GRK2 dans l'internalisation du DOPr au niveau des cellules HEK293 est en accord avec les travaux de l'équipe de Zhang, qui a démontré que le DOPr peut internaliser dans les cellules HEK293 sans faire intervenir la GRK2 [248]. Ceci peut être expliqué par l'absence ou la non-disponibilité des déterminants clés de sa participation à l'internalisation dans ce contexte cellulaire. La même étude a démontré que cette internalisation indépendante de la GRK2 fait toujours intervenir la  $\beta$ arr, résultat cohérent avec nos travaux. Aussi, l'équipe de Traynor a démontré qu'au niveau des cellules HEK293, une voie alternative indépendante de la protéine G et de la GRK2 existe pour médier la phosphorylation et l'internalisation du DOPr [250]. Cette voie impliquerait probablement la GRK5 ou GRK6 qui sont exprimées dans les cellules HEK293 et qui ne sont pas recrutées par les protéines G $\beta\gamma$  [487].

Vu que la base moléculaire du biais est donnée par la capacité différentielle des ligands d'interagir avec le récepteur lorsque celui-ci est associé à différents partenaires de signalisation [327], une divergence de ces partenaires entre les cellules HEK293 et les neurones soulève la question si un tel biais serait maintenu à travers les différents systèmes biologiques ou même dans différentes populations neuronales exprimant les ROs. Le contexte cellulaire constitue donc une source de variation qui ne peut pas être simplement contrôlée par l'utilisation du modèle opérationnel. Il devrait être pris en considération si le biais de ligands est utilisé pour la conception rationnelle de nouveaux agents thérapeutiques.

### **4.3 Estimation de la sélectivité fonctionnelle par l'inversement de l'ordre d'efficacité**

Le calcul des pourcentages d'internalisation neuronale qui pourrait être bloquée en inhibant la fonction de  $\beta$ arr, GRK2 et PKC pour les cinq ligands a démontré les observations suivantes : 1) la contribution de GRK2 à l'internalisation du DOPr n'était pas différente entre les ligands, 2) une plus grande proportion de l'internalisation produite par l'UFP-512 reposait sur la PKC en la comparant à celle induite par la morphine, 3) les ligands étaient également différents dans leur capacité à engager l'internalisation médiée par la  $\beta$ arr, l'UFP-512 étant plus efficace que DPDPE, et TIPP plus que la morphine.

L'ordre d'efficacité des ligands à engager ces différentes réponses a été comparé entre elles-mêmes et aussi aux valeurs d' $E_{max}$  obtenues dans les réponses d'accumulation d'AMPc. Une inversion significative dans l'ordre de classement n'a été observée que pour la réponse cyclase dans les cellules HEK293 par rapport à la capacité du ligand à engager l'internalisation dépendante de la  $\beta$ arr dans les neurones pour le DPDPE et l'UFP-512 ainsi que pour la morphine et la TIPP. Ces données sont cohérentes avec la notion que l'inhibition de l'AMPc dans les cellules HEK293 et l'internalisation médiée par la  $\beta$ arr dans les neurones sont médiées par des conformations distinctes du récepteur, bien qu'il soit plus adéquat de comparer les efficacités dans le même contexte cellulaire et de prendre en compte l'intensité du couplage stimulus-réponse. Aussi, malgré le fait que l'inversion de l'ordre d'efficacité des ligands entre les réponses ne fournit pas une estimation quantitative du biais, elle fournit au moins une idée préliminaire sur la sélectivité fonctionnelle des ligands du DOPr.

La GRK2 est recrutée à proximité du récepteur occupé par le ligand et activé. Elle pourra alors discriminer entre les différentes conformations du récepteur induites par les différents ligands. L'intervention de cette kinase dans l'internalisation neuronale du DOPr était pareille pour tous les ligands. On peut dans ce cas spéculer que les conformations du récepteur stabilisées par ces ligands choisis seraient similaires.

#### **4.4 Le récepteur opioïde delta suit la voie de recyclage suite à son internalisation aussi bien au niveau des cellules HEK293 que les neurones.**

Suite à la discussion des résultats du premier article, nous pouvons affirmer que la notion du biais des ligands pour la signalisation par rapport à l'internalisation ne peut pas expliquer à elle seule les bases de la tolérance analgésique et qu'il faudra tenir en compte entre autres des caractéristiques du trafic post-endocytique du récepteur. En effet, comme déjà expliquées, les réponses analgésiques dépendent de la capacité du ligand à soutenir le recyclage du DOPr [85,488]. Malgré l'existence de rapports cohérents indiquant que les DOPr sont triés vers la voie de dégradation [366,348,370], nous, avec d'autres, avons démontré que ces récepteurs sont également connus pour regagner la membrane plasmique [85,373]. Pour confirmer cette observation, nous avons évalué le trafic post-endocytique du DOPr au niveau des cellules HEK293 par la technique ELISA et au niveau des cultures primaires de neurones par immunofluorescence. Dans les deux systèmes biologiques, le DOPr stimulé par le DPDPE se dirige vers la membrane plasmique suite à son internalisation. La capacité de la drogue à induire le recyclage du récepteur dépend du ligand lui-même et ne constitue pas une propriété fixe du récepteur, comme cela a été longtemps considéré. La liaison de différents ligands va engendrer des changements conformationnels distincts au niveau du récepteur, qui permettront l'interaction avec différents partenaires de triage, dictant ou non son recyclage. L'équipe de Zhang a démontré qu'au niveau des cellules HEK293, l'internalisation indépendante de la GRK2 du DOPr induite par le DPDPE est suivie de sa dégradation [316]. Ceci contredit les résultats de notre étude, vu que le DOPr, internalisant de façon indépendante de la GRK2 au niveau des cellules HEK293, réussit à regagner la membrane plasmique suite à son internalisation par le DPDPE. Toutefois, les tests utilisés pour mesurer l'internalisation et le

recyclage du DOPr n'étaient pas les mêmes pour les deux études. Aussi, il est à noter que l'équipe de Zhang a utilisé le DOPr muté au niveau des trois sites que la GRK2 reconnaît pour le phosphoryler, ce qui pourrait expliquer la différence avec nos travaux. Ces sites de phosphorylation pourraient être essentiels au recyclage du récepteur, indépendamment de l'action de la GRK2.

#### **4.5 Le recyclage du récepteur opioïde delta des endosomes tardifs vers la membrane plasmique repose sur la protéine X interagissant avec le gène 2 lié à l'apoptose (ALIX) et le complexe Rab9/protéine interagissant avec la queue de 47kD (TIP47)**

Pour les RCPG, il est traditionnellement établi que, suite à leur internalisation, des partenaires de triage interviennent au niveau des endosomes précoces pour engager le récepteur soit vers la voie de dégradation ou celle de recyclage. Ici, nous avons démontré que cette étape de triage se déroule un peu plus loin des compartiments précoces et plus exactement au niveau des endosomes tardifs associés à la dégradation. Les endosomes tardifs fonctionnent comme une station de triage pour les M6PR et pour la furine (une endopeptidase qui active certaines protéines suite à leur synthèse), mais ce compartiment n'avait pas été précédemment associé au recyclage membranaire des RCPG à la surface des cellules. Notre étude est alors la première à démontrer qu'au niveau des endosomes tardifs, le DOPr est soumis à un processus actif de sélection l'acheminant vers la voie de recyclage. En effet, ni le Rab4 ni le rétromère, liés à la récupération du cargo à travers le réseau tubulaire avant le tri vers les VI [402,489], n'ont participé au recyclage du DOPr. Il a été démontré que le cargo qui n'est pas recyclé à travers le réseau tubulaire est progressivement trié vers la dégradation [490], un mécanisme qui a été établi pour le DOPr [378]. Notre étude a prouvé que le DOPr peut échapper à ce mécanisme en faisant intervenir plusieurs acteurs.

Premièrement, le récepteur progresse des endosomes précoces vers les tardifs avant de se diriger vers la membrane plasmique et cela se fait sous l'action de Rab7. En effet, il a été établi que le Rab7 intervient dans l'envoi du cargo des endosomes précoces vers les tardifs [423].

En d'autres termes, l'envoi du récepteur vers les endosomes tardifs ne résulte pas en sa dégradation, mais plutôt constitue une étape de triage du récepteur vers la voie de recyclage, vu que l'inhibition du Rab7 a réduit le recyclage de façon significative.

Deuxièmement, ce recyclage nécessitait l'action du complexe Rab9/TIP47, connu pour médier la récupération du M6PR à partir des endosomes tardifs vers le TGN avant que les endosomes tardifs ne fusionnent avec les lysosomes [491]. Comme le Rab9 est responsable, au moins en partie, du recrutement du TIP47 vers l'endosome [439], ceci peut expliquer comment l'inactivation de l'une ou l'autre protéine peut interférer fonctionnellement avec le recyclage du DOPr à partir des endosomes tardifs. Récemment il a été démontré que le Rab9 interagit avec le récepteur  $\alpha$ 1-adrénérique [436,435] et probablement le récepteur LGR5 (de l'anglais Leucine-Rich G protein-coupled receptor-5) [437]. Ces observations démontrent l'implication récente du Rab9 dans le monde des RCPG. Les séquences impliquées dans l'interaction directe entre le M6PR et le TIP47 ne sont pas conservées dans notre récepteur d'étude [492]. Cependant, l'interaction directe DOPr/TIP47 par d'autres résidus ne peut pas être exclue.

Troisièmement, le recyclage du DOPr a été inhibé en interférant avec l'expression d'ALIX, suggérant que le récepteur peut compter sur la rétrofusion des VI avec la membrane limitante des endosomes tardifs pour son recyclage vers la membrane plasmique (une des fonctions d'ALIX). Plusieurs études ont démontré que les DOPrs qui arrivent aux endosomes tardifs se trouvent pour la plupart dans des VI [366,378]. L'intervention d'ALIX dans le recyclage du DOPr contredit le rôle de cette protéine dans le tri des récepteurs PAR1 et P2Y1 dans les VI et leur envoi vers la dégradation [452,453]. Ceci s'explique par le fait qu'ALIX, outre le processus de rétrofusion, assure le triage du cargo dans les VI, c'est-à-dire de la membrane limitante des endosomes tardifs vers la lumière et plus précisément au niveau des VI, pour une fusion ultérieure avec les lysosomes et sa dégradation subséquente. Le mécanisme de rétrofusion est utilisé par certains lipides et différents agents pathogènes qui ont besoin d'être exportés à partir des endosomes vers des destinations autres que les lysosomes comme la membrane plasmique, le TGN ou les exosomes [493,449]. Nous pouvons alors spéculer que le DOPr, une fois au niveau de la membrane limitante grâce à ALIX, sera disponible au complexe Rab9/TIP47, qui assurera sa translocation vers le TGN. En effet, il est connu que le DOPr interagit avec GASP, et que cette machinerie le retient efficacement dans la membrane limitant les endosomes empêchant son trafic vers la voie de recyclage. Nous pouvons alors prédire que cela permettrait

au récepteur de résider au niveau de la membrane endosomale pendant une période de temps assez prolongée pour subir l'action du complexe Rab9/TIP47 et c'est comme ça que le DOPr, soumis à l'action de GASP, pourrait échapper de la dégradation. Le mécanisme par lequel la protéine cytoplasmique ALIX, sans accès à la lumière endosomale, peut favoriser la fusion des VI avec la membrane limitante endosomale reste à clarifier. Une possibilité est qu'en se liant au LBPA et à certaines composantes d'ESCRT au niveau cytoplasmique, ALIX peut réorganiser la composition de la portion luminale de la bicouche endosomale, augmentant ainsi la probabilité d'ancrage des VI [494]. Une autre possibilité, pas nécessairement exclusive, réside dans le fait qu'ALIX pourrait détourner les DOPrs dans un compartiment qui les protège de la dégradation d'où ils peuvent être récupérés par le complexe Rab9/ TIP47 et recycler vers la membrane plasmique. La possibilité qu'ALIX prévienne la dégradation du DOPr s'est renforcée par des observations récentes indiquant qu'ALIX redirige les EGFR non ubiquitinés, stimulés par le stress, hors du chemin de dégradation canonique [495]. Les EGFR incapables de lier l'ubiquitine et activés par le ligand ont été triés de manière similaire en dehors de la dégradation, suggérant que l'absence d'ubiquitination pourrait servir comme un signal reconnu par ALIX [495]. Le DOPr partage un point commun avec l'EGFR activé par le stress dans le sens qu'il peut être trié vers les VI sans ubiquitination [366].

#### **4.6 Le récepteur opioïde delta regagne la membrane plasmique à partir du réseau trans-Golgi**

Ayant établi que le recyclage du DOPr repose sur un mécanisme qui le récupère des endosomes tardifs vers le TGN, nous avons alors voulu confirmer directement cette observation et voir si les DOPrs atteignent la membrane plasmique à partir de ce compartiment.

Le recyclage à partir du TGN a été démontré pour plusieurs RCPG y compris le récepteur de type 2A de la somatostatine et le récepteur à la chimiokine CCR5 [400]. Nos observations indiquent qu'au niveau des neurones, la polymérisation de l'actine et l'activité de ROCK-II (indispensables pour la formation des transporteurs de cargo et leur fission au niveau du TGN) étaient nécessaires pour que les DOPrs recyclent vers la membrane plasmique confirmant que le DOPr regagne cette membrane à partir du TGN. Ces observations sont en accord avec les données relatives au transport du DOPr, nouvellement synthétisé, du TGN vers la membrane

plasmique en faisant intervenir la cascade ROCK-II/LIMK1/cofiline qui régule localement l'assemblage d'un ensemble spécialisé de filaments d'actine [63]. Vu que la fonctionnalité du DOPr est positivement corrélée avec le taux de récepteurs recyclés à la membrane plasmique à partir du TGN, cette même équipe a démontré que la voie ROCK-II/LIMK1/cofiline régule la signalisation du récepteur dans les neurones des DRG [63]. Ceci suggère que les mécanismes d'envoi du DOPr vers la membrane plasmique à partir du TGN sont similaires pour les récepteurs internalisés et néo-synthétisés.

ALIX et le complexe Rab9/TIP47 sont essentiels pour le recyclage du DOPr à la fois dans les cellules HEK293 et les neurones, indiquant un mécanisme de récupération conservé à partir des endosomes tardifs. Cependant, le trafic du récepteur du TGN vers la membrane plasmique repose sur des mécanismes différents selon le contexte cellulaire. En effet, l'activité de la PKD était spécifiquement requise pour le recyclage du DOPr dans les cellules HEK293 et la polymérisation de l'actine ne semblait pas y jouer un rôle. Cela est en accord avec l'observation que les mécanismes de l'exportation membranaire à partir du TGN sont multiples et distincts selon le type de cellule en question et les domaines membranaires spécifiques auxquels le cargo est destiné [405]. Encore une fois, certains mécanismes du trafic du DOPr dépendaient du contexte cellulaire. Ceci souligne l'importance de la prise en compte d'une telle divergence lors du développement rationnel de nouvelles drogues.

#### **4.7 L'itinéraire post-endocytaire établi pour le récepteur opioïde delta le protège contre la survenue de tolérance analgésique**

Une fois la voie post-endocytaire empruntée par le DOPr définie, nous avons voulu évaluer si l'itinéraire de recyclage décrit était pertinent pour les réponses analgésiques au DPDPE *in vivo*. Les études antérieures ont établi que la capacité du ligand à supporter le recyclage du DOPr était corrélée avec un effet analgésique prolongé. Mais à notre connaissance, aucune étude n'a établi le lien entre les caractéristiques de ce recyclage et la modulation de la tolérance analgésique. Nous avons alors utilisé un modèle de douleur inflammatoire chez le rat afin d'évaluer l'effet analgésique produit par le DPDPE dans les différentes conditions de l'étude. Le modèle de douleur inflammatoire a été choisi, car plusieurs études proposent que le DOPr soit impliqué dans la modulation de ce type de douleur [47]. Nous avons démontré qu'en

plus de bloquer le recyclage, l'inhibition de l'activité de ROCK a précipité la tolérance analgésique au DPDPE. Cette observation souligne la pertinence fonctionnelle de l'itinéraire de recyclage décrit dans le maintien de la réponse analgésique aux agonistes. Ceci est en accord avec un rapport récent décrivant le ROCK comme modulateur de l'activité soutenue du canal  $Ca_v2$  activé par le DOPr dans les neurones des DRG [63], ce qui nous ramène à conclure que l'envoi du DOPr à la membrane cellulaire à partir du TGN régule la durée de l'effet analgésique.

Ces propriétés sont à prendre en compte pour le criblage et le développement rationnel de nouveaux ligands opioïdes ayant une activité analgésique prolongée.



## 5 Perspectives et directions futures

Les résultats de notre étude nous amènent à conclure que la tolérance à l'analgésie est un phénomène complexe, qui peut être modulé par des événements ultérieurs à son activation tels que l'endocytose, le recyclage et/ou la dégradation. Les études qui ont clarifié les mécanismes moléculaires à la base du triage du RO vers une voie spécifique et pas une autre ne sont pas nombreuses. Notre laboratoire a démontré que la stabilité différentielle de l'association DOPr-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2 prédit le schéma de recyclage spécifique au ligand et module la survenue de la tolérance analgésique [85]. À la lumière de ces résultats, nous pouvons spéculer que la déstabilisation du complexe DOPr-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2 pourrait augmenter le recyclage du DOPr et prévenir de ce fait la tolérance analgésique. Nous avons alors pensé à déstabiliser le complexe en ciblant l'interaction G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2. L'interaction  $\beta$ arr2-G $\beta$  $\gamma$  a été ciblée afin de ne pas perturber l'interaction DOPr- $\beta$ arr2, ce qui pourra affecter l'internalisation du récepteur et par la suite rendre l'étude de recyclage difficile à réaliser vu que le recyclage est évalué en fonction de la quantité de récepteurs internalisés. Nous avons utilisé le mini-gène correspondant à la séquence de la  $\beta$ arr2 qui interagit avec la protéine G $\beta$  $\gamma$ , une procédure communément utilisée pour l'étude des fonctions de la  $\beta$ arr. De cette façon, la déstabilisation de l'interaction  $\beta$ arr2-G $\beta$  $\gamma$  a augmenté le recyclage du DOPr stimulé par l'agoniste DADLE, mais pas par la deltorphine. Le DADLE a été choisi comme ligand de l'étude vu que à notre connaissance, c'était le seul peptide qui ne produisait pas de recyclage du DOPr donc il était d'intérêt de creuser dans les mécanismes à la base de ce défaut de recyclage. La deltorphine a été utilisée vu qu'il y a eu des études confirmant le rôle de la convertase ECE2 dans le trafic post-endocytique du DOPr stimulé par cette drogue (un autre mécanisme de triage qui sera étudié, voir plus bas). Ceci aidera à la compréhension des mécanismes de triage spécifiques au ligand. Par la suite, nous avons effectué les mêmes expériences avec le DOPr tronqué au niveau C-terminal. Cette structure manque plusieurs sites de liaison avec la  $\beta$ arr2, donc le complexe sera déstabilisé cette fois du côté de l'interaction DOPr- $\beta$ arr2. Encore une fois, le recyclage du DOPr a été augmenté pour le DADLE, mais pas pour la deltorphine. On pourra alors en conclure que la nature de l'association au sein du complexe DOPr- $\beta$ arr2-G $\beta$  $\gamma$  détermine le profil de recyclage du récepteur de façon dépendante de l'agoniste. Il sera maintenant adéquat de voir si la déstabilisation du complexe DOPr-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2 augmente le recyclage du DOPr au niveau des neurones. Une fois cet effet confirmé, il

sera intéressant d'injecter le peptide identifié par l'étude *in vivo* et de voir s'il y aura une diminution subséquente de la tolérance analgésique.

En relation avec les résultats du second article, il sera intéressant d'évaluer si l'interaction stable au sein du complexe DOPr-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2 empêchera l'action d'ALIX et celle de Rab9/TIP47, ce qui bloquera le recyclage du DOPr (figure 25). C'est une façon de mieux clarifier les mécanismes de triage et les possibles liens entre eux.

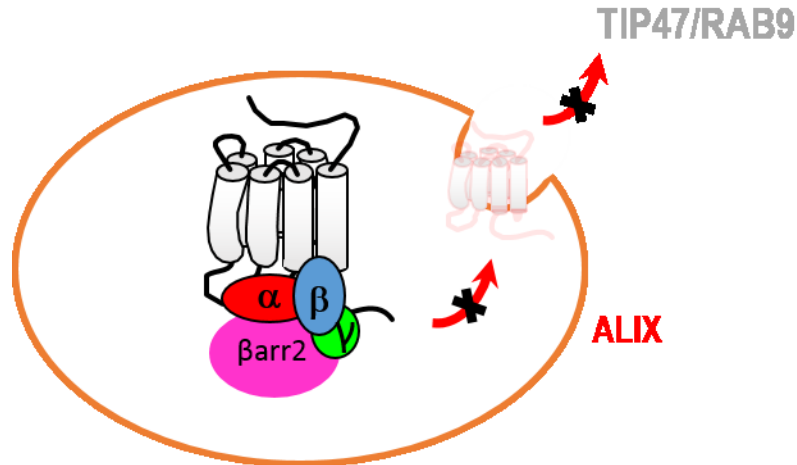


Figure 25. Représentation de l'hypothèse illustrant comment l'interaction stable au sein du complexe DOPr-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2 empêchera l'action d'ALIX et de TIP47/RAB9.

Outre la stabilité différentielle de l'association DOPr-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2, des schémas de recyclage spécifiques au ligand ont été attribués aux différences de susceptibilité aux peptidases endosomales ECE2 dans les neurones [375]. En traitant sélectivement les peptides opioïdes dans le compartiment endocytique, l'ECE2 joue un rôle dans la modulation de l'activité et la signalisation des ROs. Dans ce contexte, nous avons commencé à étudier le rôle de l'ECE2 dans le trafic post-endocytique du DOPr. Nous avons démontré que cette peptidase affecte le recyclage du DOPr stimulé par la deltorphine, mais pas par le DADLE, dans les cellules HEK293 et les neurones. L'inhibition de l'ECE2 a également précipité la tolérance analgésique à la deltorphine. Il est tentant de spéculer que certains ligands comptent sur la  $\beta$ arr pour la modulation de l'activité du récepteur alors que d'autres de nature peptidique ont besoin de l'action de l'ECE2 à cette fin. Il sera adéquat de voir si l'inhibition de l'ECE2 modulera la tolérance analgésique au DADLE et de valider ce mécanisme pour d'autres ligands afin de

confirmer cette hypothèse.

Les deux mécanismes cités ci-haut ne sont pas exclusifs pour la compréhension de la régulation différentielle du trafic post-endocytaire dépendante du ligand et la recherche d'autres partenaires de triage sera alors d'une grande utilité. Par exemple, nous pouvons penser à la voie de triage médiée par la protéine GASP, d'autant plus que le knockout de GASP a réduit la tolérance analgésique aux cannabinoïdes [372]. Il sera alors intéressant d'évaluer le rôle de GASP dans le triage du DOPr stimulé par différents ligands et comment cette intervention de GASP affectera la tolérance analgésique aux opioïdes.

## 6 Conclusions

Notre étude a démontré que pour une meilleure compréhension de la tolérance analgésique reliée aux opioïdes, une considération de tous les signaux d'activation et de régulation du récepteur stimulé par différents ligands s'impose, de même que l'utilisation de nouvelles méthodes de quantification du biais et la prise en compte du contexte cellulaire.

Il a été longtemps accepté que le DOPr soit un récepteur qui s'engage préférentiellement dans la voie de dégradation suite à son internalisation. Notre étude fournit une alternative à cette théorie affirmant que le DOPr, même s'il se trouve dans les compartiments reliés à la dégradation, est capable d'échapper à ce sort en recyclant vers la membrane plasmique via un nouveau mécanisme clairement identifié. La notion du trafic post-endocytique est importante et aide à expliquer pourquoi certains ligands, même s'ils présentent un biais de signalisation par rapport à l'internalisation, produisent toujours de la tolérance analgésique due à un défaut de recyclage du récepteur qu'ils engendrent.

Cette thèse représente alors un outil intéressant qui aiderait au développement rationnel de nouveaux opioïdes à activité analgésique durable.

## 7 Références

1. Forster C, Handwerker HO (2014) Central Nervous Processing of Itch and Pain. In: Carstens E, Akiyama T (eds) Itch: Mechanisms and Treatment. *Frontiers in Neuroscience*. Boca Raton (FL),
2. Lee JS, Pyun YD (2012) Use of hypnosis in the treatment of pain. *The Korean journal of pain* 25 (2):75-80. doi:10.3344/kjp.2012.25.2.75
3. Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413 (6852):203-210. doi:10.1038/35093019
4. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN (2017) Neuropathic pain. *Nature reviews Disease primers* 3:17002. doi:10.1038/nrdp.2017.2
5. Swieboda P, Filip R, Prystupa A, Drozd M (2013) Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM Spec no.* 1:2-7
6. Grichnik KP, Ferrante FM (1991) The difference between acute and chronic pain. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 58 (3):217-220
7. Choiniere M, Dion D, Peng P, Banner R, Barton PM, Boulanger A, Clark AJ, Gordon AS, Guerriere DN, Guertin MC, Intrater HM, Lefort SM, Lynch ME, Moulin DE, Ong-Lam M, Racine M, Rashedi S, Shir Y, Taenzer P, Ware M (2010) The Canadian STOP-PAIN project - Part 1: Who are the patients on the waitlists of multidisciplinary pain treatment facilities? *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie* 57 (6):539-548. doi:10.1007/s12630-010-9305-5
8. Schopflocher D, Taenzer P, Jovey R (2011) The prevalence of chronic pain in Canada. *Pain Res Manag* 16 (6):445-450
9. Hadjistavropoulos T, Marchildon GP, Fine PG, Herr K, Palley HA, Kaasalainen S, Beland F (2009) Transforming long-term care pain management in north america: the policy-clinical interface. *Pain medicine* 10 (3):506-520. doi:10.1111/j.1526-4637.2009.00566.x
10. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology* 14 (2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(14)70251-0
11. Trescot AM, Helm S, Hansen H, Benyamin R, Glaser SE, Adlaka R, Patel S, Manchikanti L (2008) Opioids in the management of chronic non-cancer pain: an update of American Society of the Interventional Pain Physicians' (ASIPP) Guidelines. *Pain physician* 11 (2 Suppl):S5-S62
12. Gross DP, Ferrari R, Russell AS, Battie MC, Schopflocher D, Hu RW, Waddell G, Buchbinder R (2006) A population-based survey of back pain beliefs in Canada. *Spine* 31 (18):2142-2145. doi:10.1097/01.brs.0000231771.14965.e4
13. Hirsh AT, Atchison JW, Berger JJ, Waxenberg LB, Lafayette-Lucey A, Bulcourf BB, Robinson ME (2005) Patient satisfaction with treatment for chronic pain: predictors and relationship to compliance. *Clin J Pain* 21 (4):302-310
14. Serrie A (2015) [Chronic pain management: societal impact]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 199 (4-5):555-565
15. Vranken JH (2012) Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 12 (4):304-314
16. Tarride J CJ, and Choinière M (2006) The economic burden of neuropathic pain in Canada. *J Med Econ* 9:55-68

17. Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2011) Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol* 22 (5-6):405-414. doi:10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c
18. Dubin AE, Patapoutian A (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120 (11):3760-3772. doi:10.1172/JCI42843
19. Reichling DB, Green PG, Levine JD (2013) The fundamental unit of pain is the cell. *Pain* 154 Suppl 1:S2-9. doi:10.1016/j.pain.2013.05.037
20. Smith ES, Lewin GR (2009) Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of comparative physiology A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 195 (12):1089-1106. doi:10.1007/s00359-009-0482-z
21. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139 (2):267-284. doi:10.1016/j.cell.2009.09.028
22. Emery EC, Luiz AP, Sikandar S, Magnusdottir R, Dong X, Wood JN (2016) In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Science advances* 2 (11):e1600990. doi:10.1126/sciadv.1600990
23. Kim YS, Anderson M, Park K, Zheng Q, Agarwal A, Gong C, Saijilafu, Young L, He S, LaVinka PC, Zhou F, Bergles D, Hanani M, Guan Y, Spray DC, Dong X (2016) Coupled Activation of Primary Sensory Neurons Contributes to Chronic Pain. *Neuron* 91 (5):1085-1096. doi:10.1016/j.neuron.2016.07.044
24. Smith-Edwards KM, DeBerry JJ, Saloman JL, Davis BM, Woodbury CJ (2016) Profound alteration in cutaneous primary afferent activity produced by inflammatory mediators. *eLife* 5. doi:10.7554/eLife.20527
25. Li CL, Li KC, Wu D, Chen Y, Luo H, Zhao JR, Wang SS, Sun MM, Lu YJ, Zhong YQ, Hu XY, Hou R, Zhou BB, Bao L, Xiao HS, Zhang X (2016) Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell research* 26 (1):83-102. doi:10.1038/cr.2015.149
26. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lonnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggstrom J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, Ernfors P (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci* 18 (1):145-153. doi:10.1038/nn.3881
27. Chiu IM, Barrett LB, Williams EK, Strochlic DE, Lee S, Weyer AD, Lou S, Bryman GS, Roberson DP, Ghasemlou N, Piccoli C, Ahat E, Wang V, Cobos EJ, Stucky CL, Ma Q, Liberles SD, Woolf CJ (2014) Transcriptional profiling at whole population and single cell levels reveals somatosensory neuron molecular diversity. *eLife* 3. doi:10.7554/eLife.04660
28. Hockley JR, Gonzalez-Cano R, McMurray S, Tejada-Giraldez MA, McGuire C, Torres A, Wilbrey AL, Cibert-Goton V, Nieto FR, Pitcher T, Knowles CH, Baeyens JM, Wood JN, Winchester WJ, Bulmer DC, Cendan CM, McMurray G (2017) Visceral and somatic pain modalities reveal NaV 1.7-independent visceral nociceptive pathways. *The Journal of physiology* 595 (8):2661-2679. doi:10.1113/JP272837
29. da Silva Serra I, Husson Z, Bartlett JD, Smith ES (2016) Characterization of cutaneous and articular sensory neurons. *Molecular pain* 12. doi:10.1177/1744806916636387
30. Callejo G, Castellanos A, Castany M, Gual A, Luna C, Acosta MC, Gallar J, Giblin JP, Gasull X (2015) Acid-sensing ion channels detect moderate acidifications to induce ocular pain. *Pain* 156 (3):483-495. doi:10.1097/01.j.pain.0000460335.49525.17
31. Immke DC, McCleskey EW (2001) Lactate enhances the acid-sensing Na<sup>+</sup> channel on ischemia-sensing neurons. *Nat Neurosci* 4 (9):869-870. doi:10.1038/nn0901-869
32. Yan J, Wei X, Bischoff C, Edelmayer RM, Dussor G (2013) pH-evoked dural afferent signaling is mediated by ASIC3 and is sensitized by mast cell mediators. *Headache* 53 (8):1250-1261. doi:10.1111/head.12152

33. Cadwell CR, Palasantza A, Jiang X, Berens P, Deng Q, Yilmaz M, Reimer J, Shen S, Bethge M, Tolias KF, Sandberg R, Tolias AS (2016) Electrophysiological, transcriptomic and morphologic profiling of single neurons using Patch-seq. *Nature biotechnology* 34 (2):199-203. doi:10.1038/nbt.3445
34. Cadwell CR, Scala F, Li S, Livrizzi G, Shen S, Sandberg R, Jiang X, Tolias AS (2017) Multimodal profiling of single-cell morphology, electrophysiology, and gene expression using Patch-seq. *Nature protocols* 12 (12):2531-2553. doi:10.1038/nprot.2017.120
35. St John Smith E (2017) Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *Journal of neurology*. doi:10.1007/s00415-017-8641-6
36. Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature reviews Genetics* 1 (1):20-29. doi:10.1038/35049541
37. Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, Slate CA, Ehlert FJ, Roeske WR, Yamamura HI (1999) The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacological reviews* 51 (3):503-532
38. Vortherms TA, Roth BL (2005) Receptorome screening for CNS drug discovery. *IDrugs : the investigational drugs journal* 8 (6):491-496
39. Filizola M, Devi LA (2013) Grand opening of structure-guided design for novel opioids. *Trends in pharmacological sciences* 34 (1):6-12. doi:10.1016/j.tips.2012.10.002
40. Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC (2010) Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330 (6007):1066-1071. doi:10.1126/science.1194396
41. Shang Y, Filizola M (2015) Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. *European journal of pharmacology* 763 (Pt B):206-213. doi:10.1016/j.ejphar.2015.05.012
42. Fenalti G, Giguere PM, Katritch V, Huang XP, Thompson AA, Cherezov V, Roth BL, Stevens RC (2014) Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature* 506 (7487):191-196. doi:10.1038/nature12944
43. Katritch V, Fenalti G, Abola EE, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC (2014) Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Trends in biochemical sciences* 39 (5):233-244. doi:10.1016/j.tibs.2014.03.002
44. Liu W, Chun E, Thompson AA, Chubukov P, Xu F, Katritch V, Han GW, Roth CB, Heitman LH, AP II, Cherezov V, Stevens RC (2012) Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* 337 (6091):232-236. doi:10.1126/science.1219218
45. Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258 (5090):1952-1955
46. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (24):12048-12052
47. Gendron L, Cahill CM, von Zastrow M, Schiller PW, Pineyro G (2016) Molecular Pharmacology of delta-Opioid Receptors. *Pharmacological reviews* 68 (3):631-700. doi:10.1124/pr.114.008979
48. Law PY, Wong YH, Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40:389-430. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.389
49. Cahill CM, McClellan KA, Morinville A, Hoffert C, Hubatsch D, O'Donnell D, Beaudet A (2001) Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol* 440 (1):65-84
50. Cheng PY, Svingos AL, Wang H, Clarke CL, Jenab S, Beczkowska IW, Inturrisi CE, Pickel VM (1995) Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of delta-opioid receptor within both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers

of the rat cervical spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (9):5976-5988

51. Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350 (3):412-438. doi:10.1002/cne.903500307

52. Bardoni R, Tawfik VL, Wang D, Francois A, Solorzano C, Shuster SA, Choudhury P, Betelli C, Cassidy C, Smith K, de Nooij JC, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Woodbury CJ, Basbaum AI, MacDermott AB, Scherrer G (2014) Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* 81 (6):1312-1327. doi:10.1016/j.neuron.2014.01.044

53. Mennicken F, Zhang J, Hoffert C, Ahmad S, Beaudet A, O'Donnell D (2003) Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 465 (3):349-360. doi:10.1002/cne.10839

54. Pasquini F, Bochet P, Garbay-Jaureguiberry C, Roques BP, Rossier J, Beaudet A (1992) Electron microscopic localization of photoaffinity-labelled delta opioid receptors in the neostriatum of the rat. *J Comp Neurol* 326 (2):229-244. doi:10.1002/cne.903260206

55. Cahill CM, Morinville A, Lee MC, Vincent JP, Collier B, Beaudet A (2001) Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (19):7598-7607

56. Elde R, Arvidsson U, Riedl M, Vulchanova L, Lee JH, Dado R, Nakano A, Chakrabarti S, Zhang X, Loh HH, et al. (1995) Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 757:390-404

57. Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, O'Donnell D, Vincent JP, Stroh T, Beaudet A (2006) Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (3):953-962. doi:10.1523/JNEUROSCI.3598-05.2006

58. Zhang X, Bao L, Arvidsson U, Elde R, Hokfelt T (1998) Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience* 82 (4):1225-1242

59. Cahill CM, Holdridge SV, Morinville A (2007) Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends in pharmacological sciences* 28 (1):23-31. doi:10.1016/j.tips.2006.11.003

60. Guan JS, Xu ZZ, Gao H, He SQ, Ma GQ, Sun T, Wang LH, Zhang ZN, Lena I, Kitchen I, Elde R, Zimmer A, He C, Pei G, Bao L, Zhang X (2005) Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell* 122 (4):619-631. doi:10.1016/j.cell.2005.06.010

61. Zhang Z, Pan ZZ (2010) Synaptic mechanism for functional synergism between delta- and mu-opioid receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (13):4735-4745. doi:10.1523/JNEUROSCI.5968-09.2010

62. Zhao B, Wang HB, Lu YJ, Hu JW, Bao L, Zhang X (2011) Transport of receptors, receptor signaling complexes and ion channels via neuropeptide-secretory vesicles. *Cell research* 21 (5):741-753. doi:10.1038/cr.2011.29

63. Mittal N, Roberts K, Pal K, Bentolila LA, Fultz E, Minasyan A, Cahill C, Pradhan A, Conner D, DeFea K, Evans C, Walwyn W (2013) Select G-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and beta-arrestin 1 pathway. *Cell Rep* 5 (4):1010-1021. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.015



64. Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137 (6):1148-1159. doi:10.1016/j.cell.2009.04.019
65. Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Laustriat D, Cao YQ, Basbaum AI, Dierich A, Vonesh JL, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2006) Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (25):9691-9696. doi:10.1073/pnas.0603359103
66. Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001) Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol* 85 (4):1561-1574. doi:10.1152/jn.2001.85.4.1561
67. Aronson DE, Costantini LM, Snapp EL (2011) Superfolder GFP is fluorescent in oxidizing environments when targeted via the Sec translocon. *Traffic* 12 (5):543-548. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01168.x
68. Wang HB, Guan JS, Bao L, Zhang X (2008) Distinct subcellular distribution of delta-opioid receptor fused with various tags in PC12 cells. *Neurochem Res* 33 (10):2028-2034. doi:10.1007/s11064-008-9678-9
69. Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus LH, Xia Y (2012) Current research on opioid receptor function. *Current drug targets* 13 (2):230-246
70. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL (2004) Opioid receptors. *Annual review of biochemistry* 73:953-990. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940
71. Charbogne P, Kieffer BL, Befort K (2014) 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology* 76 Pt B:204-217. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.028
72. Chavkin C (2011) The therapeutic potential of kappa-opioids for treatment of pain and addiction. *Neuropsychopharmacology* 36 (1):369-370. doi:10.1038/npp.2010.137
73. Bruchas MR, Chavkin C (2010) Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 210 (2):137-147. doi:10.1007/s00213-010-1806-y
74. Van't Veer A, Bechtholt AJ, Onvani S, Potter D, Wang Y, Liu-Chen LY, Schutz G, Chartoff EH, Rudolph U, Cohen BM, Carlezon WA, Jr. (2013) Ablation of kappa-opioid receptors from brain dopamine neurons has anxiolytic-like effects and enhances cocaine-induced plasticity. *Neuropsychopharmacology* 38 (8):1585-1597. doi:10.1038/npp.2013.58
75. Feng P, Rahim RT, Cowan A, Liu-Chen LY, Peng X, Gaughan J, Meissler JJ, Jr., Adler MW, Eisenstein TK (2006) Effects of mu, kappa or delta opioids administered by pellet or pump on oral Salmonella infection and gastrointestinal transit. *European journal of pharmacology* 534 (1-3):250-257. doi:10.1016/j.ejphar.2006.01.048
76. Gallantine EL, Meert TF (2005) A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97 (1):39-51. doi:10.1111/j.1742-7843.2005.pto\_07.x
77. Tavani A, Petrillo P, La Regina A, Sbacchi M (1990) Role of peripheral mu, delta and kappa opioid receptors in opioid-induced inhibition of gastrointestinal transit in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 254 (1):91-97
78. Cheng PY, Wu D, Soong Y, McCabe S, Decena JA, Szeto HH (1993) Role of mu 1- and delta-opioid receptors in modulation of fetal EEG and respiratory activity. *Am J Physiol* 265 (2 Pt 2):R433-438
79. Codd EE, Carson JR, Colburn RW, Stone DJ, Van Besien CR, Zhang SP, Wade PR, Gallantine EL, Meert TF, Molino L, Pullan S, Razler CM, Dax SL, Flores CM (2009) JNJ-20788560 [9-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ylidene)-9H-xanthene-3-carboxylic acid diethylamide], a selective delta opioid receptor agonist, is a potent and efficacious antihyperalgesic agent that does not produce respiratory depression,

pharmacologic tolerance, or physical dependence. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 329 (1):241-251. doi:10.1124/jpet.108.146969

80. Cowan A, Zhu XZ, Mosberg HI, Omnaas JR, Porreca F (1988) Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 246 (3):950-955

81. Spahn V, Stein C (2017) Targeting delta opioid receptors for pain treatment: drugs in phase I and II clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 26 (2):155-160. doi:10.1080/13543784.2017.1275562

82. Chu Sin Chung P, Kieffer BL (2013) Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacology & therapeutics* 140 (1):112-120. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.06.003

83. Laurent V, Leung B, Maidment N, Balleine BW (2012) mu- and delta-opioid-related processes in the accumbens core and shell differentially mediate the influence of reward-guided and stimulus-guided decisions on choice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (5):1875-1883. doi:10.1523/JNEUROSCI.4688-11.2012

84. Jutkiewicz EM, Rice KC, Traynor JR, Woods JH (2005) Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 182 (4):588-596. doi:10.1007/s00213-005-0138-9

85. Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, Amraei M, Chabot-Dore AJ, Millecamps M, Stone LS, Pineyro G (2012) Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (14):4827-4840. doi:10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012

86. Pradhan AA, Walwyn W, Nozaki C, Filliol D, Erbs E, Matifas A, Evans C, Kieffer BL (2010) Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (49):16459-16468. doi:10.1523/JNEUROSCI.3748-10.2010

87. Johnson M, Liu M, Struble E, Hettiarachchi K (2015) Characterization of cyclic peptides containing disulfide bonds. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 109:112-120. doi:10.1016/j.jpba.2015.01.009

88. Mosberg HI, Hurst R, Hruby VJ, Gee K, Yamamura HI, Galligan JJ, Burks TF (1983) Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (19):5871-5874

89. Schiller PW, Nguyen TM, Weltrowska G, Wilkes BC, Marsden BJ, Lemieux C, Chung NN (1992) Differential stereochemical requirements of mu vs. delta opioid receptors for ligand binding and signal transduction: development of a class of potent and highly delta-selective peptide antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (24):11871-11875

90. Balboni G, Salvadori S, Guerrini R, Negri L, Giannini E, Jinsmaa Y, Bryant SD, Lazarus LH (2002) Potent delta-opioid receptor agonists containing the Dmt-Tic pharmacophore. *Journal of medicinal chemistry* 45 (25):5556-5563

91. Vergura R, Balboni G, Spagnolo B, Gavioli E, Lambert DG, McDonald J, Trapella C, Lazarus LH, Regoli D, Guerrini R, Salvadori S, Calo G (2008) Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH<sub>2</sub>-COOH)-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist. *Peptides* 29 (1):93-103. doi:10.1016/j.peptides.2007.10.012

92. Calderon SN, Rothman RB, Porreca F, Flippen-Anderson JL, McNutt RW, Xu H, Smith LE, Bilsky EJ, Davis P, Rice KC (1994) Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry* 37 (14):2125-2128

93. Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66 (5):285-306
94. Bilsky EJ, Calderon SN, Wang T, Bernstein RN, Davis P, Hruby VJ, McNutt RW, Rothman RB, Rice KC, Porreca F (1995) SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 273 (1):359-366
95. Hildebrandt JD SR, Codina J, Iyengar R, Manclark CR, Birnbaumer L. (1983) Stimulation and inhibition of adenyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* 21;302(5910):706-9.
96. Hsia JA MJ, Hewlett EL, Vaughan M. (1984) ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J Biol Chem* 25;259(2):1086-90.
97. Burns DL (1988) Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin. *Microbiological sciences* 5 (9):285-287
98. Huang W, Manglik A, Venkatakrishnan AJ, Laeremans T, Feinberg EN, Sanborn AL, Kato HE, Livingston KE, Thorsen TS, Kling RC, Granier S, Gmeiner P, Husbands SM, Traynor JR, Weis WI, Steyaert J, Dror RO, Kobilka BK (2015) Structural insights into micro-opioid receptor activation. *Nature* 524 (7565):315-321. doi:10.1038/nature14886
99. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S (2012) Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485 (7398):321-326. doi:10.1038/nature10954
100. Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, Kobilka BK (2012) Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485 (7398):400-404. doi:10.1038/nature11111
101. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469 (7329):175-180. doi:10.1038/nature09648
102. Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC, Kobilka BK (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318 (5854):1266-1273. doi:10.1126/science.1150609
103. Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C, Weis WI, Okada T, Kobilka BK, Haga T, Kobayashi T (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482 (7386):547-551. doi:10.1038/nature10753
104. Kruse AC, Ring AM, Manglik A, Hu J, Hu K, Eitel K, Hubner H, Pardon E, Valant C, Sexton PM, Christopoulos A, Felder CC, Gmeiner P, Steyaert J, Weis WI, Garcia KC, Wess J, Kobilka BK (2013) Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 504 (7478):101-106. doi:10.1038/nature12735
105. Choe HW, Kim YJ, Park JH, Morizumi T, Pai EF, Krauss N, Hofmann KP, Scheerer P, Ernst OP (2011) Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 471 (7340):651-655. doi:10.1038/nature09789
106. Sounier R, Mas C, Steyaert J, Laeremans T, Manglik A, Huang W, Kobilka BK, Demene H, Granier S (2015) Propagation of conformational changes during mu-opioid receptor activation. *Nature* 524 (7565):375-378. doi:10.1038/nature14680
107. Decallot FM, Befort K, Filliol D, Yue S, Walker P, Kieffer BL (2003) Opioid receptor random mutagenesis reveals a mechanism for G protein-coupled receptor activation. *Nature structural biology* 10 (8):629-636. doi:10.1038/nsb950
108. McIntire WE (2009) Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers. *Neuro-Signals* 17 (1):82-99. doi:10.1159/000186692
109. Katada T, Bokoch GM, Northup JK, Ui M, Gilman AG (1984) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *The Journal of biological chemistry* 259 (6):3568-3577

110. Noel JP, Hamm HE, Sigler PB (1993) The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP  $\gamma$  S. *Nature* 366 (6456):654-663. doi:10.1038/366654a0
111. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK (2011) Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477 (7366):549-555. doi:10.1038/nature10361
112. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature structural & molecular biology* 25 (1):4-12. doi:10.1038/s41594-017-0011-7
113. Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews Molecular cell biology* 9 (1):60-71. doi:10.1038/nrm2299
114. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual review of biochemistry* 59:971-1005. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.004543
115. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396 (6710):474-477. doi:10.1038/24884
116. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282 (5397):2275-2279
117. Broillet MC, Firestein S (1999) Cyclic nucleotide-gated channels. Molecular mechanisms of activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868:730-740
118. Daniel PB, Walker WH, Habener JF (1998) Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annual review of nutrition* 18:353-383. doi:10.1146/annurev.nutr.18.1.353
119. Tesmer JJ, Sprang SR (1998) The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Current opinion in structural biology* 8 (6):713-719
120. Gu C, Sorkin A, Cooper DM (2001) Persistent interactions between the two transmembrane clusters dictate the targeting and functional assembly of adenylyl cyclase. *Current biology : CB* 11 (3):185-190
121. Halls ML, Cooper DM (2017) Adenylyl cyclase signalling complexes - Pharmacological challenges and opportunities. *Pharmacology & therapeutics* 172:171-180. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.01.001
122. Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289 (5479):625-628
123. Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269 (1-2):13-25
124. Smit MJ, Iyengar R (1998) Mammalian adenylyl cyclases. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 32:1-21
125. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 36:461-480. doi:10.1146/annurev.pa.36.040196.002333
126. Diel S, Klass K, Wittig B, Kleuss C (2006) Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma. *The Journal of biological chemistry* 281 (1):288-294. doi:10.1074/jbc.M511045200
127. Bayewitch ML, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds WF, Vogel Z (1998) Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (11):1019-1025
128. Gao X, Sadana R, Dessauer CW, Patel TB (2007) Conditional stimulation of type V and VI adenylyl cyclases by G protein betagamma subunits. *The Journal of biological chemistry* 282 (1):294-302. doi:10.1074/jbc.M607522200

129. Roy AA, Lemberg KE, Chidiac P (2003) Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions. *Molecular pharmacology* 64 (3):587-593. doi:10.1124/mol.64.3.587
130. Salim S, Sinnarajah S, Kehrl JH, Dessauer CW (2003) Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *The Journal of biological chemistry* 278 (18):15842-15849. doi:10.1074/jbc.M210663200
131. Roy AA, Baragli A, Bernstein LS, Hepler JR, Hebert TE, Chidiac P (2006) RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells. *Cellular signalling* 18 (3):336-348. doi:10.1016/j.cellsig.2005.05.004
132. Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* 244 (4912):1558-1564
133. Cali JJ, Zwaagstra JC, Mons N, Cooper DM, Krupinski J (1994) Type VIII adenylyl cyclase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *The Journal of biological chemistry* 269 (16):12190-12195
134. Choi EJ, Xia Z, Storm DR (1992) Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin. *Biochemistry* 31 (28):6492-6498
135. Cooper DM (2003) Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. *Biochemical Society transactions* 31 (Pt 5):912-915. doi:10.1042/
136. Zippin JH, Levin LR, Buck J (2001) CO(2)/HCO(3)(-)-responsive soluble adenylyl cyclase as a putative metabolic sensor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12 (8):366-370
137. Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (6):3363-3367
138. Cooper DM (2005) Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochemical Society transactions* 33 (Pt 6):1319-1322. doi:10.1042/BST20051319
139. Fan T, Varghese G, Nguyen T, Tse R, O'Dowd BF, George SR (2005) A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers. *The Journal of biological chemistry* 280 (46):38478-38488. doi:10.1074/jbc.M505644200
140. George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *The Journal of biological chemistry* 275 (34):26128-26135. doi:10.1074/jbc.M000345200
141. Tso PH, Yung LY, Wong YH (2000) Regulation of adenylyl cyclase, ERK1/2, and CREB by Gz following acute and chronic activation of the delta-opioid receptor. *Journal of neurochemistry* 74 (4):1685-1693
142. Tsu RC, Ho MK, Yung LY, Joshi S, Wong YH (1997) Role of amino- and carboxyl-terminal regions of G(alphaZ) in the recognition of Gi-coupled receptors. *Molecular pharmacology* 52 (1):38-45
143. Ho MK, Yung LY, Chan JS, Chan JH, Wong CS, Wong YH (2001) Galpha(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *British journal of pharmacology* 132 (7):1431-1440. doi:10.1038/sj.bjp.0703933
144. Casey PJ, Fong HK, Simon MI, Gilman AG (1990) Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *The Journal of biological chemistry* 265 (4):2383-2390
145. Glick JL, Meigs TE, Miron A, Casey PJ (1998) RGSZ1, a Gz-selective regulator of G protein signaling whose action is sensitive to the phosphorylation state of Galpha. *The Journal of biological chemistry* 273 (40):26008-26013
146. Mao H, Zhao Q, Daigle M, Ghahremani MH, Chidiac P, Albert PR (2004) RGS17/RGSZ2, a novel regulator of Gi/o, Gz, and Gq signaling. *The Journal of biological chemistry* 279 (25):26314-26322. doi:10.1074/jbc.M401800200

147. Onali P, Olanas MC (2004) G protein activation and cyclic AMP modulation by naloxone benzoylhydrazone in distinct layers of rat olfactory bulb. *British journal of pharmacology* 143 (5):638-648. doi:10.1038/sj.bjp.0705951
148. Olanas MC, Dedoni S, Onali P (2013) Coincidence signaling of dopamine D1-like and M1 muscarinic receptors in the regulation of cyclic AMP formation and CREB phosphorylation in mouse prefrontal cortex. *Neuro-Signals* 21 (1-2):61-74. doi:10.1159/000335208
149. Yao L, Fan P, Jiang Z, Mailliard WS, Gordon AS, Diamond I (2003) Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (24):14379-14384. doi:10.1073/pnas.2336093100
150. Kim KS, Lee KW, Lee KW, Im JY, Yoo JY, Kim SW, Lee JK, Nestler EJ, Han PL (2006) Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10):3908-3913. doi:10.1073/pnas.0508812103
151. Yoshimura M, Wu PH, Hoffman PL, Tabakoff B (2000) Overexpression of type 7 adenylyl cyclase in the mouse brain enhances acute and chronic actions of morphine. *Molecular pharmacology* 58 (5):1011-1016
152. Li S, Lee ML, Bruchas MR, Chan GC, Storm DR, Chavkin C (2006) Calmodulin-stimulated adenylyl cyclase gene deletion affects morphine responses. *Molecular pharmacology* 70 (5):1742-1749. doi:10.1124/mol.106.025783
153. Bernstein MA, Welch SP (1999) A method for the determination of activated receptor phosphorylation state following in vivo drug treatment. *Brain research Brain research protocols* 4 (3):420-424
154. Suh HW, Sim YB, Choi YS, Song DK, Kim YH (1995) Differential effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine injected intrathecally or intracerebroventricularly on antinociception induced by opioids administered intracerebroventricularly in the mouse. *Neuropeptides* 28 (6):357-363
155. Gijon MA, Spencer DM, Kaiser AL, Leslie CC (1999) Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Cell Biol* 145 (6):1219-1232
156. Qiu ZH, Gijon MA, de Carvalho MS, Spencer DM, Leslie CC (1998) The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 273 (14):8203-8211
157. Sun GY, Xu J, Jensen MD, Yu S, Wood WG, Gonzalez FA, Simonyi A, Sun AY, Weisman GA (2005) Phospholipase A2 in astrocytes: responses to oxidative stress, inflammation, and G protein-coupled receptor agonists. *Molecular neurobiology* 31 (1-3):27-41. doi:10.1385/MN:31:1-3:027
158. Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *Journal of neurochemistry* 67 (3):1309-1316
159. Zhang Z, Pan ZZ (2012) Signaling cascades for delta-opioid receptor-mediated inhibition of GABA synaptic transmission and behavioral antinociception. *Molecular pharmacology* 81 (3):375-383. doi:10.1124/mol.111.076307
160. Kadamur G, Ross EM (2013) Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol* 75:127-154. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183750
161. Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA (1994) Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14 (4):1920-1929
162. Yeo A, Samways DS, Fowler CE, Gunn-Moore F, Henderson G (2001) Coincident signalling between the Gi/Go-coupled delta-opioid receptor and the Gq-coupled m3 muscarinic receptor at the level of intracellular free calcium in SH-SY5Y cells. *Journal of neurochemistry* 76 (6):1688-1700

163. Yoon SH, Lo TM, Loh HH, Thayer SA (1999) Delta-opioid-induced liberation of Gbetagamma mobilizes Ca<sup>2+</sup> stores in NG108-15 cells. *Molecular pharmacology* 56 (5):902-908
164. Dortch-Carnes J, Potter DE (2003) Delta-opioid agonist-stimulated inositol phosphate formation in isolated, rabbit iris-ciliary bodies: role of G(i/o) proteins and Gbetagamma-subunits. *Experimental eye research* 77 (6):647-652
165. Murthy KS, Makhlof GM (1996) Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Molecular pharmacology* 50 (4):870-877
166. Narita M, Ohsawa M, Mizoguchi H, Aoki T, Suzuki T, Tseng LF (2000) Role of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C pathway in delta-opioid receptor-mediated antinociception in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 99 (2):327-331
167. Ohsawa M, Nagase H, Kamei J (1998) Role of intracellular calcium in modification of mu and delta opioid receptor-mediated antinociception by diabetes in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286 (2):780-787
168. Sanchez-Blazquez P, Garzon J (1998) delta Opioid receptor subtypes activate inositol-signaling pathways in the production of antinociception. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 285 (2):820-827
169. Chan JS, Lee JW, Ho MK, Wong YH (2000) Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors. *Molecular pharmacology* 57 (4):700-708
170. Murthy KS, Coy DH, Makhlof GM (1996) Somatostatin receptor-mediated signaling in smooth muscle. Activation of phospholipase C-beta3 by Gbetagamma and inhibition of adenylyl cyclase by Galphai1 and Galphao. *The Journal of biological chemistry* 271 (38):23458-23463
171. Murthy KS, Makhlof GM (1995) Functional characterization of phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 and -beta 3 in intestinal smooth muscle. *Am J Physiol* 269 (4 Pt 1):C969-978. doi:10.1152/ajpcell.1995.269.4.C969
172. Koch T, Brandenburg LO, Liang Y, Schulz S, Beyer A, Schroder H, Hollt V (2004) Phospholipase D2 modulates agonist-induced mu-opioid receptor desensitization and resensitization. *Journal of neurochemistry* 88 (3):680-688
173. Koch T, Wu DF, Yang LQ, Brandenburg LO, Hollt V (2006) Role of phospholipase D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G-protein coupled receptors. *Journal of neurochemistry* 97 (2):365-372. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03736.x
174. Yang L, Seifert A, Wu D, Wang X, Rankovic V, Schroder H, Brandenburg LO, Hollt V, Koch T (2010) Role of phospholipase D2/phosphatidic acid signal transduction in micro- and delta-opioid receptor endocytosis. *Molecular pharmacology* 78 (1):105-113. doi:10.1124/mol.109.063107
175. Koch T, Brandenburg LO, Schulz S, Liang Y, Klein J, Hollt V (2003) ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D2 activation is required for agonist-induced mu-opioid receptor endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 278 (11):9979-9985. doi:10.1074/jbc.M206709200
176. Mitchell R, McCulloch D, Lutz E, Johnson M, MacKenzie C, Fennell M, Fink G, Zhou W, Sealfon SC (1998) Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* 392 (6674):411-414. doi:10.1038/32937
177. Mace G, Miaczynska M, Zerial M, Nebreda AR (2005) Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis. *The EMBO journal* 24 (18):3235-3246. doi:10.1038/sj.emboj.7600799
178. Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews Molecular cell biology* 2 (2):107-117. doi:10.1038/35052055

179. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90 (1):291-366. doi:10.1152/physrev.00021.2009
180. Liao YJ, Jan YN, Jan LY (1996) Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (22):7137-7150
181. Jin T, Peng L, Mirshahi T, Rohacs T, Chan KW, Sanchez R, Logothetis DE (2002) The (beta)gamma subunits of G proteins gate a K(+) channel by pivoted bending of a transmembrane segment. *Mol Cell* 10 (3):469-481
182. Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, Usui H, Kumanishi T (1995) Functional couplings of the delta- and the kappa-opioid receptors with the G-protein-activated K<sup>+</sup> channel. *Biochemical and biophysical research communications* 208 (1):302-308. doi:10.1006/bbrc.1995.1338
183. Svoboda KR, Lupica CR (1998) Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I<sub>h</sub>) currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (18):7084-7098
184. Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K (2005) Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (14):3551-3559. doi:10.1523/JNEUROSCI.4899-04.2005
185. Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bader S, Stoffel M, Jan LY, Basbaum AI (2003) Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (1):271-276. doi:10.1073/pnas.0136822100
186. Bruehl S, Denton JS, Lonergan D, Koran ME, Chont M, Sobey C, Fernando S, Bush WS, Mishra P, Thornton-Wells TA (2013) Associations between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphisms and pain-related phenotypes. *Pain* 154 (12):2853-2859. doi:10.1016/j.pain.2013.08.026
187. Lotsch J, Pruss H, Veh RW, Doehring A (2010) A KCNJ6 (Kir3.2, GIRK2) gene polymorphism modulates opioid effects on analgesia and addiction but not on pupil size. *Pharmacogenetics and genomics* 20 (5):291-297. doi:10.1097/FPC.0b013e3283386bda
188. Chung MK, Cho YS, Bae YC, Lee J, Zhang X, Ro JY (2014) Peripheral G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are involved in delta-opioid receptor-mediated anti-hyperalgesia in rat masseter muscle. *Eur J Pain* 18 (1):29-38. doi:10.1002/j.1532-2149.2013.00343.x
189. Pradhan AA, Clarke PB (2005) Comparison between delta-opioid receptor functional response and autoradiographic labeling in rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 481 (4):416-426. doi:10.1002/cne.20378
190. Pedersen NP, Vaughan CW, Christie MJ (2011) Opioid receptor modulation of GABAergic and serotonergic spinally projecting neurons of the rostral ventromedial medulla in mice. *J Neurophysiol* 106 (2):731-740. doi:10.1152/jn.01062.2010
191. Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (8):a003947. doi:10.1101/cshperspect.a003947
192. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25 (3):533-535
193. Altier C, Zamponi GW (2008) Signaling complexes of voltage-gated calcium channels and G protein-coupled receptors. *Journal of receptor and signal transduction research* 28 (1-2):71-81. doi:10.1080/10799890801941947



194. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015) The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacological reviews* 67 (4):821-870. doi:10.1124/pr.114.009654
195. Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B (1998) G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (22):9163-9170
196. Blackmer T, Larsen EC, Bartleson C, Kowalchuk JA, Yoon EJ, Preininger AM, Alford S, Hamm HE, Martin TF (2005) G protein betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat Neurosci* 8 (4):421-425. doi:10.1038/nn1423
197. Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual review of cell and developmental biology* 16:521-555. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.521
198. Chen Z, Nield HS, Sun H, Barbier A, Patel TB (1995) Expression of type V adenylyl cyclase is required for epidermal growth factor-mediated stimulation of cAMP accumulation. *The Journal of biological chemistry* 270 (46):27525-27530
199. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 385 (6615):442-446. doi:10.1038/385442a0
200. Sher E, Cesare P, Codignola A, Clementi F, Tarroni P, Pollo A, Magnelli V, Carbone E (1996) Activation of delta-opioid receptors inhibits neuronal-like calcium channels and distal steps of Ca(2+)-dependent secretion in human small-cell lung carcinoma cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (11):3672-3684
201. Morikawa H, Fukuda K, Mima H, Shoda T, Kato S, Mori K (1998) Desensitization and resensitization of delta-opioid receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> channel inhibition in NG108-15 cells. *British journal of pharmacology* 123 (6):1111-1118. doi:10.1038/sj.bjp.0701733
202. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22 (2):153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
203. Hsu DT, Sanford BJ, Meyers KK, Love TM, Hazlett KE, Walker SJ, Mickey BJ, Koeppe RA, Langenecker SA, Zubieta JK (2015) It still hurts: altered endogenous opioid activity in the brain during social rejection and acceptance in major depressive disorder. *Molecular psychiatry* 20 (2):193-200. doi:10.1038/mp.2014.185
204. Ribeiro SC, Kennedy SE, Smith YR, Stohler CS, Zubieta JK (2005) Interface of physical and emotional stress regulation through the endogenous opioid system and mu-opioid receptors. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29 (8):1264-1280. doi:10.1016/j.pnpbp.2005.08.011
205. Hayashi T, Tsao LI, Su TP (2002) Antiapoptotic and cytotoxic properties of delta opioid peptide [D-Ala(2),D-Leu(5)]enkephalin in PC12 cells. *Synapse* 43 (1):86-94. doi:10.1002/syn.10019
206. Ma MC, Qian H, Ghassemi F, Zhao P, Xia Y (2005) Oxygen-sensitive {delta}-opioid receptor-regulated survival and death signals: novel insights into neuronal preconditioning and protection. *The Journal of biological chemistry* 280 (16):16208-16218. doi:10.1074/jbc.M408055200
207. Ikeda Y, Miura T, Sakamoto J, Miki T, Tanno M, Kobayashi H, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K (2006) Activation of ERK and suppression of calcineurin are interacting mechanisms of cardioprotection afforded by delta-opioid receptor activation. *Basic research in cardiology* 101 (5):418-426. doi:10.1007/s00395-006-0595-2
208. He X, Sandhu HK, Yang Y, Hua F, Belser N, Kim DH, Xia Y (2013) Neuroprotection against hypoxia/ischemia: delta-opioid receptor-mediated cellular/molecular events. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (13):2291-2303. doi:10.1007/s00018-012-1167-2

209. Wang Q, Chao D, Chen T, Sandhu H, Xia Y (2014) delta-Opioid receptors and inflammatory cytokines in hypoxia: differential regulation between glial and neuron-like cells. *Translational stroke research* 5 (4):476-483. doi:10.1007/s12975-014-0342-1
210. Bigliardi PL, Neumann C, Teo YL, Pant A, Bigliardi-Qi M (2015) Activation of the delta-opioid receptor promotes cutaneous wound healing by affecting keratinocyte intercellular adhesion and migration. *British journal of pharmacology* 172 (2):501-514. doi:10.1111/bph.12687
211. Takeda K, Naguro I, Nishitoh H, Matsuzawa A, Ichijo H (2011) Apoptosis signaling kinases: from stress response to health outcomes. *Antioxidants & redox signaling* 15 (3):719-761. doi:10.1089/ars.2010.3392
212. O'Hayre M, Degese MS, Gutkind JS (2014) Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Current opinion in cell biology* 27:126-135. doi:10.1016/j.ceb.2014.01.005
213. Belcheva MM, Vogel Z, Ignatova E, Avidor-Reiss T, Zippel R, Levy R, Young EC, Barg J, Coscia CJ (1998) Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits. *Journal of neurochemistry* 70 (2):635-645
214. Hedin KE, Bell MP, Huntoon CJ, Karnitz LM, McKean DJ (1999) Gi proteins use a novel beta gamma and Ras-independent pathway to activate extracellular signal-regulated kinase and mobilize AP-1 transcription factors in Jurkat T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 274 (28):19992-20001
215. Xu C, Hong MH, Zhang LS, Hou YY, Wang YH, Wang FF, Chen YJ, Xu XJ, Chen J, Xie X, Ma L, Chi ZQ, Liu JG (2010) Serine 363 of the {delta}-opioid receptor is crucial for adopting distinct pathways to activate ERK1/2 in response to stimulation with different ligands. *Journal of cell science* 123 (Pt 24):4259-4270. doi:10.1242/jcs.073742
216. Eisinger DA, Ammer H (2008) Delta-opioid receptors activate ERK/MAP kinase via integrin-stimulated receptor tyrosine kinases. *Cellular signalling* 20 (12):2324-2331. doi:10.1016/j.cellsig.2008.09.002
217. Eisinger DA, Ammer H (2008) delta-Opioid receptors stimulate ERK1/2 activity in NG108-15 hybrid cells by integrin-mediated transactivation of TrkA receptors. *FEBS letters* 582 (23-24):3325-3329. doi:10.1016/j.febslet.2008.08.021
218. Duman RS (2014) Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. *Depression and anxiety* 31 (4):291-296. doi:10.1002/da.22227
219. Haase J, Brown E (2015) Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? *Pharmacology & therapeutics* 147:1-11. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.10.002
220. Torregrossa MM, Isgor C, Folk JE, Rice KC, Watson SJ, Woods JH (2004) The delta-opioid receptor agonist (+)BW373U86 regulates BDNF mRNA expression in rats. *Neuropsychopharmacology* 29 (4):649-659. doi:10.1038/sj.npp.1300345
221. Zhang L, Tetrault J, Wang W, Loh HH, Law PY (2006) Short- and long-term regulation of adenylyl cyclase activity by delta-opioid receptor are mediated by Galphai2 in neuroblastoma N2A cells. *Molecular pharmacology* 69 (6):1810-1819. doi:10.1124/mol.105.021352
222. Neumann C, Bigliardi-Qi M, Widmann C, Bigliardi PL (2015) The delta-opioid receptor affects epidermal homeostasis via ERK-dependent inhibition of transcription factor POU2F3. *The Journal of investigative dermatology* 135 (2):471-480. doi:10.1038/jid.2014.370
223. Zhang Z, Xin SM, Wu GX, Zhang WB, Ma L, Pei G (1999) Endogenous delta-opioid and ORL1 receptors couple to phosphorylation and activation of p38 MAPK in NG108-15 cells and this is regulated by protein kinase A and protein kinase C. *Journal of neurochemistry* 73 (4):1502-1509
224. Husted TL, Govindaswami M, Oeltgen PR, Rudich SM, Lentsch AB (2005) A delta2-opioid agonist inhibits p38 MAPK and suppresses activation of murine macrophages. *The Journal of surgical research* 128 (1):45-49. doi:10.1016/j.jss.2005.04.003

225. Liang J, Chao D, Sandhu HK, Yu Y, Zhang L, Balboni G, Kim DH, Xia Y (2014) delta-Opioid receptors up-regulate excitatory amino acid transporters in mouse astrocytes. *British journal of pharmacology* 171 (23):5417-5430. doi:10.1111/bph.12857
226. Hong SS, Qian H, Zhao P, Bazy-Asaad A, Xia Y (2007) Anisomycin protects cortical neurons from prolonged hypoxia with differential regulation of p38 and ERK. *Brain research* 1149:76-86. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.062
227. Chattopadhyay M, Mata M, Fink DJ (2008) Continuous delta-opioid receptor activation reduces neuronal voltage-gated sodium channel (Nav1.7) levels through activation of protein kinase C in painful diabetic neuropathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (26):6652-6658. doi:10.1523/JNEUROSCI.5530-07.2008
228. Shahabi NA, McAllen K, Sharp BM (2006) delta opioid receptors stimulate Akt-dependent phosphorylation of c-jun in T cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316 (2):933-939. doi:10.1124/jpet.105.091447
229. Shahabi NA, McAllen K, Sharp BM (2003) Phosphorylation of activating transcription factor in murine splenocytes through delta opioid receptors. *Cellular immunology* 221 (2):122-127
230. Sharp BM, McAllen K, Gekker G, Shahabi NA, Peterson PK (2001) Immunofluorescence detection of delta opioid receptors (DOR) on human peripheral blood CD4+ T cells and DOR-dependent suppression of HIV-1 expression. *Journal of immunology* 167 (2):1097-1102
231. Kam AY, Chan AS, Wong YH (2003) Rac and Cdc42-dependent regulation of c-Jun N-terminal kinases by the delta-opioid receptor. *Journal of neurochemistry* 84 (3):503-513
232. Gurevich EV, Tesmer JJ, Mushegian A, Gurevich VV (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacology & therapeutics* 133 (1):40-69. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.08.001
233. Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* 53 (1):1-24
234. Kunapuli P, Onorato JJ, Hosey MM, Benovic JL (1994) Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *The Journal of biological chemistry* 269 (2):1099-1105
235. Ahmed MR, Bychkov E, Gurevich VV, Benovic JL, Gurevich EV (2008) Altered expression and subcellular distribution of GRK subtypes in the dopamine-depleted rat basal ganglia is not normalized by L-DOPA treatment. *Journal of neurochemistry* 104 (6):1622-1636. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05104.x
236. Lodowski DT, Tesmer VM, Benovic JL, Tesmer JJ (2006) The structure of G protein-coupled receptor kinase (GRK)-6 defines a second lineage of GRKs. *The Journal of biological chemistry* 281 (24):16785-16793. doi:10.1074/jbc.M601327200
237. Lodowski DT, Barnhill JF, Pyskadlo RM, Ghirlando R, Sterne-Marr R, Tesmer JJ (2005) The role of G beta gamma and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry* 44 (18):6958-6970. doi:10.1021/bi050119q
238. Lodowski DT, Barnhill JF, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, Tesmer JJ (2003) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbeta1gamma2. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 59 (Pt 5):936-939
239. Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, Tesmer JJ (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* 310 (5754):1686-1690. doi:10.1126/science.1118890
240. Singh P, Wang B, Maeda T, Palczewski K, Tesmer JJ (2008) Structures of rhodopsin kinase in different ligand states reveal key elements involved in G protein-coupled receptor kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 283 (20):14053-14062. doi:10.1074/jbc.M708974200

241. Huang CC, Orban T, Jastrzebska B, Palczewski K, Tesmer JJ (2011) Activation of G protein-coupled receptor kinase 1 involves interactions between its N-terminal region and its kinase domain. *Biochemistry* 50 (11):1940-1949. doi:10.1021/bi101606e
242. Boguth CA, Singh P, Huang CC, Tesmer JJ (2010) Molecular basis for activation of G protein-coupled receptor kinases. *The EMBO journal* 29 (19):3249-3259. doi:10.1038/emboj.2010.206
243. Palczewski K, Buczylo J, Lebioda L, Crabb JW, Polans AS (1993) Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin. *The Journal of biological chemistry* 268 (8):6004-6013
244. Gurevich VV, Gurevich EV (2017) Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *Int J Mol Sci* 18 (12). doi:10.3390/ijms18122519
245. Komolov KE, Du Y, Duc NM, Betz RM, Rodrigues J, Leib RD, Patra D, Skiniotis G, Adams CM, Dror RO, Chung KY, Kobilka BK, Benovic JL (2017) Structural and Functional Analysis of a beta2-Adrenergic Receptor Complex with GRK5. *Cell* 169 (3):407-421 e416. doi:10.1016/j.cell.2017.03.047
246. Guo J, Wu Y, Zhang W, Zhao J, Devi LA, Pei G, Ma L (2000) Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation. *Molecular pharmacology* 58 (5):1050-1056
247. Li J, Xiang B, Su W, Zhang X, Huang Y, Ma L (2003) Agonist-induced formation of opioid receptor-G protein-coupled receptor kinase (GRK)-G beta gamma complex on membrane is required for GRK2 function in vivo. *The Journal of biological chemistry* 278 (32):30219-30226. doi:10.1074/jbc.M302385200
248. Zhang X, Wang F, Chen X, Li J, Xiang B, Zhang YQ, Li BM, Ma L (2005) Beta-arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors. *Journal of neurochemistry* 95 (1):169-178. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03352.x
249. Schulz R, Wehmeyer A, Schulz K (2002) Opioid receptor types selectively cointernalize with G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300 (2):376-384
250. Bradbury FA, Zelnik JC, Traynor JR (2009) G protein independent phosphorylation and internalization of the delta-opioid receptor. *Journal of neurochemistry* 109 (5):1526-1535. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06082.x
251. Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 280 (5367):1271-1274
252. Hong MH, Xu C, Wang YJ, Ji JL, Tao YM, Xu XJ, Chen J, Xie X, Chi ZQ, Liu JG (2009) Role of Src in ligand-specific regulation of delta-opioid receptor desensitization and internalization. *Journal of neurochemistry* 108 (1):102-114. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05740.x
253. Just S, Illing S, Trester-Zedlitz M, Lau EK, Kotowski SJ, Miess E, Mann A, Doll C, Trinidad JC, Burlingame AL, von Zastrow M, Schulz S (2013) Differentiation of opioid drug effects by hierarchical multi-site phosphorylation. *Molecular pharmacology* 83 (3):633-639. doi:10.1124/mol.112.082875
254. Varga EV, Navratilova E, Stropova D, Jambrosic J, Roeske WR, Yamamura HI (2004) Agonist-specific regulation of the delta-opioid receptor. *Life sciences* 76 (6):599-612. doi:10.1016/j.lfs.2004.07.020
255. Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *The Journal of biological chemistry* 252 (21):7603-7609
256. Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 279 (3):L429-438. doi:10.1152/ajplung.2000.279.3.L429

257. Singh RM, Cummings E, Pantos C, Singh J (2017) Protein kinase C and cardiac dysfunction: a review. *Heart failure reviews* 22 (6):843-859. doi:10.1007/s10741-017-9634-3
258. Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A (1986) Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233 (4766):859-866
259. Balendran A, Biondi RM, Cheung PC, Casamayor A, Deak M, Alessi DR (2000) A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase Czeta (PKCzeta) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *The Journal of biological chemistry* 275 (27):20806-20813. doi:10.1074/jbc.M000421200
260. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281 (5385):2042-2045
261. Wilkinson SE, Nixon JS (1998) T-cell signal transduction and the role of protein kinase C. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 54 (10):1122-1144. doi:10.1007/s000180050241
262. Lee HW, Smith L, Pettit GR, Bingham Smith J (1996) Dephosphorylation of activated protein kinase C contributes to downregulation by bryostatin. *Am J Physiol* 271 (1 Pt 1):C304-311. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.1.C304
263. Pei G, Kieffer BL, Lefkowitz RJ, Freedman NJ (1995) Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Molecular pharmacology* 48 (2):173-177
264. Xiang B, Yu GH, Guo J, Chen L, Hu W, Pei G, Ma L (2001) Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* 276 (7):4709-4716. doi:10.1074/jbc.M006187200
265. Parsons SJ, Parsons JT (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23 (48):7906-7909. doi:10.1038/sj.onc.1208160
266. Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T (1986) Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 231 (4744):1431-1434
267. Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA, Nakagawa H (1991) Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351 (6321):69-72. doi:10.1038/351069a0
268. Okada M, Nakagawa H (1989) A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *The Journal of biological chemistry* 264 (35):20886-20893
269. Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller PW, Pineyro G (2005) Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *The Journal of biological chemistry* 280 (9):7808-7816. doi:10.1074/jbc.M411695200
270. Kramer HK, Andria ML, Esposito DH, Simon EJ (2000) Tyrosine phosphorylation of the delta-opioid receptor. Evidence for its role in mitogen-activated protein kinase activation and receptor internalization\*. *Biochemical pharmacology* 60 (6):781-792
271. Kramer HK, Andria ML, Kushner SA, Esposito DH, Hiller JM, Simon EJ (2000) Mutation of tyrosine 318 (Y318F) in the delta-opioid receptor attenuates tyrosine phosphorylation, agonist-dependent receptor internalization, and mitogen-activated protein kinase activation. *Brain research Molecular brain research* 79 (1-2):55-66
272. Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H (2001) c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* 276 (16):13240-13247. doi:10.1074/jbc.M011578200

273. Sarnago S, Elorza A, Mayor F, Jr. (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* 274 (48):34411-34416
274. Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Garman EF, Wakatsuki S, Mitchell E, Rasmussen B, Hunt T, Johnson LN (1995) The crystal structure of cyclin A. *Structure* 3 (11):1235-1247
275. Tang D, Chun AC, Zhang M, Wang JH (1997) Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation domain of neuronal Cdk5 activator. Evidence of the existence of cyclin fold in neuronal Cdk5a activator. *The Journal of biological chemistry* 272 (19):12318-12327
276. Tarricone C, Dhavan R, Peng J, Areces LB, Tsai LH, Musacchio A (2001) Structure and regulation of the CDK5-p25(ncK5a) complex. *Mol Cell* 8 (3):657-669
277. Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nature reviews Molecular cell biology* 2 (10):749-759. doi:10.1038/35096019
278. Beaudette KN, Lew J, Wang JH (1993) Substrate specificity characterization of a cdc2-like protein kinase purified from bovine brain. *The Journal of biological chemistry* 268 (28):20825-20830
279. Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Molecular and cellular biology* 16 (11):6486-6493
280. Chen HJ, Xie WY, Hu F, Zhang Y, Wang J, Wang Y (2012) Disruption of delta-opioid receptor phosphorylation at threonine 161 attenuates morphine tolerance in rats with CFA-induced inflammatory hypersensitivity. *Neuroscience bulletin* 28 (2):182-192. doi:10.1007/s12264-012-1216-8
281. Xie WY, He Y, Yang YR, Li YF, Kang K, Xing BM, Wang Y (2009) Disruption of Cdk5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (11):3551-3564. doi:10.1523/JNEUROSCI.0415-09.2009
282. Wilden U (1995) Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding. *Biochemistry* 34 (4):1446-1454
283. Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL (1997) Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *The Journal of biological chemistry* 272 (29):18125-18131
284. Kohout TA, Lin FS, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ (2001) beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4):1601-1606. doi:10.1073/pnas.041608198
285. Gurevich VV, Gurevich EV (2013) Structural determinants of arrestin functions. *Progress in molecular biology and translational science* 118:57-92. doi:10.1016/B978-0-12-394440-5.00003-6
286. Scheerer P, Sommer ME (2017) Structural mechanism of arrestin activation. *Current opinion in structural biology* 45:160-169. doi:10.1016/j.sbi.2017.05.001
287. Ostermaier MK, Peterhans C, Jaussi R, Deupi X, Standfuss J (2014) Functional map of arrestin-1 at single amino acid resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (5):1825-1830. doi:10.1073/pnas.1319402111
288. Gimenez LE, Vishnivetskiy SA, Baameur F, Gurevich VV (2012) Manipulation of very few receptor discriminator residues greatly enhances receptor specificity of non-visual arrestins. *The Journal of biological chemistry* 287 (35):29495-29505. doi:10.1074/jbc.M112.366674
289. Peterson SM, Pack TF, Wilkins AD, Urs NM, Urban DJ, Bass CE, Lichtarge O, Caron MG (2015) Elucidation of G-protein and beta-arrestin functional selectivity at the dopamine D2 receptor.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112 (22):7097-7102. doi:10.1073/pnas.1502742112
290. Prokop S, Perry NA, Vishnivetskiy SA, Toth AD, Inoue A, Milligan G, Iverson TM, Hunyady L, Gurevich VV (2017) Differential manipulation of arrestin-3 binding to basal and agonist-activated G protein-coupled receptors. *Cellular signalling* 36:98-107. doi:10.1016/j.cellsig.2017.04.021
291. Lee MH, Appleton KM, Strungs EG, Kwon JY, Morinelli TA, Peterson YK, Laporte SA, Luttrell LM (2016) The conformational signature of beta-arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature* 531 (7596):665-668. doi:10.1038/nature17154
292. Nuber S, Zabel U, Lorenz K, Nuber A, Milligan G, Tobin AB, Lohse MJ, Hoffmann C (2016) beta-Arrestin biosensors reveal a rapid, receptor-dependent activation/deactivation cycle. *Nature* 531 (7596):661-664. doi:10.1038/nature17198
293. Charest PG, Terrillon S, Bouvier M (2005) Monitoring agonist-promoted conformational changes of beta-arrestin in living cells by intramolecular BRET. *EMBO reports* 6 (4):334-340. doi:10.1038/sj.embor.7400373
294. Kim M, Vishnivetskiy SA, Van Eps N, Alexander NS, Cleghorn WM, Zhan X, Hanson SM, Morizumi T, Ernst OP, Meiler J, Gurevich VV, Hubbell WL (2012) Conformation of receptor-bound visual arrestin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (45):18407-18412. doi:10.1073/pnas.1216304109
295. Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng WC, Staus DP, Hilger D, Uysal S, Huang LY, Paduch M, Tripathi-Shukla P, Koide A, Koide S, Weis WI, Kossiakoff AA, Kobilka BK, Lefkowitz RJ (2013) Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497 (7447):137-141. doi:10.1038/nature12120
296. Zhuang T, Chen Q, Cho MK, Vishnivetskiy SA, Iverson TM, Gurevich VV, Sanders CR (2013) Involvement of distinct arrestin-1 elements in binding to different functional forms of rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (3):942-947. doi:10.1073/pnas.1215176110
297. Zhou XE, He Y, de Waal PW, Gao X, Kang Y, Van Eps N, Yin Y, Pal K, Goswami D, White TA, Barty A, Latorraca NR, Chapman HN, Hubbell WL, Dror RO, Stevens RC, Cherezov V, Gurevich VV, Griffin PR, Ernst OP, Melcher K, Xu HE (2017) Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell* 170 (3):457-469 e413. doi:10.1016/j.cell.2017.07.002
298. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of biological chemistry* 275 (22):17201-17210. doi:10.1074/jbc.M910348199
299. Smith JS, Rajagopal S (2016) The beta-Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *The Journal of biological chemistry* 291 (17):8969-8977. doi:10.1074/jbc.R115.713313
300. Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 278 (16):14498-14506. doi:10.1074/jbc.M209626200
301. Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2005) Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *The Journal of biological chemistry* 280 (15):15315-15324. doi:10.1074/jbc.M412418200
302. Shenoy SK, Modi AS, Shukla AK, Xiao K, Berthouze M, Ahn S, Wilkinson KD, Miller WE, Lefkowitz RJ (2009) Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (16):6650-6655. doi:10.1073/pnas.0901083106

303. Ozawa K, Whalen EJ, Nelson CD, Mu Y, Hess DT, Lefkowitz RJ, Stamler JS (2008) S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol Cell* 31 (3):395-405. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.024
304. Wyatt D, Malik R, Vesecky AC, Marchese A (2011) Small ubiquitin-like modifier modification of arrestin-3 regulates receptor trafficking. *The Journal of biological chemistry* 286 (5):3884-3893. doi:10.1074/jbc.M110.152116
305. Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ, Rockman HA (2007) Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* 117 (9):2445-2458. doi:10.1172/JCI31901
306. Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, Pei G (2004) Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell* 14 (3):303-317
307. Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, Zhang M, Bao G, Wang F, Zhang X, Yang R, Fan F, Chen X, Pei G, Ma L (2005) A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123 (5):833-847. doi:10.1016/j.cell.2005.09.011
308. Wehbi VL, Stevenson HP, Feinstein TN, Calero G, Romero G, Vilardaga JP (2013) Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-Gbetagamma complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4):1530-1535. doi:10.1073/pnas.1205756110
309. Feinstein TN, Yui N, Webber MJ, Wehbi VL, Stevenson HP, King JD, Jr., Hallows KR, Brown D, Bouley R, Vilardaga JP (2013) Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *The Journal of biological chemistry* 288 (39):27849-27860. doi:10.1074/jbc.M112.445098
310. Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, Rasmussen SG, Sunahara RK, El-Samad H, Huang B, von Zastrow M (2013) Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* 495 (7442):534-538. doi:10.1038/nature12000
311. Cahill TJ, 3rd, Thomsen AR, Tarrasch JT, Plouffe B, Nguyen AH, Yang F, Huang LY, Kahsai AW, Bassoni DL, Gavino BJ, Lamerdin JE, Triest S, Shukla AK, Berger B, Little Jt, Antar A, Blanc A, Qu CX, Chen X, Kawakami K, Inoue A, Aoki J, Steyaert J, Sun JP, Bouvier M, Skiniotis G, Lefkowitz RJ (2017) Distinct conformations of GPCR-beta-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (10):2562-2567. doi:10.1073/pnas.1701529114
312. Thomsen ARB, Plouffe B, Cahill TJ, 3rd, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, Kahsai AW, Strachan RT, Pani B, Mahoney JP, Huang L, Breton B, Heydenreich FM, Sunahara RK, Skiniotis G, Bouvier M, Lefkowitz RJ (2016) GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* 166 (4):907-919. doi:10.1016/j.cell.2016.07.004
313. Cen B, Xiong Y, Ma L, Pei G (2001) Direct and differential interaction of beta-arrestins with the intracellular domains of different opioid receptors. *Molecular pharmacology* 59 (4):758-764
314. Cen B, Yu Q, Guo J, Wu Y, Ling K, Cheng Z, Ma L, Pei G (2001) Direct binding of beta-arrestins to two distinct intracellular domains of the delta opioid receptor. *Journal of neurochemistry* 76 (6):1887-1894
315. Qiu Y, Loh HH, Law PY (2007) Phosphorylation of the delta-opioid receptor regulates its beta-arrestins selectivity and subsequent receptor internalization and adenylyl cyclase desensitization. *The Journal of biological chemistry* 282 (31):22315-22323. doi:10.1074/jbc.M611258200
316. Zhang X, Wang F, Chen X, Chen Y, Ma L (2008) Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. *Journal of neurochemistry* 106 (2):781-792. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05431.x



317. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *The Journal of biological chemistry* 276 (22):19452-19460. doi:10.1074/jbc.M101450200
318. Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ, von Zastrow M (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *The Journal of biological chemistry* 271 (32):19021-19024
319. Molinari P, Vezzi V, Sbraccia M, Gro C, Riitano D, Ambrosio C, Casella I, Costa T (2010) Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin interactions. *The Journal of biological chemistry* 285 (17):12522-12535. doi:10.1074/jbc.M109.059410
320. Rowan MP, Bierbower SM, Eskander MA, Szteyn K, Por ED, Gomez R, Veldhuis N, Bunnett NW, Jeske NA (2014) Activation of mu opioid receptors sensitizes transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) via beta-arrestin-2-mediated cross-talk. *PloS one* 9 (4):e93688. doi:10.1371/journal.pone.0093688
321. Rowan MP, Szteyn K, Doyle AP, Gomez R, Henry MA, Jeske NA (2014) beta-arrestin-2-biased agonism of delta opioid receptors sensitizes transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in primary sensory neurons. *Molecular pain* 10:50. doi:10.1186/1744-8069-10-50
322. Rang HP (2006) The receptor concept: pharmacology's big idea. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1:S9-16. doi:10.1038/sj.bjp.0706457
323. Stephenson RP (1956) A modification of receptor theory. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 11 (4):379-393
324. Kenakin T (2004) Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 25 (4):186-192. doi:10.1016/j.tips.2004.02.012
325. Black JW, Leff P (1983) Operational models of pharmacological agonism. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 220 (1219):141-162
326. Kenakin T, Christopoulos A (2013) Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nature reviews Drug discovery* 12 (3):205-216. doi:10.1038/nrd3954
327. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S (2012) A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS chemical neuroscience* 3 (3):193-203. doi:10.1021/cn200111m
328. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 320 (1):1-13. doi:10.1124/jpet.106.104463
329. Gregory KJ, Sexton PM, Tobin AB, Christopoulos A (2012) Stimulus bias provides evidence for conformational constraints in the structure of a G protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* 287 (44):37066-37077. doi:10.1074/jbc.M112.408534
330. Charfi I, Audet N, Bagheri Tudashki H, Pineyro G (2015) Identifying ligand-specific signalling within biased responses: focus on delta opioid receptor ligands. *British journal of pharmacology* 172 (2):435-448. doi:10.1111/bph.12705
331. Kenakin T (2017) Theoretical Aspects of GPCR-Ligand Complex Pharmacology. *Chemical reviews* 117 (1):4-20. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00561
332. Del Castillo J, Katz B (1957) Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 146 (924):369-381
333. Leff P (1995) The two-state model of receptor activation. *Trends in pharmacological sciences* 16 (3):89-97
334. Onaran HO, Costa T (1997) Agonist efficacy and allosteric models of receptor action. *Annals of the New York Academy of Sciences* 812:98-115

335. Baneres JL, Mesnier D, Martin A, Joubert L, Dumuis A, Bockaert J (2005) Molecular characterization of a purified 5-HT<sub>4</sub> receptor: a structural basis for drug efficacy. *The Journal of biological chemistry* 280 (21):20253-20260. doi:10.1074/jbc.M412009200
336. Georgieva T, Devanathan S, Stropova D, Park CK, Salamon Z, Tollin G, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI, Varga E (2008) Unique agonist-bound cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor conformations indicate agonist specificity in signaling. *European journal of pharmacology* 581 (1-2):19-29. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.053
337. Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR, Kobilka BK (2001) Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* 276 (27):24433-24436. doi:10.1074/jbc.C100162200
338. Zurn A, Zabel U, Vilardaga JP, Schindelin H, Lohse MJ, Hoffmann C (2009) Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes. *Molecular pharmacology* 75 (3):534-541. doi:10.1124/mol.108.052399
339. Kenakin T, Miller LJ (2010) Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacological reviews* 62 (2):265-304. doi:10.1124/pr.108.000992
340. Audet N, Archer-Lahlou E, Richard-Lalonde M, Pineyro-Filpo G (2010) [Functional selectivity of opioid receptors ligands]. *Medecine sciences : M/S* 26 (8-9):734-739. doi:10.1051/medsci/2010268-9734
341. Alvarez VA, Arttamangkul S, Dang V, Salem A, Whistler JL, Von Zastrow M, Grandy DK, Williams JT (2002) mu-Opioid receptors: Ligand-dependent activation of potassium conductance, desensitization, and internalization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (13):5769-5776. doi:20026560
342. Raehal KM, Schmid CL, Groer CE, Bohn LM (2011) Functional selectivity at the mu-opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacological reviews* 63 (4):1001-1019. doi:10.1124/pr.111.004598
343. Kenakin T (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Molecular pharmacology* 72 (6):1393-1401. doi:10.1124/mol.107.040352
344. Alves ID, Ciano KA, Boguslavski V, Varga E, Salamon Z, Yamamura HI, Hruby VJ, Tollin G (2004) Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. *The Journal of biological chemistry* 279 (43):44673-44682. doi:10.1074/jbc.M404713200
345. Alves ID, Salamon Z, Varga E, Yamamura HI, Tollin G, Hruby VJ (2003) Direct observation of G-protein binding to the human delta-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* 278 (49):48890-48897. doi:10.1074/jbc.M306866200
346. Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M, Pineyro G (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *The Journal of biological chemistry* 283 (22):15078-15088. doi:10.1074/jbc.M707941200
347. Okura T, Varga EV, Hosohata Y, Navratilova E, Cowell SM, Rice K, Nagase H, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI (2003) Agonist-specific down-regulation of the human delta-opioid receptor. *European journal of pharmacology* 459 (1):9-16
348. Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2009) In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS one* 4 (5):e5425. doi:10.1371/journal.pone.0005425

349. Sposini S, Hanyaloglu AC (2017) Spatial encryption of G protein-coupled receptor signaling in endosomes; Mechanisms and applications. *Biochemical pharmacology* 143:1-9. doi:10.1016/j.bcp.2017.04.028
350. Zhang X, Kim KM (2017) Multifactorial Regulation of G Protein-Coupled Receptor Endocytosis. *Biomolecules & therapeutics* 25 (1):26-43. doi:10.4062/biomolther.2016.186
351. Chu P, Murray S, Lissin D, von Zastrow M (1997) Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *The Journal of biological chemistry* 272 (43):27124-27130
352. Zhang J, Ferguson SS, Law PY, Barak LS, Caron MG (1999) Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin. *Journal of receptor and signal transduction research* 19 (1-4):301-313. doi:10.3109/10799899909036653
353. Bot G, Blake AD, Li S, Reisine T (1997) Opioid regulation of the mouse delta-opioid receptor expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Molecular pharmacology* 52 (2):272-281
354. Gastard M (2000) Delta-opioid receptor endocytosis in spinal cord after dermenkephalin activation. *BMC Neurosci* 1:1. doi:10.1186/1471-2202-1-1
355. Tanowitz M, Von Zastrow M (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 277 (52):50219-50222. doi:10.1074/jbc.C200536200
356. Trapaidze N, Keith DE, Cvejic S, Evans CJ, Devi LA (1996) Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *The Journal of biological chemistry* 271 (46):29279-29285
357. Murray SR, Evans CJ, von Zastrow M (1998) Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor. *The Journal of biological chemistry* 273 (39):24987-24991
358. Whistler JL, Tsao P, von Zastrow M (2001) A phosphorylation-regulated brake mechanism controls the initial endocytosis of opioid receptors but is not required for post-endocytic sorting to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 276 (36):34331-34338. doi:10.1074/jbc.M104627200
359. Hasbi A, Allouche S, Sichel F, Stanasila L, Massotte D, Landemore G, Polastron J, Jauzac P (2000) Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 293 (1):237-247
360. Zhao J, Pei G, Huang YL, Zhong FM, Ma L (1997) Carboxyl terminus of delta opioid receptor is required for agonist-dependent receptor phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 238 (1):71-76. doi:10.1006/bbrc.1997.7242
361. Chakrabarti S, Yang W, Law PY, Loh HH (1997) The mu-opioid receptor down-regulates differently from the delta-opioid receptor: requirement of a high affinity receptor/G protein complex formation. *Molecular pharmacology* 52 (1):105-113
362. Law PY, Hom DS, Loh HH (1984) Down-regulation of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. Chloroquine promotes accumulation of tritiated enkephalin in the lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 259 (7):4096-4104
363. Tsao PI, von Zastrow M (2000) Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 275 (15):11130-11140
364. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD (2011) The ESCRT pathway. *Developmental cell* 21 (1):77-91. doi:10.1016/j.devcel.2011.05.015
365. Raiborg C, Stenmark H (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458 (7237):445-452. doi:10.1038/nature07961

366. Henry AG, White IJ, Marsh M, von Zastrow M, Hislop JN (2011) The role of ubiquitination in lysosomal trafficking of delta-opioid receptors. *Traffic* 12 (2):170-184. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01145.x
367. Hislop JN, Henry AG, Marchese A, von Zastrow M (2009) Ubiquitination regulates proteolytic processing of G protein-coupled receptors after their sorting to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 284 (29):19361-19370. doi:10.1074/jbc.M109.001644
368. He C, Wei Y, Sun K, Li B, Dong X, Zou Z, Liu Y, Kinch LN, Khan S, Sinha S, Xavier RJ, Grishin NV, Xiao G, Eskelinen EL, Scherer PE, Whistler JL, Levine B (2013) Beclin 2 functions in autophagy, degradation of G protein-coupled receptors, and metabolism. *Cell* 154 (5):1085-1099. doi:10.1016/j.cell.2013.07.035
369. Marley A, von Zastrow M (2010) Dysbindin promotes the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors to lysosomes. *PLoS one* 5 (2):e9325. doi:10.1371/journal.pone.0009325
370. Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, Von Zastrow M (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297 (5581):615-620. doi:10.1126/science.1073308
371. Hislop JN, von Zastrow M (2011) Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors. *Traffic* 12 (2):137-148. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01121.x
372. Martini L, Thompson D, Kharazia V, Whistler JL (2010) Differential regulation of behavioral tolerance to WIN55,212-2 by GASP1. *Neuropsychopharmacology* 35 (6):1363-1373. doi:10.1038/npp.2010.6
373. Trapaidze N, Gomes I, Bansinath M, Devi LA (2000) Recycling and resensitization of delta opioid receptors. *DNA and cell biology* 19 (4):195-204. doi:10.1089/104454900314465
374. Marie N, Lecoq I, Jauzac P, Allouche S (2003) Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. *The Journal of biological chemistry* 278 (25):22795-22804. doi:10.1074/jbc.M300084200
375. Gupta A, Gomes I, Wardman J, Devi LA (2014) Opioid receptor function is regulated by post-endocytic peptide processing. *The Journal of biological chemistry* 289 (28):19613-19626. doi:10.1074/jbc.M113.537704
376. Faget L, Erbs E, Le Merrer J, Scherrer G, Matifas A, Benturquia N, Noble F, Decossas M, Koch M, Kessler P, Vonesch JL, Schwab Y, Kieffer BL, Massotte D (2012) In vivo visualization of delta opioid receptors upon physiological activation uncovers a distinct internalization profile. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (21):7301-7310. doi:10.1523/JNEUROSCI.0185-12.2012
377. Stoeber M, Jullie D, Lobingier BT, Laeremans T, Steyaert J, Schiller PW, Manglik A, von Zastrow M (2018) A Genetically Encoded Biosensor Reveals Location Bias of Opioid Drug Action. *Neuron* 98 (5):963-976 e965. doi:10.1016/j.neuron.2018.04.021
378. Rosciglione S, Theriault C, Boily MO, Paquette M, Lavoie C (2014) Galphas regulates the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Nature communications* 5:4556. doi:10.1038/ncomms5556
379. Abu-Helo A, Simonin F (2010) Identification and biological significance of G protein-coupled receptor associated sorting proteins (GASPs). *Pharmacology & therapeutics* 126 (3):244-250. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.03.004
380. Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, Lohse MJ (2009) Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS biology* 7 (8):e1000172. doi:10.1371/journal.pbio.1000172

381. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, Gardella TJ, Vilaradaga JP (2009) Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nature chemical biology* 5 (10):734-742. doi:10.1038/nchembio.206
382. Irannejad R, von Zastrow M (2014) GPCR signaling along the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology* 27:109-116. doi:10.1016/j.ceb.2013.10.003
383. Pavlos NJ, Friedman PA (2017) GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28 (3):213-226. doi:10.1016/j.tem.2016.10.007
384. Steinberg F, Gallon M, Winfield M, Thomas EC, Bell AJ, Heesom KJ, Tavare JM, Cullen PJ (2013) A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nature cell biology* 15 (5):461-471. doi:10.1038/ncb2721
385. Temkin P, Lauffer B, Jager S, Cimermancic P, Krogan NJ, von Zastrow M (2011) SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature cell biology* 13 (6):715-721. doi:10.1038/ncb2252
386. Seaman MN, Gautreau A, Billadeau DD (2013) Retromer-mediated endosomal protein sorting: all WASHed up! *Trends Cell Biol* 23 (11):522-528. doi:10.1016/j.tcb.2013.04.010
387. Teasdale RD, Collins BM (2012) Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *The Biochemical journal* 441 (1):39-59. doi:10.1042/BJ20111226
388. Gallon M, Clairfeuille T, Steinberg F, Mas C, Ghai R, Sessions RB, Teasdale RD, Collins BM, Cullen PJ (2014) A unique PDZ domain and arrestin-like fold interaction reveals mechanistic details of endocytic recycling by SNX27-retromer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (35):E3604-3613. doi:10.1073/pnas.1410552111
389. Feinstein TN, Wehbi VL, Ardura JA, Wheeler DS, Ferrandon S, Gardella TJ, Vilaradaga JP (2011) Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nature chemical biology* 7 (5):278-284. doi:10.1038/nchembio.545
390. Chan AS, Clairfeuille T, Landao-Bassonga E, Kinna G, Ng PY, Loo LS, Cheng TS, Zheng M, Hong W, Teasdale RD, Collins BM, Pavlos NJ (2016) Sorting nexin 27 couples PTHR trafficking to retromer for signal regulation in osteoblasts during bone growth. *Molecular biology of the cell* 27 (8):1367-1382. doi:10.1091/mbc.E15-12-0851
391. Xiong L, Xia WF, Tang FL, Pan JX, Mei L, Xiong WC (2016) Retromer in Osteoblasts Interacts With Protein Phosphatase 1 Regulator Subunit 14C, Terminates Parathyroid Hormone's Signaling, and Promotes Its Catabolic Response. *EBioMedicine* 9:45-60. doi:10.1016/j.ebiom.2016.05.028
392. Tian X, Irannejad R, Bowman SL, Du Y, Puthenveedu MA, von Zastrow M, Benovic JL (2016) The alpha-Arrestin ARRDC3 Regulates the Endosomal Residence Time and Intracellular Signaling of the beta2-Adrenergic Receptor. *The Journal of biological chemistry* 291 (28):14510-14525. doi:10.1074/jbc.M116.716589
393. Qian J, Wu C, Chen X, Li X, Ying G, Jin L, Ma Q, Li G, Shi Y, Zhang G, Zhou N (2014) Differential requirements of arrestin-3 and clathrin for ligand-dependent and -independent internalization of human G protein-coupled receptor 40. *Cellular signalling* 26 (11):2412-2423. doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.019
394. Charest-Morin X, Fortin S, Lodge R, Roy C, Gera L, Gaudreault RC, Marceau F (2013) Inhibitory effects of cytoskeleton disrupting drugs and GDP-locked Rab mutants on bradykinin B(2) receptor cycling. *Pharmacological research* 71:44-52. doi:10.1016/j.phrs.2013.02.007
395. Cunningham MR, Nisar SP, Cooke AE, Emery ED, Mundell SJ (2013) Differential endosomal sorting of a novel P2Y12 purinoreceptor mutant. *Traffic* 14 (5):585-598. doi:10.1111/tra.12054
396. Li Y, Roy BD, Wang W, Zhang L, Zhang L, Sampson SB, Yang Y, Lin DT (2012) Identification of two functionally distinct endosomal recycling pathways for dopamine D(2) receptor. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 32 (21):7178-7190. doi:10.1523/JNEUROSCI.0008-12.2012

397. Macia E, Partisani M, Paleotti O, Luton F, Franco M (2012) Arf6 negatively controls the rapid recycling of the beta2 adrenergic receptor. *Journal of cell science* 125 (Pt 17):4026-4035. doi:10.1242/jcs.102343

398. Roman-Vendrell C, Yu YJ, Yudowski GA (2012) Fast modulation of mu-opioid receptor (MOR) recycling is mediated by receptor agonists. *The Journal of biological chemistry* 287 (18):14782-14791. doi:10.1074/jbc.M111.319616

399. Conti F, Sertic S, Reversi A, Chini B (2009) Intracellular trafficking of the human oxytocin receptor: evidence of receptor recycling via a Rab4/Rab5 "short cycle". *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296 (3):E532-542. doi:10.1152/ajpendo.90590.2008

400. Cheng SB, Filardo EJ (2012) Trans-Golgi Network (TGN) as a regulatory node for beta1-adrenergic receptor (beta1AR) down-modulation and recycling. *The Journal of biological chemistry* 287 (17):14178-14191. doi:10.1074/jbc.M111.323782

401. Hierro A, Rojas AL, Rojas R, Murthy N, Effantin G, Kajava AV, Steven AC, Bonifacino JS, Hurley JH (2007) Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449 (7165):1063-1067. doi:10.1038/nature06216

402. Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS (2007) Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Molecular and cellular biology* 27 (3):1112-1124. doi:10.1128/MCB.00156-06

403. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J (2014) Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in cell & developmental biology* 31:2-10. doi:10.1016/j.semcd.2014.03.034

404. McDermott H, Kim K (2015) Molecular dynamics at the endocytic portal and regulations of endocytic and recycling traffics. *European journal of cell biology* 94 (6):235-248. doi:10.1016/j.ejcb.2015.04.003

405. De Matteis MA, Luini A (2008) Exiting the Golgi complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 9 (4):273-284. doi:10.1038/nrm2378

406. Campelo F, Malhotra V (2012) Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annual review of biochemistry* 81:407-427. doi:10.1146/annurev-biochem-051710-094912

407. Deborde S, Perret E, Gravotta D, Deora A, Salvarezza S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E (2008) Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* 452 (7188):719-723. doi:10.1038/nature06828

408. Dell'Angelica EC, Puertollano R, Mullins C, Aguilar RC, Vargas JD, Hartnell LM, Bonifacino JS (2000) GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* 149 (1):81-94

409. Cao H, Weller S, Orth JD, Chen J, Huang B, Chen JL, Stamnes M, McNiven MA (2005) Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nature cell biology* 7 (5):483-492. doi:10.1038/ncb1246

410. Carreno S, Engqvist-Goldstein AE, Zhang CX, McDonald KL, Drubin DG (2004) Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 165 (6):781-788. doi:10.1083/jcb.200403120

411. Lazaro-Dieguez F, Colonna C, Cortegano M, Calvo M, Martinez SE, Egea G (2007) Variable actin dynamics requirement for the exit of different cargo from the trans-Golgi network. *FEBS letters* 581 (20):3875-3881. doi:10.1016/j.febslet.2007.07.015

412. Casella JF, Flanagan MD, Lin S (1981) Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* 293 (5830):302-305

413. Rosso S, Bollati F, Bisbal M, Peretti D, Sumi T, Nakamura T, Quiroga S, Ferreira A, Caceres A (2004) LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. *Molecular biology of the cell* 15 (7):3433-3449. doi:10.1091/mbc.E03-05-0328
414. Aspenstrom P (1999) Effectors for the Rho GTPases. *Current opinion in cell biology* 11 (1):95-102
415. Zoudilova M, Min J, Richards HL, Carter D, Huang T, DeFea KA (2010) beta-Arrestins scaffold cofilin with chronophin to direct localized actin filament severing and membrane protrusions downstream of protease-activated receptor-2. *The Journal of biological chemistry* 285 (19):14318-14329. doi:10.1074/jbc.M109.055806
416. Lin T, Zeng L, Liu Y, DeFea K, Schwartz MA, Chien S, Shyy JY (2003) Rho-ROCK-LIMK-cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins. *Circulation research* 92 (12):1296-1304. doi:10.1161/01.RES.0000078780.65824.8B
417. Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V (2001) Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104 (3):409-420
418. Yeaman C, Ayala MI, Wright JR, Bard F, Bossard C, Ang A, Maeda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson WJ, Malhotra V (2004) Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nature cell biology* 6 (2):106-112. doi:10.1038/ncb1090
419. Wakana Y, van Galen J, Meissner F, Scarpa M, Polishchuk RS, Mann M, Malhotra V (2012) A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *The EMBO journal* 31 (20):3976-3990. doi:10.1038/emboj.2012.235
420. Malhotra V, Campelo F (2011) PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (2). doi:10.1101/cshperspect.a005280
421. Li G, Marlin MC (2015) Rab family of GTPases. *Methods in molecular biology* 1298:1-15. doi:10.1007/978-1-4939-2569-8\_1
422. Barbero P, Bittova L, Pfeffer SR (2002) Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol* 156 (3):511-518. doi:10.1083/jcb.200109030
423. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122 (5):735-749. doi:10.1016/j.cell.2005.06.043
424. Aniento F, Gu F, Parton RG, Gruenberg J (1996) An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol* 133 (1):29-41
425. Deretic V (2005) Ay, there's the Rab: organelle maturation by Rab conversion. *Developmental cell* 9 (4):446-448. doi:10.1016/j.devcel.2005.08.013
426. Gruenberg J, Stenmark H (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews Molecular cell biology* 5 (4):317-323. doi:10.1038/nrm1360
427. Bastin G, Heximer SP (2013) Rab family proteins regulate the endosomal trafficking and function of RGS4. *The Journal of biological chemistry* 288 (30):21836-21849. doi:10.1074/jbc.M113.466888
428. Georgoussi Z, Leontiadis L, Mazarakou G, Merkouris M, Hyde K, Hamm H (2006) Selective interactions between G protein subunits and RGS4 with the C-terminal domains of the mu- and delta-opioid receptors regulate opioid receptor signaling. *Cellular signalling* 18 (6):771-782. doi:10.1016/j.cellsig.2005.07.003
429. Rojas R, van Vlijmen T, Mardones GA, Prabhu Y, Rojas AL, Mohammed S, Heck AJ, Raposo G, van der Sluijs P, Bonifacino JS (2008) Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* 183 (3):513-526. doi:10.1083/jcb.200804048
430. Dale LB, Seachrist JL, Babwah AV, Ferguson SS (2004) Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *The Journal of biological chemistry* 279 (13):13110-13118. doi:10.1074/jbc.M313333200
431. Fan GH, Lapierre LA, Goldenring JR, Richmond A (2003) Differential regulation of CXCR2 trafficking by Rab GTPases. *Blood* 101 (6):2115-2124. doi:10.1182/blood-2002-07-1965

432. Choudhury A, Marks DL, Pagano RE (2005) Use of Rab GTPases to study lipid trafficking in normal and sphingolipid storage disease fibroblasts. *Methods Enzymol* 403:166-182. doi:10.1016/S0076-6879(05)03014-4
433. Kloer DP, Rojas R, Ivan V, Moriyama K, van Vlijmen T, Murthy N, Ghirlando R, van der Sluijs P, Hurley JH, Bonifacino JS (2010) Assembly of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) and its interaction with Rab9. *The Journal of biological chemistry* 285 (10):7794-7804. doi:10.1074/jbc.M109.069088
434. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A (2007) Rab GTPases at a glance. *Journal of cell science* 120 (Pt 22):3905-3910. doi:10.1242/jcs.015909
435. Castillo-Badillo JA, Sanchez-Reyes OB, Alfonzo-Mendez MA, Romero-Avila MT, Reyes-Cruz G, Garcia-Sainz JA (2015) alpha1B-adrenergic receptors differentially associate with Rab proteins during homologous and heterologous desensitization. *PloS one* 10 (3):e0121165. doi:10.1371/journal.pone.0121165
436. Alfonzo-Mendez MA, Hernandez-Espinosa DA, Carmona-Rosas G, Romero-Avila MT, Reyes-Cruz G, Garcia-Sainz JA (2017) Protein Kinase C Activation Promotes alpha1B-Adrenoceptor Internalization and Late Endosome Trafficking through Rab9 Interaction. Role in Heterologous Desensitization. *Molecular pharmacology* 91 (4):296-306. doi:10.1124/mol.116.106583
437. Snyder JC, Rochelle LK, Lyerly HK, Caron MG, Barak LS (2013) Constitutive internalization of the leucine-rich G protein-coupled receptor-5 (LGR5) to the trans-Golgi network. *The Journal of biological chemistry* 288 (15):10286-10297. doi:10.1074/jbc.M112.447540
438. Carroll KS, Hanna J, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR (2001) Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* 292 (5520):1373-1376. doi:10.1126/science.1056791
439. Aivazian D, Serrano RL, Pfeffer S (2006) TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J Cell Biol* 173 (6):917-926. doi:10.1083/jcb.200510010
440. Burguete AS, Sivars U, Pfeffer S (2005) Purification and analysis of TIP47 function in Rab9-dependent mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Methods Enzymol* 403:357-366. doi:10.1016/S0076-6879(05)03031-4
441. Wilcke M, Johannes L, Galli T, Mayau V, Goud B, Salamero J (2000) Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol* 151 (6):1207-1220
442. Chen W, Feng Y, Chen D, Wandinger-Ness A (1998) Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Molecular biology of the cell* 9 (11):3241-3257
443. Grimsey NL, Goodfellow CE, Dragunow M, Glass M (2011) Cannabinoid receptor 2 undergoes Rab5-mediated internalization and recycles via a Rab11-dependent pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1813 (8):1554-1560. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.05.010
444. Ren M, Xu G, Zeng J, De Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD (1998) Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11):6187-6192
445. Brejchova J, Vosahlikova M, Roubalova L, Parenti M, Mauri M, Chernyavskiy O, Svoboda P (2016) Plasma membrane cholesterol level and agonist-induced internalization of delta-opioid receptors; colocalization study with intracellular membrane markers of Rab family. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 48 (4):375-396. doi:10.1007/s10863-016-9667-7
446. Shin HW, Hayashi M, Christoforidis S, Lacas-Gervais S, Hoepfner S, Wenk MR, Modregger J, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Nystuen A, Frankel WN, Solimena M, De Camilli P, Zerial M (2005) An



enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol* 170 (4):607-618. doi:10.1083/jcb.200505128

447. Falguieres T, Luyet PP, Gruenberg J (2009) Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp Cell Res* 315 (9):1567-1573. doi:10.1016/j.yexcr.2008.12.006

448. Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP (2007) Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128 (5):841-852. doi:10.1016/j.cell.2007.01.035

449. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brugger B, Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319 (5867):1244-1247. doi:10.1126/science.1153124

450. Falguieres T, Luyet PP, Bissig C, Scott CC, Velluz MC, Gruenberg J (2008) In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Molecular biology of the cell* 19 (11):4942-4955. doi:10.1091/mbc.E08-03-0239

451. Luyet PP, Falguieres T, Pons V, Pattnaik AK, Gruenberg J (2008) The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic* 9 (12):2279-2290. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00820.x

452. Dores MR, Chen B, Lin H, Soh UJ, Paing MM, Montagne WA, Meerloo T, Trejo J (2012) ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J Cell Biol* 197 (3):407-419. doi:10.1083/jcb.201110031

453. Dores MR, Grimsey NJ, Mendez F, Trejo J (2016) ALIX Regulates the Ubiquitin-Independent Lysosomal Sorting of the P2Y1 Purinergic Receptor via a YPX3L Motif. *PloS one* 11 (6):e0157587. doi:10.1371/journal.pone.0157587

454. Cahill CM, Walwyn W, Taylor AMW, Pradhan AAA, Evans CJ (2016) Allostatic Mechanisms of Opioid Tolerance Beyond Desensitization and Downregulation. *Trends in pharmacological sciences* 37 (11):963-976. doi:10.1016/j.tips.2016.08.002

455. Kang M, Maguma HT, Smith TH, Ross GR, Dewey WL, Akbarali HI (2012) The role of beta-arrestin2 in the mechanism of morphine tolerance in the mouse and guinea pig gastrointestinal tract. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 340 (3):567-576. doi:10.1124/jpet.111.186320

456. Duraffourd C, Kumala E, Anselmi L, Brecha NC, Sternini C (2014) Opioid-induced mitogen-activated protein kinase signaling in rat enteric neurons following chronic morphine treatment. *PloS one* 9 (10):e110230. doi:10.1371/journal.pone.0110230

457. Gulur P, Williams L, Chaudhary S, Koury K, Jaff M (2014) Opioid tolerance--a predictor of increased length of stay and higher readmission rates. *Pain physician* 17 (4):E503-507

458. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286 (5449):2495-2498

459. Melief EJ, Miyatake M, Bruchas MR, Chavkin C (2010) Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25):11608-11613. doi:10.1073/pnas.1000751107

460. Terman GW, Jin W, Cheong YP, Lowe J, Caron MG, Lefkowitz RJ, Chavkin C (2004) G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal. *British journal of pharmacology* 141 (1):55-64. doi:10.1038/sj.bjp.0705595

461. Walker EA, Young AM (2001) Differential tolerance to antinociceptive effects of mu opioids during repeated treatment with etonitazene, morphine, or buprenorphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 154 (2):131-142

462. Walwyn W, Evans CJ, Hales TG (2007) Beta-arrestin2 and c-Src regulate the constitutive activity and recycling of mu opioid receptors in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the*

official journal of the Society for Neuroscience 27 (19):5092-5104. doi:10.1523/JNEUROSCI.1157-07.2007

463. Maguma HT, Dewey WL, Akbarali HI (2012) Differences in the characteristics of tolerance to mu-opioid receptor agonists in the colon from wild type and beta-arrestin2 knockout mice. *European journal of pharmacology* 685 (1-3):133-140. doi:10.1016/j.ejphar.2012.04.001

464. Kuhar JR, Bedini A, Melief EJ, Chiu YC, Striegel HN, Chavkin C (2015) Mu opioid receptor stimulation activates c-Jun N-terminal kinase 2 by distinct arrestin-dependent and independent mechanisms. *Cellular signalling* 27 (9):1799-1806. doi:10.1016/j.cellsig.2015.05.019

465. Pradhan AA, Perroy J, Walwyn WM, Smith ML, Vicente-Sanchez A, Segura L, Bana A, Kieffer BL, Evans CJ (2016) Agonist-Specific Recruitment of Arrestin Isoforms Differentially Modify Delta Opioid Receptor Function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36 (12):3541-3551. doi:10.1523/JNEUROSCI.4124-15.2016

466. Raehal KM, Walker JK, Bohn LM (2005) Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314 (3):1195-1201. doi:10.1124/jpet.105.087254

467. Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hubner H, Huang XP, Sassano MF, Giguere PM, Lober S, Da D, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK (2016) Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537 (7619):185-190. doi:10.1038/nature19112

468. Singla N, Minkowitz, H., Soergel, D., Burt, D., and Skobieranda, F. (2016) (432) Respiratory safety signal with oliceridine (TRV130), a novel mu receptor G protein pathway selective modulator (mu-GPS), vs morphine: a safety analysis of a Phase 2b randomized clinical trial. *J Pain* 17: S82

469. Badshah SL, Ullah A, Al-Showiman SS, Mabkhot YN (2018) Better agonist for the opioid receptors. *Chemistry Central journal* 12 (1):13. doi:10.1186/s13065-018-0383-8

470. Beaudry H, Proteau-Gagne A, Li S, Dory Y, Chavkin C, Gendron L (2009) Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience* 161 (2):381-391. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.03.053

471. Lecoq I, Marie N, Jauzac P, Allouche S (2004) Different regulation of human delta-opioid receptors by SNC-80 [(+)-4-[(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide] and endogenous enkephalins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 310 (2):666-677. doi:10.1124/jpet.103.063958

472. Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, Huard K, Paquin-Gobeil M, Pineyro G (2009) Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (1):147-163. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00308.x

473. Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in pharmacological sciences* 32 (10):581-590. doi:10.1016/j.tips.2011.06.008

474. Marie N, Landemore G, Debout C, Jauzac P, Allouche S (2003) Pharmacological characterization of AR-M1000390 at human delta opioid receptors. *Life sciences* 73 (13):1691-1704

475. Haberstock-Debic H, Wein M, Barrot M, Colago EE, Rahman Z, Neve RL, Pickel VM, Nestler EJ, von Zastrow M, Svingos AL (2003) Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (10):4324-4332

476. McLennan GP, Kiss A, Miyatake M, Belcheva MM, Chambers KT, Pozek JJ, Mohabbat Y, Moyer RA, Bohn LM, Coscia CJ (2008) Kappa opioids promote the proliferation of astrocytes via Gbetagamma and beta-arrestin 2-dependent MAPK-mediated pathways. *Journal of neurochemistry* 107 (6):1753-1765. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05745.x

477. Tudashki HB, Robertson DN, Schiller PW, Pineyro G (2014) Endocytic profiles of delta-opioid receptor ligands determine the duration of rapid but not sustained cAMP responses. *Molecular pharmacology* 85 (1):148-161. doi:10.1124/mol.113.089003
478. Lauffer BE, Melero C, Temkin P, Lei C, Hong W, Kortemme T, von Zastrow M (2010) SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J Cell Biol* 190 (4):565-574. doi:10.1083/jcb.201004060
479. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53 (1):55-63
480. Groer CE, Schmid CL, Jaeger AM, Bohn LM (2011) Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 286 (36):31731-31741. doi:10.1074/jbc.M111.248310
481. Pineyro G, Archer-Lahlou E (2007) Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cellular signalling* 19 (1):8-19. doi:10.1016/j.cellsig.2006.05.026
482. Kenakin T, Christopoulos A (2013) Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nature reviews Drug discovery* 12 (6):483. doi:10.1038/nrd3954-c2
483. Rajagopal S, Ahn S, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Lam CM, Dewire SM, Violin JD, Lefkowitz RJ (2011) Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. *Molecular pharmacology* 80 (3):367-377. doi:10.1124/mol.111.072801
484. Martini L, Whistler JL (2007) The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Current opinion in neurobiology* 17 (5):556-564. doi:10.1016/j.conb.2007.10.004
485. Marie N, Aguila B, Allouche S (2006) Tracking the opioid receptors on the way of desensitization. *Cellular signalling* 18 (11):1815-1833. doi:10.1016/j.cellsig.2006.03.015
486. Schmid CL, Bohn LM (2009) Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation. *Pharmacology & therapeutics* 121 (3):285-293. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.11.005
487. Ferguson G, Watterson KR, Palmer TM (2000) Subtype-specific kinetics of inhibitory adenosine receptor internalization are determined by sensitivity to phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases. *Molecular pharmacology* 57 (3):546-552
488. Gupta A, Fujita W, Gomes I, Bobeck E, Devi LA (2015) Endothelin-converting enzyme 2 differentially regulates opioid receptor activity. *British journal of pharmacology* 172 (2):704-719. doi:10.1111/bph.12833
489. van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70 (5):729-740
490. Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madhus IH, Stang E, Stenmark H (2002) Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nature cell biology* 4 (5):394-398. doi:10.1038/ncb791
491. Diaz E, Schimmoller F, Pfeffer SR (1997) A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J Cell Biol* 138 (2):283-290
492. Diaz E, Pfeffer SR (1998) TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 93 (3):433-443
493. Le Blanc I, Luyet PP, Pons V, Ferguson C, Emans N, Petiot A, Mayran N, Demaurex N, Faure J, Sadoul R, Parton RG, Gruenberg J (2005) Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nature cell biology* 7 (7):653-664. doi:10.1038/ncb1269
494. Bissig C, Gruenberg J (2014) ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol* 24 (1):19-25. doi:10.1016/j.tcb.2013.10.009

495. Tomas A, Vaughan SO, Burgoyne T, Sorkin A, Hartley JA, Hochhauser D, Futter CE (2015) WASH and Tsg101/ALIX-dependent diversion of stress-internalized EGFR from the canonical endocytic pathway. *Nature communications* 6:7324. doi:10.1038/ncomms8324