

Université de Montréal

Développement d'un biosenseur BRET permettant le criblage de drogues qui causent l'activation de canaux Kir3 via les récepteurs couplés aux protéines G

par
Mélissa Richard-Lalonde

Département de pharmacologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences
en pharmacologie
option neuropharmacologie

août 2010

©, Mélissa Richard-Lalonde, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Développement d'un biosenseur BRET permettant le criblage de drogues qui
causent l'activation de canaux Kir3 via les récepteurs couplés aux protéines G

présenté par :

Mélissa Richard-Lalonde

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nikolaus Heveker
président-rapporteur

Graciela Piñeyro
directrice de recherche

Réjean Couture
membre du jury

Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines G forment des complexes multimériques comprenant protéines G et effecteurs. Nous cherchons à caractériser de tels complexes comprenant les récepteurs opioïdes delta (DOR) et les canaux Kir3, qui nous sont d'intérêt vu leur implication dans l'analgésie des opioïdes.

Des expériences d'immunopurification, de BRET et de liaison GTP γ S ont été réalisées à l'intérieur de cellules HEK293 transfectées. Les canaux Kir3 ont été co-immunopurifiés avec les DOR, suggérant une interaction spontanée entre récepteur et effecteur. Des essais BRET ont corroboré que l'interaction était présente dans des cellules vivantes et nous ont permis d'identifier une interaction spontanée et spécifique entre DOR/G γ et G γ /Kir3, indiquant leur coexistence en un même complexe. Puisque l'activation du récepteur implique la présence de changements conformationnels à l'intérieur de celui-ci, nous étions intéressés à vérifier si l'information conformationnelle circule à partir du récepteur lié au ligand jusqu'à l'effecteur en aval. Ainsi, nous avons déterminé l'effet de différents ligands sur le signal BRET généré par les paires suivantes : DOR/G $\beta\gamma$, DOR/Kir3 et Kir3/G $\beta\gamma$. Nous avons constaté une modulation de l'interaction DOR/G $\beta\gamma$ et G $\beta\gamma$ /Kir3 suivant l'ordre d'efficacité des ligands à stimuler la protéine G, ce que nous n'avons pas observé entre DOR et Kir3.

Donc, nous concluons que l'information conformationnelle circule du récepteur au canal Kir3 via la protéine G $\beta\gamma$. Ces résultats nous ont permis de développer un biosenseur BRET (EYFP-G γ_2 /Kir3.1-Rluc) qui pourrait être utilisé dans le criblage à haut débit afin de détecter de nouvelles molécules ayant une grande efficacité à activer les canaux Kir3.

Mots clés

Complexes multimériques, sélectivité fonctionnelle, récepteurs opioïdes delta, HEK293, conformations multiples

Summary

G protein-coupled receptors form multimeric complexes comprising G protein and effectors. We want to characterize such complexes comprising delta opioid receptors (DOR) and Kir3 channels, which interest us due to their involvement in opioid analgesia.

Immunopurification, BRET and GTP γ S binding experiments were done in transfected HEK293 cells. Kir3 channels were co-immunopurified with DOR, implying a spontaneous interaction between the receptor and effector. BRET assays corroborated the presence of this interaction in living cells and allowed us to identify a spontaneous and specific interaction between DOR/G γ and G γ /Kir3, indicating their co-existence within the same complex. Since the activation of the receptor implies it undergoes conformational changes, we were interested in evaluating if the conformational information flows from the ligand-bound receptor until the downstream effector. Hence, we determined the effect of different ligands on the BRET signal that was generated by the following pairs: DOR/G $\beta\gamma$, DOR/Kir3 and Kir3/G $\beta\gamma$. We noticed a modulation of the DOR/G $\beta\gamma$ and G $\beta\gamma$ /Kir3 interactions that followed the order of efficacy of the ligands to activate the G protein, which we did not observe between DOR and Kir3.

Therefore, we concluded that the conformational information flows from the receptor to the Kir3 channel via the G $\beta\gamma$ protein. These results allowed us to develop a BRET biosensor (EYFP-G γ_2 /Kir3.1-Rluc), which could be used in high throughput screening to detect new molecules that activate Kir3 channels with high efficacy.

Keywords

Multimeric complexes, functional selectivity, delta opioid receptors, HEK293, multiple conformations

Table des matières

1. Introduction et recension des écrits.....	1
1.1 Les circuits de la douleur	1
1.2 La distribution des RO	5
1.3 Les cibles analgésiques.....	15
1.4 Effets secondaires des opioïdes.....	17
1.5 Ligands des DOR.....	20
1.6 Structure et effecteurs des RO	24
1.7 Voies de signalisation	25
1.8 Existence de complexes multimériques	29
1.9 Sélectivité fonctionnelle.....	33
1.10 Criblage à haut débit	38
1.11 But du projet.....	43
2. Méthodologie	44
2.1 Réactifs.....	44
2.2 Plasmides	45
2.3 Culture cellulaire et transfection.....	46
2.4 Essais BRET.....	47
2.5 Co-IP des protéines étiquetées FLAG.....	50
2.6 Liaison de [³⁵ S]GTPγS.....	52
2.7 Analyse de données.....	52
3. Exposé et analyse des résultats	54

3.1 Les canaux potassiques Kir3 forment des complexes constitutifs avec les DOR et les protéines G hétérotrimériques	54
3.2 Étude de l'effet de ligands DOR sur l'interaction entre les différentes composantes du complexe DOR-G $\alpha\beta\gamma$ -Kir.....	63
3.2.1 L'effet des ligands au niveau de l'interaction DOR/canaux Kir3 est minimal et ne suit pas l'ordre d'efficacité connu des ligands.....	63
3.2.2 L'effet des ligands sur d'autres interactions à l'intérieur du complexe DOR/Kir3 est significatif et suit l'ordre d'efficacité connu des ligands.....	66
3.2.2.1 Étude de l'effet de ligands DOR sur l'interaction entre le récepteur DOR et la sous-unité G γ	66
3.2.2.2 Étude de l'effet de ligands DOR sur l'interaction entre la sous-unité G γ et les canaux potassiques Kir3	69
3.2.3 Les changements des signaux BRET induits par les ligands DOR à l'intérieur du biosenseur détectant les interactions entre G γ et Kir3 sont corrélés avec des paramètres de l'activation de la protéine G	75
3.2.4 L'interférence avec le ciblage membranaire du canal ou la prévention de l'interaction adéquate avec le dimère G $\beta\gamma$ réduit l'activité du biosenseur	77
4. Discussion générale.....	81
5. Conclusion	89
Références.....	92
Annexe I. Tableaux des conditions de transfection.....	xv
Annexe II. Figures 24 à 27.....	xxii
Annexe III. Revue Médecine Sciences.....	xxvi

Liste des tableaux

Tableau I. Liste des opioïdes et métabolites principaux qui se lient aux MOR et leurs affinités relatives à la morphine	18
Tableau II. Conditions de transfection pour la figure 11	xv
Tableau III. Conditions de transfection pour les figures 11 et 13.....	xvi
Tableau IV. Conditions de transfection pour la figure 13	xvi
Tableau V. Conditions de transfection pour la figure 24.....	xvi
Tableau VI. Conditions de transfection pour la figure 12	xvii
Tableau VII. Conditions de transfection pour la figure 14.....	xvii
Tableau VIII. Conditions de transfection pour la figure 15A.....	xvii
Tableau IX. Conditions de transfection pour la figure 15B.....	xviii
Tableau X. Conditions de transfection pour la figure 15C.....	xviii
Tableau XI. Conditions de transfection pour la figure 16	xviii
Tableau XII. Conditions de transfection pour la figure 17	xix
Tableau XIII. Conditions de transfection pour la figure 18.....	xix
Tableau XIV. Conditions de transfection pour la figure 20A.....	xix
Tableau XV. Conditions de transfection pour la figure 20B	xx
Tableau XVI. Conditions de transfection pour la figure 22.....	xx
Tableau XVII. Conditions de transfection pour la figure 23.....	xx
Tableau XVIII. Conditions de transfection pour la figure 25.....	xxi

Liste des figures

Figure 1. Anatomie des voies de la douleur	3
Figure 2. Distribution anatomique et expression relative des RO.....	12
Figure 3. L'échelle OMS à trois étapes pour soulager les douleurs cancéreuses.....	16
Figure 4. Structure des ligands utilisés dans notre étude.....	23
Figure 5. Voie de signalisation des canaux Kir3	26
Figure 6. Les domaines de liaison des protéines G dans la structure de la sous-unité Kir3.1	27
Figure 7. Adaptation des MOR au traitement chronique de la morphine	30
Figure 8. La sélectivité fonctionnelle	35
Figure 9. Courbes de saturation [3H]Naltrindole et courbes de déplacement [3H]Naltrindole par DPDPE	36
Figure 10. La méthode BRET	41
Figure 11. Les canaux potassiques Kir3 interagissent de façon spécifique et constitutive avec DOR	55
Figure 12. Le traitement avec DPDPE n'affecte pas la quantité de Kir3.1 récupérée avec le FLAG-DOR immunopurifié.....	58
Figure 13. Les canaux potassiques Kir3 interagissent de façon constitutive et spécifique avec des complexes comprenant la sous-unité $G\gamma_2$ hétérotrimérique et cette interaction est modulable par un agoniste.....	60
Figure 14. Le traitement avec DPDPE n'affecte pas la quantité de $G\gamma_2$ récupérée avec le FLAG-Kir3.1 immunopurifié.....	62
Figure 15. Les ligands du DOR ne modifient pas l'interaction du récepteur avec l'effecteur.....	65
Figure 16. La liaison de ligands au DOR modifie le transfert énergétique à l'interface du récepteur avec la sous-unité $G\gamma_2$ de la protéine G hétérotrimérique	68

Figure 17. La liaison de différents ligands au DOR induit un changement de transfert d'énergie entre les paires BRET déterminant l'interaction $G\gamma/Kir3.1$	70
Figure 18. La liaison de différents ligands au DOR induit un changement dans le transfert d'énergie entre les paires BRET déterminant l'interaction $G\gamma/Kir3.2$	72
Figure 19. Les changements BRET induits par les ligands à l'interface de DOR/ $G\beta\gamma$ sont directement corrélés à ceux qui prennent place à l'interface de $G\beta\gamma/Kir3.1$	73
Figure 20. Les changements BRET induits par les ligands à l'interface de DOR/ $G\beta\gamma$ (A) ou de $G\beta\gamma/Kir3.1$ (B) sont concentration-dépendants	74
Figure 21. La capacité des ligands à induire des changements dans le signal BRET généré par le biosenseur $G\beta\gamma/Kir3.1$ est corrélée avec les paramètres de l'activation de la protéine G	76
Figure 22. La capacité des ligands DOR à modifier l'interaction de $G\beta\gamma$ avec les sous-unités Kir3.1 est réduite en absence de la sous-unité Kir3.2	78
Figure 23. Les changements conformationnels subis par les sous-unités $G\beta\gamma$, suite à la liaison du ligand au récepteur, sont ressentis par les Kir3.1 de type naturel et non pas par les Kir3.1 qui n'ont pas les sites d'interaction du dimère.....	80
Figure 24. Le signal BRET diminue lorsque Kir3.1-Rluc est déplacé par FLAG-Kir3.1.....	xxii
Figure 25. Les canaux potassiques Kir3 interagissent de façon constitutive et spécifique avec des complexes comprenant la sous-unité $G\gamma_2$ hétérotrimérique et l'absence du récepteur DOR rend cette interaction non modulable par un agoniste.....	xxiii
Figure 26. La distribution subcellulaire de Kir3.1 en présence et en absence de la sous-unité Kir3.2 : Kir3.1-Rluc se colocalise avec les DOR membranaires en présence mais moins en absence de Kir3.2.....	xxiv
Figure 27. L'effet électrophysiologique du ligand SNC-80 sur les cellules qui co-expriment DOR, $G\beta_1\gamma_2$ et Kir3.1/3.2 est annonciateur de l'activation du canal potassique Kir3.....	xxv

Liste des sigles et abréviations

[³⁵S]GTPγS : guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate étiqueté par l'isotope ³⁵S

5-HT : sérotonine (5-hydroxy-tryptamine)

AC : l'adénylate cyclase

ADP : adénosine diphosphate

AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

AMP_c : adénosine monophosphate cyclique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ASIC : *acid-sensing ion channel*

BiFC : *bimolecular fluorescence complementation*

BRET : *bioluminescence resonance energy transfer*

BW : buvardage de Western

CB1 : cannabinoïde de type 1

DOR : récepteur opioïde delta

DPDPE : c[D-pénicillamine²,D-pénicillamine⁵]enképhaline

EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

EYFP: *enhanced yellow fluorescent protein*

FDA : *Food and Drug Administration*

FRET : *Förster resonance energy transfer*

GABA : acide γ-aminobutyrique

GDP : guanosine diphosphate

GFP : *green fluorescent protein*

GRK : kinase de récepteur couplé aux protéines G

GTPase : hydrolase guanosine triphosphate

GTP : guanosine triphosphate

HEK293 : *human embryonic kidney 293 cells*

IP : immunopurification

JNK : protéine kinase c-Jun N-terminale

Kir3 : *inward-rectifier potassium ion channel member 3*

KOR : récepteur opioïde kappa

MgCl₂ : chlorure de magnésium

MOR : récepteur opioïde mu

NaCl : chlorure de sodium

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

NOR : récepteur opioïde nociceptine

OMS : organisation mondiale de la santé

PBS : *phosphate buffered saline*

PEI : polyéthylénimine

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PTX : toxine pertussique

Ras : *rat sarcoma*

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

Rluc: luciférase de *Renilla reniformis*

RO : récepteur opioïde

RT-PCR : *reverse transcription-polymerase chain reaction*

SNC : système nerveux central

SNC-80 : (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyloxy)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide

SNP : système nerveux périphérique

Src : sarcoma

STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*

TEP : tomographie par émission de positrons

TICP : H-Tyr-Ticψ[CH₂-NH]Cha-Phe-OH

TIPP : H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

TRPV : *transient receptor potential vanilloid*

UFP-512 : H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid

YFP : *yellow fluorescent protein*

*À Anthony,
pour la vie*

Remerciements

Je souhaite remercier le Dr P. Schiller d'avoir généreusement fourni les ligands TICP, TIPP; le Dr G. Balboni pour l'UFP-512; le Dr L.A. Devi pour les plasmides d'expression de DOR-EYFP et de DOR-Rluc; le Dr H. Zing pour le plasmide d'expression de Δ CD8-EYFP; le Dr Murray pour le plasmide d'expression de FLAG-DOR; le Dr T. Hébert pour les plasmides d'expression de FLAG-Kir3.1, Kir3.1-Rluc, Kir3.1 Δ 183-342-Rluc, Kir3.1 Δ 342-501-Rluc, Kir3.2-Rluc et Kir3.2, et le Dr Bouvier pour les plasmides d'expression de $G\alpha_o$, $G\alpha_{i1}$, $G\beta_1$, $G\gamma_2$, et EYFP- $G\gamma_2$.

Je remercie également tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ma maîtrise et l'aboutissement de cet ouvrage : professeurs, collègues, amis, famille et belle-famille. Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Graciela Piñeyro pour m'avoir guidé tout au long de ces deux dernières années, ainsi que les membres du laboratoire que j'ai eu l'honneur de côtoyer : Mohammad Amraei, Nicolas Audet, Élodie Archer-Lahlou, Ouissame Mnie-Filali, Ines Charfi, Claire Liauzun et Karim Nagi.

Merci à mes parents qui ont eu la patience de lire et corriger mon français qui est loin d'être parfait. Merci à mes amis, ma famille et ma belle-famille pour tout leur soutien et surtout, merci à mon mari qui en connaît aujourd'hui beaucoup plus sur la pharmacologie des opioïdes que la majorité de ses collègues architectes...

1. Introduction et recension des écrits

1.1 Les circuits de la douleur

La douleur est définie par la *International Association for the Study of Pain* comme étant « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en terme d'une telle lésion » [1]. On reconnaît depuis longtemps l'importance de l'évolution du système de la douleur dans la survie des organismes multicellulaires. Ce système comprend divers neurones permettant aux vertébrés, et à quelques invertébrés, de réagir à un environnement présentant régulièrement des stimuli nuisibles. Ces neurones spécialisés, dénommés « nocicepteurs », existent en différents formats et degrés de myélinisation, et expriment une multitude de protéines, tout dépendant de leur rôle dans la communication de la douleur [2]. Il existe deux classes de nocicepteurs : les fibres $A\delta$ et les fibres C. Les fibres $A\delta$, interviennent dans la première douleur, c'est-à-dire la douleur aiguë, rapide et localisée. Ces nocicepteurs d'un diamètre moyen sont myélinisés, mais à un degré inférieur aux grosses fibres $A\beta$ qui, elles, communiquent la stimulation mécanique normale. La deuxième classe de nocicepteurs, composée de fibres C, intervient dans la douleur secondaire, lente et moins bien localisée. Ces dernières sont d'un diamètre plus étroit que les fibres $A\delta$ et ne sont pas myélinisées [3].

Bien que la douleur soit un élément essentiel à la survie, il devient souvent nécessaire de la contrôler, par exemple lorsqu'elle est induite dans un contexte opératoire, ou encore lorsqu'elle devient chronique et perdure au point où la qualité de vie du patient en est atteinte. On peut catégoriser de façon générale deux types de douleur : la douleur « normale », parfois connue sous le nom de douleur « nociceptive » – bien que la nociception *per se* ne comprenne pas l'aspect émotionnel de la douleur – et la douleur « centrale. » La douleur dite normale survient lors d'un endommagement mécanique, thermique ou chimique du tissu, libérant des substances inflammatoires. Ceci active plusieurs terminaisons nerveuses périphériques qui sont quasi ou complètement inactives en temps normal. Ces neurones afférents primaires, dont les corps cellulaires se retrouvent dans les ganglions de la racine dorsale ou dans le ganglion de Gasser, aboutissent dans la moelle épinière, où ils transmettent l'information douloureuse à des neurones secondaires. Ces derniers se projettent au cerveau, pour aboutir au tronc cérébral et au thalamus, d'où le signal de douleur se divise entre un système discriminatoire sensoriel et un système régissant l'aspect affectif relié à la douleur, tous deux répartis dans différentes régions du cortex ou des noyaux thalamiques (figure 1, page 3). Il est important de préciser que la transmission du signal douloureux est modulable via plusieurs mécanismes, en direction ascendante comme descendante pour fins de contrôle, impliquant principalement les opioïdes endogènes, la sérotonine (5-HT) et la noradrénaline. Cette

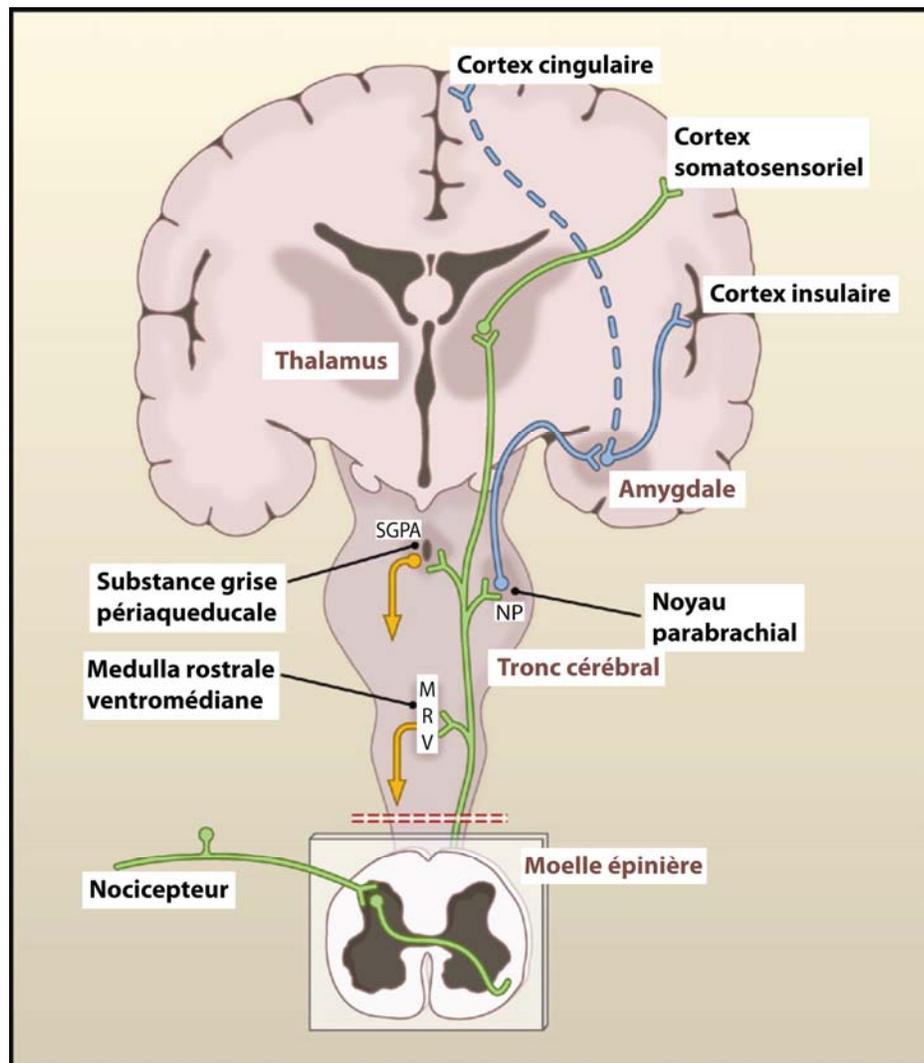


Figure 1. Anatomie des voies de la douleur

Les nocicepteurs afférents primaires transmettent l'information douloureuse aux neurones de projection dans la corne dorsale de la moelle épinière. Un sous-ensemble de ces neurones de projection transmet les informations au cortex somatosensoriel via le thalamus, fournissant des informations sur la localisation et l'intensité du stimulus douloureux. D'autres neurones de projection suscitent les cortex cingulaire et insulaire via des connexions dans le tronc cérébral (noyau parabrachial) et dans l'amygdale, contribuant à la composante affective de l'expérience de la douleur. Cette information ascendante accède également à des neurones du bulbe rachidien rostro-ventral et de la substance grise périaqueducale du mésencéphale afin d'engager des systèmes de rétroaction descendants qui régulent le signal à la moelle épinière. Modifié à partir de : (Basbaum, Bautista et al. 2009) [3]

modulation se produit via les interneurons présents dans la corne dorsale [4] et émerge également de plusieurs régions telles le cortex, le thalamus et le tronc cérébral, incluant la substance grise périaqueducale, les noyaux du raphé et le locus coeruleus [5]. La douleur normale est nécessaire à la détection de stimuli dangereux mais devient pathologique lorsqu'elle ne sert plus à cet effet et perpétue le signal douloureux de façon chronique. La douleur dite centrale provient de l'endommagement du système nerveux central (SNC), plus spécifiquement d'une des sections responsables de la perception de la douleur, comme suite à un accident vasculaire cérébral, à une hémorragie méningée, à une compression, à une blessure traumatique du cerveau, à un abcès ou à un processus de démyélinisation ou encore de dégénérescence [6].

Le signal douloureux est transmis d'un neurone à l'autre grâce à plusieurs protéines retrouvées à l'intérieur ou à la surface des cellules neuronales, notamment aux extrémités (synapses ou terminaisons nerveuses libres). Ces protéines consistent en des récepteurs membranaires tels que les récepteurs opioïdes (RO), α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate (AMPA), acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), glycine, acide γ -aminobutyrique (GABA), adrénergiques, 5-HT, cannabinoïde type 1 (CB1) et de l'adénosine et de leurs neurotransmetteurs respectifs; d'enzymes intracellulaires tels que les protéines kinases A (PKA), C (PKC), régulées par signal extracellulaire (ERK), p38 activées par des mitogènes et c-Jun N-terminale (JNK); ainsi que de canaux ioniques tels que certains canaux

potassiques, calciques, sodiques, potentiels récepteurs transitoires vanilloïdes (TRPV) et des canaux ioniques senseurs de l'acidification extracellulaire (ASIC) [7]. L'ouvrage présenté ici portera sur les récepteurs opioïdes delta (DOR) ainsi que sur les canaux potassiques à rectification entrante aux sous-unités 3.1 et 3.2 (Kir3.1 et Kir3.2).

1.2 La distribution des RO

Le système opioïde, apparu tôt dans l'évolution des vertébrés – il y a plus de 450 millions d'années – joue un rôle primordial dans la perception de la douleur ainsi que dans les mécanismes de récompense [8]. On reconnaît officiellement trois sous-types de RO : le δ (DOR) [9, 10], le μ (MOR) [11] et le κ (KOR) [12]. L'enképhaline, la β -endorphine et la dynorphine sont considérés comme étant les ligands endogènes desdits récepteurs, les deux premiers ayant une plus forte affinité pour les DOR et MOR, et le dernier ayant une plus forte affinité pour les KOR [13]. Un quatrième sous-type de récepteur légèrement plus éloigné des trois autres existe également, appelé le récepteur de la nociceptine (NOR), en référence à son ligand endogène [14]. Le NOR fait partie de la famille des RO mais il se différencie clairement des trois autres par son profil pharmacologique et ses propriétés pro-nociceptives [15].

La distribution des RO et de leurs ligands endogènes, telle que nous la connaissons aujourd'hui, est basée sur l'ensemble d'une variété de méthodes de localisation des récepteurs, dans plusieurs modèles précliniques tels que

rongeurs et primates non-humains, mais également chez l'humain, et ceci à partir d'échantillons obtenus post mortem de même qu'*in vivo*, par biopsies, prises de sang et, méthode de tomographie par émission de positrons (TEP). Les MOR sont à ce jour les RO les plus ciblés en analgésie clinique, simplement parce que la première molécule à avoir été utilisée comme analgésique est un agoniste MOR : la morphine.

Une étude d'immunohistochimie sur le SNC chez le rat a démontré la présence de MOR dans la corne dorsale de la moelle épinière, le noyau du tractus solitaire, le noyau ambigu, le locus coeruleus, le noyau interpedonculaire, le noyau latéral de l'habénula, le noyau accumbens, l'aire tegmentale ventrale, le thalamus, l'hypothalamus, les noyaux amygdaliens, le striatum, l'aire préoptique, et le cortex cérébral [16]. L'activation de RO induit différents effets physiologiques propres aux régions anatomiques où ils sont exprimés. Par exemple, chez les furets, les MOR de l'area postrema semblent être responsables de l'effet émétique causé par la morphine [17]. Les nausées et vomissements associés à l'utilisation prolongée d'opioïdes émergent aussi suite à l'activation des MOR gastro-intestinaux, qui freinent de façon importante le péristaltisme du tube digestif et causent, par la même occasion, l'important effet secondaire qu'est la constipation [18]. On pense que les symptômes d'abus et de dépendance aux opioïdes, c'est-à-dire l'euphorie, le plaisir, l'extase, l'excitation, les changements d'humeur et les propriétés de récompense, ainsi que les symptômes de sevrage, soit

l'irritabilité et la dysphorie, sont médiés à travers les MOR que l'on retrouve dans les neurones GABAergiques et leurs connections au système dopaminergique mésolimbique-mésocortical [19].

Chez le rat, l'activation des MOR et DOR du noyau accumbens – région critique pour lier la motivation à l'action – induit la consommation de l'éthanol et de la nourriture riche et sucrée en plus d'induire l'anti-nociception [20]. L'hippocampe et le cortex sont des régions du cerveau cruciales à la cognition, et les RO qui y sont présents jouent des rôles dans l'activation synaptique, l'apprentissage et la mémoire [21].

Bien que la majorité des recherches sur les RO soit axée sur le SNC, de plus en plus d'études s'intéressent aux récepteurs retrouvés à l'intérieur du système nerveux périphérique (SNP) : la morphine est un agoniste MOR qui agit sur les RO du SNC et du SNP (ou dans la périphérie) alors que certains nouveaux opioïdes interagissent principalement avec les RO localisés sur des cellules non-neuronales tels que les leucocytes [22]. D'ailleurs, une étude qui a utilisé plusieurs méthodes de visualisation des récepteurs, c'est-à-dire des anticorps contre les récepteurs ainsi que des étiquettes de la protéine fluorescente verte (GFP) directement liées aux récepteurs, a démontré l'existence d'une ségrégation dans la distribution des MOR et DOR dans les neurones afférentes primaires chez la souris : les MOR se retrouvent dans les nocicepteurs peptidergiques, alors que les DOR prédominent dans les neurones myélinisés et non-myélinisés non-peptidergiques. Cette démarcation

se traduit d'autant plus par une séparation fonctionnelle : le MOR serait associé à la perception de la douleur thermique et le DOR, à la perception de la douleur mécanique [23].

Chez l'humain, des études de TEP ont démontré l'activation des MOR dans plusieurs régions du cerveau : la substance grise périaqueducale, l'hypothalamus, le thalamus antérieur et latéral, la région ventrale des ganglions de la base (noyau accumbens et le pallidum ventral), l'amygdale, le cortex latéral préfrontal, le cortex insulaire antérieur et le cortex cingulaire antérieur [19]. D'autres expériences de TEP mesurant la liaison de MOR et le débit sanguin cérébral ont démontré une association entre les opioïdes endogènes dans les régions limbiques du lobe temporal ainsi que dans le prosencéphale basal et l'inhibition anxiolytique [24].

Les kératinocytes relâchent de la β -endorphine lorsqu'ils sont stimulés à l'intérieur de la peau, permettant ainsi un effet analgésique périphérique [22]. Les MOR et β -endorphines retrouvés dans les mélanocytes de l'épiderme humain joueraient aussi un rôle dans la pigmentation en régulant la mélanogenèse et la prolifération des mélanocytes [25]. Chez certains rongeurs et primates, l'inflammation en périphérie résulte en l'augmentation de la quantité de MOR et d'endomorphines exprimés à l'intérieur des neurones de la racine dorsale [22]. On retrouve plusieurs enképhalines, en dehors du SNC du rat, qui jouent un rôle dans le contrôle de la douleur de ces articulations : à l'intérieur de la membrane synoviale, de la moelle osseuse, du périoste et de

l'os juxta-articulaire [22]. Comme pour le reste des RO, très peu d'études ont été faites sur la distribution des MOR chez l'humain, à part de démontrer leur existence dans une panoplie de cellules immunitaires : lymphocytes T et B, monocytes, macrophages et neutrophiles [26].

Des souris, exprimant le gène DOR étiqueté de la protéine fluorescente verte renforcée (EGFP), ont été conçues, rendant ainsi possible la localisation *in vivo* de ces récepteurs. Chez les souris adultes, les DOR fluorescents ont été détectés dans plusieurs régions du SNC: dans la moelle épinière, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le striatum, l'amygdale basolatérale, ainsi que dans le cortex [27]. Ces souris *knock-in* ont permis de voir jusqu'à la neuro-anatomie des récepteurs, à travers le système nerveux, révélant leur présence dans les corps cellulaires et les extensions des interneurons de l'hippocampe, de l'amygdale basolatérale et de plusieurs sections du striatum [28]. Les DOR de l'hippocampe et du cortex de la souris joueraient un rôle dans la mémoire spatiale ainsi que dans la cognition [21]. Par ailleurs, les DOR du cortex prémoteur, du striatum sensori-moteur et associatif ont été associés au fonctionnement de la motricité du rat [29]. Effectivement, des études de TEP ont confirmé la distribution des DOR chez l'humain en la corrélant avec d'autres études d'autoradiographie et d'acide ribonucléique messenger (ARNm) faites auparavant [30].

Chez les souris adultes, les DOR fluorescents ont été détectés dans plusieurs régions du SNP dont les ganglions de la racine dorsale [27]. Les

DOR se retrouvent également en dehors du système nerveux : dans des lymphocytes [31] et dans des cellules de peau récoltées par des biopsies de volontaires sains [32]. La présence de plusieurs RO, à la surface de cardiomyocytes et kératinocytes, suggère également l'intervention d'opioïdes endogènes lors de la croissance et maturation de certaines cellules ou tissus [33].

Récemment, dans une étude d'imagerie *in vivo* jumelant la technologie de TEP et d'un radiotracer, on a observé que la distribution des KOR dans le cerveau du babouin serait retrouvée en plus grande concentration dans le cortex préfrontal et cingulé, ainsi que dans le striatum [34]. Plusieurs groupes de chercheurs ont étudié la distribution des KOR chez l'humain. Parmi les régions de cerveaux humains examinés à l'intérieur d'une banque d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) de cerveau humain fœtal, on a retrouvé des concentrations élevées d'ARNm de KOR dans l'amygdale, le noyau caudé, l'hypothalamus et le noyau sous-thalamique (suggérant un rôle des KOR dans le contrôle moteur); des concentrations modérées dans l'hippocampe et le thalamus; de faibles concentrations dans la substance noire et le corps calleux [35]. Également, en disséquant quelques cerveaux humains 5-20h post mortem, une étude de transcription inverse suivie de réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) et d'hybridation *in situ* a estimé l'expression des KOR dans une multitude de régions: la moelle épinière au niveau cervical, dorsal et lombaire, l'hypophyse, le locus coeruleus, la substance noire, le

globus pallidus, le corpus mamillare, les colliculi supérieur et inférieur, le noyau olivaire, le bulbe olfactif, le noyau accumbens, le striatum, les noyaux thalamiques, l'amygdale, l'hypothalamus, l'aire tegmentale ventrale, l'hippocampe cérébelleux, ainsi qu'à travers le cortex [36]. On retrouve également des KOR à l'extérieur du système nerveux : à partir d'échantillons de sang (lymphocytes) provenant de volontaires sains, de l'ARNm des KOR a été extrait [37]. De plus, en analysant des échantillons de peau humains [32] ainsi que des cultures de kératinocytes, des expériences de RT-PCR et d'immunohistochimie ont permis de découvrir la présence de KOR et de dynorphines dans ces tissus [22].

Enfin, une revue publiée en 2009 a compilé et comparé exhaustivement la distribution des trois RO principaux (DOR, KOR et MOR) dans le cerveau de rats et de souris, étant donné la provenance de la majorité des recherches faites à ce jour [38]. Principalement, les trois types de récepteurs sont exprimés dans le cortex, le système limbique et le tronc cérébral, mais les DOR sont plus abondants que les autres RO dans le tractus olfactif, les cellules corticales et le striatum, alors qu'ils le sont moins dans les régions de l'hypothalamus, du thalamus, du mésencéphale et du tronc cérébral [38]. Les DOR sont les seuls RO que l'on retrouve dans la région du noyau pontique; les KOR, dans sept régions du cerveau constituant l'axe du stress; et les MOR, dans quatre noyaux thalamiques, le noyau trijumeau sensoriel et le

noyau ambigu. Les KOR et MOR coexistent dans la plupart des structures, mais les KOR sont plus abondants dans la région prosencéphale basale

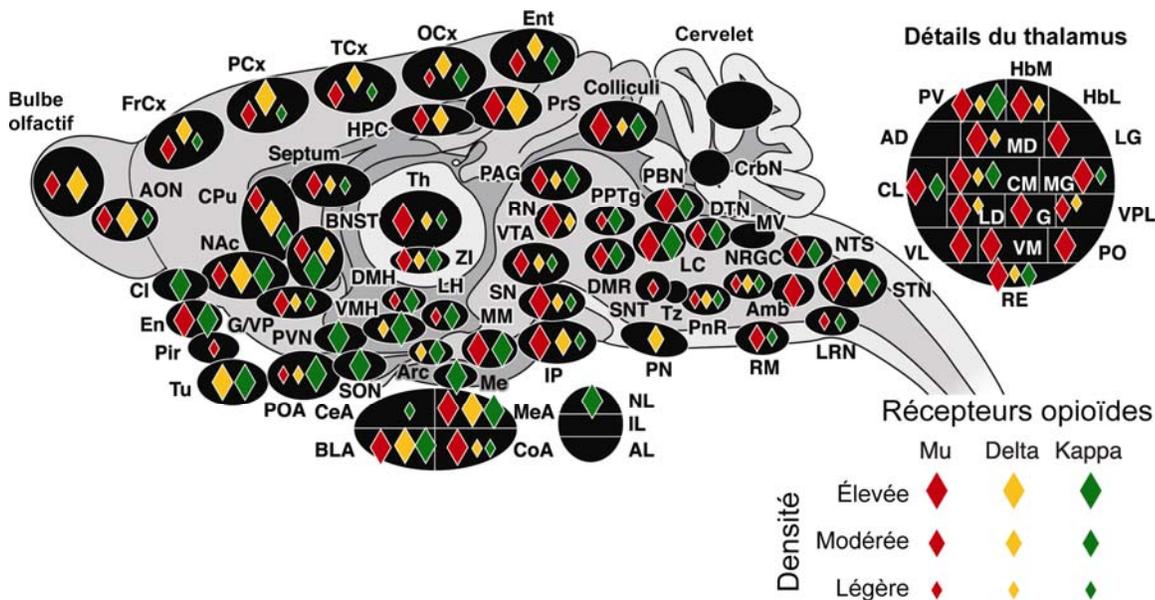


Figure 2. Distribution anatomique et expression relative des RO

Légende : Amb, noyau ambigu; AD, thalamus antérodorsal; AL, lobe antérieur, hypophyse; AON, noyau olfactif antérieur; Arc, noyau arqué, hypothalamus; BLA, noyau basolatéral, amygdale; BNST, noyau du lit de la strie terminale; CeA, noyau central, amygdale; Cl, claustrum; CL, thalamus centrolatéral; CM, thalamus centromédial; CoA, noyau cortical, amygdale; CPu, putamen caudé; CrbN, noyaux du cervelet; DMH, hypothalamus dorsomédial; DMR, raphé dorsal et médian; DTN, noyau tegmental dorsal; En, cortex endopiriforme; Ent, cortex entorhinal; FrCx, cortex frontal; G, noyau gélatineux, thalamus; G/VP, globus pallidus/ pallidum ventral; HbL, habenula latérale; HbM, habenula médiale; HPC, hippocampe; IL, lobe intermédiaire, hypophyse; IP, noyau interpédonculaire; LC, locus coeruleus; LD, thalamus latérodorsal; LG, géniculé latéral, thalamus; LH, hypothalamus latéral; LRN, noyau réticulaire latéral; MD, thalamus médiadorsal; Me, éminence médiane; MEA, noyau médian, amygdale; MG, géniculé moyen; MM, noyau mamillaire moyen; MV, noyau vestibulaire médial; NAc, noyau accumbens; NL, lobe neuronal, hypophyse; NRGC, noyau réticulaire gigantocellulaire; NTS, noyau du tractus solitaire; OCx, cortex occipital; PAG, substance grise périaqueducale; PCx, cortex pariétal; Pir, cortex piriforme; PN, noyau pontin; PnR, pontin réticulaire; PO, thalamus postérieur; POA, aire préoptique; PPTg, noyau pédonculopontin; PrS, pr/subiculum; PV, thalamus paraventriculaire; PVN, hypothalamus paraventriculaire; RE, thalamus reuniens; RN, noyau rouge; RM, raphé magnus; SON, noyau supra-optique; SN, substantia nigra; SNT, noyau trijumeau sensoriel; STN, noyau trigéminal spinal; TCx, cortex temporal; Th, thalamus; Tu, tubercule olfactif; Tz, noyau du corps trapézoïde; VL, thalamus ventrolatéral; VM, thalamus ventromédial; VMH, hypothalamus ventromédial; VPL, thalamus ventropostérolatéral; VTA, aire tegmentale ventral; ZI, zona incerta. Modifié à partir de : (Le Merrer, Becker et al. 2009) [38]

antérieure alors que les MOR le sont plutôt dans l'amygdale, le thalamus, le mésencéphale et quelques noyaux du tronc cérébral (voir la figure 2, page 12) [38]. Les trois sous-types de RO sont donc présents dans les SNC et SNP où leur activation produit une inhibition de la motilité gastrique [18]. Cet effet de constipation demeure un des effets secondaires les plus importants dans les traitements opioïdes à long terme. En effet, le système nerveux entérique est situé à l'intérieur du mur du tractus gastro-intestinal et partage plusieurs caractéristiques avec le SNC, dont la présence de RO et de leurs ligands endogènes, quoiqu'il contrôle les fonctions gastriques telles que la motricité, l'absorption et la sécrétion, indépendamment du SNC, même si celui-ci en module souvent les fonctions [39].

Les RO et leurs opioïdes endogènes, que l'on retrouve à l'intérieur des immunocytes, servent probablement à la régulation de la douleur périphérique inflammatoire; les opioïdes périphériques sont plus efficaces en présence d'inflammation [22]. En somme, on retrouve les RO non seulement à plusieurs endroits à l'intérieur du système nerveux mais aussi dans nombreux sites périphériques : leucocytes du sang périphérique [40], lignées cellulaires de tissu lymphoïde, cellules immunitaires [41], cellules tapissant le tractus gastro-intestinal [18], ganglions de la racine dorsale, tissus articulaires, fibroblastes, muscles lisses vasculaires et cellules satellites [32]. Les RO s'expriment non seulement aux membranes de certains neurones du SNC et du SNP, où ils jouent un rôle dans la transmission et le contrôle du signal

douloureux, mais se trouvent également à l'extérieur du tissu nerveux où ils agissent probablement lors de la croissance et la maturation de certaines cellules ou certains tissus [33].

Le fait de connaître la distribution des RO permet de mieux comprendre la physiologie des effets des ligands agissant sur ceux-ci. Par exemple, le haut niveau d'expression des RO, dans les régions du tronc cérébral, de la moelle épinière et des neurones afférents primaires, explique l'efficacité analgésique des opioïdes dans la voie spinale, au même titre que leurs effets sur la sédation, la dépression respiratoire et les nausées [33]. D'ailleurs, des lignées mutantes (*knockout*) pour les gènes du MOR (*Oprm*), du DOR (*Oprd*) ou du KOR (*Oprk*) ont été développées, sans aucun problème de survie pour les animaux. Ces lignées ont permis d'établir la relation entre les MOR et les mécanismes de récompenses renforcés par diverses drogues d'abus (opioïdes, cannabinoïdes, alcool et nicotine) ainsi que par des interactions sociales; celle entre les KOR et les effets dysphoriques des opioïdes ainsi que des cannabinoïdes, opposant les MOR; et celle entre les DOR et les réponses émotionnelles, les activités anxiolytiques et antidépressives [28].

Même si les lignées mutantes ne révèlent actuellement aucune information anatomique, elles démontrent le rôle indéniable des RO dans la douleur et donnent une idée des effets comportementaux qui s'y rattachent [38]. En conséquence, les RO continuent d'être étudiés assidûment puisqu'ils

demeurent les cibles analgésiques les plus prometteuses, à ce jour. En général, les agonistes MOR et DOR sont associés à des effets analgésiques et de récompense, alors que les agonistes KOR sont associés à des effets indésirables comme la dysphorie et les hallucinations [42].

1.3 Les cibles analgésiques

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont reconnus pour être la plus importante famille de cibles thérapeutiques, soit plus de 25% des médicaments approuvés par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) [43]. Plusieurs analgésiques sont d'ailleurs des ligands de RCPG : les opioïdes, cannabinoïdes, α_2 -adrénergiques, muscariniques, GABA_B, glutamate métabotropique de groupes II et III, et somatostatines [44]. Néanmoins, les agonistes des RO demeurent la pierre angulaire en matière de gestion des douleurs modérées à sévères, aiguës et chroniques, post-opératoires, cancéreuses et, de plus en plus, noncancéreuses [45]. Les douleurs que l'on appelle « noncancéreuses » sont définies comme étant des douleurs chroniques qui persistent plus de trois mois après le temps normal de guérison du tissu, survenant dans un contexte autre que le cancer ou en fin de vie [46]. Ceci inclut, par exemple, les maux de dos, l'ostéoartrite, la fibromyalgie ainsi que les maux de tête [47]. Quelle que soit son origine, la douleur est un problème de santé majeur répandu à travers le monde, officiellement reconnu par l'organisation mondiale de la santé (OMS) depuis presque trente ans [48]. Aujourd'hui, on estime que plus de 50% des

patients ayant subi une chirurgie ou un traumatisme continuent à ressentir des douleurs sévères. Quant à la douleur chronique, elle affecterait une personne sur cinq en Europe, Amérique du Nord, Océanie et autres régions, résultant en d'énormes pertes économiques inhérents au coût des soins de santé et des médicaments, d'absentéismes d'emploi, des troubles de rendement au travail, des pertes de revenus, sans compter les coûts d'indemnisation des travailleurs et des prestations d'aide sociale [49]. L'OMS en est donc venu à rédiger les concepts d'une échelle analgésique visant à ériger les lignes directrices dans le traitement clinique de la douleur cancéreuse, basées sur la prémisse que tous les patients, à travers le monde, devraient recevoir un soulagement adéquat (figure 3, page 16).

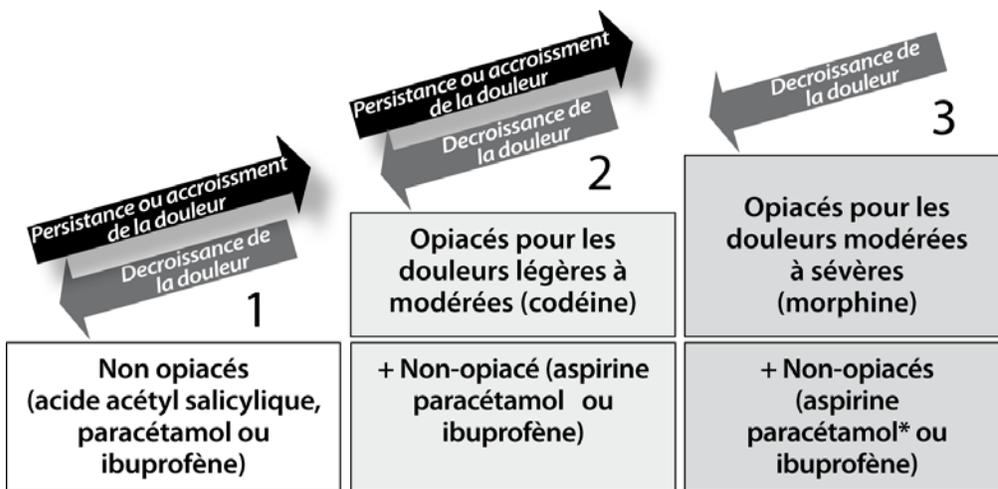


Figure 3. L'échelle OMS à trois étapes pour soulager les douleurs cancéreuses

L'OMS a mis au point une échelle à trois étapes pour soulager les douleurs cancéreuses. Si la douleur survient, il devrait y avoir une prompt administration par voie orale de médicaments dans l'ordre ci-dessus : des non-opioïdes, puis, le cas échéant, des opioïdes légers, puis des opioïdes forts tels que la morphine, jusqu'à ce que le patient ne ressente plus de douleur. Afin de maintenir l'analgésie, les médicaments doivent être administrés aux 3-6h, plutôt que sur demande. Cette approche en trois étapes d'administrer le bon médicament à la bonne dose et au bon moment est peu coûteuse et efficace à environ 80%. Source : (OMS 2008) [50]

L'OMS a pour but de développer des lignes directrices pour tous les types de douleurs dans les années à venir, mais de façon générale, la cible pharmacologique couramment visée dans le traitement opioïde demeure à ce jour les MOR, puisque la morphine et ses dérivés ont une plus grande affinité avec ceux-ci. D'ailleurs, la morphine et la naloxone font partie de la 16^e et plus récente édition de la « Liste de médicaments essentiels » publiée par l'OMS représentant les médicaments nécessaires minimum à n'importe quel système de santé de base [51]. De plus, une grande partie des métabolites ont la même action pharmacologique que l'opioïde administré initialement. Les antagonistes et agonistes inverses MOR sont utilisés à plusieurs fins : en recherche, ils sont utilisés pour réduire certains des effets secondaires des agonistes MOR administrés ou encore pour agir sur les MOR présents dans le locus coeruleus afin de précipiter les effets de sevrage [52, 53]; et en clinique, dans des cas de surdose aux opioïdes [54]. Le tableau I (page 18) illustre la grande quantité d'agonistes et d'antagonistes MOR utilisés en milieu clinique, ainsi que certains métabolites et leur affinité au récepteur relativement à la morphine.

1.4 Effets secondaires des opioïdes

Actuellement, on constate maints problèmes liés à l'utilisation des opioïdes, à court ou à long terme, tels la constipation, la dépression respiratoire, l'hypotension orthostatique suite à la libération d'histamine, la nausée et le développement de la tolérance et de la dépendance [40, 53].

Tableau I. Liste des opioïdes et métabolites principaux qui se lient aux MOR et leurs affinités relatives à la morphine

Médicament métabolite	Moyenne de l'affinité au récepteur comparé à la morphine (%)	Médicament métabolite	Moyenne de l'affinité au récepteur comparé à la morphine (%)
Buprénorphine	>1 000	Rac-méthadone	200-1 000
Norbuprénorphine	>1 000	(R)-méthadone	200-1 000
Codéine	<10	(S)-méthadone	<10
Morphine	100	EDDP	<10
Morphine-3-glucuronide	<10	α -Méthadol	<10
Morphine-6-glucuronide	50-199	Morphine	100
Codéine-6-glucuronide	<10	Morphine-6-glucuronide	50-199
Norcodéine	<10	Morphine-3-glucuronide	<10
Normorphine	11-49	Normorphine	11-49
Dextromoramide	200-1 000	Nicomorphine	<10
Dextropropoxyphène	<10	6-Nicotinylmorphine	50-199
Nordextropropoxyphène	<10	3-Nicotinylmorphine	<10
Dihydrocodéine	<10	Morphine	100
Dihydromorphine	50-199	Oxycodone	11-49
Dihydromorphine-6-glucuronide	50-199	Oxymorphone	200-1 000
Dihydromorphine-3-glucuronide	<10	Noroxycodone	<10
Dihydrocodéine-6-glucuronide	<10	Noroxymorphone	50-199
Nordihydrocodéine	<10	Péthidine	<10
Héroïne-diamorphine	10-49	Norpéthidine	-
6-Monoacétylmorphine	50-199	Tilidine	<10
Morphine	100	Nortilidine	<10
Hydrocodone	<10	Tramadol	<10
Hydromorphone	50-199	O-desméthyltramadol	11-49
Hydromorphone	50-199	N-desméthyltramadol	<10
Dihydromorphine	50-199	Nalorphine	50-100
Norhydromorphine	<10	Nalorphine-6-glucuronide	<10
Kétobémidone	50-199	Naloxone	50-199
Norkétobémidone	11-40	6- β -Naloxol	-
Kétobémidone glucuronide		Naltrexone	>1 000
LAAM (lévo-alphaacétyméthadol)	10-49	6- β -Naltrexol	200-1 000
NorLAAM	200-1 000		
DinorLAAM	50-199		

Note : Les valeurs de liaison ont été regroupées afin de refléter les différents résultats provenant des diverses publications; les valeurs de 50-199 peuvent être interprétées comme étant équivalentes à la morphine. Modifié à partir de : (Coller, Christrup et al. 2009) [55]

Précisément, les MOR sont associés le plus fortement à tous ces effets, tandis que le KOR serait plutôt responsable de causer la sédation et la dysphorie en parallèle avec l'analgésie [42]. D'après de nombreuses études, plusieurs de ces impasses seraient évitables si on cherchait à développer des ligands spécifiques aux DOR, puisque ceux-ci seraient associés à des effets analgésiques avec de moindres effets secondaires [23, 56-58]. Précisément, les agonistes DOR démontrent une efficacité intéressante pour un potentiel d'abus moindre, des effets indésirables minimaux sur la respiration [59] et le système gastroentérique, comparé au MOR [58]. De plus, les agonistes DOR démontrent un potentiel unique dans la neurogenèse et la neuroprotection que l'on ne retrouve pas chez les autres RO [60]. Par contre, les agonistes DOR produisent des effets analgésiques moindre que les agonistes MOR [61] et à fortes doses, peuvent même causer des convulsions, quoique le mécanisme précis responsable de cet effet demeure inconnu [62].

Finalement, les DOR sont non seulement des cibles intéressantes pour fins analgésiques, mais également des cibles potentielles pour le traitement de la dépression [62], de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et des troubles d'anxiété [21, 29, 63]. Voilà donc pourquoi nous nous sommes intéressés aux DOR.

1.5 Ligands des DOR

Même si on n'en retrouve pas encore en milieu clinique, plusieurs ligands DOR ont été développés et identifiés. Voici un mot sur ceux qui seront adressés dans cet ouvrage. Tout d'abord, la morphine et la naloxone ont déjà été mentionnés au tableau I (page 18) de la section des cibles analgésiques comme étant des ligands MOR, mais les deux agissent également sur les DOR. L'activité de nouveaux ligands DOR, catégorisés ainsi suite à la détermination de leur affinité spécifique pour les DOR, a été traditionnellement évaluée par l'essai biologique sur le canal déférent de la souris. Brièvement, la technique consiste à appliquer les nouvelles molécules sur le tissu du canal déférent, ce dernier exprimant majoritairement des DOR comparativement aux MOR et KOR. La force des contractions du tissu – induites continuellement par des électrodes – est donc mesurée en présence et en absence du ligand potentiel : plus la force de contraction est diminuée par un ligand, plus celui-ci est considéré comme étant efficace [64]. En utilisant cette méthode, le ligand (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC-80) a été trouvé plus efficace que le c[D-pénicillamine²,D-pénicillamine⁵]enképhaline (DPDPE) [65]. Le ligand H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid (UFP-512) a été soumis au même essai ainsi qu'à un essai d'inhibition de l'accumulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP_c), et a subséquemment été considéré comme étant un agoniste plus puissant que la morphine, mais

d'efficacité similaire [63, 66]. Notre laboratoire a également comparé l'efficacité de certains ligands à inhiber l'accumulation de l'AMP_c et a obtenu, en ordre décroissant d'efficacité : SNC-80 ≥ DPDPE > UFP-512 > morphine ≥ H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH (TIPP) ≥ naloxone > H-Tyr-Ticψ[CH₂-NH]Ch-Phe-OH (TICP) [67]. Une autre méthode courante, l'essai de liaison de [³⁵S]GTPγS, mesure l'activation de la protéine G contrôlée par le récepteur survenant à un stade précoce dans la cascade de signalisation : lorsque la liaison au [³⁵S]GTPγS est augmentée par un ligand, celui-ci est jugé être un agoniste tandis que si la liaison est diminuée, le ligand est considéré comme étant un agoniste inverse; un antagoniste stabilise l'activité présente en condition basale, c'est-à-dire sans ligand. Ainsi, plusieurs ligands DOR ont été comparés par la méthode de liaison au [³⁵S]GTPγS : TICP et SNC-80 ont occasionné des changements de liaison significatifs de façon à être identifiés comme étant agoniste inverse – quoique modéré – et agoniste, respectivement. La naloxone, n'occasionnant qu'une légère diminution de la liaison [³⁵S]GTPγS, et le naltrindole tout comme le TIPP n'occasionnant que de légères augmentations de la liaison, ont été reconnus comme étant des antagonistes neutres [68] ou partiels en AMP_c [67]. Quelques-uns de ces ligands, le DPDPE [69, 70], le naltrindole [71] et la naloxone [72], agissent sur la signalisation des canaux potassique Kir3, mais aucune comparaison systématique n'a été faite et donc l'ordre d'efficacité des ligands DOR dans cette voie de signalisation demeure à ce jour incomplet.

En résumé, du point de vue de leurs structures, les ligands peuvent être catégorisés en deux groupes, les ligands peptidiques : DPDPE, UFP-512, TIPP et TICP, et les ligands non peptidiques : SNC-80, morphine, naloxone et naltrindole. Les ligands non peptidiques sont privilégiés dans les études d'imagerie cérébrale et s'ils passent la barrière hématoencéphalique, ils ont plus de chance de passer les membranes cellulaires [65]. D'un autre côté, un exemple de ligand peptidique est le DPDPE : un peptide qui a été synthétisé à partir de l'enképhaline en ajoutant des ponts de disulfure afin de rendre la conformation moins flexible à tous les RO et plus rigide pour se lier spécifiquement aux DOR. Même si le DPDPE semble nécessiter le transporteur d'anion organique Oatp1a4 afin de pouvoir traverser la barrière hématoencéphalique [73], ce ligand traverse la membrane du placenta principalement par transport passif [74]. L'UFP-512 a été synthétisé à partir d'un pharmacophore antagoniste du DOR, le Dmt-Tic, en modifiant l'extrémité C-terminale dans le but de créer un agoniste [75]. Il est possible que l'UFP-512 traverse la membrane cellulaire [66], puisque ce composé contient un groupement CH_2COOH qui lui permet de traverser la barrière hématoencéphalique [63]. Le tripeptide TIPP appartient à une classe d'antagonistes DOR caractérisés par la séquence H-Tyr-Tic-Phe- à l'extrémité N-terminale [76]. Finalement, TICP est un dérivé de TIPP, mais plus hydrophobe et plus stable [77]. La figure 4, page 23, illustre la structure de ces huit ligands.

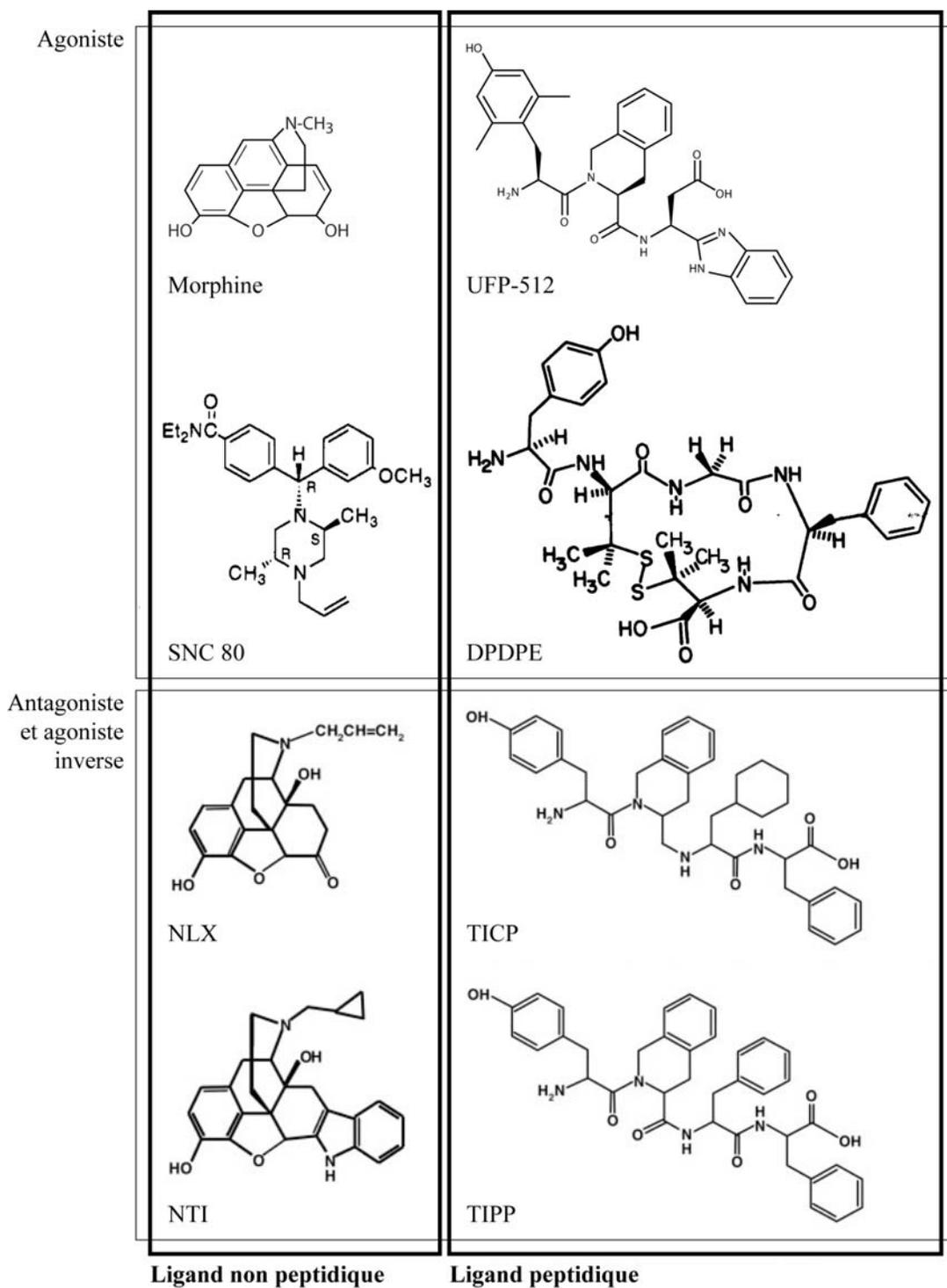


Figure 4. Structure des ligands utilisés dans notre étude

Sources : (Mosberg, Hurst et al. 1983; Calderon, Rothman et al. 1994; Tryoen-Toth, Decaillet et al. 2005; Aguila, Coulbault et al. 2007; et Trescot, Datta et al. 2008) [53, 65, 66, 68, 78]

1.6 Structure et effecteurs des RO

Les RO font partie de la famille rhodopsine appartenant à la superfamille des RCPG [79]. Ces derniers sont responsables de la transmission d'environ 80% de la transduction de signaux à travers la membrane cellulaire [80]. Les RCPG sont aussi connus sous le nom de récepteurs à sept domaines transmembranaires à cause de leur topologie : sept hélices alpha traversant la membrane cellulaire, la terminaison aminée située à l'extérieur de la cellule et la terminaison carboxyle du côté intérieur, les deux connectées par trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. Les RCPG sont également des récepteurs qui changent de conformation lorsqu'ils sont exposés à un de leurs ligands. La liaison d'un ligand au récepteur mène à l'activation d'une cascade d'événements intracellulaires qui se déroulent à travers diverses protéines G hétérotrimériques – chacune composée de trois sous-unités, soit un des 23 isoformes de la sous-unité α , un des 7 isoformes de la sous-unité β et un des 12 isoformes de la sous-unité γ – affiliées à différents effecteurs [81]. Les sous-unités β et γ forment un dimère qui ne se dissocie pas dans des conditions physiologiques, mais il demeure controversé si l'activation de la sous-unité α crée ou non une dissociation avec le dimère $\beta\gamma$ [81]. La sous-unité α est composée d'une hydrolase guanosine triphosphate (GTPase) qui convertit la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP) par hydrolyse, déclenchant son activation et le contrôle de la durée du signal en aval. C'est l'étape de la dissociation du GDP,

permettant la liaison d'un nouveau GTP non-hydrolysé, qui constitue l'étape limitante de ce système de signalisation. Plus précisément, la sous-unité $G\alpha_o$ est la protéine G la plus abondante du SNC, estimée à 1% de toutes les protéines membranaires [82]. Les RO s'associent spécifiquement aux protéines $G\alpha_{i/o}$ mais la sous-unité $G\alpha_o$ se dissocie de la GDP et se réassocie à la GTP trois fois plus rapidement que la $G\alpha_i$, et l'activité de la GTPase de $G\alpha_o$ est de 3 à 7 fois plus élevée que celle de la $G\alpha_i$ [82]. La toxine pertussique (PTX) adénosine diphosphate (ADP)-rybosyle les protéines G associées aux RO et inhibe ainsi la communication avec leurs divers effecteurs [83]. Les RO s'associent effectivement avec une multitude d'effecteurs dont plusieurs types de canaux ioniques et d'enzymes de signalisation.

1.7 Voies de signalisation

Précisément, les DOR ont pour effecteurs l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase C, certains canaux potassiques et calciques, et modulent plusieurs cascades de kinases dont les ERK, les transducteurs de signaux et activateur de la transcription STAT3, les p38 impliquant les tyrosines kinases proto-oncogènes sarcoma (Src) et les protéines sarcoma du rat (Ras), pour n'en nommer que quelques-uns [84]. Certains des effecteurs activés suite à la liaison d'un agoniste RO, agissent, en bout de ligne, pour réduire la transmission du signal douloureux d'un neurone à l'autre. Par exemple, les canaux calciques et potassiques retrouvés aux membranes synaptiques jouent des rôles importants dans la voie analgésique des

opioïdes : l'entrée de calcium dans la cellule, via des canaux voltage-dépendants, promeut la relâche de neurotransmetteurs présynaptiquement alors que les canaux à rectification entrante produisent l'effet inhibitoire de plusieurs neurotransmetteurs tels le GABA et les opioïdes [85-87].

Le canal potassique à rectification entrante appartenant à la famille Kir3 a été le premier effecteur $\beta\gamma$ à avoir été identifié [88]. Lorsqu'un canal Kir3 est activé suite à la liaison d'un opioïde au récepteur, il hyperpolarise la cellule neuronale, réduisant le potentiel électrique de la membrane et inhibe ainsi la propagation du signal de façon post-synaptique [89] figure 5, page 26.

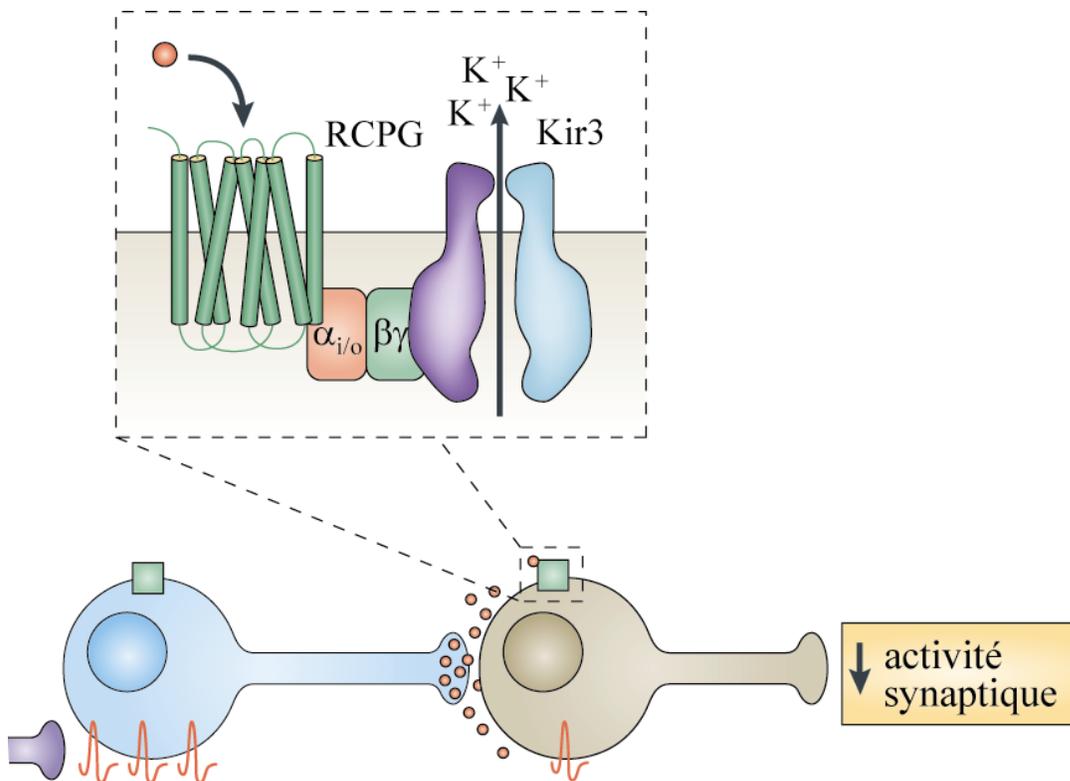


Figure 5. Voie de signalisation des canaux Kir3

Lorsque des neurotransmetteurs tels les opioïdes sont émis, ils activent les RO postsynaptiques associés aux Kir3 et augmentent ainsi la conductance de ces canaux. Ceci mène à l'hyperpolarisation de la membrane, réduisant finalement la propagation du potentiel d'action, ou de l'influx douloureux. Source : (Luscher et Slesinger 2010) [89]

Les mammifères expriment 4 différentes sous-unités des canaux Kir3 (1 à 4), que l'on retrouve principalement sous forme d'hétérotétramères : Kir3.1/Kir3.2, Kir3.1/Kir3.3 et Kir3.2/Kir3.3 sont abondants dans le cerveau, et Kir3.1/Kir3.4 l'est dans le cœur [88]. On retrouve les Kir3.1 et Kir3.2 à la membrane postsynaptique de cellules excitatrices, en colocalisation avec les RO [90]. Il convient de préciser que les Kir3.1 exprimés seuls s'expriment mal à la membrane [91]. Ces canaux sont activés par les récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_{i/o}$ [92, 93]. Également, les sous-unités $G\beta_1$ et $G\gamma_2$ forment des dimères qui activent les canaux Kir3.1, alors que les dimères contenant la sous-unité $G\beta_5$ inhibent les courants des canaux Kir3 [94]. Trois sites de liaison au dimère $G\beta\gamma$ ont été identifiés dans la structure Kir3.1 : un à l'extrémité N-terminale et les deux autres à l'extrémité C-terminale (figure 6, page 27). Kir3.1 se lie mieux avec $G\beta_1$ et $G\beta_2$ qu'avec d'autres $G\beta$, ce qui contribue à la spécificité de leur association [92, 93].

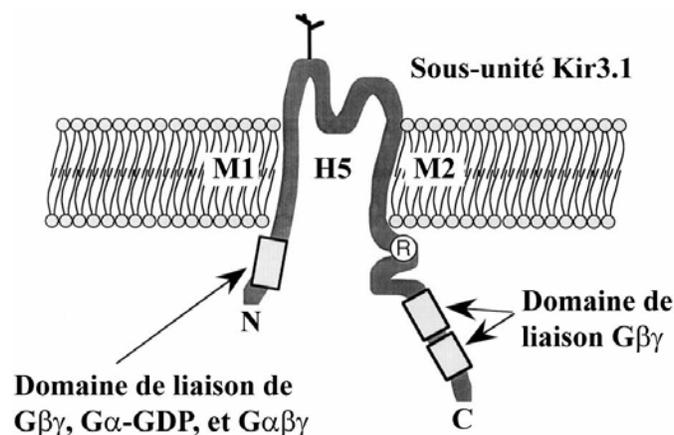


Figure 6. Les domaines de liaison des protéines G dans la structure de la sous-unité Kir3.1
Source : (Yamada, Inanobe et al. 1998) [95]

De la famille des Kir3, ce seraient les homomères Kir3.2, ainsi que les hétéromères Kir3.1/Kir3.2 qui produiraient les courants ayant les plus grandes amplitudes [91]. Le développement de souris mutantes n'exprimant pas de Kir3.2 a démontré la perte partielle ou totale de l'antinociception normalement induite lors de traitement avec opioïdes, annonçant ainsi Kir3.2 comme étant un joueur critique et donc une cible potentielle dans le traitement de la douleur via les RO [96]. Des expériences d'électrophysiologie ont soutenu que l'hyperpolarisation des cellules neuronales induite par des agonistes MOR passent bel et bien par les canaux potassiques à rectification entrante [97, 98]. Globalement, les opioïdes induisent l'analgésie en grande partie en activant les canaux Kir3.1/Kir3.2 [99]. On retrouve ces derniers dans les cibles spinales [99] et supraspinales des opioïdes, tels le bulbe olfactif, locus coeruleus, l'hippocampe, l'habenula, le cervelet, l'amygdale, le thalamus, la substance grise périaqueducule et l'aire tegmentale ventrale du cerveau du rat adulte [100].

Le développement de la tolérance étant un des problèmes actuels des opioïdes utilisés en clinique, il convient d'aborder également la voie de signalisation de l'AC puisque celle-ci fait partie des adaptations cellulaires les mieux caractérisées associées aux traitements chroniques des opioïdes. En conditions normales, les opioïdes se lient aux RO, qui inhibent l'activité des AC, principalement via les sous-unités α . Par contre, suite à une exposition continue à la morphine, l'effet inhibiteur est grandement diminué et des effets

excitatoires émergent. Ce changement survient en raison d'une augmentation de la synthèse de différents isoformes d'AC qui se trouvent stimulés par $G\beta\gamma$ au lieu d'être inhibés par $G\alpha_i$ [101]. Il existe une panoplie de protéines et de mécanismes impliqués dans le développement de la tolérance cellulaire aux opioïdes (voir figure 7, page 30). Par exemple, une augmentation de la phosphorylation des sous-unités $G\beta\gamma$ ainsi que des AC II et AC VII via la PKC accroît leur stimulation par $G\alpha_s$ et $G\beta\gamma$ [102]. Ainsi, les canaux Kir3 qui interagissent avec les RO jouent un rôle dans la voie de l'analgésie alors que les effecteurs AC mentionnés ci-dessus sont préférablement associés à la voie de la tolérance aux opioïdes.

1.8 Existence de complexes multimériques

L'interaction entre les RO, protéines G et Kir3 ou AC ne se réalise pas par collisions aléatoires, mais plutôt par compartiment, formant un multi-complexe préassemblé [103, 104]. Depuis plusieurs années déjà, on se demande comment le récepteur stimulé arrive à reconnaître et activer ses effecteurs parmi les autres présents dans la cellule, considérant la multitude de récepteurs, de protéines G et d'effecteurs retrouvés à la membrane et dans le cytoplasme. Une première série de preuves soutenant l'existence de complexes multimériques provient d'expériences démontrant que les RCPG se regroupent avec leurs protéines G avant même d'atteindre la membrane à laquelle ils sont destinés [105, 106]. Par exemple, le récepteur β_2 -adrénergique

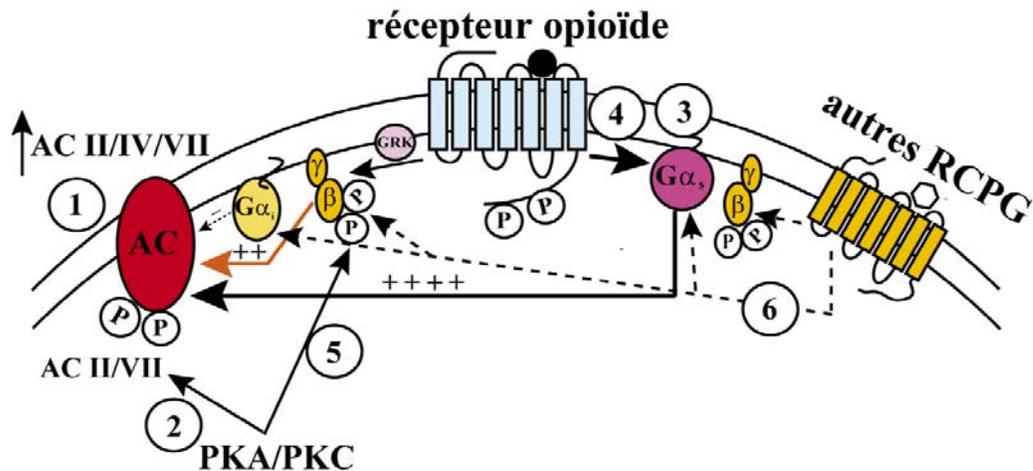


Figure 7. Adaptation des MOR au traitement chronique de la morphine

Le traitement de morphine de façon chronique initie une variété d'adaptations en aval du RO. Ces adaptations surviennent à travers la signalisation des protéines $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Les adaptations principales identifiées à ce jour sont la synthèse et la phosphorylation des isoformes IV et VII de l'AC, ainsi que la phosphorylation de $G\beta$. 1. La régulation positive des isoformes IV et VII de l'AC, qui sont stimulés via $G\beta\gamma$. 2. L'augmentation de la phosphorylation de l'AC par la PKC, ce qui augmente chez AC II/VII la stimulation $G\beta\gamma$. 3. La phosphorylation d'AC II et VII augmente également leur stimulation via $G\alpha_s$. 4. $G\alpha_s$ est augmenté suite au traitement chronique de la morphine et s'associe au MOR, augmentant ainsi la stimulation (via $G\alpha_s$) de l'AC couplé aux MOR. 5. L'augmentation de la phosphorylation des kinases de RCPG (GRK) 2/3 et $G\beta$ par la PKA et la PKC diminue l'association de $G\beta\gamma$ avec GRK, augmentant la disponibilité de $G\beta\gamma$ à interagir avec AC. La phosphorylation de $G\beta$ par la PKC augmente la puissance de $G\beta\gamma$ à stimuler l'AC. 6. Les changements des enzymes effecteurs et des molécules de signalisation élicités par les traitements chroniques de morphine modifieraient la réactivité à d'autres neurotransmetteurs (non-opioïdes) qui signalisent via les $G\alpha_i/G\alpha_o$, $G\alpha_s$ et l'AC, augmentant l'effet stimulateur des $G\alpha_s$ et $G\beta\gamma$ générés. En résumé, toutes les adaptations ont tendance à contrer l'inhibition de l'AC par les opioïdes. Source : (Gintzler et Chakrabarti 2006) [102]

est assemblé et s'associe au dimère $G\beta\gamma$ à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Ensuite, c'est lors du passage au Golgi que s'ajoute la sous-unité $G\alpha$, afin de compléter le « cœur » du complexe de signalisation, c'est-à-dire le récepteur et la protéine hétérotrimérique [107]. Ces observations ont été réalisées en étiquetant les protéines étudiées avec une luciférase de *Renilla reniformis* (Rluc) et une protéine fluorescente, soit entière ou à moitié, afin de voir si celles-ci interagissent ensemble, et d'identifier leur localisation, combinant ainsi les méthodes de transfert d'énergie par résonance de type bioluminescente (BRET), de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) et de microscopie confocale. La formation du complexe RCPG/protéine G serait donc constitutive et non pas induite à la suite de la liaison d'un agoniste [108]. Il importe d'ajouter que la formation de complexes multimériques lors de la biosynthèse des protéines au réticulum endoplasmique a lieu également avec des récepteurs n'appartenant pas à la superfamille des RCPG, tels les récepteurs d'insuline, par exemple [109]. D'autres études ont ensuite démontré, en utilisant le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) cette fois-ci, que les récepteurs rhodopsines et β_2 -adrénergiques peuvent, sous forme de monomère, former des complexes stables avec leurs protéines G, sans oligomérisation requise comme il avait été proposé auparavant [110, 111]. Des RO extraits de cerveaux de rats ont été co-immunoprécipités avec la sous-unité $G\alpha$ indiquant l'existence de complexes récepteur/protéine G [112]. Une série d'études a démontré que

certaines effecteurs s'ajoutent également aux complexes composés de RCPG et de protéines G avant qu'ils soient expédiés à la membrane. Par exemple, il a été démontré que le canal Kir3.1 interagit initialement avec le dimère $G\beta_1\gamma_2$ à l'intérieur du réticulum endoplasmique, ou du moins avant de se rendre à la membrane [113]. Une autre étude a trouvé que le récepteur β_2 -adrénergique, extrait des neurones de l'hippocampe du cerveau du rat, s'immunoprécipite avec la protéine $G\alpha_{1C}$ et l'effecteur $Ca_v1.2$, ce dernier étant activé dans des expériences de patch-clamp lorsque soumis à un agoniste du récepteur présent dans la pipette [114]. D'autres ont également co-immunoprécipité la sous-unité $G\beta_1$ avec l'effecteur AC, ainsi que la sous-unité $G\gamma_2$ avec l'effecteur Kir3.1 [104]. Des expériences de BRET ont complété l'interprétation de ces interactions en démontrant ce qui semblerait être des changements de conformations induites par les agonistes des récepteurs muscariniques de type M2 et des récepteurs β -adrénergiques faisant partie de l'un ou l'autre des complexes ci-mentionnés [104]. Dans certains cas, des complexes de signalisation macromoléculaires ont été observés entre effecteurs et récepteurs : c'est le cas des canaux calciques de type N retrouvés dans les neurones, qui s'associent avec plusieurs types de récepteurs dont les $GABA_B$ et les NOR [115, 116]. Plusieurs autres types de protéines comme les protéines Homer, par exemple, interagissent avec les complexes de signalisation et font l'objet de plus en plus d'études cherchant à mieux

caractériser tous les joueurs impliqués dans la formation de ces complexes [117].

Somme toute, les complexes macromoléculaires sont la base de l'activité biologique dans les cellules. Plusieurs complexes ont maintenant été identifiés et il tarde donc de développer des approches qui détermineront leurs structures, basées sur les sous-unités individuelles et leurs interactions [118]. Malgré les nombreuses études démontrant la formation de complexes signalétiques composés de RCPG, protéines hétérotrimériques et effecteurs, d'autres questions persistent à déterminer l'instant précis où ces complexes se forment : certains prétendent que l'association se fait au niveau intracellulaire, alors que d'autres croient plutôt à une association des protéines une fois le récepteur rendu à la membrane. Quelles sont les implications de ces différentes possibilités?

1.9 Sélectivité fonctionnelle

La découverte des complexes de signalisation ouvre la porte à un potentiel précieux en matière de ciblage pour de nouvelles molécules. Un même récepteur peut se retrouver en compagnie de diverses protéines G et d'effecteurs et adopter ainsi diverses conformations. Ces conformations permettent donc au complexe d'afficher différentes interfaces qui deviennent accessibles à certains ligands. Ces ligands peuvent ensuite démontrer plus ou moins d'affinité envers l'une ou l'autre des différentes interfaces du complexe. En d'autres mots, une conformation en particulier pourrait être la

cible d'une molécule développée spécifiquement pour le complexe multimérique du récepteur lié à un seul de ses multiples effecteurs potentiels [119]. Traditionnellement, la théorie de la sélectivité fonctionnelle propose que les agonistes se lient au récepteur seul à la membrane, dictant ainsi une conformation unique à l'agoniste en question, qui favorise la liaison du récepteur avec l'un ou l'autre de ses effecteurs, produisant donc un effet préférentiel (figure 8A, page 35). Par exemple, une étude a comparé l'effet d'une série de ligands sur deux différents effecteurs (AC et ERK) appartenant à un même récepteur (DOR) et les ordres d'efficacité de ces ligands se sont avérés différents d'un effecteur à l'autre, soutenant la théorie de la sélectivité fonctionnelle, puisque la théorie de la pharmacologie traditionnelle dicte que différents ligands devraient avoir le même effet sur tous les effecteurs d'un même récepteur, conservant le même ordre d'efficacité peu importe l'effecteur [67]. Avec l'évidence présentée ci-dessus à l'effet que certains complexes semblent plutôt se former avant l'arrivée à la membrane, il serait également possible que ce soient les divers complexes en entier qui présentent différentes conformations et donc différentes interfaces du récepteur, dépendant de leur composition. Ces différentes interfaces dicteraient ainsi l'affinité d'un ligand versus celle d'un autre envers le complexe entier (figure 8B, page 35).

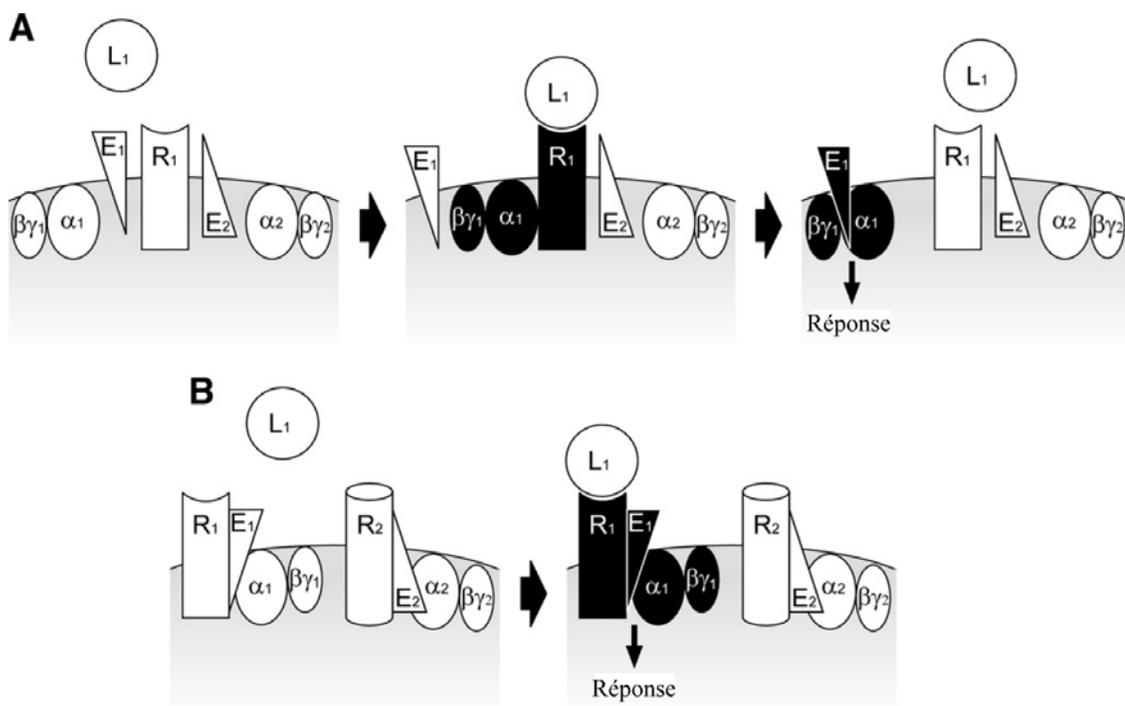


Figure 8. La sélectivité fonctionnelle

Comparaison de la sélectivité fonctionnelle via le recrutement d'un effecteur spécifique (A) ou via l'activation spécifique d'un complexe signalétique de diverse composition (B). Selon la théorie la plus commune de la sélectivité fonctionnelle (A), le ligand (L₁) stabilise une conformation du récepteur (R₁) qui conduit au recrutement préférentiel et à l'activation d'un effecteur (E₁) des multiples partenaires de signalisation possibles (E₁ et E₂). Par contre, si la sélectivité fonctionnelle est considérée comme étant un modèle où les récepteurs sont constitutivement associés à l'un ou l'autre des effecteurs (B), le ligand (L₁) reconnaît et active préférentiellement le récepteur (R₁) appartenant à un des multiples complexes potentiels, ce qui conduit à une stimulation de l'effecteur (E₁) appartenant au même complexe (R₁/E₁/Gα₁/Gβγ₁). Source : (Pineyro 2009) [119]

Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire indiquent que les DOR associés à différents effecteurs, tels l'AC II et le Kir3.1 n'ont pas la même affinité de liaison avec un même ligand (voir la figure 9, page 36) Ainsi, la pharmacologie du récepteur est différente lorsque celui-ci est lié au Kir3 que lorsqu'il est lié à l'AC II.

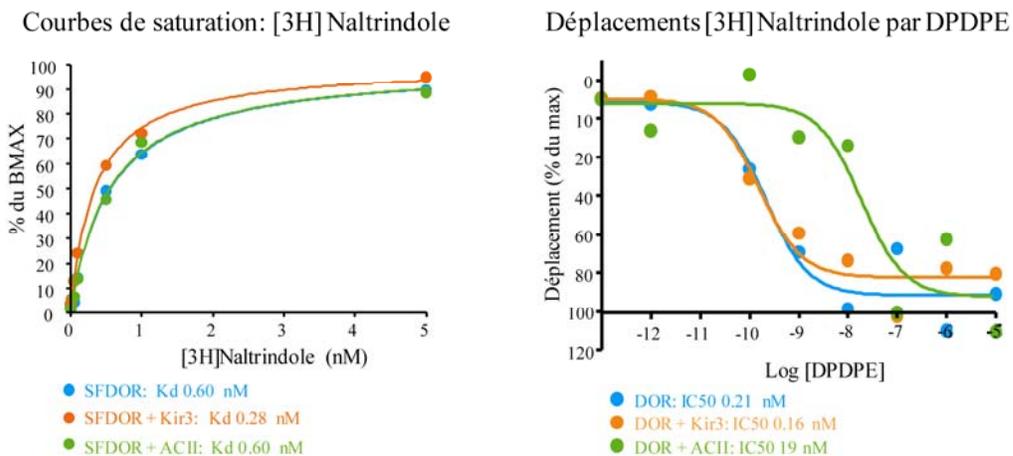


Figure 9. Courbes de saturation [3H]Naltrindole et courbes de déplacement [3H]Naltrindole par DPDPE

Les complexes qui contiennent différents effecteurs se lient de façon similaire à l'antagoniste [3H]naltrindole mais ont différentes affinités pour l'agoniste DPDPE. (résultats préliminaires)

L'efficacité change donc de définition au fur et à mesure que la recherche avance : il n'y a pas si longtemps encore, l'efficacité d'un ligand était déterminée par sa capacité à stabiliser l'une des deux conformations possibles d'un RCPG, soit la conformation active et la conformation inactive. On observe maintenant depuis quelques temps que les ligands ont des efficacités dites « pluridimensionnelles », qui dépendent de la réponse de l'effecteur mesuré : un ligand peut donc être considéré agoniste dans une voie de signalisation, mais antagoniste ou agoniste inverse dans une autre voie affiliée à un autre effecteur. L'efficacité devient donc « le changement de

comportement du récepteur envers sa cellule hôte » [120]. Il convient de préciser qu'un ligand peut se lier à plusieurs endroits sur un récepteur; l'endroit où le ligand endogène se lie est nommé « site orthostérique », alors que tout autre endroit de liaison est qualifié de « site allostérique ». En effet, chaque RO exprime une pochette (comprenant le site dit orthostérique) permettant la liaison des différents ligand(s) endogène(s) [121]. Ces sites sont plus ou moins accessibles, dépendant de la conformation du récepteur [122]. Ainsi, la connaissance du potentiel des différentes conformations aiderait certainement à développer des ligands qui dirigeraient le signal vers des voies de signalisation précises et pourraient, ultimement, mener à la réduction d'effets secondaires [123]. Par exemple, en analgésie opioïde, l'inhibition de l'AC par $G\alpha$ est reliée au développement de la tolérance [101], alors que les voies d'activation des canaux potassiques Kir3 sont associées à l'effet désirable analgésique [99]. Plus précisément, quand la protéine hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$ est inactive, les sites de liaison de $G\beta\gamma$ et de $G\alpha$ à leurs effecteurs sont inaccessibles à cause de leur propre association ensemble. Suite à l'activation du RO, les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ se dissocient et peuvent ainsi se lier à des effecteurs. Il serait donc théoriquement possible de moduler la capacité de $G\alpha$ ou de $G\beta\gamma$ à réguler leurs effecteurs, comme le fait par exemple la molécule M119. En effet, M119 inhibe sélectivement l'effecteur PLC (sans toucher aux canaux) et réduit ainsi la tolérance à l'antinociception de la morphine [124]. Par extension, si le site de liaison entre

Kir3.1 et le dimère $G\beta\gamma$ diffère de celui entre AC et $G\alpha$ [125], il s'ensuit donc notre hypothèse de la possibilité de développer des ligands capables de diriger spécifiquement le signal d'activation vers le Kir3 (effet d'analgésie suite à l'activation du récepteur) en bloquant par exemple le lien $G\alpha/AC$ (développement de la tolérance suite à l'activation du récepteur). C'est pourquoi nous croyons que cibler les voies Kir3 et AC séparément pourrait permettre de réduire la tolérance tout en conservant l'effet analgésique.

1.10 Criblage à haut débit

Suite à la découverte de l'existence de complexes signalétiques, les interactions entre protéines deviennent le centre d'intérêt d'un nombre croissant d'études (interactomiques) et pour cela, plusieurs méthodes d'imagerie moléculaire ont été développées, telles le FRET, le BRET, le gène rapporteur divisé, et les diverses variantes de la technique double hybride [126]. Le BRET démontre un potentiel particulièrement intéressant pour le criblage à haut débit. En plus de permettre l'étude de l'interaction entre protéines exprimées n'importe où à l'intérieur de cellules vivantes, la méthode BRET ne requiert aucune excitation lumineuse de source extérieure, évitant ainsi les problèmes de photoblanchiment, photodommage, diffusion de la lumière et autofluorescence [126]. Le BRET permet en outre d'observer en temps réel les différences qui se produisent à l'intérieur des interactions protéines-protéines lorsque celles-ci sont exposées à des ligands. Ainsi, le

recrutement de protéines peut être distingué des changements de conformation en créant des courbes de titrations, voir figure 9, page 36 [127].

Le BRET est un essai de proximité développé récemment [128] qui ressemble à la méthode plus ancienne de FRET [129]. Dans le BRET, les deux protéines d'intérêt sont étiquetées chacune avec un rapporteur d'expression, tel qu'illustré à la figure 10, page 41 : un « donneur », soit la Rluc, et un « accepteur », soit la protéine jaune fluorescente (YFP). L'essai se base sur la capacité du donneur à émettre de la lumière et de l'énergie. Cette énergie sera absorbée par l'accepteur, s'il se trouve à l'intérieur d'un rayon d'environ 100Å (ou 10 nm), et ensuite réémise sous forme de lumière à une longueur d'onde plus élevée (530 nm) que la lumière émise par le donneur, initialement (485 nm). La différence entre les deux pics de lumière est plus importante en BRET qu'en FRET, puisque le donneur BRET est une protéine bioluminescente qui émet de la lumière à courte longueur d'onde et donc à forte énergie, alors que le donneur FRET est une protéine fluorescente qui émet une lumière à une longueur d'onde plus élevée, renfermant donc une plus faible énergie. Ceci rend la méthode BRET plus avantageuse puisqu'il y a moins de chevauchement entre les deux longueurs d'ondes du donneur et de l'accepteur, et le signal résultant est plus précis. Le ratio entre la lumière émise par l'accepteur et la lumière émise par le donneur est établi comme étant le « ratio BRET » et permet de comparer les transferts d'énergie d'une expérience à l'autre. Des paramètres tels que le $BRET_{max}$ et le $BRET_{50}$ ont

également été conçus comme mesures de tendances d'association des deux protéines étudiées.

Le BRET est idéal, en tant que technique de transfert d'énergie par résonance, pour le criblage à haut débit parce que la méthode est rapide : la lecture des résultats se fait en quelques minutes avec un lecteur de plaques approprié, en plus d'être spécifique à une seule interaction entre deux protéines précises; c'est une méthode peu coûteuse et les résultats générés sont faciles à interpréter [130, 131]. Le criblage à haut débit traditionnel consiste à détecter des agonistes ou antagonistes orthostériques, mais avec l'arrivée de nouveaux concepts de ligands allostériques et de sélectivité fonctionnelle pouvant activer l'une ou l'autre des voies de signalisation d'un même récepteur, il conviendrait de développer des méthodes de criblage à haut débit tenant compte de ces nouvelles possibilités relatives aux différents types d'efficacités [132].

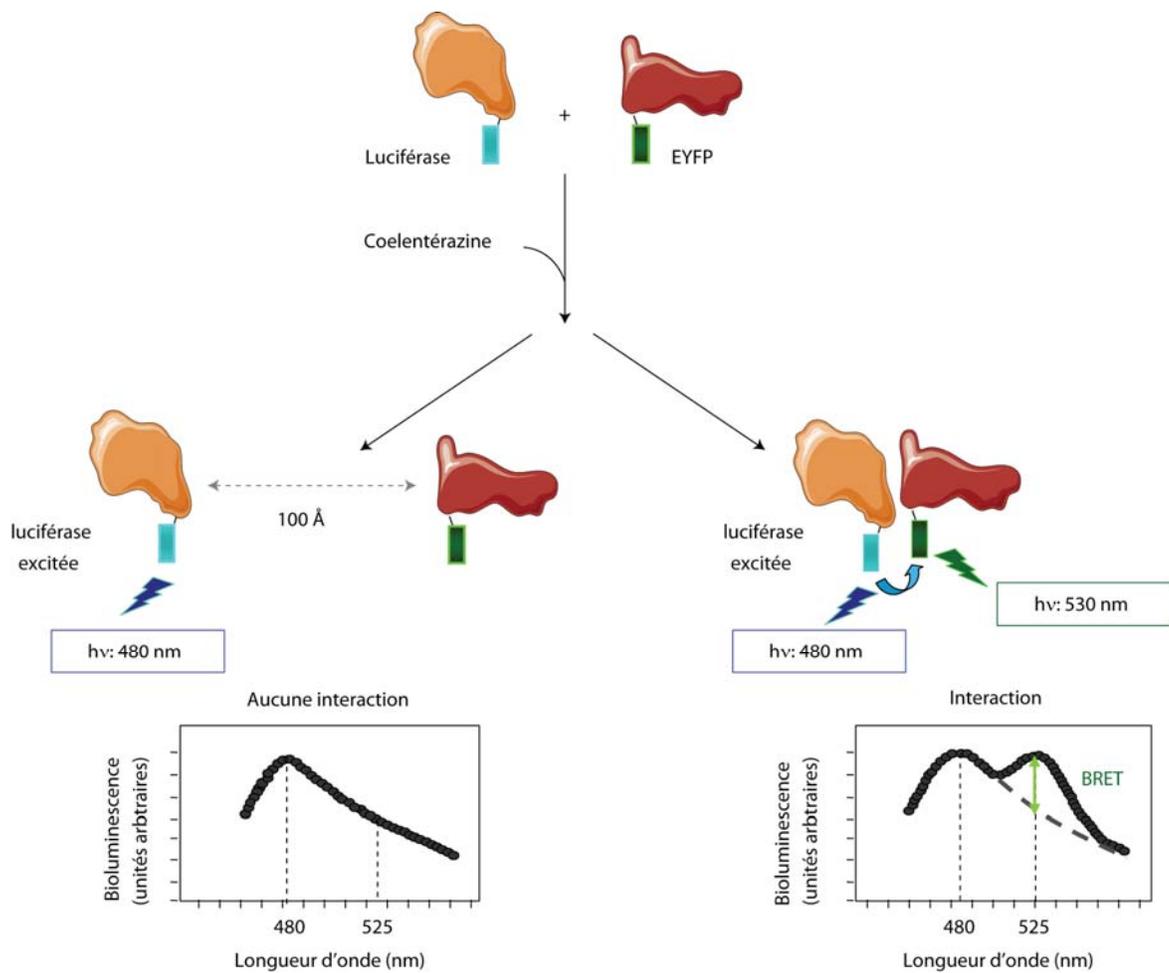


Figure 10. La méthode BRET

Afin d'étudier l'interaction entre deux protéines, la protéine 1 est fusionnée à une Rluc et la protéine 2 est fusionnée à une protéine fluorescente, telle la protéine jaune fluorescente renforcée (EYFP), par exemple. La réaction est initiée par l'addition du substrat de la Rluc, la coelentérazine. Si la distance entre les protéines 1 et 2 est plus grande que 100Å, la lumière qui est émise reflète seulement le spectre d'émission propre à la Rluc. Si la distance entre les protéines 1 et 2 est de 10 à 100Å, l'énergie est transférée de la Rluc à la EYFP et la lumière émise est complétée du signal de la EYFP. Le ratio BRET correspond au ratio 530nm/485nm obtenu lorsque les deux partenaires sont présents, corrigé par le même ratio obtenu dans les mêmes circonstances expérimentales lorsque seulement un des deux partenaires fusionné à la Rluc est présent dans l'essai. Source : (Issad, Blanquart et al. 2007) [127]

Il existe déjà quelques essais d'influx à base de thallium qui mesurent l'activité des canaux potassiques dans les cellules vivantes. Même s'ils sont rapides et peuvent être utilisés en criblage à haut débit, ces essais demeurent des approches invasives, en plus de nécessiter que les cellules soient exposées à un tampon sans chlore, puisque le thallium est non-soluble avec cet ion. De plus, ces méthodologies requièrent 1h d'incubation des cellules avec le milieu contenant un colorant fluorescent, qui nécessite une excitation lumineuse externe afin de détecter l'influx de thallium par les canaux potassiques. En bout de ligne, ces méthodes ne permettent même pas de savoir exactement où le ligand agit, mais seulement si celui-ci induit un changement dans le potentiel de la membrane [133, 134]. C'est donc l'essai BRET que nous avons choisi pour détecter les changements conformationnels induits par les ligands DOR, afin d'étudier si ces changements étaient proportionnels à l'activation des canaux Kir3.1/Kir3.2 et nous permettraient ainsi de développer un biosenseur pour déterminer l'efficacité de nouveaux ligands DOR dans la voie Kir3.

1.11 But du projet

Les changements de conformation à l'intérieur des complexes macromoléculaires induits par les ligands pourraient donner une idée de l'efficacité de ces derniers, dans la voie de signalisation contrôlée par l'effecteur présent dans le complexe. Nous avons donc cherché à développer un biosenseur qui permettrait de détecter, dans des cellules vivantes, des ligands qui activent sélectivement une des voies de signalisation d'analgésie des RO : celle qui passe par Kir3.

2. Méthodologie

2.1 Réactifs

Les réactifs reliés à la culture cellulaire tels le milieu minimum essentiel d'Eagle modifié (milieu de base), le sérum de veau fœtal, le sérum de veau bovin, la glutamine, la pénicilline, la streptomycine et la trypsine proviennent de Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Le bleu de trypan provient de VWR. Le chlorure de sodium (NaCl) provient d'ACP Chemicals (Montréal, QC, Canada). La polyéthylénilimine (PEI) provient de Polysciences, Inc. (Warrington, PA, États-Unis). La PTX, la naloxone, le naltrindole-hydrochloride, la morphine, le DPDPE, les inhibiteurs de protéase, le peptide DYKDDDDK (FLAG), la résine anti-FLAG M2, le persulfate d'ammonium, le tétra-méthyl-éthylènediamine, le luminol, le bleu de bromophénol, les sels utilisés pour le tampon PBS, le n-dodecylmaltoside, le dithiothréitol et le sodium de fluorure proviennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, États-Unis). Les ligands TICP et TIPP proviennent généreusement du laboratoire du Dr P. Schiller, et l'UFP-512, du laboratoire de Dr G. Balboni. Le SNC-80 provient de Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, États-Unis). La coelentérazine provient de Nanolight Technology (Pinetop, AZ, États-Unis). Le Tris provient de MD Biomedicals, LLC (Aurora, OH, États-Unis). L'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) et le sérum d'albumine bovine proviennent d'EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, États-Unis). Le dodécylsulfate de sodium et les réactifs pour la méthode de Lowry

proviennent de BioRad (Hercules, CA, États-Unis). Le marqueur de poids moléculaire pour protéines et les films pour le développement des images des buvardages de Western (BW) proviennent de GE Healthcare Life Sciences. Les membranes de nitrocellulose sont de la marque déposée Protran et les plaques de 96 puits (puits blancs, extérieur noir et puits transparents, extérieur blanc) proviennent de Perkin-Elmer. Les anticorps secondaires anti-souris conjugués au fluorochrome Alexa 488 et les anti-lapin ou anti-souris conjugués au fluorochrome Alexa 647 proviennent d'Invitrogen.

2.2 Plasmides

Les plasmides comprenant les gènes étiquetés pour les expériences de BRET sont les suivants : le DOR-EYFP [135] qui a été produit en insérant le gène DOR humain sans codon d'arrêt à l'intérieur du vecteur pEYFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, États-Unis); le DOR-Rluc [135] qui a été produit en insérant le gène DOR humain sans codon d'arrêt à l'intérieur du vecteur pLuc-N3 (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, États-Unis); le Δ CD8-EYFP qui a été produit en sous-clonant le fragment correspondant aux 209 premiers acides aminés de CD8 à l'intérieur du vecteur pEYFP-N1 (Clontech); la sous-unité hétérotrimérique EYFP-G γ_2 , qui a été produite en fusionnant la protéine EYFP à la sous-unité G γ_2 à l'extrémité N-terminale, tel que préalablement décrit pour la GFP₁₀-G γ_2 [136]; la sous-unité de canal potassique Kir3.1-EGFP [137], qui a été produite en insérant le gène humain Kir3.1 étiqueté à l'extrémité C-terminale avec la protéine EGFP (Clontech) à

l'intérieur du vecteur d'expression pGEMHE; les canaux potassiques Kir3.1-Rluc [104], qui est le résultat du gène humain Kir3.1 ayant été étiqueté à l'extrémité C-terminale avec la Rluc; Kir3.1-Rluc- Δ 183-342 étant le même plasmide que Kir3.1-Rluc mais avec la délétion des acides aminés 183 à 342 du canal; Kir3.1-Rluc- Δ 342-501 étant le même plasmide que Kir3.1-Rluc mais avec la délétion des acides aminés 342 à 501 du canal, et Kir3.2-Rluc qui a été produit en insérant le gène humain Kir3.2 étiqueté à l'extrémité C-terminale avec la Rluc à l'intérieur du vecteur pcDNA3.1+ [113]. Les plasmides comprenant les gènes étiquetés pour les expériences d'immunopurification (IP) sont le FLAG-DOR [138, 139] qui est le résultat du gène murin DOR étiqueté à l'extrémité N-terminale avec l'épitope FLAG à l'intérieur du vecteur pcDNA3, et le FLAG-Kir3.1 qui est le résultat du gène humain Kir3.1 contenant l'épitope FLAG, inséré entre les acides aminés 114 et 115 du canal. Les plasmides comprenant les gènes non-étiquetés, soit le $G\alpha_o$, le $G\alpha_{i1}$, le $G\beta_1$, le $G\gamma_2$, le Kir3.2 et le vecteur pcDNA3.1+ ont été cotransfectés avec les plasmides étiquetés (mentionnés ci-dessus), tel qu'indiqué aux tableaux *ad hoc*.

2.3 Culture cellulaire et transfection

Toutes les expériences ont été faites sur des cellules provenant d'une lignée cellulaire issue de tissu épithélial du rein (HEK293), cultivées en milieu de base complété à 10% de sérum de veau fœtal, ainsi que de 1000 U/mL de pénicilline, de 1 mg/mL de streptomycine et de 10 μ g/mL de plasmocine,

lesdites cellules ayant été incubées à 37 °C en milieu humide supplémenté de 5% de dioxyde de carbone. Les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec des plasmides encodant les divers gènes requis en suivant la méthode de transfection polyéthylèneimine [140]. La veille de la transfection, les cellules ont été redistribuées dans des pétris à une concentration de 4.5 million de cellules par pétri de 10 cm. Le lendemain, les cellules ont été incubées 3-4h avec un mélange contenant du milieu de base, les plasmides requis (voir les tableaux à l'annexe I, pages xv-xxi, pour chaque combinaison), 150 mM de NaCl et 3 µg de PEI (pH entre 6.5 et 7.5) pour chaque µg de plasmide présent, ces trois derniers ayant été préalablement incubés 15 min ensemble avant d'être ajoutés aux cellules. Ensuite, la période d'incubation a été arrêtée en ajoutant du milieu de base supplémenté de sérum de veau fœtal à 10%. Finalement, les cellules transfectées ont été incubées 48h dans les conditions décrites plus haut.

2.4 Essais BRET

Les essais BRET ont été réalisés dans des cellules exprimant les gènes étiquetés pour le BRET, tel qu'indiqué dans les tableaux inclus à l'annexe I (pages xv-xxi). Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été lavées deux fois et détachées mécaniquement avec une solution de tampon phosphate salin (PBS), centrifugées 5 min à 300g pour ensuite être resuspendues dans cette solution PBS. Ensuite, les cellules ont été réparties à l'intérieur des puits (microplaque à 96 puits, B&W Isoplate avec puits blancs

et extérieur noir) à une concentration de 1 ou 2 mg/mL (80-160 µg par puits; méthode de Lowry, BioRad), ce qui a permis d'obtenir des niveaux de luminescence convenables, c'est-à-dire environ 15 000 comptes par seconde, pour les lectures BRET avec divers plasmides. Suite à leur suspension en solution PBS, les cellules vivantes et intactes, maintenues à la température de la pièce, ont été traitées avec 10 µM de ligand (ou PBS en tant que véhicule) pendant 2 min, suite à l'ajout du substrat de la Rluc, la coelentérazine à une concentration finale de 5 µM (Nanolight Technology), qui elle-même a été introduite 3 min auparavant, pour un total de 5 min avant les lectures. Tout de suite après, le transfert d'énergie entre la Rluc et la protéine fluorescente (EYFP ou EGFP) a été déterminé. Les lectures ont été faites par un lecteur de plaques (Victor3, Perkin Elmer) qui permet l'intégration séquentielle des signaux détectés dans les fenêtres de longueur d'ondes suivantes, à travers les filtres d'émission : la lumière émise par la Rluc, 448 à 473 nm, suivie de la lumière émise par la EYFP, 524 à 548 nm, ou la EGFP, 400 à 500 nm. Le signal BRET a été déterminé en calculant le ratio de la lecture de la EYFP ou de la EGFP sur la lecture de la Rluc. Les valeurs BRET ont ensuite été corrigées pour enlever l'auto-fluorescence des cellules en soustrayant du signal BRET total le signal de fond BRET, émis par les cellules elles-mêmes lorsque celles-ci expriment seulement la Rluc. Cette valeur corrigée a été désignée comme étant le « net BRET. » Afin de trouver les quantités de plasmides optimales pour étudier les changements de conformation potentiels

avec le BRET, des courbes de titrations ont été effectuées. Pour ces expériences, les quantités de la protéine étiquetée fluorescente ont été transfectées de façon croissante tout en conservant les autres quantités de protéines constantes, de manière à saturer le signal BRET, c'est-à-dire le transfert d'énergie entre la protéine étiquetée avec le donneur luminescent, et l'accepteur fluorescent, donnant lieu aux « $BRET_{max}$ » et « $BRET_{50}$ ». Le $BRET_{max}$ est donc défini comme étant la valeur maximale du signal BRET émis lors de la titration, alors que le paramètre qu'est le $BRET_{50}$ représente le ratio « fluorescence/luminescence » qui permet d'obtenir une valeur correspondant à 50% du $BRET_{max}$ [141]. Il convient de préciser que ces deux valeurs sont des paramètres calculés et non empiriques.

Le niveau d'expression de chaque protéine étiquetée a été déterminé par mesure directe de la fluorescence totale et de la luminescence totale des cellules transfectées. La fluorescence totale a été mesurée de nouveau avec le lecteur de plaque Victor3, mais cette fois au moyen d'une plaque avec puits transparents et extérieur blanc (microplaque à 96 puits, Isoplate); un filtre d'excitation à 485 nm; et un filtre d'émission à 535 nm pour la EYFP ou encore un miroir dichromic à 485 nm pour la EGFP. La luminescence totale a été mesurée avec le même lecteur de plaque Victor3, mais cette fois sans filtre, 10 min après l'ajout de la coelentérazine.

2.5 Co-IP des protéines étiquetées FLAG

Pour ce qui est des essais de co-IP, les cellules ont été co-transfectées avec les plasmides encodant FLAG-DOR, Kir3.1-Rluc/Kir3.2, et les sous-unités hétérotrimériques $G\alpha\beta\gamma$ ou FLAG-Kir3.1, Kir3.2, EYFP- $G\gamma_2$, DOR-Rluc, et les sous-unités $G\alpha\beta$ tel que spécifié aux tableaux VI et VII (voir annexe I, page xvii). Les cellules ont été exposées aux ligands indiqués, comme en BRET (10 μ M, 2 min), et ensuite récupérées dans le tampon PBS, pour être resuspendues dans du tampon de lyse (5 mM de trishydroxyméthylaminométhane (Tris), 3 mM de chlorure de magnésium ($MgCl_2$), 2 mM d'EDTA, 1 mM de fluorure de sodium, 5 μ g/mL de leupeptine, 5 μ g/mL d'inhibiteur de trypsine de soja, et 10 μ g/mL de benzamidine) après quoi les cellules ont été homogénéisées 20 sec avec un homogénéisateur Ultraturax (IKA, Wilmington, NC, États-Unis). Suite à une centrifugation à 300g pendant 5 min, afin d'éliminer les mitochondries et noyaux, le surnageant a été centrifugé à 30 000g pendant 20 min et le culot résultant a été resuspendu dans du tampon de lyse pour un second tour de centrifugation (30 000g, 20 min). Le culot obtenu a été solubilisé sous agitation à 4 °C pendant 2h dans une solution contenant 0.5% de *n*-dodécylmaltoside, 25mM de Tris, pH 7.4, 140mM de NaCl, 2mM de EDTA, 1mM de fluorure de sodium, 5 μ g/mL de leupeptine, 5 μ g/mL d'inhibiteur de trypsine du soya, et 10 μ g/mL de benzamidine, et ensuite centrifugé à 10 000

g pendant 30 min. À partir du surnageant, les IP du récepteur et du canal ont été réalisées à l'aide d'une résine d'agarose couplée à un anticorps anti-FLAG M2 (60 µL par échantillon), préalablement équilibrée dans le tampon de solubilisation supplémenté de 0.1% de sérum albumine bovine. Après incubation de 12-16h sous agitation à 4 °C, la résine a été amassée et lavée deux fois avec 500 µL du tampon de solubilisation et quatre fois avec 500 µL d'un tampon de solubilisation contenant 0.1% au lieu de 0.5% de *n*-dodécyl-maltoside. Le récepteur ou le canal a subséquemment été élué trois fois par incubation de la résine pendant 10 min à 4°C avec 100 µL d'un tampon de solubilisation modifié contenant 150 µg/mL d'un peptide FLAG, et les éluats ont été combinés et concentrés par filtration membranaire au-dessus de concentrateurs de Microcon-30 (Millipore). Les échantillons ont ensuite été analysés selon la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium et la méthode de BW. Le tampon d'échantillon de dodécylsulfate de sodium a été ajouté (55 µL par échantillon), puis les échantillons, ainsi qu'une échelle de protéine, ont été déposés sur un gel d'empilement de 4% suivi d'un gel séparateur de 10%. Les protéines ont ensuite été transférées (50 mA, 16h; appareil Bio-Rad Mini-TransBlot) du gel séparateur à une membrane de nitrocellulose, et la quantité de EYFP-G γ_2 ou Kir3.1-Rluc récupérée avec le FLAG-Kir3.1 (anti-M2-FLAG, souris, 1:1000) ou FLAG-DOR (anti-FLAG M2, lapin, 1:1000) immunopurifié (respectivement) a été évaluée en utilisant des anticorps contre

la GFP (lapin, 1:5000) ou contre la Rluc (1:500), suivi d'anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris couplés au raifort (1:40 000 Amersham Biosciences) [142].

2.6 Liaison de [³⁵S]GTPγS

Les essais de [³⁵S]GTPγS ont été faits avec des membranes cellulaires telles que décrites précédemment [143]. Les cellules ont été suspendues dans du tampon de lyse (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 5 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL inhibiteur de trypsine de soja, and 10 µg/mL benzamidine) et homogénéisées 3 fois 5 sec au réglage maximum d'un homogénéisateur Polytron (Ultra-Turrax T-25, Janke & Kunkel). Les homogénats ont été centrifugés 5 min à 700g et le surnageant a été de nouveau centrifugé, cette fois à 27 000g pendant 20 min. Les culots ont été lavés deux fois avec du tampon de lyse et immédiatement resuspendus dans du tampon pour essai [³⁵S]GTPγS (50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithithreitol, 0.5% sérum d'albumine bovin et 3 µM GDP, pH 7.4) afin d'obtenir un rendement de 10 µg de protéine par tube. Le [³⁵S]GTPγS a été utilisé à 50 nM et la liaison non-spécifique a été déterminée en présence de 100 µM de GTP. Les ligands ont été introduits à une concentration finale de 100 nM pendant 60 min à température ambiante, et la réaction a été arrêtée par filtration rapide sur filtres de verre Whatman GF/C prétrempés dans l'eau. Les filtres ont été lavés deux fois avec du tampon de

lavage glacé (pH 7) contenant 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, et 50 mM NaCl, et la radioactivité retenue a été déterminée par scintillation liquide.

2.7 Analyse de données

Tous les résultats compilés sont présentés sous forme de moyenne des données provenant de répétitions d'une même expérience \pm l'erreur standard. Les comparaisons statistiques ont été effectuées par analyse de variance à mesures répétées à un facteur ou à deux facteurs, suivie de tests de comparaisons multiples de Bonferroni ou du test de Dunnett, afin de comparer les effets des ligands avec les conditions de base ou entre eux. Les analyses statistiques et ajustements de courbes ont tous été faits en utilisant Prism4 (GraphPad, San Diego, États-Unis).

3. Exposé et analyse des résultats

3.1 Les canaux potassiques Kir3 forment des complexes constitutifs avec les DOR et les protéines G hétérotrimériques

Nous avons préalablement démontré que les DOR et l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$ forment un complexe constitutif [142]. Puisque les canaux Kir3 sont des effecteurs de DOR activés via $G\alpha\beta\gamma$, et puisque les canaux Kir ont été démontrés comme interagissant de façon constitutive avec d'autres RCPG et leurs protéines G [113, 144, 145], nous étions intéressés à chercher si tel était le cas des DOR, protéines G et Kir3.

Tout d'abord, l'interaction entre les protéines DOR et le canal Kir3.1/3.2 a été étudiée. Pour cela, nous avons utilisé la paire BRET constituée de DOR-EYFP et Kir3.1-Rluc, de même que le complexe $G\alpha\beta\gamma$, plus la sous-unité Kir3.2 du canal. La constitution et la spécificité de cette interaction ont été analysées en faisant des courbes de titration BRET où les ratios d'accepteur pour donneur étaient modulés en augmentant progressivement la quantité de protéine étiquetée de l'accepteur (DOR-EYFP), tout en maintenant constante la quantité de protéine étiquetée du donneur (Kir3.1-Rluc). La courbe résultante est une hyperbole quadrangulaire, qui est représentée par deux paramètres : le $BRET_{max}$ et le $BRET_{50}$, tels que décrits dans l'introduction. Les paramètres calculés pour la courbe, en utilisant Prism4, sont donnés à la figure 11, page 55. La saturation du signal BRET basal que nous avons observé décrit typiquement une situation où toutes

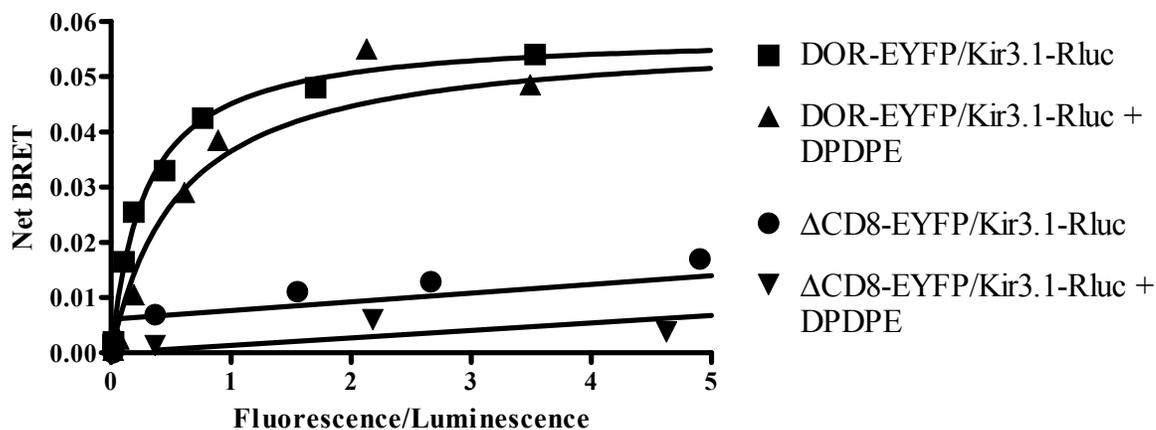


Figure 11. Les canaux potassiques Kir3 interagissent de façon spécifique et constitutive avec DOR

Des cellules HEK293 exprimant une quantité fixe du donneur Kir3.1-Rluc ainsi que des sous-unités $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ et Kir3.2 ont été transfectées avec des quantités croissantes des accepteurs listés dans la figure. L'agoniste DPDPE a été introduit à une concentration de 10 μM , 2 min avant la lecture du signal BRET. Les résultats ont été exprimés en net BRET (voir la section méthodologie, page 48, pour le calcul du net BRET expérimental) et correspondent à un exemple représentatif. Les quantités de plasmides transfectées sont indiquées aux tableaux II et III de l'annexe I (pages xv et xvi). Pour la courbe DOR-EYFP/Kir3.1-Rluc basal, le BRET_{max} est de 0.058 ± 0.004 (calculé à partir de l'asymptote de la courbe) et le BRET_{50} est de 0.283 ± 0.080 . Pour la courbe DOR-EYFP/Kir3.1-Rluc avec traitement DPDPE, le BRET_{max} est de 0.057 ± 0.004 et le BRET_{50} est de 0.572 ± 0.162 . La droite $\Delta\text{CD8-EYFP/Kir3.1-Rluc}$ donne une pente de 0.0001 ± 0.0002 . Pour la droite $\Delta\text{CD8-EYFP/Kir3.1-Rluc}$ avec traitement DPDPE, la pente est de 0.0002 ± 0.0002 .

les protéines donneuses sont considérées comme étant en étroite proximité des protéines accepteuses permettant l'émission d'un tel signal. De plus, puisque cette interaction saturable est présente en situation basale sans l'ajout d'agoniste, on peut conclure qu'il s'agit d'une interaction constitutive (figure 11, page 55).

Ensuite, l'interaction entre les protéines Δ CD8 et Kir3.1 a été évaluée. La protéine tronquée Δ CD8 exhibe une distribution similaire au récepteur mais n'interagit pas avec le canal Kir3 et peut donc servir de contrôle de la spécificité de l'interaction BRET [136]. La même expérience de titration décrite ci-dessus a été faite en augmentant progressivement les quantités de Δ CD8-EYFP tout en conservant les quantités de Kir3.1-Rluc constantes. Tel qu'illustré dans la figure 11, page 55, il n'y a pas eu d'hyperbole quadrangulaire décrivant une saturation mais plutôt une faible pente insaturable, ce qui indique typiquement une interaction non-spécifique (figures 11 et 13, pages 55 et 60).

Afin d'évaluer d'avantage la spécificité de l'interaction entre DOR et Kir3.1, une expérience de compétition a été menée sur l'interaction entre DOR-EYFP et Kir3.1-Rluc. En d'autres termes, l'une des deux protéines de la paire BRET est mise en compétition avec sa contrepartie non-étiquetée, afin de déterminer s'il y a effet sur le signal BRET et donc sur la proximité entre le donneur et l'accepteur. Ici, des quantités de FLAG-Kir3.1 ont été transfectées de façon croissante dans des cellules exprimant la paire BRET DOR-

EYFP/Kir3.1-Rluc. Le signal BRET a été diminué au fur et à mesure que les quantités de FLAG-Kir3.1 ont augmenté, supportant la conclusion initiale que DOR-EYFP et Kir3.1-Rluc forment un complexe spécifique (figure 24, annexe II, page xxii, ajustement de courbe fait en utilisant Prism4).

Finalement, afin de confirmer que les protéines DOR et Kir3.1 forment un complexe de façon constitutive, des expériences d'IP ont été faites *in vitro* où le récepteur étiqueté FLAG, a été purifié, et les quantités de Kir3.1-Rluc récupérées avec le récepteur ont été évaluées en présence ou en absence de l'agoniste DPDPE. Tel que démontré à la figure 12, page 58, la sous-unité du canal a été récupérée avec le récepteur en présence ou en absence d'agoniste, indiquant l'organisation de ces deux protéines à l'intérieur d'un complexe stable et constitutif qui est préservé lors des premiers stades de l'activation du récepteur. Ainsi, les données démontrent que DOR et Kir3.1/3.2 interagissent de façon constitutive pour former un complexe récepteur/effecteur.

Nous avons préalablement démontré que DOR interagit de façon constitutive et spécifique avec $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ [142]. Donc, d'après nos résultats obtenus pour l'interaction entre DOR et le canal, il devrait s'ensuivre que Kir3.1/3.2 et les composantes de la protéine G interagissent aussi de façon constitutive et spécifique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons choisi de tester l'interaction Kir3 avec le dimère $G\beta\gamma$, la portion de la protéine G qui

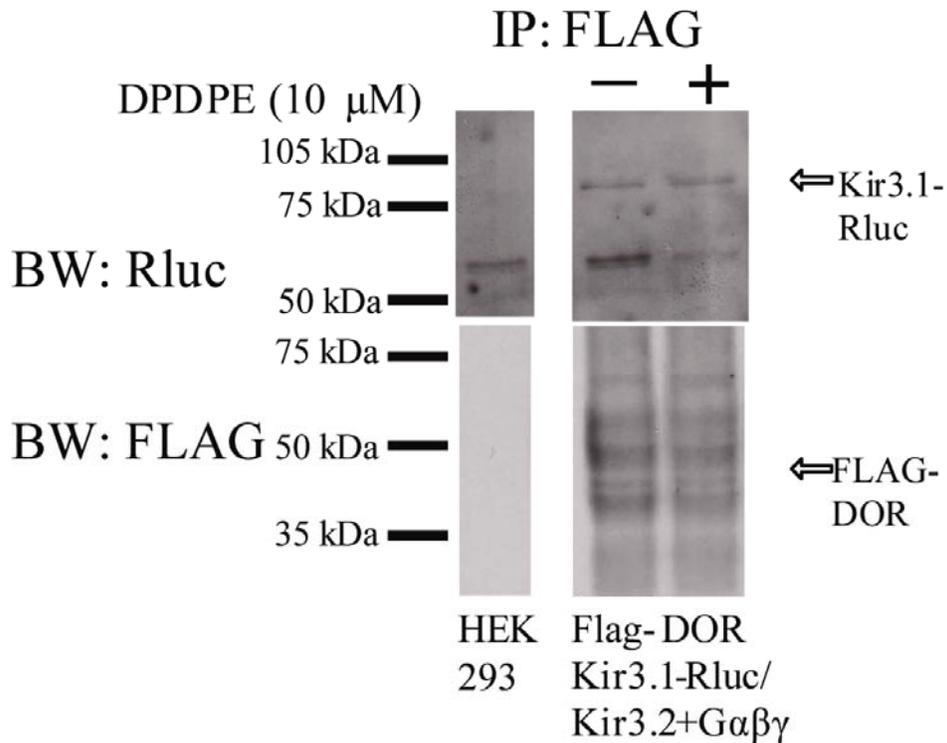


Figure 12. Le traitement avec DPDPE n'affecte pas la quantité de Kir3.1 récupérée avec le FLAG-DOR immunopurifié

Des cellules HEK293 non-transfectées (premier puits, ci-dessus) ainsi que des cellules HEK293 transfectées avec Kir3.1-Rluc, les sous-unités G α β γ , Kir3.2 et FLAG-DOR, tel qu'indiqué au tableau VI de l'annexe I, page xvii (deuxième et troisième puits ci-dessus) ont été utilisées dans cette co-IP. Les protéines FLAG-DOR (environ 48 kDa) [146] ont été immunopurifiées et les quantités de Kir3.1-Rluc (environ 93 kDa) récupérées avec ou sans traitement DPDPE (10 μ M, 2 min) ont été comparées par immunoblot et n'ont révélé aucune différence. L'expérience a été faite une fois.

active directement le canal [95, 147, 148]. L'interaction entre la sous-unité hétérotrimérique $G\gamma_2$ et le canal Kir3.1 a été analysée par une titration dans laquelle des quantités fixes de Kir3.1-Rluc, Kir3.2, FLAG-DOR et les sous-unités hétérotrimériques complémentaires $G\alpha_o$ et $G\beta_1$ ont été co-exprimées en parallèle avec des quantités croissantes de EYFP- $G\gamma_2$. Effectivement, la titration pour cette paire BRET a également produit une hyperbole saturée, indiquant que notre supposition était correcte et qu'il y a une interaction de base entre les deux protéines (figure 13, page 60, ajustement de courbe fait en utilisant Prism4). De plus, le traitement avec SNC-80 (10 μ M, 2 min) induit une modulation du signal BRET, qui ne se voit pas en absence du récepteur (voir Figure 25, à l'annexe II, page xxiii) ou chez le contrôle négatif Δ CD8-EYFP/Kir3.1-Rluc (figure 13, page 60).

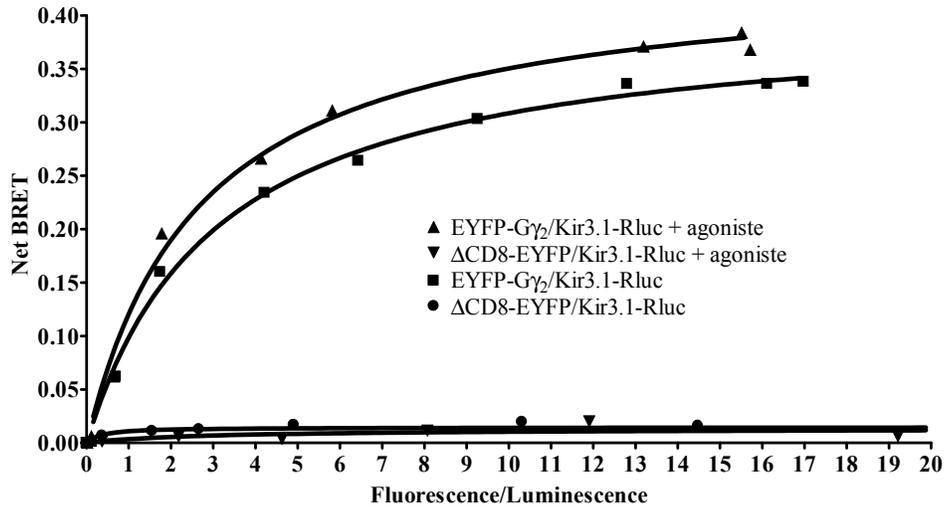


Figure 13. Les canaux potassiques Kir3 interagissent de façon constitutive et spécifique avec des complexes comprenant la sous-unité G γ_2 hétérotrimérique et cette interaction est modulable par un agoniste

Des cellules HEK293 exprimant une quantité fixe du donneur Kir3.1-Rluc ainsi que des sous-unités G $\alpha_0\beta_1\gamma_2$ et Kir3.2 ont été transfectées avec des quantités croissantes des accepteurs listés dans la figure. L'agoniste SNC-80 a été introduit à une concentration de 10 μ M, 2 min avant la lecture du signal BRET. Les résultats ont été exprimés en net BRET (voir méthodologie, page 48, pour le calcul du net BRET). Les quantités de plasmides transfectées sont indiquées aux tableaux III et IV de l'annexe I (page xvi). Pour la courbe EYFP-G γ_2 /Kir3.1-Rluc basal, le BRET_{max} est de 0.403 ± 0.011 et le BRET₅₀ est de 3.089 ± 0.301 . Pour la courbe EYFP-G γ_2 /Kir3.1-Rluc avec traitement SNC-80, le BRET_{max} est de 0.444 ± 0.014 et le BRET₅₀ est de 2.679 ± 0.319 . La droite Δ CD8-EYFP/Kir3.1-Rluc donne une pente de 0.0001 ± 0.0002 . Pour la droite Δ CD8-EYFP/Kir3.1-Rluc avec traitement, la pente est de 0.0002 ± 0.0002 .

Une deuxième expérience de co-IP a été effectuée cette fois pour évaluer l'interaction Kir3.1-Rluc/EYFP-G γ_2 . La figure 14, page 62, démontre que G γ_2 peut être récupéré suite à l'IP de la sous-unité FLAG-Kir3.1, corroborant ainsi l'interaction constitutive des deux protéines. De plus, le fait que l'exposition à l'agoniste DPDPE ne change pas la quantité de G γ_2 qui précipite avec le canal indique que, tout comme pour l'interaction DOR/Kir3, celle de G γ_2 /Kir3 demeure également stable suite à l'activation du récepteur.

Somme toute, les résultats obtenus en IP démontrent une association constitutive entre le canal Kir3 et le récepteur, ainsi qu'entre l'effecteur et la sous-unité G γ . En plus, les résultats BRET permettent d'étendre cette conclusion à l'interaction *in vivo* entre les protéines G, DOR et effecteur, tel qu'indiqué par un signal BRET de base et spécifique, généré par les paires BRET évaluant l'interaction de Kir3 avec DOR et la sous-unité γ de la protéine G.

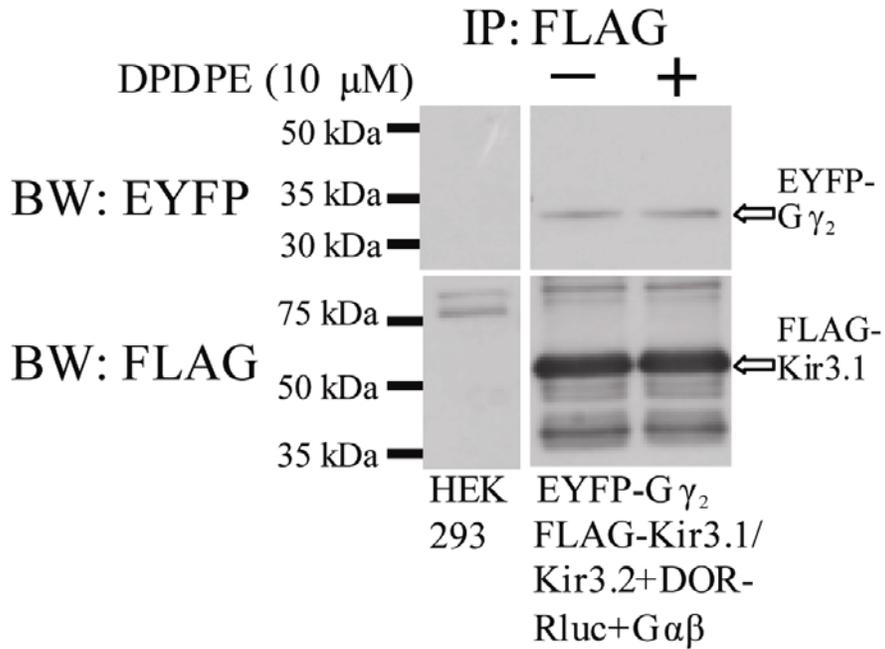


Figure 14. Le traitement avec DPDPE n'affecte pas la quantité de $G\gamma_2$ récupérée avec le FLAG-Kir3.1 immunopurifié

Des cellules HEK293 non-transfectées (premier puits, ci-dessus) ainsi que des cellules HEK293 transfectées avec ou sans FLAG-Kir3.1, EYFP- $G\gamma_2$, les sous-unités $G\alpha\beta\gamma$ et Kir3.2, telles qu'indiquées au tableau VII de l'annexe I, page xvii (deuxième et troisième puits ci-dessus) ont été utilisées dans cette co-IP. Les protéines FLAG-Kir3.1 (environ 56 kDa) ont été immunopurifiées et les quantités de EYFP- $G\gamma_2$ (environ 32 kDa) récupérées avec ou sans traitement DPDPE (10 μ M, 2 min) ont été comparées par immunoblot. L'expérience correspond à un exemple représentatif de 2 expériences et les résultats n'ont révélé aucune différence que ce soit avec ou sans le traitement.

3.2 Étude de l'effet de ligands DOR sur l'interaction entre les différentes composantes du complexe DOR-G α β γ -Kir

3.2.1 L'effet des ligands au niveau de l'interaction DOR/canaux Kir3 est minimal et ne suit pas l'ordre d'efficacité connu des ligands

Les titrations obtenues dans la section précédente ont démontré que le ligand DPDPE ne modifiait pas le signal BRET basal produit par la paire BRET DOR-EYFP/Kir3.1-Rluc. Afin de déterminer si le manque d'effet était une caractéristique de ce ligand en particulier, nous avons cherché à déterminer les effets d'une panoplie d'autres ligands DOR qui abritent toute une gamme d'efficacités comprenant des agonistes inverses, des antagonistes ainsi que des agonistes partiels et complets [67, 149].

Tel que mentionné dans la section méthodologie, les effets de ligands ont été évalués dans les conditions optimales de transfection de plasmides donnant un signal BRET de base correspondant à la zone de saturation de la courbe de titration, et nous avons comparé l'efficacité des différents ligands à moduler le signal basal. La figure 15A, page 65, illustre la façon dont chacun des ligands testés a modifié ce signal de base. Aucun ligand n'a produit de changement significatif dans l'interaction DOR/Kir3 tel qu'établi par la paire DOR-EYFP/Kir3.1-Rluc : ($p > 0.05$ et $n = 3$ pour la valeur net BRET de chaque ligand comparée avec la valeur net BRET basale, soit 0.042 ± 0.002 (analyse de variance à mesures répétées, suivie du test de Dunnett). Afin d'éliminer la possibilité que le manque d'effet soit occasionné par l'emplacement de l'étiquette, nous avons répété le même type d'expérience, en utilisant cette

fois une paire BRET dans laquelle les étiquettes de donneur et d'accepteur étaient inversées : DOR-Rluc et Kir3.1-EGFP. Tel qu'illustré à la figure 15B, page 65, les changements du signal basal induit par les différents ligands étaient minimaux, suggérant fortement que l'emplacement des étiquettes n'est pas à la base du manque de modulation de l'interaction DOR/Kir3 par les ligands ($p > 0.05$ et $n = 5$ pour la valeur net BRET de chaque ligand comparée avec la valeur net BRET basale, soit 0.033 ± 0.002 ; analyse de variance à mesures répétées, suivie du test de Dunnett). L'absence presque généralisée de changements BRET significatifs a aussi été observé lors de la substitution de Kir3.1-Rluc par Kir3.2-Rluc en tant que donneur sauf pour TIPP pour lequel le test de statistique s'est révélé significatif (0.079 ± 0.003 ; $p > 0.05$ et $n = 7$ pour la valeur net BRET de chaque ligand comparée avec la valeur net BRET basale, soit 0.087 ± 0.003 ; analyse de variance à mesures répétées, suivie du test de Dunnett), voir figure 15C, page 65. Prises ensemble, ces observations nous amènent à penser que le changement conformationnel entre DOR et Kir serait minimal.

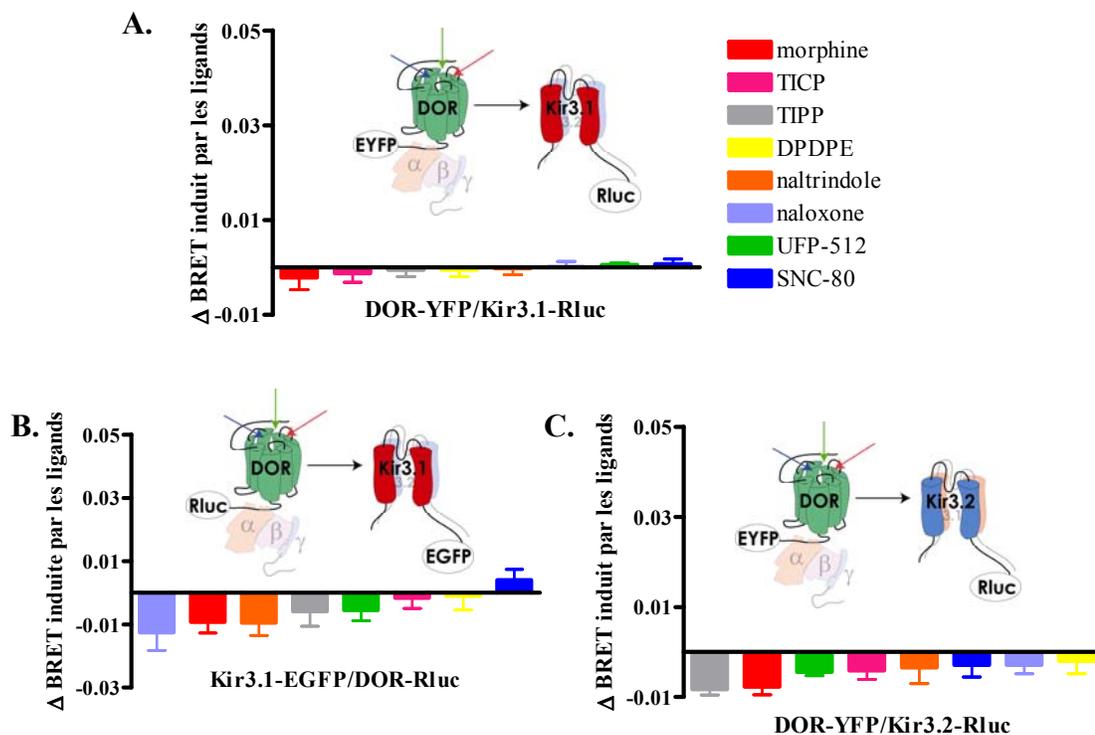


Figure 15. Les ligands du DOR ne modifient pas l'interaction du récepteur avec l'effecteur

Afin de décoder les changements d'interaction induits par divers ligands DOR à l'intérieur du complexe multimérique comprenant DOR, $G\alpha\beta\gamma$ et Kir3.1/3.2, plusieurs paires BRET ont été testées. Des cellules HEK293 exprimant les paires BRET ci-dessus ont été traitées avec huit différents ligands et le signal BRET basal (sans traitement) a été soustrait des signaux BRET obtenus suite aux traitements de ligands (10 μ M, 2 min). Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de la différence et ont été obtenus en faisant les traitements en parallèle, voir les tableaux VIII, IX et X à l'annexe I (pages xvii et xviii) pour les conditions de transfection. Les Δ BRET ont été comparés les uns aux autres (analyse de variance à mesures répétées, suivie du test de Dunnett) afin de déterminer s'il y avait un ordre d'efficacité dans les effets des ligands, mais tous les résultats se sont avérés non significatifs, c'est-à-dire que nous n'avons pas vu de différence d'efficacité des ligands à modifier le signal BRET. **A.** Les cellules transfectées expriment l'accepteur DOR-EYFP et le donneur Kir3.1-Rluc (n = 3). **B.** Les cellules transfectées expriment l'accepteur Kir3.1-EGFP et le donneur DOR-Rluc (n = 5). **C.** Les cellules transfectées expriment l'accepteur DOR-EYFP et le donneur Kir3.2-Rluc (n = 7).

3.2.2 L'effet des ligands sur d'autres interactions à l'intérieur du complexe DOR/Kir3 est significatif et suit l'ordre d'efficacité connu des ligands

3.2.2.1 Étude de l'effet de ligands DOR sur l'interaction entre le récepteur DOR et la sous-unité G γ

Les données obtenues dans la section précédente indiquent que nous avons analysé l'interaction de DOR et Kir3 avec différentes paires BRET mais la majorité n'indiquait pas de changement, sauf TIPP. Pourtant, la paire BRET n'a pas détecté de changement BRET pour les ligands étant connus comme ayant un effet d'activation du canal Kir. Donc, malgré l'association constitutive entre le DOR et les canaux Kir3, l'effet des ligands sur le RET n'est pas prédictif de leur capacité à ouvrir le canal Kir. Ces observations sont consistantes avec notre compréhension actuelle de l'activation du canal Kir3 via les protéines G hétérotrimériques et non pas directement par le récepteur. En effet, plusieurs études ont démontré que le dimère G $\beta\gamma$ est essentiel pour l'activation des Kir3 via les RCPG [150].

Nos données antérieures démontrent également que les changements BRET induits par la liaison de ligands au DOR sont directement transmis à leurs partenaires de signalisation en aval, soit G α et G $\beta\gamma$ [142]. En accord avec ces études, nous avons observé que le net BRET basal généré par DOR-Rluc et EYFP-G γ_2 (0.169 ± 0.004) a été augmenté de façon significative par SNC-80 et DPDPE 10 μ M, 2 min (net BRET après SNC-80 : 0.207 ± 0.007 , n = 5; p < 0.01 et net BRET après DPDPE : 0.188 ± 0.004 , n = 5; p < 0.05;

analyse de variance à mesures répétées, suivie du test de Dunnett). De plus, la comparaison des changements BRET induits par les différents ligands a démontré que la modification du transfert d'énergie était liée à leur efficacité à activer le récepteur, tel qu'indiqué par le fait que l'augmentation induite par le très efficace agoniste SNC-80 était significativement plus élevée [151] que ceux induits par l'agoniste DPDPE et les agonistes partiels morphine et UFP-512, qui étaient à leur tour plus élevés que l'antagoniste neutre naloxone (figure 16, page 68) [66, 67].

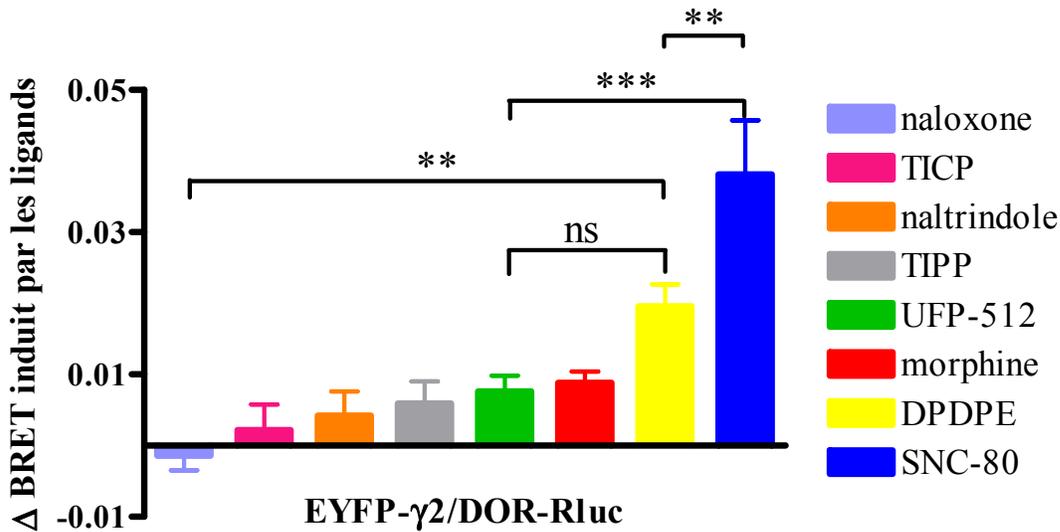


Figure 16. La liaison de ligands au DOR modifie le transfert énergétique à l'interface du récepteur avec la sous-unité $G\gamma_2$ de la protéine G hétérotrimérique

La paire BRET utilisée ici est composée du donneur DOR-Rluc et de l'accepteur EYFP- $G\gamma_2$, le premier étiqueté à l'extrémité C-terminale et le second à l'extrémité N-terminale, voir le tableau XI à l'annexe I (page xviii) pour les conditions de transfection. Les résultats ci-dessus correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 5 expériences effectuées en parallèle afin d'évaluer les changements de net BRET induits par les ligands énumérés ci-haut. Les changements ont été calculés en soustrayant le BRET basal du BRET détecté en présence des ligands. Une analyse de variance à mesures répétées, suivie de tests de Dunnett entre SNC-80 et UFP-512, morphine et DPDPE a été faite et a démontré une différence significative ($p < 0.01$). Une seconde analyse de variance à mesures répétées, suivie de tests de Dunnett a également été faite afin de comparer ces 3 derniers ligands avec la naloxone, ce qui a donné lieu à une autre différence significative, telle qu'illustré ci-dessus.

ns = non significatif

** = $p < 0.01$

*** = $p < 0.001$

3.2.2.2 Étude de l'effet de ligands DOR sur l'interaction entre la sous-unité $G\gamma_2$ et les canaux potassiques Kir3

Subséquentement, l'analyse statistique de l'action des ligands sur l'interaction EYFP- $G\gamma_2$ /Kir3.1-Rluc a révélé un type de résultat semblable à celui décrit ci-haut, dans lequel différents ligands ont produit une augmentation significative au net BRET : net BRET basal : 0.237 ± 0.011 ; net BRET après SNC-80 : 0.285 ± 0.014 , $n = 13$, $p < 0.01$; net BRET après DPDPE : 0.268 ± 0.013 , $n = 13$, $p < 0.01$; net BRET après UFP-512 : 0.254 ± 0.013 , $n = 13$, $p < 0.01$; net BRET après morphine : 0.253 ± 0.013 , $n = 13$, $p < 0.01$; analyse de variance à mesures répétées, suivie du test de Dunnett. La comparaison des changements BRET induits par les différents ligands a démontré que la modification du transfert d'énergie était liée à leur efficacité à activer le récepteur, tel qu'indiqué par le fait que l'augmentation induite par le très efficace agoniste SNC-80 était significativement plus élevée [151] que celles induites par les agonistes partiels DPDPE, morphine et UFP-512, qui étaient à leur tour plus élevées que celles induites par les antagonistes naloxone, naltrindole, TICP et TIPP, analyse de variance à mesures répétées, suivie de tests de comparaisons multiples de Bonferroni (figure 17, page 70) [66, 67].

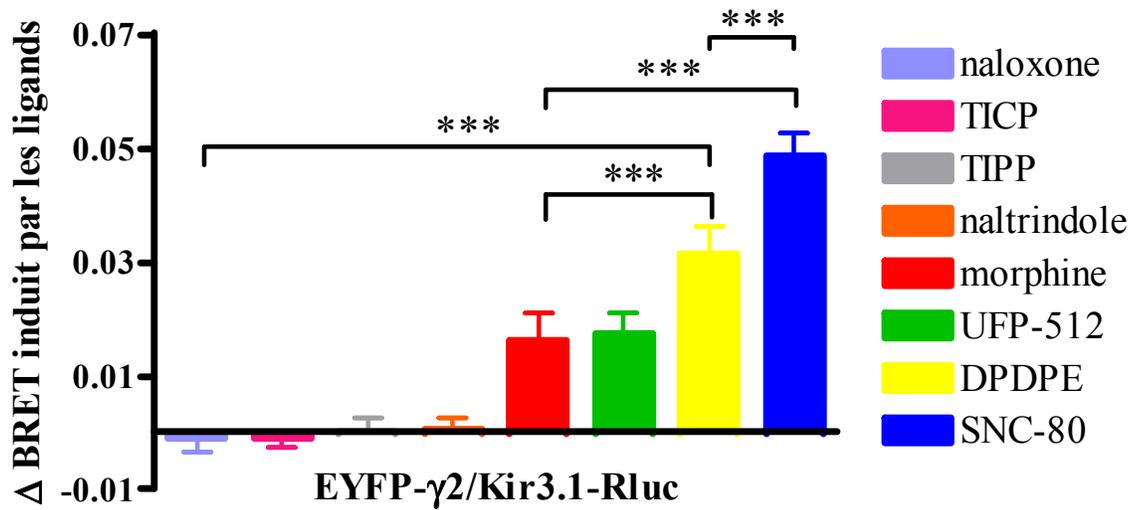


Figure 17. La liaison de différents ligands au DOR induit un changement de transfert d'énergie entre les paires BRET déterminant l'interaction $G\gamma/Kir3.1$

La paire BRET utilisée ici est composée de l'accepteur EYFP- $G\gamma_2$ et du donneur Kir3.1-Rluc, le premier étiqueté à l'extrémité N-terminale et le second à l'extrémité C-terminale, voir le tableau XII à l'annexe I (page xix) pour les conditions de transfection. Les résultats ci-dessus correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 13 expériences effectuées en parallèles afin d'évaluer les changements de net BRET induits par les ligands énumérés ci-haut. Les changements ont été calculés en soustrayant le BRET basal du BRET détecté en présence des ligands. Les analyses de variance à mesures répétées, suivie de tests de comparaisons multiples de Bonferroni entre SNC-80 et UFP-512, morphine et DPDPE, ainsi qu'entre ces 3 derniers et la naloxone ont donné lieu aux valeurs p indiquées dans la figure ci-dessus.

*** = $p < 0.001$

La figure 18, page 72, illustre des changements BRET quasi identiques à ceux de la figure 17, page 70, la seule différence étant que le donneur ici est Kir3.2-Rluc et non Kir3.1-Rluc, en relation avec EYFP-G γ_2 . Nous avons observé que le net BRET basal généré par Kir3.2-Rluc et EYFP-G γ_2 (0.152 ± 0.011) a été augmenté de façon significative par SNC-80, DPDPE, morphine et UPF-512 à 10 μ M, 2 min (net BRET après SNC-80 : 0.171 ± 0.013 , n = 7; p < 0.01, net BRET après DPDPE : 0.161 ± 0.010 , n = 7; p < 0.01, net BRET après morphine : 0.163 ± 0.012 , n = 7; p < 0.01 et net BRET après UFP-512 : 0.160 ± 0.011 , n = 7; analyse de variance à mesures répétées, suivie du test de Dunnett). De plus, la comparaison des changements BRET induits par les différents ligands a démontré que la modification du transfert d'énergie était reliée à leur efficacité à activer le récepteur, tel qu'indiqué par le fait que l'augmentation induite par le très efficace agoniste SNC-80 était significativement plus élevée [151] que celles induites par l'agoniste DPDPE et les agonistes partiels morphine et UFP-512, qui étaient à leur tour plus élevées que celle induite par l'antagoniste neutre naloxone (figure 18, page 72) [66, 67]. Ainsi, le transfert d'énergie induit par les différents ligands est détectable autant avec la paire BRET G γ_2 /Kir3.1 qu'avec G γ_2 /Kir3.2 et les effets induits par les ligands sont reproductibles avec les deux biosenseurs, ce qui est escompté puisque le canal fonctionnel est un hétérodimère des deux sous-unités.

En fait, les changements BRET induits par les ligands à l'interface DOR/G γ sont directement corrélés à ceux observés pour l'interaction G γ /Kir3.1 (figure 18, page 72). Ces observations sont consistantes avec la notion que les changements résultant de l'activation du récepteur sont transmis au dimère G $\beta\gamma$, qui les transmet à son tour directement vers le canal effecteur (figure 19, page 73).

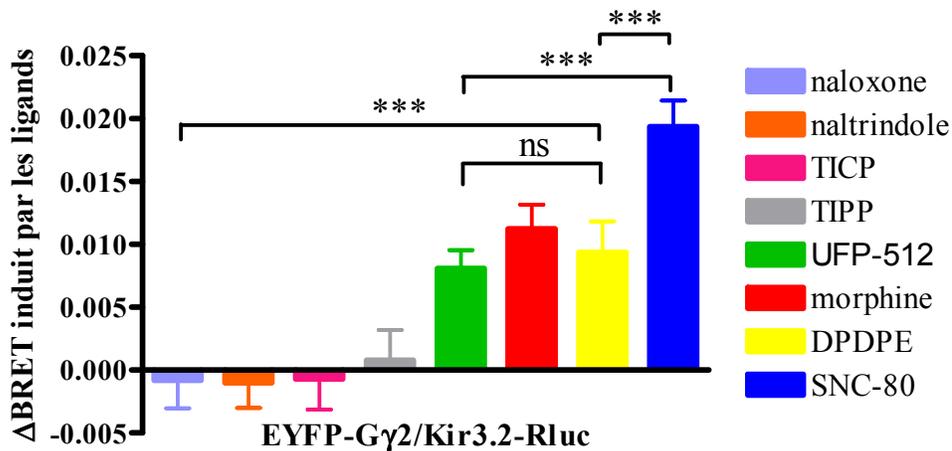


Figure 18. La liaison de différents ligands au DOR induit un changement dans le transfert d'énergie entre les paires BRET déterminant l'interaction G γ /Kir3.2

La paire BRET utilisée ici est composée de l'accepteur EYFP-G γ_2 et du donneur Kir3.2-Rluc le premier étiqueté à l'extrémité N-terminale et le second à l'extrémité C-terminale, voir le tableau XIII à l'annexe I (page xix) pour les conditions de transfection. Les résultats ci-dessus correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne de 7 expériences effectuées en parallèle afin d'évaluer les changements de net BRET induits par les ligands énumérés ci-haut. Les changements ont été calculés en soustrayant le BRET basal du BRET détecté en présence des ligands. Les analyses de variance à mesures répétées, suivie de tests de Dunnett entre SNC-80 et UFP-512, morphine et DPDPE, ainsi qu'entre ces 3 derniers et la naloxone ont donné lieu aux valeurs p indiquées dans la figure ci-dessus.

ns = non significatif

*** = $p < 0.001$

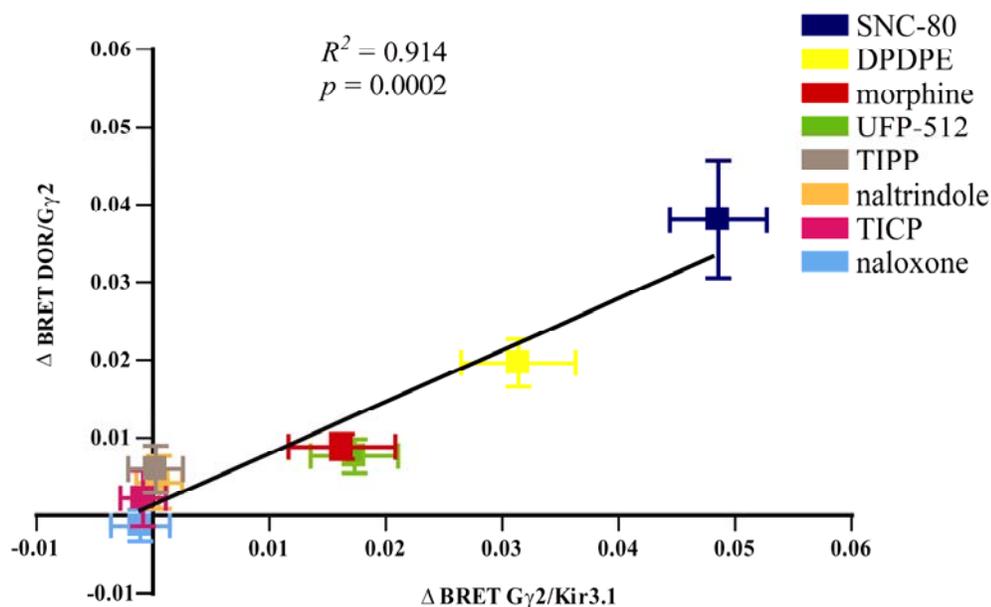


Figure 19. Les changements BRET induits par les ligands à l'interface de DOR/ $G\beta\gamma$ sont directement corrélés à ceux qui prennent place à l'interface de $G\beta\gamma/\text{Kir}3.1$

Les effets des ligands sur l'interaction $G\gamma_2$ -Kir3 étaient corrélés avec ceux observés pour la paire $G\gamma_2$ -DOR, d'après une analyse de corrélation faite avec le logiciel Prism4 qui a calculé un R^2 de 0.914 et une valeur p de 0.0002 pour la corrélation.

De plus, les changements BRET induits par ligands à chacune de ces interfaces successives sont concentration-dépendants et les valeurs de puissance à modifier chacune des interactions sont similaires (figure 20A et 20B, page 74), supportant davantage la notion que $G\beta\gamma$ agit en tant qu'intermédiaire, transmettant l'information du récepteur à l'effecteur. Comme on peut voir à la figure 20B, page 74, le changement du signal BRET induit par DPDPE est inhibé lorsque les cellules sont préalablement traitées avec la PTX 100 ng/mL, 16h qui inactive l'hétérotrimère $\alpha_i\beta\gamma$ [83]. Donc, il s'ensuit que l'effet DPDPE sur le BRET basal passe par l'activation de la protéine G [142, 152]. Il convient de préciser que le niveau de BRET basal n'est pas affecté par le traitement avec la PTX.

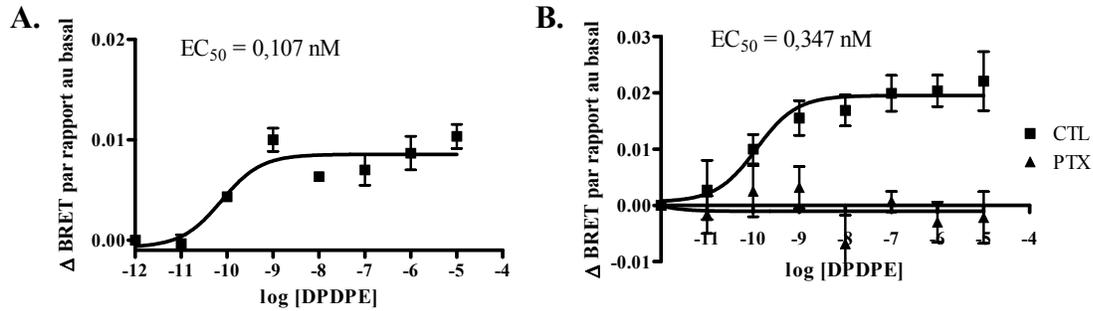


Figure 20. Les changements BRET induits par les ligands à l'interface de DOR/G $\beta\gamma$ (A) ou de G $\beta\gamma$ /Kir3.1 (B) sont concentration-dépendants

A. Des cellules HEK293 transfectées avec la paire BRET EYFP-G γ_2 et DOR-Rluc ont été traitées avec des concentrations croissantes du ligand DPDPE (0 à 10^{-5} M). **B.** Des cellules HEK293 transfectées avec la paire BRET EYFP-G γ_2 et Kir3.1-Rluc ont été traitées avec des concentrations croissantes du ligand DPDPE (0 à 10^{-5} M), en présence ou en absence de 100 ng/mL de PTX. Voir les tableaux XIV et XV à l'annexe I (pages xix et xx) pour les conditions de transfection des courbes A et B, respectivement. La courbe dose-réponse de la figure 20A a été calculée en utilisant l'outil d'analyse de courbe dose-réponse intégré au logiciel Prism4 et la concentration d'efficacité 50% a été estimée à 0.107 nM. La courbe dose-réponse de la figure 20B a été calculée de la même façon et semblablement, la concentration d'efficacité 50% a été estimée à 0.347 nM. Nous avons aussi observé que le signal de BRET basal ne change pas lorsque les cellules sont incubées avec DPDPE 10 μM , 2 min si elles ont préalablement été traitées avec la PTX.

3.2.3 Les changements des signaux BRET induits par les ligands DOR à l'intérieur du biosenseur détectant les interactions entre $G\gamma$ et Kir3 sont corrélés avec des paramètres de l'activation de la protéine G

Nous avons donc démontré que les changements BRET à l'interface $G\gamma_2$ /Kir3 sont dépendants de l'activation de la protéine G. Par la suite, nous avons fait des expériences de [35 S]GTP γ S pour certains ligands. Cet essai nous donne un index biochimique de l'activation de la protéine G suite à l'activation du récepteur par son ligand [153]. Les résultats obtenus via cet essai ont révélé que la liaison de [35 S]GTP γ S à la protéine G est plus élevée suite au traitement avec SNC-80 (2.008 ± 0.349) qu'au traitement avec DPDPE (0.986 ± 0.183), qui à son tour était plus efficace que les traitements de TIPP (-0.045 ± 0.035), naloxone (-0.137 ± 0.033) et TICP (-0.133 ± 0.052), voir figure 21A, page 76. Si on compare l'efficacité des différents ligands à activer la protéine G et à induire un changement BRET à l'interface EYFP- $G\gamma_2$ /Kir3.1-Rluc, on trouve une forte corrélation ($R^2 = 0.995$, $p = 0.0004$) des effets des différents ligands (SNC-80, DPDPE, TIPP, naloxone et TICP) perçus par les deux essais. Cette corrélation implique que le changement du signal BRET détecté par notre biosenseur est proportionnel à l'activation de la protéine $G\alpha$, une mesure directe de l'efficacité des ligands. Il existe donc une corrélation entre les paramètres de l'activation de la protéine G et le changement du transfert d'énergie en BRET à l'interface $G\gamma_2$ /Kir3.1.

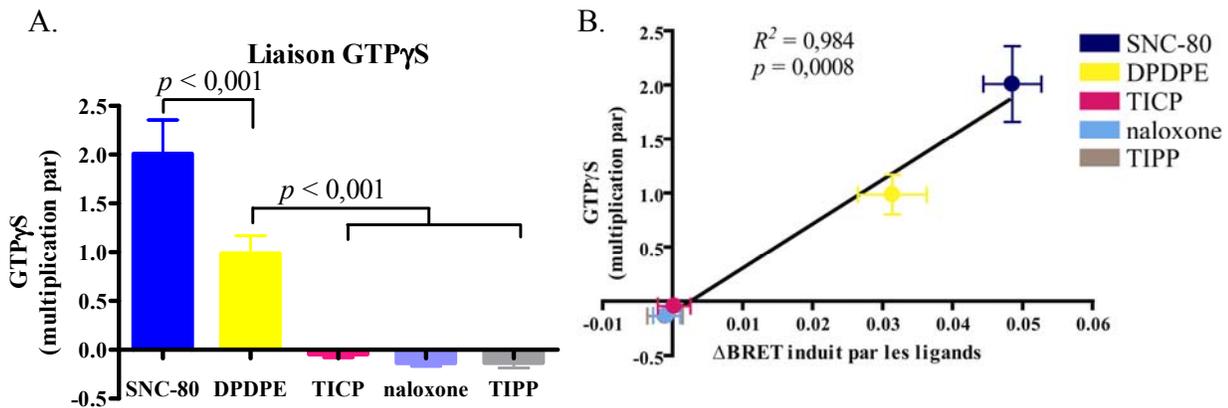


Figure 21. La capacité des ligands à induire des changements dans le signal BRET généré par le biosenseur G $\beta\gamma$ /Kir3.1 est corrélée avec les paramètres de l'activation de la protéine G

A. Des cellules HEK293 ont été co-transfectées de façon stable avec FLAG-DOR et utilisées pour les essais de liaison [35 S]GTP γ S, tel que décrit à la section méthodologie (page 52). Les résultats correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard des changements de liaison [35 S]GTP γ S induits par les ligands, provenant de plus de 7 expériences conduites en triplicata. Les analyses de variance à mesures répétées, suivies de tests de Bonferroni entre SNC-80 et DPDPE, ainsi qu'entre ce dernier et TICP, TIPP et naloxone ont donné lieu aux valeurs p indiquées dans la figure ci-dessus.

Source : Graciela Piñeyro **B.** L'efficacité des ligands à modifier l'interaction G γ_2 -Kir3 a été corrélée avec l'efficacité observée pour induire l'activation de la protéine G, telle que mesurée par la liaison du GTP radioactif. L'analyse de corrélation faite avec le logiciel Prism4 a calculé une valeur R^2 de 0.984 et une valeur p de 0.0008.

3.2.4 L'interférence avec le ciblage membranaire du canal ou la prévention de l'interaction adéquate avec le dimère $G\gamma_2$ réduit l'activité du biosenseur

Afin d'évaluer plus en profondeur la validité fonctionnelle de notre biosenseur, nous avons comparé les changements BRET induits entre $G\gamma_2$ et Kir3.1 dans des cellules co-transfectées avec ou sans la sous-unité Kir3.2. En l'absence de Kir3.2, Kir3.1 se rend moins bien à la membrane puisqu'il ne contient pas les motifs d'exportation requis, qui sont présents dans Kir3.2 [154]. Ainsi, on s'attendrait à une réduction de l'adressage à la membrane des Kir3.1 en absence de Kir3.2, de même qu'une réduction de l'action des ligands efficaces dans des cellules exprimant $G\gamma_2$ /Kir3.1 sans Kir3.2, en comparaison avec des cellules exprimant ce dernier. Afin de tester cette possibilité, nous avons comparé les changements BRET induits par SNC-80, DPDPE, UFP-512 et morphine dans des cellules exprimant ou non Kir3.2. Nos résultats BRET supportent la théorie que Kir3.1-Rluc se co-localise mieux avec les DOR membranaires en présence qu'en absence de Kir3.2. Les effets des ligands sur les valeurs net BRET générés par EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc en absence de Kir3.2 sont moindres que lorsque Kir3.2 est présent (figure 22, page 78). Ainsi, la différence entre les deux groupes a indiqué que lorsqu'on interfère avec l'exportation du canal Kir3.1 à la membrane, on interfère aussi avec la capacité du biosenseur à répondre à l'activation du récepteur. Il convient de préciser que les différences des effets observés ne seraient pas reliées aux différences entre les net BRET de base en présence et

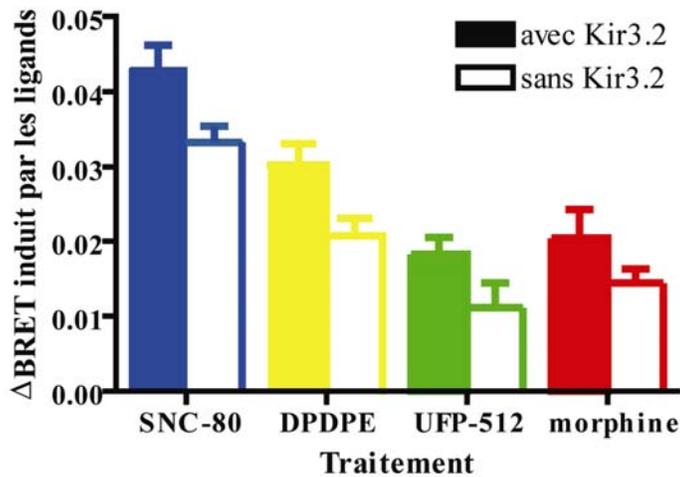


Figure 22. La capacité des ligands DOR à modifier l'interaction de $G\beta\gamma$ avec les sous-unités Kir3.1 est réduite en absence de la sous-unité Kir3.2

Des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire avec les paires BRET EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc ainsi que les sous-unités hétérotrimériques $G\alpha_o$ et $G\beta_1\gamma_2$, accompagnés ou non de la sous-unité Kir3.2 du canal ont été traitées avec divers ligands (10 μ M, 2 min) et le ratio du transfert d'énergie résultant a été comparé avec celui des cellules non-traitées (voir le tableau XVI à l'annexe I (page xx) pour les conditions de transfection). Une analyse de variance à deux facteurs a été faite afin de comparer les changements du signal BRET entre EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc en présence de Kir3.2 d'avec les changements BRET en absence de Kir3.2 (n = 7). Les résultats ont été trouvés significativement différents, $p < 0.001$. La valeur du net BRET basal en présence de Kir3.2 était de : 0.209 ± 0.012 , alors que la valeur du net BRET basal en absence de Kir3.2 était de 0.222 ± 0.021 .

absence de Kir3.2 puisque l'omission de cette sous-unité ne modifie pas le net BRET obtenu en sa présence.

Finalement, l'expérience des effets de différents ligands sur le BRET basal entre EYFP-G γ_2 et Kir3.1-Rluc a été répétée, cette fois-ci en remplaçant Kir3.1-Rluc de type naturel par l'un ou l'autre des mutants suivants : Kir3.1-Rluc Δ 183-342 ou Kir3.1-Rluc Δ 342-501, ce qui équivaut à des mutations des canaux à l'extrémité C-terminale, la région qui se lie à l'hétérodimère G $\beta\gamma$ [148]. Donc, il était attendu que le signal BRET serait réduit entre EYFP-G γ_2 et les mutants Kir3.1-Rluc si ce signal passait bel et bien par l'interaction entre le canal et la protéine G $\beta\gamma$ hétérotrimérique. Effectivement, nous avons observé non seulement l'abolition de tout changement BRET dépendant des ligands (figures 23A et 23B, page 80), mais aussi une réduction du net BRET de base. Ces observations sont consistantes avec le fait que le retrait des sites d'interaction de G $\beta\gamma$ modifie non seulement l'interaction constitutive entre la sous-unité Kir3.1 et le dimère G $\beta\gamma$ mais aussi les effets induits par les ligands activant le récepteur.

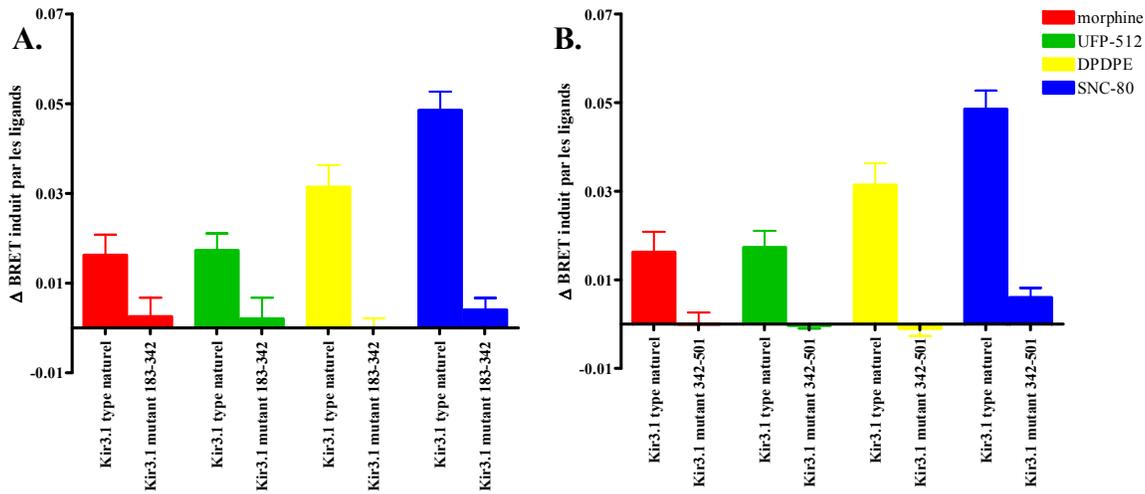


Figure 23. Les changements conformationnels subis par les sous-unités $G\beta\gamma$, suite à la liaison du ligand au récepteur, sont ressentis par les Kir3.1 de type naturel et non pas par les Kir3.1 qui n'ont pas les sites d'interaction du dimère

Des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire avec les paires BRET EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc, Kir3.1-Rluc Δ 183-342 (**A**) ou Kir3.1-Rluc Δ 342-501 (**B**) ainsi que les sous-unités hétérotrimériques $G\alpha_o$ et $G\beta_1\gamma_2$ et la sous-unité du canal Kir3.2 ont été traitées avec divers ligands (10 μ M, 2 min) et le ratio du transfert d'énergie résultant a été comparé avec celui des cellules non-traitées. Voir le tableau XVII à l'annexe I (page xx) pour les conditions de transfection. Les résultats ci-dessus correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard d'au moins 4 expériences effectuées afin d'évaluer les changements de net BRET induits par les ligands énumérés ci-haut. Les changements de net BRET ont été calculés en soustrayant le BRET basal du BRET détecté en présence des ligands. Dans les deux cas, les données ont été comparées par analyse de variance à deux facteurs répétée. Les deux comparaisons ont démontré l'effet de la sous-unité ($p < 0.0001$) où les changements BRET induits par les ligands sont plus élevés dans les cellules transfectées avec le canal potassique Kir3.1 de type naturel comparé aux canaux potassiques Kir3.1 mutants à l'extrémité C-terminale. La valeur du net BRET basal en présence de Kir3.1-Rluc Δ 183-342 était de : 0.173 ± 0.022 , alors que la valeur du net BRET basal en présence de Kir3.1-Rluc Δ 342-501 était de 0.169 ± 0.012 . Le net BRET basal pour le Kir type naturel était de : 0.237 ± 0.011 .

Discussion générale

Tout d'abord, nous avons déterminé que les DOR forment des complexes signalétiques constitutifs avec la protéine G hétérotrimérique et le canal Kir3. Nos expériences de BRET ont indiqué des signaux de base entre les paires BRET DOR-EYFP/Kir3.1-Rluc, DOR-Rluc/EYFP-G γ_2 ainsi que EYFP-G γ_2 /Kir3.1-Rluc. Nous avons interprété ces résultats comme étant représentatifs de l'association constitutive des protéines G, des récepteurs et du canal. Les expériences de co-IP ont démontré que Kir3.1 est récupéré lorsque FLAG-DOR est immunopurifié, et que G γ_2 est récupéré lorsque FLAG-Kir3.1 est immunopurifié, ce qui confirme les associations constitutives des protéines DOR et Kir3.1 ainsi que G γ_2 et Kir3.1. En plus, les titrations que nous avons faites en BRET ont révélé des signaux saturables, suggérant une interaction spécifique entre DOR et Kir3.1 ainsi qu'entre G γ_2 et Kir3.1. Par opposition, la titration du contrôle négatif entre la paire BRET Δ CD8-EYFP/Kir3.1-Rluc n'a démontré qu'une faible pente, révélant une interaction non-spécifique entre les deux protéines. Ainsi, nous avons conclu dans cette première série expérimentale que DOR et Kir3.1, de même que G γ_2 et Kir3.1 forment des associations constitutives et spécifiques.

Pour ce qui est de l'interaction entre DOR et G γ_2 , notre laboratoire avait préalablement établi, avec des méthodes semblables, que ces deux protéines forment également un complexe constitutif et spécifique qui contient

aussi les autres sous-unités de la protéine G hétérotrimérique [142]. De plus, l'étude de compétition a démontré que l'interaction BRET DOR-EYFP/Kir3.1-Rluc est déplaçable avec FLAG-Kir3.1, ce qui confirme la spécificité de l'interaction DOR/Kir3.1. Le fait que le signal BRET se soit stabilisé à environ 0.016 présente la possibilité que les cellules transfectées à de très hautes concentrations de FLAG-Kir3.1 n'expriment pas la totalité des plasmides et donc ne permet pas une réduction absolue du signal BRET.

Ensuite, nous avons établi que l'activation du DOR induit des changements conformationnels qui circulent à partir du récepteur jusqu'à l'effecteur en passant par le dimère $G\beta\gamma$ de la protéine hétérotrimérique. Par contre, l'interaction entre DOR et Kir3.1, confirmée par la courbe de titration démontrant un signal BRET saturable, n'a subi aucune modification détectable suite au traitement DPDPE de 10 μ M pendant 2 min et donc, ni induit de changement conformationnel, ni de recrutement des partenaires BRET détectables. Ceci a été confirmé avec une expérience de co-IP : les complexes DOR-Kir3.1 ne se forment pas suite à l'activation de DPDPE puisque la même quantité de Kir3.1-Rluc a été récupérée avec ou sans traitement, suite à l'IP du DOR. Le fait que nous n'ayons presque pas observé de changement BRET entre DOR et Kir3 suite au traitement avec plusieurs ligands et différentes combinaisons de biosenseurs ne garantit pas qu'il n'y ait absolument aucun changement conformationnel entre les deux protéines (voir TIPP entre DOR et Kir3.2, figure 15), mais puisque ces changements

conformationnels n'ont pas permis de détecter tous les ligands capables d'activer le canal, nous croyons que les changements conformationnels qui passent directement de DOR à Kir3 seraient minimaux et incommodes afin de produire un biosenseur.

Après avoir constaté que les ligands DOR n'occasionnaient aucun changement du signal BRET pertinent entre les différentes paires DOR/Kir3 testées, nous avons dirigé notre attention sur l'interaction entre le DOR, la protéine $G\gamma_2$ et le canal effecteur Kir3.1/3.2 pour déterminer si l'information conformationnelle passait du DOR à l'effecteur Kir3 par l'intermédiaire de la protéine G hétérotrimérique.

Notre laboratoire a déjà regardé l'interaction entre DOR et $G\alpha$ ainsi qu'entre DOR et $G\gamma$, et nous avons trouvé que les changements BRET reflétaient des changements conformationnels uniques aux ligands [142]. Lorsque les différents ligands se lient aux DOR, nous avons détecté des changements dans les signaux BRET entre DOR-GFP/ $G\alpha_{i1}$ -Rluc et DOR-Rluc/GFP- $G\gamma_2$ qui s'expliquent par des réarrangements conformationnels et non par des assemblages de nouveaux complexes DOR/protéine G. En étiquetant la sous-unité $G\alpha$ à plusieurs endroits, nous avons observé les changements de conformation induits par les ligands à partir de différents angles. Les résultats ont démontré que chaque ligand change la conformation à l'intérieur des complexes DOR/ $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i1}/G\beta_1\gamma_2$ d'une façon unique, contrairement à la théorie traditionnelle qui dicte que chaque ligand devrait

activer le récepteur dans l'un ou l'autre de deux conformations possibles – active ou inactive – mais à différents degrés [142]. Par exemple, les changements conformationnels perçus par la sous-unité $G\alpha_i$ étiquetée avec la Rluc au 60^e acide aminé sont corrélés avec l'accumulation d'AMP_c, mais ne le sont pas avec la quantité d'ERK phosphorylé. Par contre, les changements conformationnels perçus par la sous-unité $G\alpha_i$ étiquetée au 122^e acide aminé sont corrélés avec la quantité d'ERK phosphorylé, mais pas avec l'accumulation d'AMP_c.

Dans la présente étude, nous avons poursuivi la voie d'interaction entre DOR et $G\gamma$, en testant des ligands connus pour avoir différentes efficacités à activer le récepteur et en comparant leur capacité à induire des changements conformationnels entre $G\gamma_2$ et Kir3.1. Cette comparaison nous a permis de constater que les changements BRET et donc conformationnels au niveau de deux interactions étaient positivement corrélés. Ceci nous a indiqué que la même information conformationnelle transmise par un ligand entre le DOR et la sous-unité $G\gamma_2$ était transmise au même degré que celle transmise de $G\gamma_2$ au canal Kir3.1/3.2. Nous avons trouvé que ces changements conformationnels étaient doses-dépendants, à des puissances semblables.

Effectivement, nous avons établi que le complexe constitutif $G\gamma_2$ et Kir3.1 est modulable par des ligands en BRET. Les expériences BRET de titration et de point individuel à l'intérieur la paire EYFP- $G\gamma_2$ /Kir3.1-Rluc indiquent que le traitement avec l'agoniste DPDPE augmente les valeurs net

BRET de la courbe changement du signal BRET, ce qui peut refléter l'une ou l'autre des possibilités, mais notre expérience de co-IP n'a indiqué aucun recrutement de protéine à l'intérieur du complexe, suite au traitement DPDPE. Ensuite, on démontre que la sous-unité $G\gamma_2$ est récupérée lorsque Kir3.1 est immunopurifié, et les quantités de $G\gamma_2$ récupérées n'ont pas été affectées par le traitement avec DPDPE, ce qui corrobore l'idée que le changement de signal BRET observé préalablement entre $G\gamma_2$ et Kir3.1 lors du traitement DPDPE a été causé par un changement de conformation à l'intérieur du complexe multimérique, et non à cause d'un recrutement du canal à la protéine G suite à la liaison du ligand au récepteur. De plus, le traitement avec DPDPE n'a pas induit de modulation du signal BRET chez le contrôle négatif $\Delta CD8$ -EYFP/Kir3.1-Rluc impliquant un changement de conformation spécifique à $G\gamma_2$ et Kir3.1 lorsque le complexe est exposé au ligand.

Une fois établi que les agonistes induisent des changements du signal BRET représentant des changements conformationnels à l'intérieur du complexe DOR/ $G\gamma_2$ /Kir3.1, nous avons comparé différents ligands dans leur efficacité à produire ce changement. Nous avons trouvé que les changements conformationnels suivent un rang d'ordre d'efficacité compatible avec celui publié pour ces ligands dans d'autres effecteurs [63, 65-67].

Par ailleurs, la littérature existante indique que Kir3.1 se rend mal à la membrane et nécessite la sous-unité Kir3.2 pour le faire [154]. En premier lieu nous avons fait des expériences d'IF pour vérifier cette observation

s'appliquait aussi à notre biosenseur. Des expériences préliminaires d'immunofluorescence (figure 26, annexe II, page xxiv) ont démontré que le canal Kir3.1-Rluc nécessite la présence de Kir3.2 afin de s'exprimer de façon optimale à la membrane avec les DOR. Effectivement, nous avons regardé la co-localisation du DOR membranaire avec Kir3.1-Luc en présence et absence de Kir3.2. Tel qu'attendu, la co-localisation de Kir3.1-Rluc avec les récepteurs membranaire est nettement supérieure qu'en l'absence de 3.2. Au niveau fonctionnel, les données sont réduites en absence de 3.2 (résultats BRET, figure 22). À partir de là, nous concluons que si le récepteur est moins disponible à la membrane, le ligand a moins de facilité à atteindre celui-ci, ce qui explique les effets réduits observés. Bien que les ligands gardent l'ordre d'efficacité en absence de Kir3.2, leur effet est moindre. Pourtant, il reste toujours un effet, qui peut provenir du fait que, même si l'immunofluorescence montre peu de biosenseur à la membrane, cette technique est moins sensible que le BRET. Donc ce dernier serait capable de donner une réponse fonctionnelle même avec expression minimale du biosenseur à la membrane telle que vue par l'IF. Il existe également la possibilité que les ligands pénètrent à travers la membrane et atteignent les complexes DOR/Kir3.1 intracellulaires. Somme toute, le biosenseur BRET EYFP-G γ ₂/Kir3.1-Rluc nécessite la présence de Kir3.2 afin d'être ciblé de façon optimale à la membrane et de transmettre les effets des ligands tel qu'attendu.

Par ailleurs, la présence des mutations à la terminaison carboxyle de la sous-unité Kir3.1 a entraîné un changement de base et l'abolition de l'effet des ligands ayant préalablement eu un impact sur la conformation $G\gamma_2$ /Kir3.1 détectable en BRET. Puisque les régions supprimées des extrémités C-terminales sont les sites de liaison du dimère $G\beta\gamma$ avec le canal Kir3.1, leur association est entravée (changement du net BRET de base) et le signal BRET ne peut plus se transmettre d'un à l'autre [95]. Ceci supporte notre hypothèse que l'information conformationnelle des ligands DOR passe nécessairement à travers la protéine G hétérotrimérique pour arriver au canal Kir3.1 et que le biosenseur BRET EYFP- $G\gamma_2$ /Kir3.1-Rluc nécessite forcément l'intégrité de l'interaction $G\gamma_2$ /Kir3.1 pour bien fonctionner.

Subséquentement, nous avons trouvé que les changements conformationnels sont corrélés avec certains paramètres de l'activation de la protéine G hétérotrimérique et sont ainsi concentration-dépendants, sensibles à la PTX et corrélés avec la liaison [^{35}S]GTP γ S. Effectivement, les changements BRET détectés entre $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc ont été inhibés par la PTX, indiquant que le message conformationnel a besoin de l'activation de la protéine hétérotrimérique. Nous avons ensuite regardé la relation entre les changements conformationnels et l'efficacité des ligands à activer la protéine G en GTP γ S. De plus, nous avons trouvé une corrélation entre une partie des ligands préalablement testés en BRET et leur efficacité à activer la protéine G. Un autre groupe a publié plusieurs résultats [^{35}S]GTP γ S comparant encore

plus de ligands DOR et même si leur résultat pour TICP était une diminution plus accrue de l'activation de la protéine G que celle que nous avons observé, les autres ligands suivent également de façon corrélée les changements BRET observés au niveau de l'interaction DOR/ $G\gamma_2$ et $G\gamma_2$ /Kir3 [68].

Bien que nous ayons caractérisé la complexes multimériques d'intérêt avec des méthodes d'immunopurification et de BRET, à tout moment à travers l'étude, nous ne pouvons qu'observer deux protéines à la fois. Il existe d'autres techniques de complémentation, telles le BiFC présenté dans l'introduction de cet ouvrage, ou encore de combinaisons de BRET et de FRET [156] qui permettent de regarder les interactions entre plus de deux partenaires. Il serait intéressant d'explorer de telles techniques dans le futur.

Finalement, tel qu'indiqué dans la figure 27 de l'annexe II (page xxv), nous avons obtenu des résultats préliminaires grâce à une collaboration que nous entretenons présentement avec le laboratoire du Dr. T.E. Hébert à l'Université McGill, afin de déterminer quel est l'effet des ligands DOR (ici, SNC-80), que nous avons testés dans l'étude présentée, sur l'activation du canal Kir3 par méthode d'électrophysiologie [104, 157]. Il sera essentiel de pouvoir comparer les résultats avec les changements de conformation que nous avons obtenus en BRET et nous nous attendons à observer une corrélation positive entre les deux, pour valider le biosenseur ce qui supporterait d'autant plus l'utilité du biosenseur EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc à cribler pour des ligands des RCPG qui activent le canal.

Conclusion

Plusieurs récents progrès scientifiques ont inspiré l'hypothèse du projet ici présent : un biosenseur à l'intérieur du complexe multimérique DOR/ $G\alpha_o\beta_1\gamma_2$ /Kir3.1-3.2 basé sur la méthode BRET, une technique très prometteuse dans le criblage à haut débit, permettra de détecter l'efficacité de ligands DOR dans la voie de signalisation Kir3 et pourra être transposée à d'autres RCPG pour fin de criblage de nouvelles molécules.

En effet, le développement de biosenseurs en tant que technologie constituée de deux modules, soit un élément sensible pour la reconnaissance et la liaison des analytes et un module transducteur pour transmettre et rapporter le signal n'a pour limite que l'imagination de ceux et celles qui les conçoivent [158]. L'utilisation de biosenseurs dans le criblage à haut débit devient rapidement très efficace comme méthode pour la recherche de nouveaux médicaments à partir des panoplies de molécules existantes et disposant d'un immense potentiel, surtout lorsqu'exploité dans des systèmes de cellules entières et vivantes tel que le permet la méthode de BRET [126, 127].

De plus, la théorie de la sélectivité fonctionnelle apporte un nouveau regard sur la définition de l'efficacité des molécules. Ainsi, si une même protéine peut adopter différentes conformations liées à différentes voies de signalisation, une molécule se liant préférentiellement à l'une des conformations possibles activerait préférentiellement une voie de signalisation de manière à engendrer plus précisément un effet recherché. Un des avantages

de notre biosenseur est qu'il nous permet de déceler l'activation des canaux Kir3 peu importe si le ligand est allostérique ou orthostérique, puisque c'est le changement de conformation détecté en BRET qui est indicateur de l'efficacité du ligand à activer le canal Kir3.

Effectivement, en regardant la totalité de nos résultats présentés ci-haut, nous avons conclu que les changements conformationnels induits par les ligands entre $G\gamma_2$ et Kir3.1, tels que détectés en BRET avec la paire de protéines EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc, sont corrélables à l'efficacité des ligands à activer la protéine G. Ceci signifie que la paire BRET EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc pourrait être utilisée comme biosenseur afin de déterminer l'efficacité d'un ligand DOR nouvellement développé et dont on ne connaît pas encore l'efficacité. Par exemple, un ligand X induisant une différence de net BRET semblable à SNC-80 serait jugé plus efficace qu'un ligand Y induisant une différence de net BRET semblable à UFP-512, qui lui, serait jugé plus efficace qu'un ligand Z induisant une différence de net BRET semblable à TICP.

Les méthodes de criblage à haut débit jouent un rôle important dans le développement de nouveaux médicaments. On recherche des méthodes peu coûteuses et efficaces pouvant cribler rapidement une grande banque de molécules détenant un potentiel presque infini. Voilà pourquoi les protéines EYFP- $G\gamma_2$ et Kir3.1-Rluc utilisées comme biosenseur BRET tel que démontré dans cet ouvrage représentent un nouvel outil intéressant pour le

développement des essais de criblage de nouveaux analgésiques qui agissent aux canaux Kir3, reconnaissant le besoin grandissant d'en découvrir bientôt.

Effectivement, un tel système de biosenseur BRET serait très intéressant s'il pouvait permettre le criblage à haut débit de nouvelles drogues spécifiquement ciblant le complexe DOR/G γ_2 /Kir3.1 afin d'identifier des ligands capables de produire l'analgésie avec moins d'effets indésirables associés à l'adénylate cyclase. Ceci semble s'avérer le cas pour la paire BRET EYFP- G γ_2 /Kir3.1-Rluc, mais il reste à en démontrer la validité avec des expériences d'électrophysiologie, qui nous permettront d'évaluer l'activation réelle des canaux Kir3 suite aux traitements de ligands DOR.

Références

1. Bonica, J., *The need of a taxonomy*. Pain, 1979. **6**(3): p. 247-252.
2. Smith, E.S. and G.R. Lewin, *Nociceptors: a phylogenetic view*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2009. **195**(12): p. 1089-106.
3. Basbaum, A.I., D.M. Bautista, G. Scherrer, and D. Julius, *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell, 2009. **139**(2): p. 267-84.
4. Seifert, F., G. Kiefer, R. DeCol, M. Schmelz, and C. Maihofner, *Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome*. Brain, 2009. **132**(Pt 3): p. 788-800.
5. Stamford, J.A., *Descending control of pain*. Br J Anaesth, 1995. **75**(2): p. 217-27.
6. Taber, K.H., A. Rashid, and R.A. Hurley, *Functional anatomy of central pain*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2001. **13**(4): p. 437-40.
7. Scholz, J. and C.J. Woolf, *Can we conquer pain?* Nat Neurosci, 2002. **5 Suppl**: p. 1062-7.
8. Dreborg, S., G. Sundstrom, T.A. Larsson, and D. Larhammar, *Evolution of vertebrate opioid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15487-92.
9. Evans, C.J., D.E. Keith, Jr., H. Morrison, K. Magendzo, and R.H. Edwards, *Cloning of a delta opioid receptor by functional expression*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1952-5.
10. Kieffer, B.L., K. Befort, C. Gaveriaux-Ruff, and C.G. Hirth, *The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 12048-52.
11. Yasuda, K., K. Raynor, H. Kong, C.D. Breder, J. Takeda, T. Reisine, and G.I. Bell, *Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6736-40.
12. Chen, J.C., E.R. Smith, M. Cahill, R. Cohen, and J.B. Fishman, *The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine*. Life Sci, 1993. **52**(4): p. 389-96.

13. Evans, C.J., D.L. Hammond, and R.C.A. Frederickson, eds. *The opioid peptides*. The Opiate Receptors, ed. G.W. Pasternak 1988, Humana Press: Clifton. 520.
14. Meunier, J.C., C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J.L. Butour, J.C. Guillemot, P. Ferrara, B. Monsarrat, et al., *Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 532-5.
15. Witta, J., M. Palkovits, J. Rosenberger, and B.M. Cox, *Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain*. Brain Res, 2004. **997**(1): p. 24-9.
16. Moriwaki, A., J.B. Wang, A. Svingos, E. van Bockstaele, P. Cheng, V. Pickel, and G.R. Uhl, *mu Opiate receptor immunoreactivity in rat central nervous system*. Neurochem Res, 1996. **21**(11): p. 1315-31.
17. Yoshikawa, T. and N. Yoshida, *Effect of 6-hydroxydopamine treatment in the area postrema on morphine-induced emesis in ferrets*. Jpn J Pharmacol, 2002. **89**(4): p. 422-5.
18. Porreca, F. and M.H. Ossipov, *Nausea and vomiting side effects with opioid analgesics during treatment of chronic pain: mechanisms, implications, and management options*. Pain Med, 2009. **10**(4): p. 654-62.
19. Ribeiro, S.C., S.E. Kennedy, Y.R. Smith, C.S. Stohler, and J.K. Zubieta, *Interface of physical and emotional stress regulation through the endogenous opioid system and mu-opioid receptors*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2005. **29**(8): p. 1264-80.
20. Fields, H., *State-dependent opioid control of pain*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(7): p. 565-75.
21. Teng, L., J. Zhao, F. Wang, L. Ma, and G. Pei, *A GPCR/secretase complex regulates beta- and gamma-secretase specificity for Abeta production and contributes to AD pathogenesis*. Cell Res, 2010. **20**(2): p. 138-53.
22. Smith, H.S., *Peripherally-acting opioids*. Pain Physician, 2008. **11**(2 Suppl): p. S121-32.
23. Scherrer, G., N. Imamachi, Y.Q. Cao, C. Contet, F. Mennicken, D. O'Donnell, B.L. Kieffer, and A.I. Basbaum, *Dissociation of the opioid*

- receptor mechanisms that control mechanical and heat pain.* Cell, 2009. **137**(6): p. 1148-59.
24. Liberzon, I., J.K. Zubieta, L.M. Fig, K.L. Phan, R.A. Koeppe, and S.F. Taylor, *mu-Opioid receptors and limbic responses to aversive emotional stimuli.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 7084-9.
 25. Kauser, S., K.U. Schallreuter, A.J. Thody, C. Gummer, and D.J. Tobin, *Regulation of human epidermal melanocyte biology by beta-endorphin.* J Invest Dermatol, 2003. **120**(6): p. 1073-80.
 26. Chuang, T.K., K.F. Killam, Jr., L.F. Chuang, H.F. Kung, W.S. Sheng, C.C. Chao, L. Yu, and R.Y. Chuang, *Mu opioid receptor gene expression in immune cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(3): p. 922-30.
 27. Scherrer, G., P. Tryoen-Toth, D. Filliol, A. Matifas, D. Laustriat, Y.Q. Cao, A.I. Basbaum, A. Dierich, J.L. Vonesh, C. Gaveriaux-Ruff, et al., *Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(25): p. 9691-6.
 28. Kieffer, B.L. and C.J. Evans, *Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo.* Neuropharmacology, 2009. **56 Suppl 1**: p. 205-12.
 29. Hallett, P.J. and J.M. Brotchie, *Striatal delta opioid receptor binding in experimental models of Parkinson's disease and dyskinesia.* Mov Disord, 2007. **22**(1): p. 28-40.
 30. Smith, J.S., J.K. Zubieta, J.C. Price, J.E. Flesher, I. Madar, J.R. Lever, C.M. Kinter, R.F. Dannals, and J.J. Frost, *Quantification of delta-opioid receptors in human brain with N1'-([11C]methyl) naltrindole and positron emission tomography.* J Cereb Blood Flow Metab, 1999. **19**(9): p. 956-66.
 31. Chuang, L.F., T.K. Chuang, K.F. Killam, Jr., A.J. Chuang, H.F. Kung, L. Yu, and R.Y. Chuang, *Delta opioid receptor gene expression in lymphocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **202**(3): p. 1291-9.
 32. Salemi, S., A. Aeschlimann, N. Reisch, A. Jungel, R.E. Gay, F.L. Heppner, B.A. Michel, S. Gay, and H. Sprott, *Detection of kappa and delta opioid receptors in skin--outside the nervous system.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(2): p. 1012-7.

33. Decosterd, I., A.T. Beggah, A. Durrer, and E. Buchser, [*Spinal opioids: mechanisms of action and chronic pain management*]. Rev Med Suisse, 2006. **2**(71): p. 1636-8, 1640.
34. Talbot, P.S., R. Narendran, E.R. Butelman, Y. Huang, K. Ngo, M. Slifstein, D. Martinez, M. Laruelle, and D.R. Hwang, *11C-GRI03545, a radiotracer for imaging kappa-opioid receptors in vivo with PET: synthesis and evaluation in baboons*. J Nucl Med, 2005. **46**(3): p. 484-94.
35. Zhu, J., C. Chen, J.C. Xue, S. Kunapuli, J.K. DeRiel, and L.Y. Liu-Chen, *Cloning of a human kappa opioid receptor from the brain*. Life Sci, 1995. **56**(9): p. PL201-7.
36. Simonin, F., C. Gaveriaux-Ruff, K. Befort, H. Matthes, B. Lannes, G. Micheletti, M.G. Mattei, G. Charron, B. Bloch, and B. Kieffer, *kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7006-10.
37. Chuang, L.F., T.K. Chuang, K.F. Killam, Jr., Q. Qiu, X.R. Wang, J.J. Lin, H.F. Kung, W. Sheng, C. Chao, L. Yu, et al., *Expression of kappa opioid receptors in human and monkey lymphocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **209**(3): p. 1003-10.
38. Le Merrer, J., J.A. Becker, K. Befort, and B.L. Kieffer, *Reward processing by the opioid system in the brain*. Physiol Rev, 2009. **89**(4): p. 1379-412.
39. Van Oudenhove, L., K. Demyttenaere, J. Tack, and Q. Aziz, *Central nervous system involvement in functional gastrointestinal disorders*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(4): p. 663-80.
40. Bowdle, T.A., *Adverse effects of opioid agonists and agonist-antagonists in anaesthesia*. Drug Saf, 1998. **19**(3): p. 173-89.
41. Gaveriaux, C., J. Peluso, F. Simonin, J. Laforet, and B. Kieffer, *Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells*. FEBS Lett, 1995. **369**(2-3): p. 272-6.
42. Henriksen, G. and F. Willoch, *Imaging of opioid receptors in the central nervous system*. Brain, 2008. **131**(Pt 5): p. 1171-96.

43. Overington, J.P., B. Al-Lazikani, and A.L. Hopkins, *How many drug targets are there?* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(12): p. 993-6.
44. Pan, H.L., Z.Z. Wu, H.Y. Zhou, S.R. Chen, H.M. Zhang, and D.P. Li, *Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors.* Pharmacol Ther, 2008. **117**(1): p. 141-61.
45. Smith, H.S., *Opioid metabolism.* Mayo Clin Proc, 2009. **84**(7): p. 613-24.
46. Chou, R., *2009 Clinical Guidelines from the American Pain Society and the American Academy of Pain Medicine on the use of chronic opioid therapy in chronic noncancer pain: what are the key messages for clinical practice?* Pol Arch Med Wewn, 2009. **119**(7-8): p. 469-77.
47. Chou, R., G.J. Fanciullo, P.G. Fine, J.A. Adler, J.C. Ballantyne, P. Davies, M.I. Donovan, D.A. Fishbain, K.M. Foley, J. Fudin, et al., *Clinical guidelines for the use of chronic opioid therapy in chronic noncancer pain.* J Pain, 2009. **10**(2): p. 113-30.
48. Azevedo Sao Leao Ferreira, K., M. Kimura, and M. Jacobsen Teixeira, *The WHO analgesic ladder for cancer pain control, twenty years of use. How much pain relief does one get from using it?* Support Care Cancer, 2006. **14**(11): p. 1086-93.
49. IASP, I.A.F.T.S.O.P.-. and E.F.O.I.C.-. EFIC, *Unrelieved Pain is a Major Global Healthcare Problem*, 2004.
50. OMS, O.M.D.L.S.-. *Prise en charge des symptômes et soins de fin de vie*, 2008.
51. WHO, W.H.O.-. *WHO Model List of Essential Medicines, 16th edition*, 2010.
52. Nestler, E.J., M. Alreja, and G.K. Aghajanian, *Molecular control of locus coeruleus neurotransmission.* Biol Psychiatry, 1999. **46**(9): p. 1131-9.
53. Trescot, A.M., S. Datta, M. Lee, and H. Hansen, *Opioid pharmacology.* Pain Physician, 2008. **11**(2 Suppl): p. S133-53.
54. Uhelski, M.L. and P.N. Fuchs, *Naltrexone fails to increase pain affect in response to inflammatory pain in a novel escape/avoidance paradigm.* Physiol Behav, 2009. **98**(3): p. 263-7.

55. Coller, J.K., L.L. Christrup, and A.A. Somogyi, *Role of active metabolites in the use of opioids*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65**(2): p. 121-39.
56. Bie, B. and Z.Z. Pan, *Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition*. Mol Pain, 2007. **3**: p. 37.
57. Rapaka, R.S. and F. Porreca, *Development of delta opioid peptides as nonaddicting analgesics*. Pharm Res, 1991. **8**(1): p. 1-8.
58. Vanderah, T.W., *Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain*. Clin J Pain, 2010. **26 Suppl 10**: p. S10-5.
59. Szeto, H.H., Y. Soong, D. Wu, N. Olariu, A. Kett, H. Kim, and J.F. Clapp, *Respiratory depression after intravenous administration of delta-selective opioid peptide analogs*. Peptides, 1999. **20**(1): p. 101-5.
60. Narita, M., N. Kuzumaki, M. Miyatake, F. Sato, H. Wachi, Y. Seyama, and T. Suzuki, *Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection*. J Neurochem, 2006. **97**(5): p. 1494-505.
61. Gendron, L., M.J. Esdaile, F. Mennicken, H. Pan, D. O'Donnell, J.P. Vincent, L.A. Devi, C.M. Cahill, T. Stroh, and A. Beaudet, *Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin*. Neuroscience, 2007. **144**(1): p. 263-74.
62. Broom, D.C., E.M. Jutkiewicz, K.C. Rice, J.R. Traynor, and J.H. Woods, *Behavioral effects of delta-opioid receptor agonists: potential antidepressants?* Jpn J Pharmacol, 2002. **90**(1): p. 1-6.
63. Vergura, R., G. Balboni, B. Spagnolo, E. Gavioli, D.G. Lambert, J. McDonald, C. Trapella, L.H. Lazarus, D. Regoli, R. Guerrini, et al., *Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist*. Peptides, 2008. **29**(1): p. 93-103.
64. Kramer, T.H., P. Davis, V.J. Hruby, T.F. Burks, and F. Porreca, *In vitro potency, affinity and agonist efficacy of highly selective delta opioid receptor ligands*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **266**(2): p. 577-84.
65. Calderon, S.N., R.B. Rothman, F. Porreca, J.L. Flippen-Anderson, R.W. McNutt, H. Xu, L.E. Smith, E.J. Bilsky, P. Davis, and K.C. Rice, *Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of*

- (+)-4-[(*alpha R*)-*alpha*-((2*S*,5*R*)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-*N,N*-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist. *J Med Chem*, 1994. **37**(14): p. 2125-8.
66. Aguila, B., L. Coulbault, M. Boulouard, F. Leveille, A. Davis, G. Toth, A. Borsodi, G. Balboni, S. Salvadori, P. Jauzac, et al., *In vitro and in vivo pharmacological profile of UFP-512, a novel selective delta-opioid receptor agonist; correlations between desensitization and tolerance*. *Br J Pharmacol*, 2007. **152**(8): p. 1312-24.
67. Audet, N., M. Paquin-Gobeil, O. Landry-Paquet, P.W. Schiller, and G. Pineyro, *Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(9): p. 7808-16.
68. Tryoen-Toth, P., F.M. Decaillot, D. Filliol, K. Befort, L.H. Lazarus, P.W. Schiller, H. Schmidhammer, and B.L. Kieffer, *Inverse agonism and neutral antagonism at wild-type and constitutively active mutant delta opioid receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **313**(1): p. 410-21.
69. Svoboda, K.R. and C.R. Lupica, *Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I_h) currents*. *J Neurosci*, 1998. **18**(18): p. 7084-98.
70. Ikeda, K., T. Kobayashi, T. Ichikawa, H. Usui, and T. Kumanishi, *Functional couplings of the delta- and the kappa-opioid receptors with the G-protein-activated K⁺ channel*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **208**(1): p. 302-8.
71. Shirasaki, T., K. Abe, F. Soeda, and K. Takahama, *delta-Opioid receptor antagonists inhibit GIRK channel currents in acutely dissociated brainstem neurons of rat*. *Brain Res*, 2004. **1006**(2): p. 190-7.
72. Shi, Y., F.S. Huang, W.Y. Chen, Y. Wu, Y. Tang, and Q. Hu, *DPDPE-induced enhancement of inward rectifier potassium current via opioid receptor in neuroblastomaxglioma NG108-15 cells*. *Neurosci Res*, 2000. **36**(3): p. 209-14.
73. Ose, A., H. Kusuhara, C. Endo, K. Tohyama, M. Miyajima, S. Kitamura, and Y. Sugiyama, *Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of*

drugs across the blood-brain barrier. Drug Metab Dispos, 2009. **38**(1): p. 168-76.

74. Ampasavate, C., G.A. Chandorkar, D.G. Vande Velde, J.F. Stobaugh, and K.L. Audus, *Transport and metabolism of opioid peptides across BeWo cells, an in vitro model of the placental barrier*. Int J Pharm, 2002. **233**(1-2): p. 85-98.
75. Balboni, G., S. Salvadori, R. Guerrini, L. Negri, E. Giannini, Y. Jinsmaa, S.D. Bryant, and L.H. Lazarus, *Potent delta-opioid receptor agonists containing the Dmt-Tic pharmacophore*. J Med Chem, 2002. **45**(25): p. 5556-63.
76. Schiller, P.W., T.M. Nguyen, G. Weltrowska, B.C. Wilkes, B.J. Marsden, C. Lemieux, and N.N. Chung, *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*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 11871-5.
77. Szatmari, I., G. Toth, I. Kertesz, P.W. Schiller, and A. Borsodi, *Synthesis and binding characteristics of [3H] H-Tyr-Ticpsi[CH2-NH] Cha-Phe-OH, a highly specific and stable delta-opioid antagonist*. Peptides, 1999. **20**(9): p. 1079-83.
78. Mosberg, H.I., R. Hurst, V.J. Hruby, K. Gee, H.I. Yamamura, J.J. Galligan, and T.F. Burks, *Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(19): p. 5871-4.
79. Lagerstrom, M.C. and H.B. Schioth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(4): p. 339-57.
80. Millar, R.P. and C.L. Newton, *The year in G protein-coupled receptor research*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(1): p. 261-74.
81. McIntire, W.E., *Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers*. Neurosignals, 2009. **17**(1): p. 82-99.
82. Jiang, M. and N.S. Bajpayee, *Molecular mechanisms of go signaling*. Neurosignals, 2009. **17**(1): p. 23-41.

83. Locht, C. and R. Antoine, *A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit*. *Biochimie*, 1995. **77**(5): p. 333-40.
84. Law, P.Y., Y.H. Wong, and H.H. Loh, *Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000. **40**: p. 389-430.
85. Xie, K., K.L. Allen, S. Kourrich, J. Colon-Saez, M.J. Thomas, K. Wickman, and K.A. Martemyanov, *Gbeta5 recruits R7 RGS proteins to GIRK channels to regulate the timing of neuronal inhibitory signaling*. *Nat Neurosci*, 2010. **13**(6): p. 661-3.
86. Kohno, T., E. Kumamoto, H. Higashi, K. Shimoji, and M. Yoshimura, *Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord*. *J Physiol*, 1999. **518** (Pt 3): p. 803-13.
87. Bagley, E.E., B.C. Chieng, M.J. Christie, and M. Connor, *Opioid tolerance in periaqueductal gray neurons isolated from mice chronically treated with morphine*. *Br J Pharmacol*, 2005. **146**(1): p. 68-76.
88. Ivanina, T., I. Rishal, D. Varon, C. Mullner, B. Frohnwieser-Steinecke, W. Schreimbayer, C.W. Dessauer, and N. Dascal, *Mapping the Gbetagamma-binding sites in GIRK1 and GIRK2 subunits of the G protein-activated K⁺ channel*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(31): p. 29174-83.
89. Luscher, C. and P.A. Slesinger, *Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2010. **11**(5): p. 301-15.
90. Marker, C.L., R. Lujan, H.H. Loh, and K. Wickman, *Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids*. *J Neurosci*, 2005. **25**(14): p. 3551-9.
91. Schoots, O., J.M. Wilson, N. Ethier, E. Bigras, T.E. Hebert, and H.H. Van Tol, *Co-expression of human Kir3 subunits can yield channels with different functional properties*. *Cell Signal*, 1999. **11**(12): p. 871-83.
92. Dascal, N., *Signalling via the G protein-activated K⁺ channels*. *Cell Signal*, 1997. **9**(8): p. 551-73.

93. Robitaille, M., N. Ramakrishnan, A. Baragli, and T.E. Hebert, *Intracellular trafficking and assembly of specific Kir3 channel/G protein complexes*. Cell Signal, 2009. **21**(4): p. 488-501.
94. Lei, Q., M.B. Jones, E.M. Talley, A.D. Schrier, W.E. McIntire, J.C. Garrison, and D.A. Bayliss, *Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein beta gamma subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9771-6.
95. Yamada, M., A. Inanobe, and Y. Kurachi, *G protein regulation of potassium ion channels*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(4): p. 723-60.
96. Blednov, Y.A., M. Stoffel, H. Alva, and R.A. Harris, *A pervasive mechanism for analgesia: activation of GIRK2 channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 277-82.
97. Ikeda, K., T. Kobayashi, T. Kumanishi, H. Niki, and R. Yano, *Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K (GIRK) channels in opioid-induced analgesia*. Neurosci Res, 2000. **38**(1): p. 113-6.
98. Han, S.H., Y.W. Cho, C.J. Kim, B.I. Min, J.S. Rhee, and N. Akaike, *Mu-opioid agonist-induced activation of G-protein-coupled inwardly rectifying potassium current in rat periaqueductal gray neurons*. Neuroscience, 1999. **90**(1): p. 209-19.
99. Marker, C.L., M. Stoffel, and K. Wickman, *Spinal G-protein-gated K⁺ channels formed by GIRK1 and GIRK2 subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia*. J Neurosci, 2004. **24**(11): p. 2806-12.
100. Karschin, C., E. Dissmann, W. Stuhmer, and A. Karschin, *IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain*. J Neurosci, 1996. **16**(11): p. 3559-70.
101. Avidor-Reiss, T., I. Nevo, D. Saya, M. Bayewitch, and Z. Vogel, *Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 5040-7.
102. Gintzler, A.R. and S. Chakrabarti, *Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules*. Life Sci, 2006. **79**(8): p. 717-22.

103. Lober, R.M., M.A. Pereira, and N.A. Lambert, *Rapid activation of inwardly rectifying potassium channels by immobile G-protein-coupled receptors*. J Neurosci, 2006. **26**(48): p. 12602-8.
104. Rebois, R.V., M. Robitaille, C. Gales, D.J. Dupre, A. Baragli, P. Trieu, N. Ethier, M. Bouvier, and T.E. Hebert, *Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 13): p. 2807-18.
105. Dupre, D.J., A. Baragli, R.V. Rebois, N. Ethier, and T.E. Hebert, *Signalling complexes associated with adenylyl cyclase II are assembled during their biosynthesis*. Cell Signal, 2007. **19**(3): p. 481-9.
106. Dupre, D.J. and T.E. Hebert, *Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes*. Cell Signal, 2006. **18**(10): p. 1549-59.
107. Dupre, D.J., M. Robitaille, N. Ethier, L.R. Villeneuve, A.M. Mambarachi, and T.E. Hebert, *Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34561-73.
108. Filipek, S., K.A. Krzysko, D. Fotiadis, Y. Liang, D.A. Saperstein, A. Engel, and K. Palczewski, *A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface*. Photochem Photobiol Sci, 2004. **3**(6): p. 628-38.
109. Issad, T., N. Boute, S. Boubekeur, and D. Lacasa, *Interaction of PTPB with the insulin receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 111-6.
110. Ernst, O.P., V. Gramse, M. Kolbe, K.P. Hofmann, and M. Heck, *Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(26): p. 10859-64.
111. Whorton, M.R., M.P. Bokoch, S.G. Rasmussen, B. Huang, R.N. Zare, B. Kobilka, and R.K. Sunahara, *A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7682-7.

112. Georgoussi, Z., G. Milligan, and C. Zioudrou, *Immunoprecipitation of opioid receptor-Go-protein complexes using specific GTP-binding-protein antisera*. *Biochem J*, 1995. **306 (Pt 1)**: p. 71-5.
113. David, M., M. Richer, A.M. Mamarbachi, L.R. Villeneuve, D.J. Dupre, and T.E. Hebert, *Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels*. *Cell Signal*, 2006. **18(12)**: p. 2172-81.
114. Davare, M.A., V. Avdonin, D.D. Hall, E.M. Peden, A. Burette, R.J. Weinberg, M.C. Horne, T. Hoshi, and J.W. Hell, *A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2*. *Science*, 2001. **293(5527)**: p. 98-101.
115. Altier, C. and G.W. Zamponi, *Signaling complexes of voltage-gated calcium channels and G protein-coupled receptors*. *J Recept Signal Transduct Res*, 2008. **28(1-2)**: p. 71-81.
116. Beedle, A.M., J.E. McRory, O. Poirot, C.J. Doering, C. Altier, C. Barrere, J. Hamid, J. Nargeot, E. Bourinet, and G.W. Zamponi, *Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors*. *Nat Neurosci*, 2004. **7(2)**: p. 118-25.
117. Bockaert, J., J. Perroy, C. Becamel, P. Marin, and L. Fagni, *GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010. **50**: p. 89-109.
118. Aloy, P. and R.B. Russell, *Structural systems biology: modelling protein interactions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7(3)**: p. 188-97.
119. Pineyro, G., *Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling*. *Cell Signal*, 2009. **21(2)**: p. 179-85.
120. Kenakin, T., *Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28(8)**: p. 407-15.
121. Mansour, A., M.T. Hoversten, L.P. Taylor, S.J. Watson, and H. Akil, *The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores*. *Brain Res*, 1995. **700(1-2)**: p. 89-98.

122. Conn, P.J., A. Christopoulos, and C.W. Lindsley, *Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(1): p. 41-54.
123. Hoffmann, C., A. Zurn, M. Bunemann, and M.J. Lohse, *Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S358-66.
124. Mathews, J.L., A.V. Smrcka, and J.M. Bidlack, *A novel Gbetagamma-subunit inhibitor selectively modulates mu-opioid-dependent antinociception and attenuates acute morphine-induced antinociceptive tolerance and dependence*. J Neurosci, 2008. **28**(47): p. 12183-9.
125. Davis, T.L., T.M. Bonacci, S.R. Sprang, and A.V. Smrcka, *Structural and molecular characterization of a preferred protein interaction surface on G protein beta gamma subunits*. Biochemistry, 2005. **44**(31): p. 10593-604.
126. Massoud, T.F., R. Paulmurugan, A. De, P. Ray, and S.S. Gambhir, *Reporter gene imaging of protein-protein interactions in living subjects*. Curr Opin Biotechnol, 2007. **18**(1): p. 31-7.
127. Issad, T., C. Blanquart, and C. Gonzalez-Yanes, *The use of bioluminescence resonance energy transfer for the study of therapeutic targets: application to tyrosine kinase receptors*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(4): p. 541-56.
128. Xu, Y., D.W. Piston, and C.H. Johnson, *A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 151-6.
129. Trugnan, G., P. Fontanges, D. Delautier, and T. Ait-Slimane, *[FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM...new techniques for a colourful life]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(11): p. 1027-34.
130. Prinz, A., M. Diskar, and F.W. Herberg, *Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies*. Chembiochem, 2006. **7**(7): p. 1007-12.
131. Gandia, J., C. Lluís, S. Ferre, R. Franco, and F. Ciruela, *Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization*. Bioessays, 2008. **30**(1): p. 82-9.

132. Kenakin, T.P., *Ligand detection in the allosteric world*. J Biomol Screen, 2010. **15**(2): p. 119-30.
133. Niswender, C.M., K.A. Johnson, Q. Luo, J.E. Ayala, C. Kim, P.J. Conn, and C.D. Weaver, *A novel assay of Gi/o-linked G protein-coupled receptor coupling to potassium channels provides new insights into the pharmacology of the group III metabotropic glutamate receptors*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(4): p. 1213-24.
134. Weaver, C.D., D. Harden, S.I. Dworetzky, B. Robertson, and R.J. Knox, *A thallium-sensitive, fluorescence-based assay for detecting and characterizing potassium channel modulators in mammalian cells*. J Biomol Screen, 2004. **9**(8): p. 671-7.
135. Rios, C., I. Gomes, and L.A. Devi, *mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis*. Br J Pharmacol, 2006. **148**(4): p. 387-95.
136. Gales, C., R.V. Rebois, M. Hogue, P. Trieu, A. Breit, T.E. Hebert, and M. Bouvier, *Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells*. Nat Methods, 2005. **2**(3): p. 177-84.
137. Mirshahi, T. and D.E. Logothetis, *Molecular determinants responsible for differential cellular distribution of G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11890-7.
138. Chu, P., S. Murray, D. Lissin, and M. von Zastrow, *Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27124-30.
139. Keith, D.E., S.R. Murray, P.A. Zaki, P.C. Chu, D.V. Lissin, L. Kang, C.J. Evans, and M. von Zastrow, *Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19021-4.
140. Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J.P. Behr, *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
141. Ayoub, M.A. and K.D. Pflieger, *Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(1): p. 44-52.

142. Audet, N., C. Gales, E. Archer-Lahlou, M. Vallieres, P.W. Schiller, M. Bouvier, and G. Pineyro, *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): p. 15078-88.
143. Pineyro, G., M. Azzi, A. De Lean, P. Schiller, and M. Bouvier, *Short-term inverse-agonist treatment induces reciprocal changes in delta-opioid agonist and inverse-agonist binding capacity*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(4): p. 816-27.
144. Doupnik, C.A., *GPCR-Kir channel signaling complexes: defining rules of engagement*. J Recept Signal Transduct Res, 2008. **28**(1-2): p. 83-91.
145. Robillard, L., N. Ethier, M. Lachance, and T.E. Hebert, *Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo*. Cell Signal, 2000. **12**(9-10): p. 673-82.
146. Petaja-Repo, U.E., M. Hogue, T.T. Leskela, P.M. Markkanen, J.T. Tuusa, and M. Bouvier, *Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor*. J Biol Chem, 2006. **281**(23): p. 15780-9.
147. Logothetis, D.E., Y. Kurachi, J. Galper, E.J. Neer, and D.E. Clapham, *The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart*. Nature, 1987. **325**(6102): p. 321-6.
148. Reuveny, E., P.A. Slesinger, J. Inglese, J.M. Morales, J.A. Iniguez-Lluhi, R.J. Lefkowitz, H.R. Bourne, Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits*. Nature, 1994. **370**(6485): p. 143-6.
149. Pineyro, G., M. Azzi, A. deLean, P.W. Schiller, and M. Bouvier, *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): p. 336-48.
150. Wickman, K.D., J.A. Iniguez-Lluhl, P.A. Davenport, R. Taussig, G.B. Krapivinsky, M.E. Linder, A.G. Gilman, and D.E. Clapham, *Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel*. Nature, 1994. **368**(6468): p. 255-7.
151. Xu, H., Y.F. Lu, J.B. Thomas, F.I. Carroll, K.C. Rice, and R.B. Rothman, *Opioid peptide receptor studies. 15. Relative efficacy of 4-*

[(N-allyl-3-methyl-4-piperidinyl)phenylamino]-N,N-diethylbenzamide and related compounds at the cloned human delta-opioid receptor. Synapse, 2001. **40**(4): p. 269-74.

152. Connor, M. and M.D. Christie, *Opioid receptor signalling mechanisms.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(7): p. 493-9.
153. Harrison, C. and J.R. Traynor, *The [35S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology.* Life Sci, 2003. **74**(4): p. 489-508.
154. Ma, D., N. Zerangue, K. Raab-Graham, S.R. Fried, Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart.* Neuron, 2002. **33**(5): p. 715-29.
155. Schiller, P.W., *Opioid peptide-derived analgesics.* AAPS J, 2005. **7**(3): p. E560-5.
156. Breton, B., M. Lagace, and M. Bouvier, *Combining resonance energy transfer methods reveals a complex between the α_2A -adrenergic receptor, $G_{\alpha i 1 \beta 1 \gamma 2}$, and GRK2.* FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4733-4743.
157. Weerapura, M., S. Nattel, D. Chartier, R. Caballero, and T.E. Hebert, *A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link?* J Physiol, 2002. **540**(Pt 1): p. 15-27.
158. Khalil, A.S. and J.J. Collins, *Synthetic biology: applications come of age.* Nat Rev Genet, 2010. **11**(5): p. 367-79.

Tableau VI. Conditions de transfection pour la figure 12

plasmide	Quantité de plasmide (μg)
FLAG-DOR	10
G α_o	2
G β_1	2
G γ_2	2
Kir3.1-Rluc	1
Kir3.2	1
Total μg	18

Tableau VII. Conditions de transfection pour la figure 14

plasmide	Quantité de plasmide (μg)
DOR-Rluc	6
G α_o	4
G β_1	4
EYFP-G γ_2	4
FLAG-Kir3.1	2
Kir3.2	2
Total μg	22

Tableau VIII. Conditions de transfection pour la figure 15A

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
FLAG-DOR	1	0
DOR-EYFP	0	1
G α_o	2	2
G β_1	2	2
G γ_2	2	2
Kir3.1-Rluc	1	1
Kir3.2	1	1
Total μg	9	9

Tableau IX. Conditions de transfection pour la figure 15B

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
FLAG-DOR	4	4
G α_o	3	3
G β_1	5	5
G γ_2	10.5	0
EYFP-G γ_2	0	10.5
Kir3.2-Rluc	0.5	0.5
total μg	23	23

Tableau X. Conditions de transfection pour la figure 15C

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
FLAG-DOR	5	0
DOR-EYFP	0	5
G α_o	2	2
G β_1	2	2
G γ_2	2	2
Kir3.1-HA	0.2	0.2
Kir3.2-Rluc	0.2	0.2
Total μg	11.4	11.4

Tableau XI. Conditions de transfection pour la figure 16

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
DOR-Rluc	0.5	0.5
G α_o	4	4
G β_1	6	6
G γ_2	12	0
EYFP-G γ_2	0	12
Kir3.1-HA	1	1
Kir3.2	1	1
total μg	24.5	24.5

Tableau XII. Conditions de transfection pour la figure 17

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
FLAG-DOR	3	3
Gα_o	2	2
Gβ_1	2	2
Gγ_2	15	0
EYFP-Gγ_2	0	15
Kir3.1-Rluc	0.5	0.5
Kir3.2	0.5	0.5
total μg	23	23

Tableau XIII. Conditions de transfection pour la figure 18

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
FLAG-DOR	4	4
Gα_o	3	3
Gβ_1	5	5
Gγ_2	10.5	0
EYFP-Gγ_2	0	10.5
Kir3.2-Rluc	0.5	0.5
total μg	23	23

Tableau XIV. Conditions de transfection pour la figure 20A

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
DOR-Rluc	0.5	0.5
Gα_o	4	4
Gβ_1	6	6
Gγ_2	12	0
EYFP-Gγ_2	0	12
Kir3.1-HA	1	1
Kir3.2	1	1
total μg	24.5	24.5

Tableau XV. Conditions de transfection pour la figure 20B

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
FLAG-DOR	3	3
G α_o	2	2
G β_1	2	2
G γ_2	15	0
EYFP-G γ_2	0	15
Kir3.1-Rluc	0.5	0.5
Kir3.2	0.5	0.5
total μg	23	23

Tableau XVI. Conditions de transfection pour la figure 22

plasmide	Quantité de plasmide (μg)	
	1	2
FLAG-DOR	3	3
G α_o	2	2
G β_1	2	2
G γ_2	0	0
EYFP-G γ_2	15	15
Kir3.1-HA	0.5	0
Kir3.1-Rluc	0.5	0.5
Kir3.2	0	0.5
total μg	11.4	11.4

Tableau XVII. Conditions de transfection pour la figure 23

plasmide	Quantité de plasmide (μg)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
FLAG-DOR	2	2	3	3	2	2	3	3
G α_o	1	1	2	2	1	1	2	2
G β_1	4	4	2	2	4	4	2	2
G γ_2	12	16	15	15	0	0	0	0
EYFP-G γ_2	0	0	0	0	15	15	15	15
Kir3.1-Rluc	0	0	0.5	0.5	0	0	0.5	0.5
Kir3.1-Rluc	0.5	0	0	0	0.5	0	0	0
Kir3.1-HA	0	0.5	0	0	0	0.5	0	0
Kir3.1-HA	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0
Kir3.1-Rluc	0	0	0	0.5	0	0	0	0.5
total μg	20	24	23	23	23	23	23	23

ANNEXE II. Figures 24 à 27

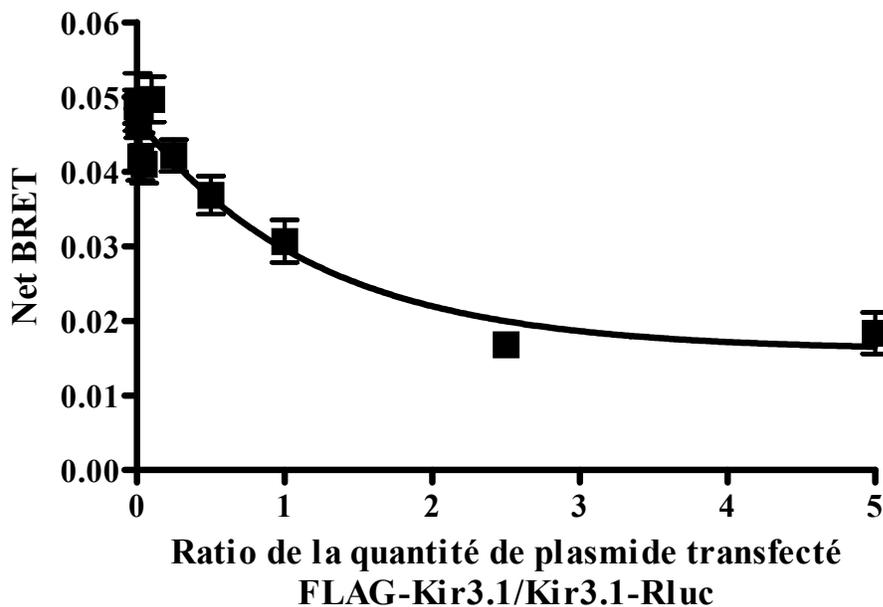


Figure 24. Le signal BRET diminue lorsque Kir3.1-Rluc est déplacé par FLAG-Kir3.1
 Des cellules HEK293 exprimant une quantité fixe du donneur Kir3.1-Rluc, de l'accepteur DOR-EYFP ainsi que des sous-unités $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ et Kir3.2 ont été transfectées tel que décrit au tableau V (annexe I, page xvi). Les résultats ont été exprimés en net BRET (voir méthodologie, page 48, pour le calcul de cette valeur expérimentale), en fonction du ratio des quantités de plasmides transfectées, c'est-à-dire FLAG-Kir3.1/Kir3.1-Rluc. Initialement, le net BRET basal expérimental obtenu est de 0.048 ± 0.005 et est réduit jusqu'à un plateau projeté à 0.016 ± 0.003 , occasionnant une réduction du net BRET de 62% entre le premier et le dernier point. Source : Nicolas Audet, candidat au doctorat en pharmacologie sous la direction de Graciela Piñeyro

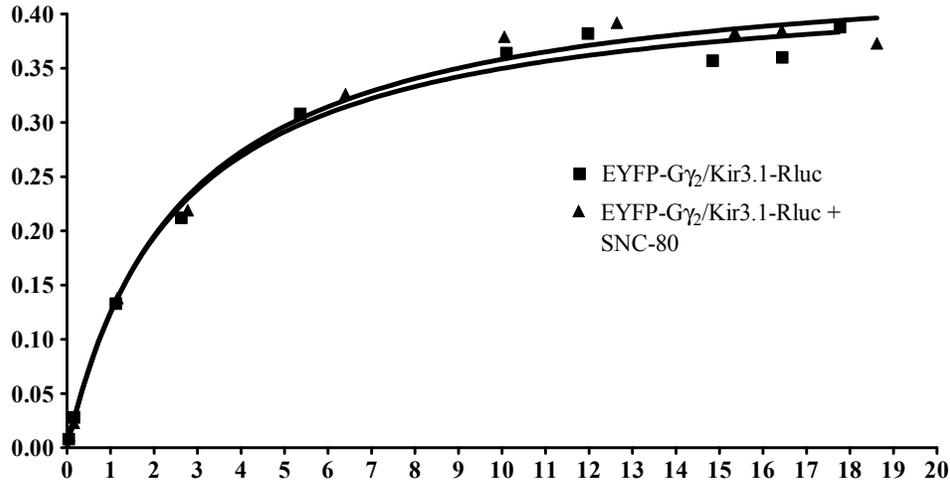


Figure 25. Les canaux potassiques Kir3 interagissent de façon constitutive et spécifique avec des complexes comprenant la sous-unité G γ_2 hétérotrimérique et l'absence du récepteur DOR rend cette interaction non modulable par un agoniste

Des cellules HEK293 exprimant une quantité fixe du donneur Kir3.1-Rluc ainsi que des sous-unités G $\alpha_0\beta_1\gamma_2$ et Kir3.2 ont été transfectées avec des quantités croissantes des accepteurs listés dans la figure. L'agoniste SNC-80 a été introduit à une concentration de 10 μ M, 2 min avant la lecture du signal BRET. Les résultats ont été exprimés en net BRET (voir méthodologie, page 48, pour le calcul du net BRET). Les quantités de plasmides transfectées sont indiquées au tableau XVIII de l'annexe I (page xxi). Pour la courbe EYFP-G γ_2 /Kir3.1-Rluc basal, le BRET_{max} est de 0.438 ± 0.012 et le BRET₅₀ est de 2.509 ± 0.299 . Pour la courbe EYFP-G γ_2 /Kir3.1-Rluc avec traitement SNC-80, le BRET_{max} est de 0.452 ± 0.012 et le BRET₅₀ est de 2.633 ± 0.308 .

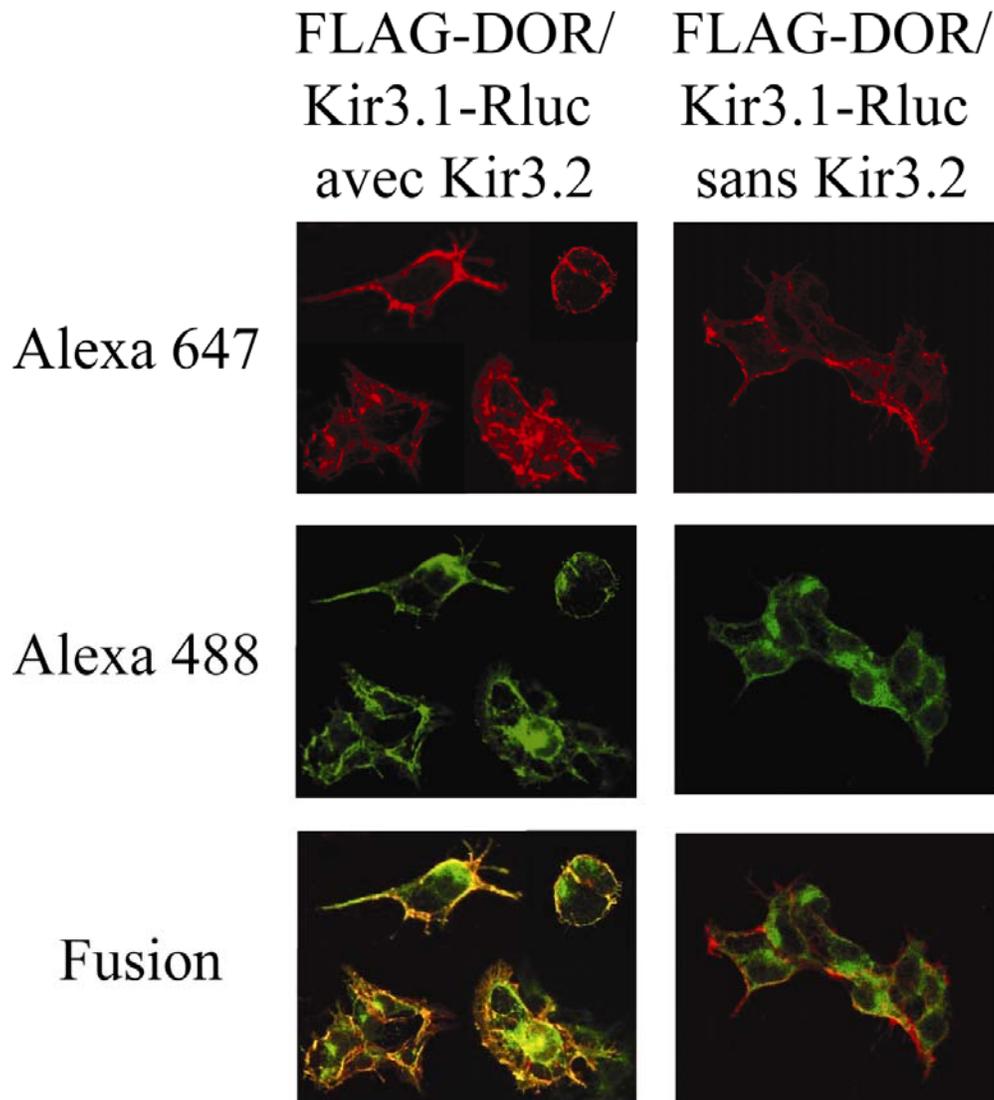


Figure 26. La distribution subcellulaire de Kir3.1 en présence et en absence de la sous-unité Kir3.2 : Kir3.1-Rluc se co-localise avec les DOR membranaires en présence mais moins en absence de Kir3.2

Les cellules HEK293 ont été transfectées de façon transitoire avec les plasmides suivants : FLAG-DOR, $G\alpha_o$, $G\beta_1$, $G\gamma_2$, Kir3.1-Rluc \pm Kir3.2 dans le but de déterminer comment Kir3.1-Rluc se distribue lorsque co-exprimé avec ou sans Kir3.2. Les FLAG-DOR localisés à la membrane ont été marqués par introduction du premier anticorps anti-flag *in vivo* tandis que l'anticorps anti-Rluc a été introduit après la perméabilisation des cellules, ce qui a permis de localiser Kir3.1-Rluc soit à la surface ou à l'intérieur de la cellule. Des anticorps primaires contre l'épitope FLAG et la protéine Rluc ont ensuite été liés avec des anticorps secondaires, soit conjugués à Alexa 647, un fluorochrome émettant la couleur rouge, soit conjugué à Alexa 488, un fluorochrome émettant la couleur bleu-vert. Afin de visualiser l'immunofluorescence des cellules et la colocalisation du récepteur et de l'effecteur Kir, les images ont été analysées avec le programme ImageJ. Source : Mohammad Amraei, assistant de recherche sous la direction de Graciela Piñeyro (résultats préliminaires)

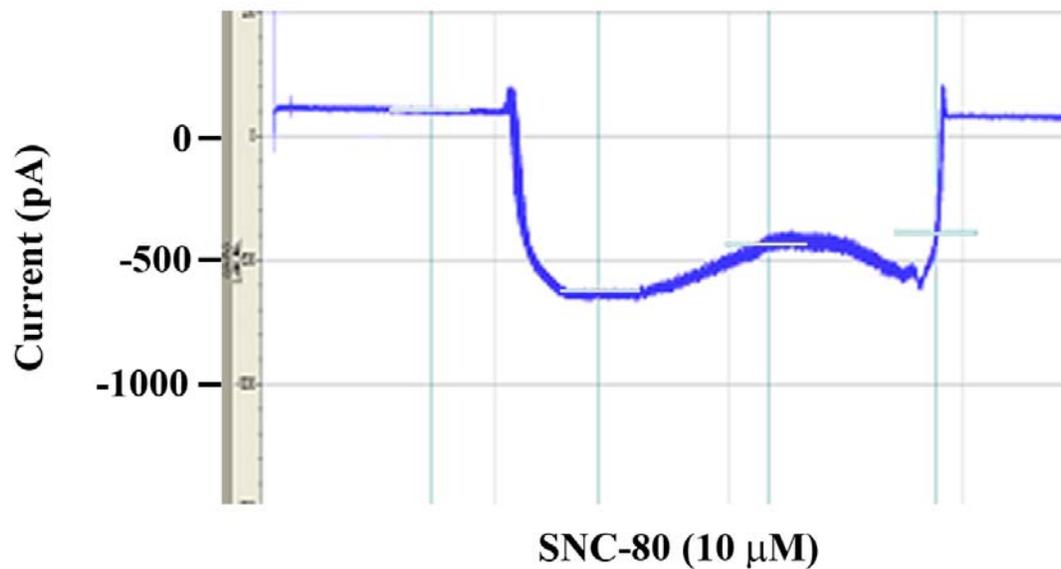


Figure 27. L'effet électrophysiologique du ligand SNC-80 sur les cellules qui co-expriment DOR, $G\beta_1\gamma_2$ et Kir3.1/3.2 est annonciateur de l'activation du canal potassique Kir3

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec DOR, $G\beta_1\gamma_2$, Kir3.1 et Kir3.2. Ensuite, les cellules ont été perfusées continuellement avec deux solutions à basse et haute concentrations de potassium pour permettre des mesures de courant en potentiel imposé. Les cellules ont été maintenues à -60 mV et perfusées avec une solution externe, et un traitement de $10 \mu\text{M}$ de SNC-80 a été manuellement appliqué à la cellule à l'aide d'une valve contrôlant sa relâche. Le temps de la réponse maximale est de l'ordre de quelques minutes. Source : Laboratoire de T.E. Hébert (résultats préliminaires)

ANNEXE III. Revue Médecine Sciences

Au cours de ma maîtrise j'ai participé à la rédaction de la revue scientifique présentée ci-dessous. Cette revue intitulée « Sélectivité fonctionnelle des ligands des récepteurs opiacés » a été acceptée par Médecine Sciences et sera publiée en août-septembre 2010.

Titre en français

SÉLECTIVITÉ FONCTIONNELLE DES LIGANDS DES RÉCEPTEURS
OPIACÉS

Titre en anglais

FUNCTIONAL SELECTIVITY OF OPIOID RECEPTORS LIGANDS

Chapôt

Les analgésiques opiacés, qui restent les plus efficaces pour le traitement des douleurs sévères, induisent des effets secondaires qui limitent leur utilisation en clinique. De nouvelles stratégies de recherches doivent donc être explorées afin de développer des ligands présentant un meilleur profil thérapeutique. La sélectivité fonctionnelle apparaît comme une de ces stratégies. Elle consisterait à exploiter la capacité des ligands à stabiliser différentes conformations des récepteurs activant des voies de signalisation distinctes. Il serait ainsi possible de développer des ligands favorisant l'activation des voies responsables de l'analgésie, au détriment de celles associées aux effets indésirables. Cet article présente une synthèse des travaux qui mettent en évidence la sélectivité fonctionnelle des ligands des récepteurs opiacés μ et δ et propose deux hypothèses sur le type de sélectivité fonctionnelle à cibler pour réduire le développement de tolérance analgésique.

Résumé anglais

Opiates are the most effective analgesics available for the treatment of severe pain. However, their clinical use is restricted by unwanted side effects such as tolerance, physical dependence and respiratory depression. The strategy to develop new opiates with reduced side effects has mainly focused on the study and production of ligands that specifically bind to different opiate receptors subtypes. However, this strategy has not allowed the production of novel therapeutic ligands with a better side effects profile. Thus, other research strategies need to be explored. One which is receiving increasing attention is the possibility of exploiting ligand ability to stabilize different receptor conformations with distinct signalling profiles. This newly described property, termed functional selectivity, provides a potential means of directing the stimulus generated by an activated receptor towards a specific cellular response. Here we summarize evidence supporting the existence of ligand-specific active conformations for two opioid receptors subtypes (delta and mu), and analyze how functional selectivity may contribute in the production of longer lasting, better tolerated opiate analgesics.

I. La sélectivité fonctionnelle : un nouveau concept pharmacologique

Dans le but de prédire si un médicament aura la capacité de se lier à un récepteur (affinité) et de l'activer (efficacité), la pharmacologie classique se base sur des principes de type quantitatif. Ces principes reposent sur l'hypothèse qu'un récepteur oscille entre une conformation active et une conformation inactive, l'état actif étant responsable de toutes les réponses pharmacologiques associées au récepteur (figure 1a). Dans ce modèle, l'efficacité d'un ligand est définie par sa capacité à stabiliser diverses quantités d'une seule conformation active du récepteur : l'agoniste complet stabilise une grande quantité de la forme active, l'agoniste partiel une quantité moindre, l'agoniste inverse stabilise principalement la conformation inactive alors que l'antagoniste occupe le récepteur sans modifier la distribution entre les deux états de celui-ci [1].

Ce modèle pharmacologique classique a cependant été remis en question au cours de ces dernières années. Les progrès technologiques ont en effet permis de démontrer que l'ordre d'efficacité et/ou de puissance de différents ligands peut s'inverser lorsque ces propriétés sont évaluées sur plusieurs voies de signalisation [2]. Ces observations ne peuvent pas s'expliquer par l'existence d'un état actif unique, mais impliqueraient plutôt qu'un même récepteur puisse être stabilisé sous différentes conformations actives possédant des propriétés de signalisation spécifiques à chacune [1, 3].

Avec ce nouveau concept est née l'idée que le développement de ligands sélectifs capables d'induire spécifiquement certaines conformations de récepteurs pourrait permettre de cibler des voies de signalisation et donc les réponses pharmacologiques qui y sont associées (figure 1b) [3]. La capacité d'un ligand à stabiliser un récepteur sous une conformation reliée à des propriétés de signalisation et/ou de régulation spécifiques [2] est appelée sélectivité fonctionnelle [1] ou « biased agonism » [3]. Ce nouveau paradigme fait 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 responsables de chaque type de réponse.

II. Les récepteurs opiacés

Les récepteurs opiacés, dont les trois sous-types connus sont le μ (MOR), le δ (DOR) et le κ (KOR), appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Leur activation est associée à l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par les sous-unités $G_{\alpha i/o}$ et à la modulation d'effecteurs par les sous-unités $G\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques ($G\alpha\beta\gamma$). Cette modulation inclut l'activation des kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK) [4], l'activation des phospholipases C (PLC) [5] ainsi que la modulation des canaux calciques N/P [6] et des canaux potassiques à rectification entrante (GIRK) [7]. Les récepteurs opiacés peuvent également

induire une signalisation indépendante des protéines G. L'activation de la cascade ERK par la β -arrestine en est un exemple typique [8].

Les agonistes des récepteurs opiacés sont les analgésiques les plus efficaces actuellement disponibles. L'activation des trois sous-types conduit à des effets antinociceptifs, mais les opiacés généralement utilisés dans le traitement de la douleur (ex. : morphine, hydromorphone, fentanyl et oxycodone) agissent de façon prédominante sur le MOR, dont l'activation est indissociable d'effets indésirables tels que la constipation, la dépression respiratoire, la tolérance, la dépendance physique ainsi que les risques d'abus [9-11]. L'analgésie induite par les agonistes du KOR est associée à un potentiel d'abus inférieur à celui produit par les ligands du MOR [10], mais les propriétés psychomimétiques de ces agonistes [12], le développement de processus de tolérance [13] ainsi que leurs effets dysphoriques et anxiogènes [14] limitent leur utilisation en clinique. Enfin, les agonistes du DOR produisent moins de dépression respiratoire [15], de constipation [16] et de dépendance physique [17] que les agonistes du MOR, mais il a été démontré dans des modèles animaux de douleur chronique et aiguë qu'ils induisent la tolérance à l'analgésie [11, 18, 19].

Ces observations suggèrent que le développement de ligands sélectif de l'un des sous-types de récepteur n'apportera qu'une réponse partielle aux problèmes des analgésiques opiacés. Par conséquent, de nouvelles stratégies doivent être élaborées afin de développer des agonistes opiacés possédant un

meilleur profil thérapeutique. Une stratégie consisterait à exploiter le concept de sélectivité fonctionnelle pour un sous-type de récepteur, notamment pour développer des opiacés présentant un potentiel de tolérance réduit. Dans les sections suivantes, nous évaluerons les données qui soutiennent l'idée selon laquelle les récepteurs opiacés constituent des cibles valables pour le développement de ligands fonctionnellement sélectifs. Nous proposerons une hypothèse sur le type de sélectivité fonctionnelle qui permettrait de réduire la tolérance analgésique. L'accent sera mis sur les ligands du MOR et du DOR, compte tenu de leur potentiel thérapeutique dans le traitement pharmacologique des douleurs sévères.

III. Sélectivité fonctionnelle et signalisation des récepteurs opiacés

La capacité des ligands opiacés à stabiliser différentes conformations actives a été démontrée sur des récepteurs purifiés en utilisant la résonance plasmonique de surface [20]. Il a été observé que l'affinité des DOR pour différentes sous-unités $G\alpha$ varie en fonction de l'agoniste utilisé, démontrant ainsi que le ligand peut déterminer le partenaire de signalisation du récepteur auquel il est lié. Ces résultats sont en accord avec les observations obtenues dans des cellules vivantes, qui montrent que le DOR occupé par différents ligands interagit de façon distincte avec les différentes sous-unités du complexe $G\alpha\beta\gamma$ [21].

La stabilisation de conformations spécifiques par divers ligands, qui entraîne l'activation préférentielle de différentes cascades de signalisation, se manifeste par une inversion de l'ordre d'efficacité et/ou de puissance de ces ligands. Cette inversion est primordiale pour démontrer la sélectivité fonctionnelle des ligands [1, 3]. Par exemple, dans des cellules exprimant de façon endogène le DOR, l'agoniste DPDPE ([D-Pen_{2,5}]-Enkephalin) produit une plus grande activation de la sous-unité G α i2 que de G α o2, tandis que l'agoniste deltorphine I active préférentiellement G α o2 [22]. La sélectivité fonctionnelle des ligands du MOR n'a quant à elle pas encore été clairement démontrée bien qu'une inversion de l'ordre d'efficacité des agonistes pour les protéines de fusion MOR-G α o1 et MOR-G α i2 ait été observée [23].

Il est important de ne pas confondre la sélectivité fonctionnelle des ligands avec la sélectivité de signalisation qui dépend du type cellulaire. Dans ce dernier cas, la spécificité de la réponse pharmacologique est déterminée par les protéines de signalisation qui sont exprimées dans la cellule étudiée [3]. Les propriétés pharmacologiques et signalétiques des récepteurs opiacés peuvent en effet varier en fonction du profil d'expression protéique qui est spécifique à chaque type cellulaire. Différents partenaires de dimérisation peuvent ainsi modifier la pharmacologie des récepteurs [24, 25]. Pourtant, si aucune inversion de l'ordre d'efficacité et/ou de puissance des ligands n'est observée, ces modifications ne constituent pas une preuve irréfutable de la présence de conformations actives spécifiques aux ligands.

L'hétérodimérisation DOR/MOR, par exemple, produit un changement de couplage du DOR de $G\alpha i3$ vers $G\alpha z$, mais ne modifie pas l'ordre d'efficacité avec lequel le DPDPE et la deltorphine II activent les différentes sous-unités $G\alpha$ [25].

Par ailleurs, la sélectivité fonctionnelle ne se limite pas à produire l'activation de différentes sous-unités $G\alpha$. Elle peut également permettre l'activation de voies de signalisation par des mécanismes différents. La morphine et l'étorphine par exemple, deux agonistes du MOR, produisent l'activation des kinases ERK. Cependant, cette activation passe par l'intermédiaire de la protéine kinase C (PKC) dans le cas de la morphine alors que celle produite par l'étorphine implique la β -arrestine [8]. Ces deux mécanismes conduisent d'ailleurs à des distributions subcellulaires différentes des ERK, l'étorphine et la morphine entraînant respectivement une accumulation de la kinase dans le noyau et le cytoplasme [8]. Les ligands du DOR produisent également des conformations actives différentes du récepteur, avec une sélectivité fonctionnelle au niveau des voies ERK et AC. Le TICP (Tyr-Tic Ψ [CH₂-NH]Cha-Phe-OH) et le DPDPE produisent tous deux l'activation de la cascade ERK, mais le DPDPE se comporte comme un agoniste dans la voie cyclase alors que le TICP est agoniste inverse sur cette voie [2]. Ces observations indiquent que même si le DOR occupé par l'un ou l'autre des ligands est capable d'activer la voie de signalisation des ERK, les

conformations sont nécessairement distinctes puisqu'elles produisent des effets opposés sur la voie de l'AMPC.

IV. Sélectivité fonctionnelle et tolérance analgésique

La tolérance à l'analgésie est un phénomène complexe qui implique des changements à différents niveaux d'organisation du système nerveux central. Ces changements débutent par des adaptations cellulaires et moléculaires qui se développent de façon progressive et vont aller interférer avec la fonction normale des circuits de perception de la douleur. En particulier, la tolérance aux opiacés est induite par un traitement prolongé et serait associée à la désensibilisation du récepteur et/ou à des changements adaptatifs au niveau cellulaire qui s'opposent aux effets induits par l'activation soutenue de ce dernier.

a) Désensibilisation des récepteurs opiacés

La désensibilisation des récepteurs se manifeste par une réduction de leur capacité de signalisation. Elle débute par l'activation des kinases dépendantes du second messenger et/ou de type GRK (kinases des RCPG) qui entraînent la phosphorylation du récepteur et son découplage des protéines G. La phosphorylation par les GRK induit le recrutement de la β -arrestine au niveau du récepteur et permet ensuite la formation d'un complexe avec les protéines d'endocytose. Après leur internalisation, les récepteurs sont soit

dégradés par les lysosomes, soit recyclés au niveau de la membrane pour un nouveau cycle de signalisation (figure 2).

La théorie pharmacologique classique prédit une corrélation directe entre la capacité de signalisation d'un ligand et sa capacité à induire des processus de régulation. Toutefois, certaines études ont montré l'absence d'une telle corrélation indiquant que les mécanismes de régulation peuvent également être induits spécifiquement en fonction des ligands utilisés. A titre d'exemple, la morphine qui se comporte comme un agoniste partiel du MOR dans la voie cyclase, produit la phosphorylation du récepteur par un mécanisme dépendant de la PKC et indépendant de GRK2 [26, 27]. À l'inverse, le DAMGO ([D-Ala₂, N-Me-Phe₄, Gly₅-ol]-Enkephalin), qui est agoniste complet sur la voie cyclase, n'est pas capable de stimuler la PKC, mais il induit la phosphorylation du MOR par un mécanisme dépendant de GRK2 [26]. Contrairement à la phosphorylation par la PKC, la phosphorylation par GRK2 facilite le recrutement de la β -arrestine vers le MOR, son internalisation ainsi que son recyclage (figure 2). Ces deux dernières étapes étant primordiales pour la resensibilisation des récepteurs phosphorylés, le DAMGO serait donc plus efficace que la morphine pour éviter la tolérance analgésique puisqu'il recrute GRK2 [28]. Un autre exemple de dissociation entre la signalisation et l'internalisation est observé avec l'herkinorine, un agoniste MOR dont on ignore les propriétés analgésiques et de tolérance. Ce ligand possède une efficacité de signalisation comparable à

celle du DAMGO, mais n'induit pas le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation du récepteur [29].

Les agonistes du DOR peuvent également induire différentes conformations de récepteur possédant des propriétés de régulation distinctes. Les DOR activés par le DPDPE ou le SNC-80, par exemple, sont phosphorylés sur des résidus sérine et/ou thréonine différents, régulant ensuite différemment le trafic postendocytaire [30]. Les DOR occupés par le DPDPE sont en effet plus susceptibles d'être recyclés à la membrane après leur internalisation que ceux activés par le SNC-80. Cette différence a été observée dans des cellules HEK293 et dans des cultures de neurones corticaux (résultats non publiés). Ainsi, les DOR traités avec le SNC-80 sont dégradés par voie lysosomale après leur internalisation, entraînant une extinction rapide du signal et le développement de la tolérance analgésique [19, 30]. À l'inverse, l'internalisation produite par le DPDPE entraîne le recyclage à la membrane d'une partie des récepteurs, qui pourront alors retrouver leur couplage aux protéines G et permettre une certaine résistance à la désensibilisation [31]. Enfin, la démonstration la plus évidente de la sélectivité fonctionnelle des ligands au niveau de la désensibilisation du DOR a été fournie par la comparaison du SNC-80 avec son métabolite M100390. Alors que ces deux ligands activent les protéines G et induisent de l'analgésie avec la même efficacité, seul le SNC-80 produit la phosphorylation du récepteur, sa désensibilisation et induit la tolérance [19].

Ces résultats suggèrent que la tolérance à l'analgésie pourrait être réduite grâce à des ligands dont la sélectivité fonctionnelle permettrait de dissocier les processus de signalisation de ceux qui conduisent à la désensibilisation des récepteurs opiacés. Selon cette hypothèse, la mise au point d'agonistes n'induisant pas la phosphorylation et/ou ciblant le recyclage des récepteurs permettrait de diminuer la tolérance analgésique.

b) Adaptations cellulaires

L'action analgésique des opiacés est principalement transmise par les canaux [7]. La fermeture des canaux calciques par les opiacés inhibe la libération des neurotransmetteurs à partir des neurones afférents nociceptifs primaires [6], et l'activation des canaux potassiques hyperpolarise les relais neuronaux de la voie nociceptive [7] (figure 3). D'autre part, une inhibition prolongée de la voie cyclase par les opiacés entraîne des adaptations cellulaires qui aboutiront finalement à une suractivation compensatoire de cette voie [28]. Plusieurs études démontrent une corrélation directe entre une production excessive d'AMPC et la tolérance analgésique : l'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'AMPC augmente la tolérance à l'analgésie [32]; l'administration i.c.v. d'inhibiteur de PKA réduit la tolérance à la morphine [33]; les souris génétiquement modifiées qui surexpriment l'AC-VII [34] et celles qui n'expriment pas les cyclases dépendantes de la calmoduline (AC-I/AC-VIII) [35] présentent respectivement une augmentation et une diminution de la tolérance à l'effet analgésique des opiacés. Ces observations

suggèrent qu'en dissociant la signalisation associée aux canaux ioniques de celle associée à la voie cyclase, il serait possible de générer des ligands opiacés aptes à produire un effet analgésique sans déclencher les adaptations cellulaires responsables d'une production exagérée d'AMPc. Par conséquent, un tel type de ligand induirait probablement moins de tolérance.

V. Conclusion

Les études qui ont été citées dans cette revue démontrent que les récepteurs opiacés peuvent adopter différentes conformations actives possédant des propriétés de signalisation et de régulation spécifiques. L'utilisation de modèles animaux a permis de démontrer qu'en exploitant la sélectivité fonctionnelle des ligands du DOR, les effets analgésiques produits par ce récepteur pourraient être dissociés des effets conduisant à la tolérance. Le défi est maintenant d'appliquer ce nouveau concept de sélectivité fonctionnelle afin de mettre au point de nouveaux analgésiques, en séparant les effets désirés des effets néfastes des opiacés.

Remerciements

Les auteurs remercient chaleureusement Dr Robert Élie pour sa relecture attentive et critique de ce manuscrit.

Listes de références

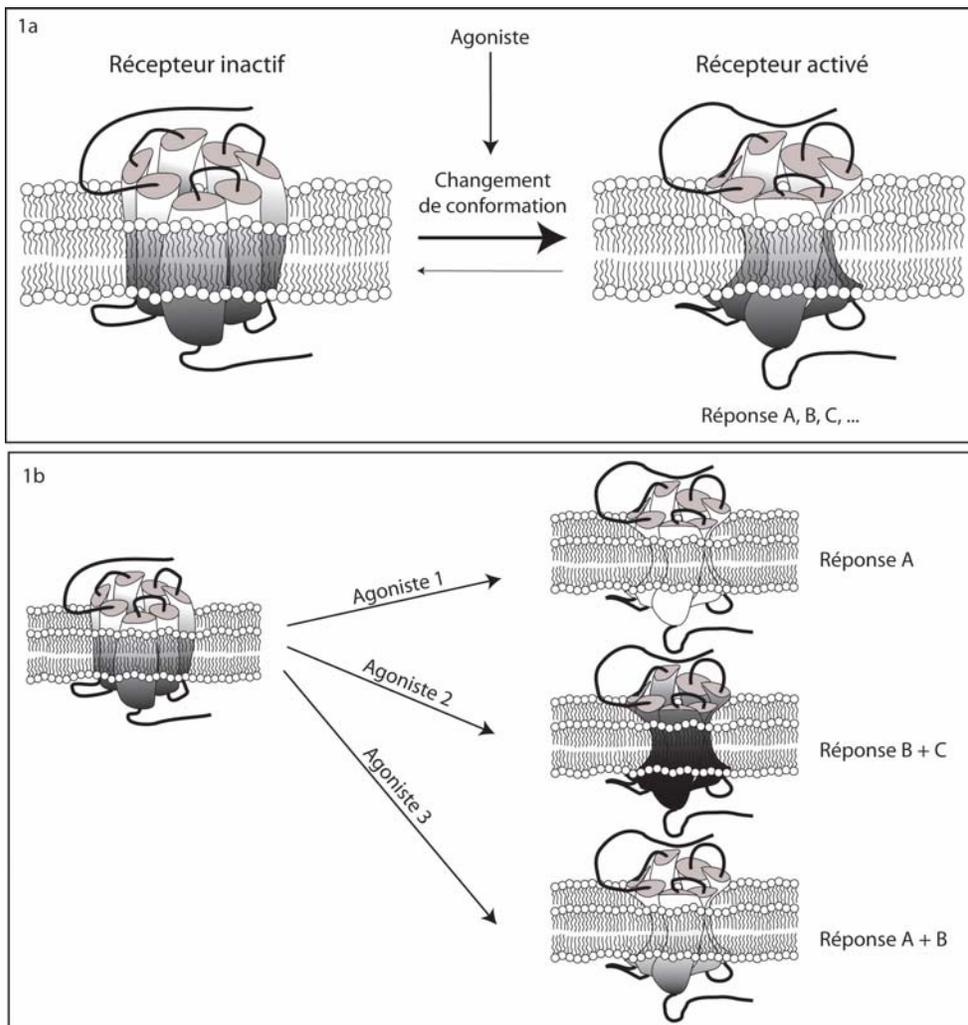
1. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, *et al.* Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 1-13.
2. Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, *et al.* Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *J Biol Chem* 2005; 280: 7808-16.
3. Kenakin T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* 2007; 72: 1393-401.
4. May LT, Hill SJ. ERK phosphorylation: spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2013-7.
5. Mathews JL, Smrcka AV, Bidlack JM. A novel Gbetagamma-subunit inhibitor selectively modulates mu-opioid-dependent antinociception and attenuates acute morphine-induced antinociceptive tolerance and dependence. *J Neurosci* 2008; 28: 12183-9.
6. McDowell TS. Fentanyl decreases Ca²⁺ currents in a population of capsaicin-responsive sensory neurons. *Anesthesiology* 2003; 98: 223-31.
7. Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K. Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta but not kappa-opioids. *J Neurosci* 2005; 25: 3551-9.
8. Zheng H, Loh HH, Law PY. Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) translocate to Nucleus in contrast to G protein-dependent ERK activation. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 178-90.
9. Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 2002; 66: 285-306.
10. Negus SS, Schrode K, Stevenson GW. Micro/kappa opioid interactions in rhesus monkeys: implications for analgesia and abuse liability. *Exp Clin Psychopharmacol* 2008; 16: 386-99.
11. Beaudry H, Proteau-Gagne A, Li S, *et al.* Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience* 2009; 161: 381-91.

12. Walsh SL, Strain EC, Abreu ME, Bigelow GE. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 157: 151-62.
13. McLaughlin JP, Myers LC, Zarek PE, *et al.* Prolonged kappa opioid receptor phosphorylation mediated by G-protein receptor kinase underlies sustained analgesic tolerance. *J Biol Chem* 2004; 279: 1810-8.
14. Bruchas MR, Land BB, Aita M, *et al.* Stress-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation mediates kappa-opioid-dependent dysphoria. *J Neurosci* 2007; 27: 11614-23.
15. May CN, Dashwood MR, Whitehead CJ, Mathias CJ. Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 903-13.
16. Porreca F, Mosberg HI, Hurst R, *et al.* Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 230: 341-8.
17. Cowan A, Zhu XZ, Mosberg HI, *et al.* Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 950-5.
18. Broom DC, Nitsche JF, Pintar JE, *et al.* Comparison of receptor mechanisms and efficacy requirements for delta-agonist-induced convulsive activity and antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 723-9.
19. Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, *et al.* In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS One* 2009; 4: e5425.
20. Alves ID, Ciano KA, Boguslavski V, *et al.* Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 44673-82.
21. Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, *et al.* Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signalling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 2008; 283: 15078-88.

22. Allouche S, Polastron J, Hasbi A, *et al.* Differential G-protein activation by alkaloid and peptide opioid agonists in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE. *Biochem J* 1999; 342 (Pt 1): 71-8.
23. Stanasila L, Lim WK, Neubig RR, Pattus F. Coupling efficacy and selectivity of the human mu-opioid receptor expressed as receptor-Galpa fusion proteins in Escherichia coli. *J Neurochem* 2000; 75: 1190-9.
24. Gupta A, Decaillet FM, Devi LA. Targeting opioid receptor heterodimers: strategies for screening and drug development. *AAPS J* 2006; 8: E153-9.
25. Fan T, Varghese G, Nguyen T, *et al.* 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. *J Biol Chem* 2005; 280: 38478-88.
26. Johnson EA, Oldfield S, Braksator E, *et al.* Agonist-selective mechanisms of muopioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 676-85.
27. Gabra BH, Bailey CP, Kelly E, *et al.* Pre-treatment with a PKC or PKA inhibitor prevents the development of morphine tolerance but not physical dependence in mice. *Brain Res* 2008; 1217: 70-7.
28. Pineyro G. Functional Selectivity at Opioid Receptors. In: K. A. Neve, eds. *Functional Selectivity of G Protein-Coupled Receptor Ligands*. New York: Humana Press, 2009:243-266.
29. Groer CE, Tidgewell K, Moyer RA, *et al.* An opioid agonist that does not induce micro-opioid receptor--arrestin interactions or receptor internalization. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 549-57.
30. Okura T, Varga EV, Hosohata Y, *et al.* Agonist-specific down-regulation of the human delta-opioid receptor. *Eur J Pharmacol* 2003; 459: 9-16.
31. Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, *et al.* Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 147-63.
32. Ho IK, Loh HH, Way EL. Effects of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on morphine tolerance and physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 185: 347-57.
33. Bernstein MA, Welch SP. Effects of spinal versus supraspinal administration of cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors on morphine tolerance in mice. *Drug Alcohol Depend* 1997; 44: 41-6.

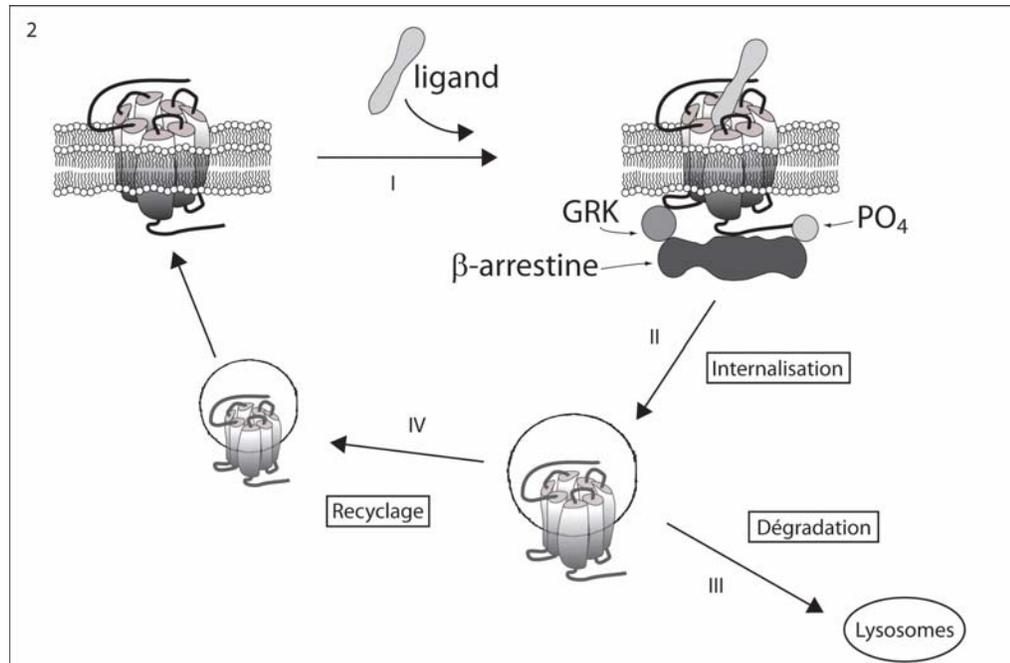
34. Yoshimura M, Wu PH, Hoffman PL, Tabakoff B. Overexpression of type 7 adenylyl cyclase in the mouse brain enhances acute and chronic actions of morphine. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 1011-6.
35. Li S, Lee ML, Bruchas MR, *et al.* Calmodulin-stimulated adenylyl cyclase gene deletion affects morphine responses. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1742-9.

Figure 1



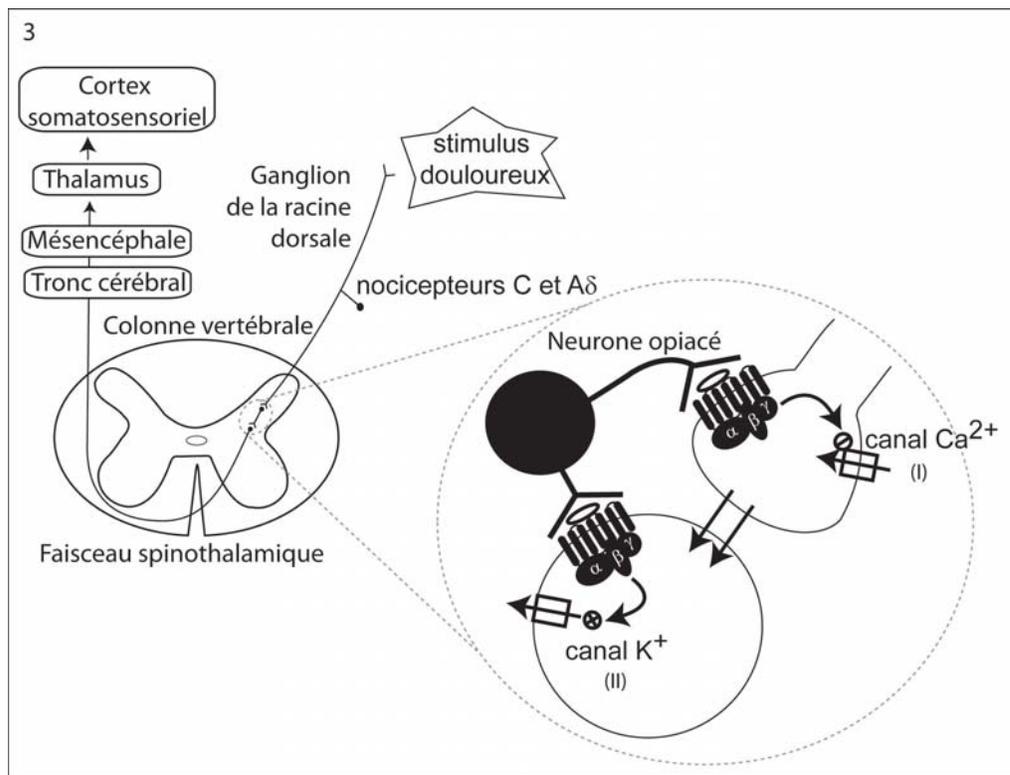
Évolution du concept d'efficacité en pharmacologie. (a) Modèle à deux états : une conformation active unique est responsable de toutes les réponses associées à un récepteur donné. (b) États actifs multiples : différentes conformations actives qui présentent des profils de signalisation distincts.

Figure 2



Désensibilisation homologue et trafic intracellulaire des récepteurs opiacés. (I) Suite à l'activation prolongée du récepteur par un agoniste, des kinases de type GRK produisent la phosphorylation du récepteur. (II) Le recrutement de la β -arrestine permet le découplage des protéines G et l'interaction du récepteur avec les protéines d'endocytose. Le récepteur internalisé est alors soit (III) dégradé soit (IV) recyclé pour un nouveau cycle de signalisation.

Figure 3



Rôle des signaux induits par les récepteurs opiacés dans la régulation de l'activité du circuit de perception de la douleur. Les récepteurs opiacés sont présents à la fois sur les terminaisons des neurones ganglionnaires, au niveau des neurones postsynaptiques de la moelle épinière ainsi qu'au niveau des interneurons spinaux. La moelle épinière joue donc un rôle de plaque tournante dans les contrôles ascendants et descendants de la douleur. L'activation des récepteurs opiacés (I) entraîne la fermeture des canaux calciques réduisant la libération de neurotransmetteurs par les nocicepteurs et (II) active les canaux potassiques responsables d'une réduction de l'excitabilité des neurones postsynaptiques.