

Université de Montréal

La sélectivité fonctionnelle des ligands du  
récepteur delta opiacé

Par

Nicolas Audet

Département de pharmacologie

Centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
docteur en Pharmacologie

Décembre 2011

© Nicolas Audet, 2011

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée  
La sélectivité fonctionnelle des ligands du  
récepteur delta opiacé

présentée par :

Nicolas Audet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Audrey Claing

Président-rapporteur

Graciela Pineyro

Directrice de recherche

Guy Rousseau

Membre du jury

Emanuel Escher

Examineur externe

Représentant du doyen

## Résumé

Les récepteurs couplés aux protéines GRCPG sont une des plus grandes familles de récepteur membranaire codifié par le génome humain et certainement la plus grande famille de récepteurs. Localisés au niveau des membranes plasmiques, ils sont responsables d'une grande variété de réponses cellulaires. L'activation de ces derniers par des ligands était traditionnellement associée à un changement de conformation de la protéine, passant d'un état inactif à un état actif. Toutefois, certaines observations entraient en contradiction avec cette théorie et laissaient supposer la présence de plusieurs conformations actives du récepteur. Ces différentes conformations pouvaient être actives pour certaines voies de signalisation ou de régulation et inactives pour d'autres. Ce phénomène, initialement appelé agoniste dirigé ou « biased agonism », est maintenant décrit comme étant la sélectivité fonctionnelle des ligands des RCPG. Cette sélectivité des voies de signalisation et de régulation permettrait en théorie de développer des ligands capables de cibler seulement les voies de signalisation et de régulation responsable des effets thérapeutiques sans activer les voies responsables des effets secondaires ou indésirables.

Le récepteur delta opiacé (DOR) est un RCPG impliqué dans la gestion de la douleur chronique. L'action analgésique de ses ligands est toutefois soumise à un effet de tolérance produite lors de leur utilisation à long terme. Cet effet secondaire limite l'utilisation thérapeutique de ces médicaments. Cette thèse s'est donc intéressée à la sélectivité fonctionnelle des ligands du DOR afin d'évaluer la possibilité de réduire les effets de tolérance produits par ces molécules. En premier lieu, nous avons déterminé que le DOR peut être stabilisé dans plusieurs conformations actives dépendantes du ligand qui le lie et ces conformations possèdent différents profils d'activation des voies de signalisation et de régulation. En deuxième lieu, nous avons déterminé que les différents ligands du DOR stabilisent des conformations du complexe récepteur/protéine G qui ne concordent pas avec la théorie des récepteurs à deux états, suggérant plutôt la présence d'une multitude de conformations actives. Finalement, nous avons démontré que ces différentes conformations interagissaient de façon distincte avec les protéines de régulation des RCPG; le ligand favorisant le retour du récepteur à la membrane produisant

moins de désensibilisation et moins de tolérance aiguë à l'analgésie que le ligand favorisant la séquestration du récepteur à l'intérieur de la cellule. Les résultats de cette thèse démontrent que la sélectivité fonctionnelle des ligands opiacés pourrait être utilisée dans le développement de nouveau analgésique produisant moins de tolérance.

**Mots-Clés :** RCPG, opiacé, tolérance,  $\beta$ arrestine, signalisation, régulation, MAPK, AMPc, DOR, douleur, phosphorylation, analgésique, protéine G, BRET, conformation, sélectivité fonctionnelle, internalisation, recyclage, désensibilisation.

## Abstract

G protein coupled receptors (GPCRs) are one of the largest families of membrane receptor coded by the human genome and certainly the biggest family of receptors. Localized at the plasma membrane, they are responsible for a wide variety of cellular responses. Activation of GPCRs by ligands has been traditionally associated with change in protein conformation, switching from an inactive to an active state. However, some observations were inconsistent with this theory suggesting the presence of several active conformations of the receptor. These different conformations could be active in some signalling or regulatory pathways and inactive in others. This phenomenon, originally called biased agonism, is now described as the functional selectivity of GPCRs ligands. In theory, this type of selectivity could lead to the development of drugs that therapeutic action without activating signalling pathways responsible for side effect.

The delta opioid receptor (DOR) is a GPCR involved in chronic pain management. However, analgesic action of its ligands is subject to tolerance that develops over the course of long-term treatment, limiting their clinical use. This thesis focuses on functional selectivity of DOR ligands to assess the possibility of reducing the effects of tolerance produced by these molecules. First, we determined that DORs adopt ligand-specific active conformations with distinct ability to activate different signalling pathways and regulatory responses. Second, we established that DORs constitutively associate with G $\alpha$ i heterotrimeric subunits, and that different receptor ligands induce distinct conformational changes within these signalling complexes. These observations are inconsistent with a two-state model of receptor activation, pointing instead the presence of multiple active conformations. Finally, we demonstrated that conformations stabilized by different agonists distinctively interact with  $\beta$ arrestin2, such that the agonist who promoted a transient receptor interaction with this regulatory protein produced more recycling, less desensitization and less acute analgesic tolerance than the ligand who promoted a stable DOR- $\beta$ arrestin2 interaction. Taken together, the results presented in this thesis show DORs adopt ligand-specific conformations that support ligand-specific profiles of analgesic

tolerance. This type of functional selectivity of opioid ligands could be eventually exploited in the development of novel therapeutic agents with longer analgesic actions.

**Keyword :** GPCR, opioid, tolerance,  $\beta$ arrestin, signalisation, regulation, MAPK, cAMP, DOR, pain, phosphorylation, analgesic, G protein, BRET, conformation, functional selectivity, internalization, recycling, desensitization.

## Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>x</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>xi</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Les RCPG et les protéines G.....	1
1.1.1 Description des RCPG.....	1
1.1.1.1 Structure des RCPG.....	1
1.1.1.2 Classification des RCPG.....	3
1.1.2 Description des protéines G.....	7
1.1.3 Signalisation des RCPG et de leurs effecteurs.....	12
1.1.3.1 Voie de l'adénylate cyclase et de l'AMPc.....	14
1.1.3.2 Les canaux calciques dépendant du voltage ( $Ca_v$ ).....	17
1.1.3.3 Les canaux potassiques à rectification entrante activée par les protéines G.....	20
1.1.3.4 Signalisation indépendante des protéines G.....	24
1.1.3.5 Voie de signalisation des MAPK de type ERK1/2, un exemple de convergence de la signalisation.....	27
1.1.3.5.1 Régulation des MAPK ERK1/2 par les protéines $G_{i/o}$ .....	27
1.1.3.5.1.1 Stimulation par $G_{\alpha_{i/o}}$ .....	27
1.1.3.5.1.2 Stimulation par $G_{\beta\gamma}$ .....	28
1.1.3.5.2 Activation des MAPK par les RCPG à travers l'activation des récepteurs tyrosines kinase (RTK).....	30
1.1.3.5.3 Activation des MAPK ERK1/2 au travers de protéines d'échafaudage tel la $\beta$ arr.....	31
1.1.4 Complexes multimériques.....	32
1.1.5 Régulation de la signalisation.....	35
1.1.5.1 Phosphorylation du récepteur.....	36

1.1.5.2 Le découplage fonctionnel par la $\beta$ arr.....	40
1.1.5.3 L'internalisation du récepteur.....	42
1.1.5.4 Le tri postendocytose.....	43
1.2 Théorie pharmacologique.....	45
1.2.1 La naissance du concept des récepteurs.....	45
1.2.2 La théorie de l'occupation.....	46
1.2.3 Modèle des récepteurs à deux états.....	47
1.2.4 Les modèles ternaires.....	48
1.2.5 Le modèle « probabilistique ».....	52
1.2.6 La sélectivité fonctionnelle.....	53
1.3 Les opiacés.....	56
1.3.1 Historique et utilisation médicale.....	56
1.3.2 Biologie des opiacés.....	58
1.3.2.1 Les récepteurs.....	58
1.3.2.2 Les ligands endogènes.....	59
1.3.2.3 La distribution cellulaire.....	60
1.3.3 Signalisation de l'analgésie des opiacés.....	62
1.3.4 Mécanisme de tolérance aux opiacés.....	62
<b>2. Hypothèse et objectifs.....</b>	<b>64</b>
<b>3. Résultats.....</b>	<b>66</b>
3.1 Première publication (publiée dans <i>Journal of Biological Chemistry</i> ).....	66
3.1.1 Introduction et mise en contexte du premier article.....	66
3.1.2 Article 1.....	68
3.2 Deuxième publication (publiée dans <i>Journal of Biological Chemistry</i> ).....	106
3.2.1 Introduction et mise en contexte du deuxième article.....	106
3.2.2 Article 2.....	108
3.3 Troisième publication (soumis à <i>Journal of Neuroscience</i> ).....	137
3.3.1 Introduction et mise en contexte du troisième article.....	137
3.3.2 Article 3.....	140
<b>4. Discussion.....</b>	<b>208</b>
4.1 Les agonistes a double efficacité du DOR stabilisent des conformations actives différentes que ses agonistes.....	209



4.1.1 L'inversion de l'ordre d'efficacité des ligands.....	209
4.1.2 L'effet agoniste du TICP sur les MAPK ERK1/2 dépend de la fonctionnalité de la sous-unité $G\alpha_i$ mais pas de son activation.....	210
4.1.3 Le TICP, contrairement au DPDPE, stabilise une conformation qui n'est pas désensibilisée.....	211
4.1.4 Le double rôle de Src dans l'activation et la désensibilisation de la voie des MAPK ERK1/2.....	213
4.2 Les ligands du DOR stabilisent des conformations actives différentes du complexe DOR/protéine G.....	215
4.2.1 Le DOR forme un complexe préformé à la membrane avec les protéines G.....	215
4.2.2 Les ligands modifient la conformation du complexe DOR/protéine G.....	217
4.2.3 Les ligands du DOR stabilisent des conformations différentes.....	218
4.2.4 Le mouvement entre les protéines G, élément prédictible de l'activation des voies de signalisation.....	220
4.3 Implication des différentes conformations dépendantes du ligand dans la régulation de la signalisation du DOR.....	221
4.3.1 Une stimulation prolongée avec les agonites complet DPDPE et SNC-80 stabilisent des conformations qui sont régulées différemment.....	221
4.3.2 Les conformations stabilisées par DPDPE et SNC-80 diffèrent dans leur interaction avec les protéines G et la $\beta$ arr.....	223
4.3.3 La conformation du DOR stabilisée par le SNC-80 produit une plus forte désensibilisation de la voie de l'AMPC et de la tolérance aiguë à l'analgésie que la conformation stabilisée par le DPDPE.....	227
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>229</b>
<b>6. Liste de référence.....</b>	<b>231</b>

## Listes des figures

- Figure 1** : Représentation schématique d'un RCPG
- Figure 2** : Domaine de liaison de la classe G
- Figure 3** : Représentation schématique de la protéine G hétérotrimérique ( $G_{\alpha_1\beta_1\gamma_2}$ )
- Figure 4** : Rotation d'un noyau aromatique du TM6 lors de l'activation du récepteur Rhodopsin
- Figure 5** : Verrou ionique entre le TM3 et le TM6
- Figure 6** : Activation de la protéine G
- Figure 7** : Régulation d'un Cav2 par les  $G\beta\gamma$  lors de l'activation d'un RCPG
- Figure 8** : Régulation d'un Kir3 par les  $G\beta\gamma$  lors de l'activation d'un RCPG
- Figure 9** : Désensibilisation hétérologue des RCPG
- Figure 10** : Désensibilisation homologue des RCPG
- Figure 11** : Théorie pharmacologique des récepteurs à 2 états
- Figure 12** : Théorie pharmacologique : modèle ternaire
- Figure 13** : Théorie pharmacologique : modèle complexe ternaire étendu d'activation des récepteurs
- Figure 14** : Théorie pharmacologique : modèle complexe ternaire cubique d'activation des récepteurs

## Liste des sigles et abréviations

A <sub>2A</sub> R	Récepteur de l'adénosine de type 2a
AC	Adénylate cyclase
ADP	Adénosine bi-phosphate
AMPC	Adénosine mono-phosphate cyclique
ATP	Adénosine tri-phosphate
AKAP	Protéine d'encrage de la kinase A
AMPC	Adénosine 3',5' monophosphate cyclique
AP-2	Protéine adaptatrice 2
AT1aR	Récepteur à l'angiotensine II de type 1a
ATP	Adénosine triphosphate
BAI	Inhibiteur de l'angiogénèse cérébrale
BRET	Transfert de la fluorescence par résonance énergétique
C1-2	Domaines catalytiques de l'AC
CaM	Calmoduline
CASR	Récepteur sensible au calcium
Ca <sub>v</sub>	Canaux calciques dépendant du voltage
CD97	Récepteur de la famille adhésion
CELSR	Récepteur à 7 TM de type Cadherin/EGF/LAG
CNG	Canaux ioniques modulés par les nucléotides et non sélectif au cation
COS-7	Cellules de rein du singe vert d'Afrique immortalisées par le gène du virus SV40
CREB	Protéine se fixant au CRE (CRE-binding protein)
CTC	Modèle complexe ternaire cubique d'activation des récepteurs
CTE	Modèle complexe ternaire étendu d'activation des récepteurs

D <sub>1-4</sub> R	Récepteur dopaminergique de type 1-4
D2R	Récepteur dopaminergique de type 2
DAG	Diacyl glycérol
DEP	Domaine de translocation de l'EPAC2 (de l'anglais « dishevelled, Egl-10 and plexktrin).
DLG4	« Postsynaptic density protein 95 »
DOR	Récepteur $\delta$ opiacé
DPDPE	[D-Pen2,5]Enkephalin , [D-Pen2,D-Pen5]Enkephalin
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique
EPAC	Protéine d'échange activé par l'AMPc
ERK	Kinase régulé par un signal extracellulaire
FRET	Transfert de la luminescence par résonance énergétique
GABA	Récepteurs à l'acide aminobutyrique $\gamma$
GC	Guanylate cyclase
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange des nucléotides guanines
GFP	Protéine fluorescente verte
GIP	Protéines interagissant avec les RCPG
GIP	Polypeptide insulino-trope dépendant du glucose
GIRK	Canaux potassiques à rectification entrante
GRAFS	Système de classification des RCPG : <u>G</u> lutamate, <u>R</u> hodopsin, <u>A</u> dhésion, <u>F</u> rizzled/Taste2 et <u>S</u> écrétine
Grb2	Protéine adaptatrice de la transduction du signal de type 2 (« growth factor receptor-bound protein-2 »)
GRK	Kinases des RCPG
GTP	Guanosine triphosphate

G $\alpha$	Sous-unité $\alpha$ de la protéine G
G $\beta$	Sous unité $\beta$ de la protéine G
G $\gamma$	Sous unité $\gamma$ de la protéine G
H <sub>2</sub> R	Récepteur à l'histamine de type 2
HCN	Canaux ioniques activés par hyperpolarisation, modulé par les nucléotides et non sélectif au cation
HEK293	Cellules de rein embryonnaire humain immortalisées avec le gène du virus SV40
Her2	Glycoprotéine membranaire
HVA	Canaux calcique activés par un haut voltage
IP3	Inositol triphosphate
Kir3	Canaux potassique à rectification entrante
KOR	Récepteur $\kappa$ opiacé
LEC	Récepteurs aux chemokines exprimé dans le foie
LHR	Récepteur à l'hormone de la Lutéine
LPAR	Récepteur à l'acide lysophosphatidique
Luc	Luciférase
LVA	Canaux calciques activés par un bas voltage
M2R	Récepteur muscarinique de type 2
MAPK	Kinase active par la mitogénèse (Mitogen-activated protein kinase)
mGluR	Récepteurs métabotrope du glutamate
mGLURII	Récepteur métabotrope au glutamate
MOR	Récepteur $\mu$ opiacé
mSOS	Facteur d'échange des nucléotides guanines (Son of sevenless homolog)
NHERF	Facteur de régulation d'échange Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NK <sub>1</sub> R	Récepteur à la neurokinine de type 1

NRTK	Tyrosine kinase qui n'est pas un récepteur
ORL1	Récepteur ressemblant aux opioïdes
P2Y1R	Récepteur au nucléotide P2Y de type 1
PAR <sub>1</sub>	Récepteur de type 1 activé par des protéase
PAR <sub>2</sub>	Récepteur de type 2 activé par des protéase
PDE1-8	Phosphodiesterases de type 1 à 8
PDZ	Domaine de liaison de protéines pour leur ancrage au cytosquelette.
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PTH <sub>1</sub> R	Récepteur pour l'hormone parathyroïde de type 1
PyK2	"Protein tyrosine kinase 2"
PTX	Toxine pertussique
R	Domaine régulateur de l'AC
Rap	Petite protéine G
Rap-1-GAP	Protéine activatrice de GTPase de RAP1
RCPG	Récepteur couplés aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RLuc	Renilla Luciférase
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
Sar1	GTPase impliquée dans le déplacement des protéines vers la membrane
Ser	Sérine
SH3	Domaine homologue de Src
Shc	"Src homology 2 domain containing"

SMO	Récepteurs Smoothened
SNAP-25	« Synaptosomal-associated protein 25 »
SNC-80	4-[(R)-[(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethylpiperazin-1-yl](3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide
SNX27	Sorting nexin 27
Src	Tyrosine kinase qui n'est pas un récepteur
STX1	Syntaxine 1
TAS1	Récepteur du goût de type 1
Thr	Thréonine
TICP	Tyr-TicΨ[CH <sub>2</sub> NH]cyclohexylalanine-Phe-OH
TIPP	Tyr-L-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid-Phe-Phe-OH
TM1-7	Passage transmembranaire 1 à 7
Tyr	Tyrosine
V2R	Récepteur à la vasopressine de type 2
VAMP	Protéine membranaire associée aux vésicules
YFP	Protéine fluorescente jaune
α <sub>2</sub> AR	Récepteur α-adrénergique de type 2
β <sub>1</sub> AR	Récepteur β-adrénergique de type 1
β <sub>2</sub> AR	Récepteur β-adrénergique de type 2
β <sub>3</sub> AR	Récepteur β-adrénergique de type 3
βarr	β-Arrestine

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice, Dre Graciela Pineyro, qui m'a donné la chance de faire de la recherche alors que j'avais presque abandonné mon rêve de jeunesse. Elle fut la première à croire en mes capacités même si mes notes scolaires n'étaient pas à mon avantage. Son aide, sa patience, sa compréhension, ses encouragements dans les moments difficiles et ses coups de fouet au moment opportun m'ont permis de grandir en tant que chercheur et en tant que personne. Elle m'a appris à réduire ma pensée à des problèmes concrets, moi qui avais tendance à éparpiller mes idées dans toutes les directions. Je me souviendrai toujours des années passées dans ton laboratoire et je t'en serai à jamais reconnaissant.

Un immense merci pour une personne qui a été mon mentor durant plusieurs années, Dr Robert Élie. Sans son aide et ses conseils, cette thèse aurait été impossible. Il m'a permis de m'inscrire au département de pharmacologie en appuyant ma candidature. Il m'a aussi aidé financièrement les deux années de mes études supérieures. Mais plus important encore, il m'a ouvert les yeux sur la vie en me montrant comment affronter les problèmes de celle-ci. Grâce à lui, je suis passé de jeune révolté en adulte responsable. Même si je n'ai pas toujours écouté ses conseils, ils se sont toujours avérés très judicieux. Son enseignement m'a aussi permis de développer une expertise en biostatistique qui me suivra tout le long de ma carrière. Même si je ne t'ai pas assez souvent visité depuis ta retraite Robert, tu seras toujours un père pour moi.

J'aimerai aussi remercier mon frère Martin qui m'a permis de rencontrer ma directrice. Nous avons commencé nos études supérieures en même temps, moi avec la Dre Pineyro et lui avec le Dr Bouvier. Son ouverture d'esprit a permis des discussions scientifiques les plus spectaculaires et les plus intéressantes, et ce n'est pas fini. Il fut une oreille attentive lorsque j'avais des difficultés. Ne lâche pas Martin, tu vas terminer bientôt toi aussi.

Merci également à mes parents, Colette et Robert, qui m'ont toujours soutenu dans les bons et moins bons moments, même quand j'étais le principal responsable de mes malheurs. Ils ont toujours été présents pour moi. Je n'oublierai jamais toute l'aide qu'ils m'ont apportée, tout l'appui moral qu'ils m'ont donné. C'est grâce à leur éducation que je



me suis toujours intéressé à la science et c'est grâce à leur soutien que j'ai pu me rendre aussi loin. Merci gros comme la Terre.

Merci à Faïza d'avoir été à l'écoute lorsque j'avais des problèmes avec ma directrice. Merci à Billy Breton pour son aide et ses conseils techniques. Merci à Mohammad pour toutes les discussions animées sur la politique internationale. Merci à Mélanie, Ouissame et Mélissa pour tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec vous. Finalement, un gros merci à toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à la réussite de cette thèse, incluant les membres présents et passés de mon laboratoire avec qui j'ai eu des discussions animées qui ont fait évoluer ma pensée scientifique et aussi ma capacité à m'exprimer clairement.

# 1. Introduction

## 1.1 Les RCPG et les protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une des plus grandes familles de récepteur membranaire codifié par le génome humain et certainement la plus grande famille de récepteurs [1]. Localisés au niveau des membranes plasmiques, ils sont responsables d'une grande variété de réponses cellulaires. Ces récepteurs peuvent être activés par différents ligands, variant de simples photons à des protéines complexes en passant par des ions, des odeurs, des acides aminés, des acides gras, des neurotransmetteurs et des peptides [2]. Ils sont un lien essentiel entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, le lien entre l'environnement et la réaction envers celui-ci. Ils nous permettent de goûter, de sentir, de voir, d'interagir avec ce qui nous entoure.

Mais au-delà de leur importance physiologique, ils jouent un rôle extrêmement important en médecine, car ils sont la cible de près du tiers des médicaments actuellement utilisés. Malgré ce fait, les médicaments ne ciblent qu'une infime partie des RCPG connus (plus de 800). Plusieurs de ces récepteurs sont orphelins de ligands ou nous ne connaissons tout simplement pas leur rôle physiologique. Le terrain de recherche est donc encore très vaste afin de comprendre les rôles de ces différents récepteurs dans la physiologie et la pathophysiologie de l'humain ainsi que dans la thérapie de ces conditions pathologiques.

### 1.1.1 Description des RCPG

#### 1.1.1.1 Structure des RCPG

Jusqu'à tout récemment, toutes les informations concernant la structure des RCPG s'appuyaient sur les données de cristallisation du récepteur visuel Rhodopsine [3;4]. Cependant, l'utilisation de ligands ou de partie de protéines G dans le but de stabiliser la conformation du récepteur a permis une percée technologique importante dans la cristallisation des protéines membranaires ces dernières années. Cette percée a amélioré

notre compréhension de la structure tridimensionnelle des RCPG. L'utilisation d'antagoniste ou d'agonistes inverses a permis la cristallisation de conformations inactives des récepteurs suivant :  $\beta_2$ adrenergique humain ( $\beta_2$ AR) [5-7],  $\beta_1$ adrenergique aviaire ( $\beta_1$ AR) [8], le récepteur de l'adénosine  $A_{2A}$  [9], le récepteur aux chimiokines CXCR4 [10], le récepteur à la dopamine  $D_3$  ( $D_3$ R) [11], le récepteur KOR [12] et le récepteur MOR [13], tandis que l'utilisation d'agonistes et de fragments de la protéine G a permis la cristallisation de conformation active des récepteurs suivant :  $\beta_2$ AR [14;15],  $\beta_1$ AR [16] et le récepteur à l'adénosine  $A_{2A}$  [17]. Deux structures actives du récepteur opsine (rhodopsine sans chromophore) ont également été cristallisées : un sans ligand [18] et l'autre en interaction avec sa protéine G [19]. Même si ces récepteurs font tous partie de la famille Rhodopsine, la majorité des RCPG partagent des caractéristiques communes qui les distinguent des autres protéines.

Leur première caractéristique est qu'ils sont pratiquement tous couplés à une protéine G qui sert de transducteur principal du signal vers les seconds messagers et les effecteurs de la cellule. Autrement dit, les protéines G sont les engrenages permettant la transmission du message du récepteur vers les mécanismes cellulaires. Une seconde caractéristique est qu'ils traversent la membrane plasmique à l'aide de 7 domaines transmembranaires (TM1-7). Cette structure a été fortement conservée au cours de l'évolution; les RCPG partagent environ 25% d'homologie de séquence dans ce noyau transmembranaire [20]. De ces TM naissent 3 boucles extracellulaires responsables, avec la queue N-terminale, de la liaison des ligands, une queue C-terminale permettant l'interaction avec différentes protéines accessoires ou GIP (de l'anglais GPCR interacting proteins) et différentes protéines de régulation [21], et trois boucles intracellulaires responsables de la liaison avec les protéines G et de certaines protéines régulatrices comme les arrestines (Figure 1) [22-27].

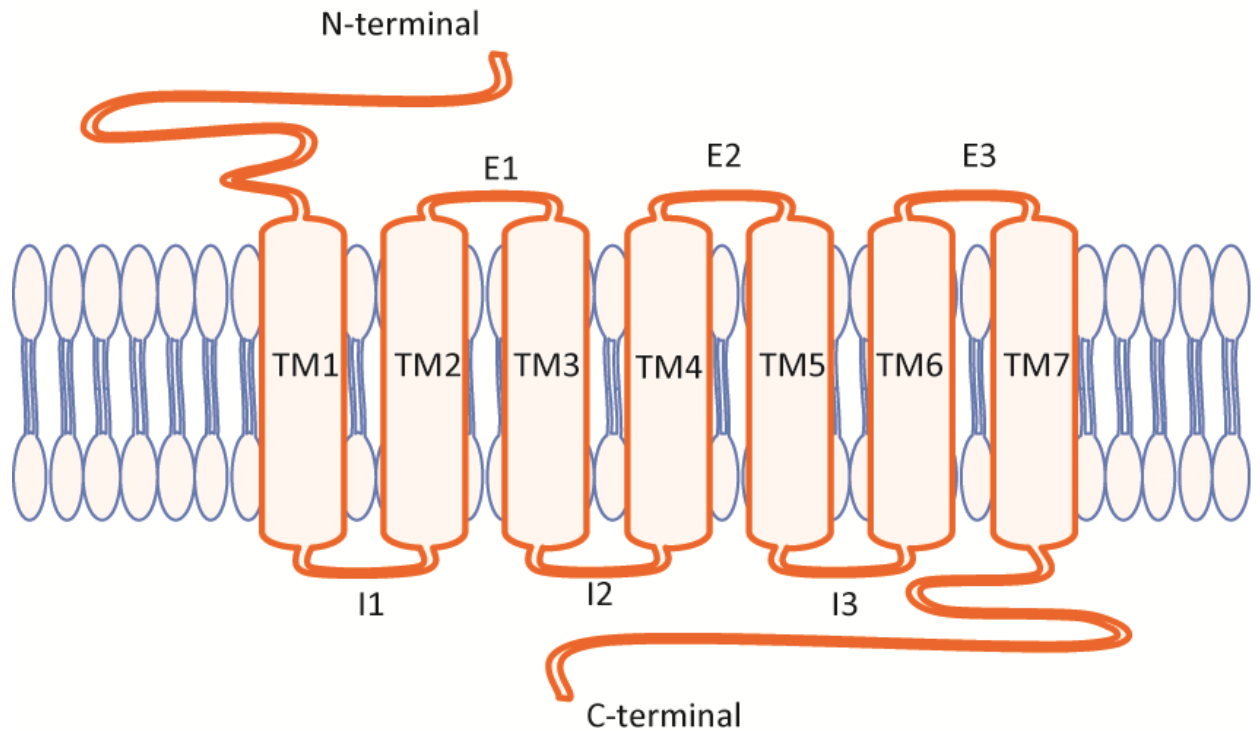


Figure 1 : Représentation schématique d'un RCPG avec sa queue N-terminale, ses 7 passages transmembranaires (TM1-7), ses 3 boucles extracellulaires (E1-3), ses 3 boucles intracellulaires (I1-3) et sa queue C-terminale.

### 1.1.1.2 Classification des RCPG

Les RCPG ont été classés de plusieurs façons depuis leur découverte. Alors que certains classements sont basés sur la localisation du site de liaison du ligand, d'autres utilisent les caractéristiques physiologiques et structurales des RCPG [28]. Jusqu'à tout dernièrement, le système de classification le plus utilisé fut le système A-F (une lettre pour chaque famille) qui utilise les homologies de séquences en acides aminés pour classifier les RCPG des vertébrés et des invertébrés [29;30]. Toutefois, un nouveau système de classification basé sur une analyse phylogénique de la majorité des RCPG du génome humain fit son apparition en 2003 [31]. Ce nouveau système, prénommé GRAFS pour Glutamate (G), Rhodopsin (R), Adhésion (A), Frizzled/Taste2 (F) et Sécrétine (S), fut par la suite validé pour la majorité des RCPG des espèces de mammifères, de poissons, d'insectes et de nématode [2].

Selon ce système, les RCPG seraient divisés en 5 classes distinctes. La première, la famille des récepteurs aux glutamates (groupe C de la classification A-F), est composée de huit récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), deux récepteurs à l'acide aminobutyrique  $\gamma$  (GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>), un récepteur sensible au calcium (CASR) et un récepteur du goût de type 1 (TAS1). La plupart de ces récepteurs possèdent une longue queue N-terminal extracellulaire qui permet la liaison du ligand. Ce domaine de liaison est composé de deux lobes de la queue N-terminale séparés par une cavité. À la suite de la liaison du ligand à l'intérieur de cette cavité, les deux lobes se referment et piègent le ligand (Figure 2). Ce domaine fut nommé amicalement « Vénus Fly Trap » (nom commun anglais de la plante dionée attrape-mouche) par sa similarité avec la technique de chasse de la plante carnivore [2].

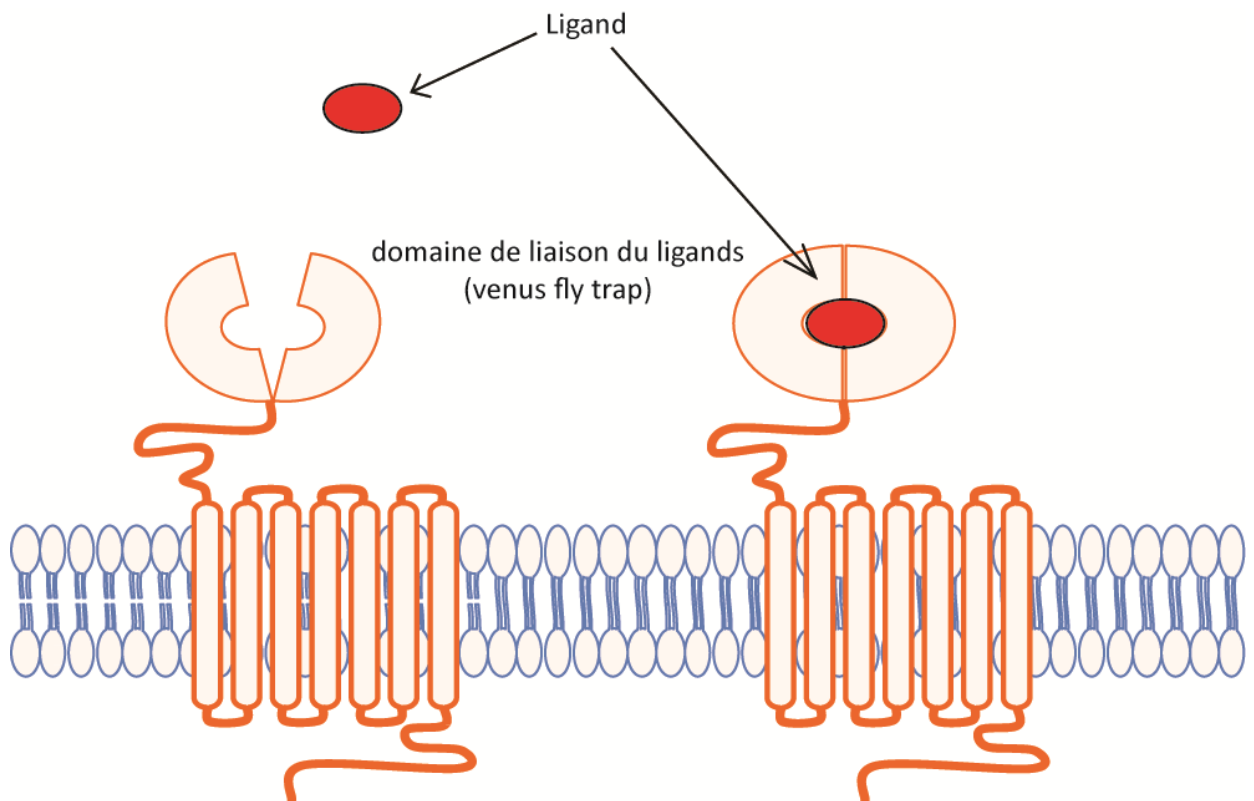


Figure 2 : Schéma représentant le domaine de liaison d'un RCPG de classe G

La deuxième, la famille de la Rhodopsine (approximativement le groupe A de la classification A-F), est sans conteste la plus grande famille des RCPG de tous les vertébrés (jusqu'à 672 représentants dans le génome humain). Ces récepteurs ont presque tous comme caractéristique une séquence NSxxNPxxY dans le TM7 et une séquence DRY entre le TM3 et la boucle intracellulaire 2. Ils diffèrent aussi grandement des autres familles, car ils ont en général une queue N-terminale assez courte. Et, contrairement aux récepteurs de la famille G qui utilisent leur queue N-terminale comme pochette de liaison, la liaison de leurs ligands s'effectue pour la majorité à l'intérieur d'une cavité entre les régions transmembranaires. Cette famille est séparée par phylogénèse en quatre groupes pour le génome humain :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . Généralement, le groupe  $\alpha$  est composé de RCPG liant des amines, des peptides ainsi que les récepteurs aux prostaglandines. Le groupe  $\beta$  est composé exclusivement de RCPG liant des peptides. Le groupe  $\gamma$  inclut des RCPG liant plusieurs types de ligands comme les chimiokine, les somatostatines, les galalines et les opiacés. Finalement, le groupe  $\delta$  est représenté par les récepteurs olfactifs, les récepteurs purinergiques et les récepteurs des glycoprotéines [2].

La troisième famille, la famille Adhésion, est composée de 33 récepteurs chez l'humain (certains appartiennent au groupe B de la classification A-F). Ces RCPG possèdent une très longue queue N-terminale pouvant aller jusqu'à plusieurs milliers d'acides aminés et contenant des domaines aux fonctions multiples dont la plupart ont des propriétés adhésives. Ces domaines sont généralement uniques à cette famille de RCPG de par leurs similarités avec d'autres protéines de membranes telles les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), les cadhérines et les intégrines [32;33]. Les récepteurs de cette famille peuvent être séparés en plusieurs sous familles possédant des fonctions différentes. La sous-famille des EGF (pour leur similarité avec les récepteurs au facteur de croissance épidermique ((EGFR)) est impliquée dans le système immunitaire tel le récepteur CD97 qui peut induire une réponse inflammatoire [34] et qui est impliqué dans la migration des neutrophiles [35]. La sous-famille des BAI (pour brain specific angiogenese inhibitor) est exprimée dans la majorité du système nerveux central [36] et elle est impliquée dans l'inhibition de l'angiogenèse dans les glioblastomes [37;38]. La sous-famille des CELSR (pour Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor) qui est exprimée dans le système

nerveux central, périphérique et dans plusieurs organes serait impliquée entre autres dans le développement précoce du cerveau et du système nerveux périphérique [39]. La sous-famille des LEC (pour Liver-expressed chemokine) est exprimée dans la majorité des organes ainsi que dans le cerveau [40;41], leur fonction reste toutefois un mystère sauf pour le récepteur LEC1 qui serait impliqué dans l'exocytose des vésicules synaptiques [42]. Les autres récepteurs de la famille des Adhésions ont été peu étudiés jusqu'à présent et leurs rôles physiologiques restent pour la plupart un mystère [43].

La quatrième, la famille Frizzled/Taste2, est composée chez l'humain des récepteurs Frizzled, Smoothened (ils appartiennent au groupe F du classement A-F) et Taste2. Les récepteurs Frizzled possèdent une section extracellulaire contenant de 200 à 320 acides aminés qui divergent principalement au niveau de leur région entre les TM et le domaine de liaison extracellulaire des ligands [44]. Les ligands de ces récepteurs se lient dans une région riche en cystéines formant un pont entre la première et la deuxième boucle intracellulaire [45], bien que d'autres sites de liaison hors de ce pont ont été découverts [46]. Les récepteurs SMO (smoothened) partagent plusieurs structures des récepteurs Frizzled. Par exemple, leur domaine extracellulaire possède une région riche en cystéine qui est préservée au travers de tous les récepteurs SMO et la destruction de ce pont cystéine entre la première et la deuxième boucle extracellulaire est associée à la perte de fonction de ces récepteurs [47;48]. Les récepteurs Taste2 ne possèdent pas les mêmes caractéristiques que leurs confrères de cette famille. Ils sont composés de seulement 290 à 340 acides aminés et ils possèdent de petites des queues C et N terminales [49;50]. De plus, ils n'ont pas conservé le pont de cystéines important pour la liaison des ligands des autres récepteurs de la famille [1] et leurs domaines de liaison des ligands, situés sur la première ou la deuxième boucle extracellulaire, varient selon les ligands [51]. Les récepteurs Frizzled et Smoothened sont impliqués dans les processus de survie, de prolifération et de polarisation cellulaires [1;2] tandis que les récepteurs Taste2 seraient impliqués dans la reconnaissance de l'amertume ([1]).

La cinquième, la famille Sécrétine (groupe B du classement A-F), contient 15 récepteurs dans le génome humain. Elle tire son nom du premier récepteur de cette famille qui a été cloné [52]. Cette famille a longtemps été jumelée avec la famille Adhésion, car elles ont en

commun une queue N-terminale riche en cystéine [2]. Toutefois, le N-terminal des récepteurs S est plus court (entre 60 et 80 acides aminés) et contient habituellement trois ponts cystéines [2] contrairement aux récepteurs de la famille Adhésion qui en possède qu'un seul. Ce N-terminal est aussi très important lors de l'activation du récepteur. Le ligand forme un pont entre le N-terminal, les boucles extracellulaires et le passage transmembranaire 6 pour activer ce dernier.

### 1.1.2 Description des protéines G

C'est au début des années 70 que fut démontrée l'importance du GTP dans la dissociation du ligand et l'activation de la signalisation des RCPG [53;54]. Les auteurs ont alors observé que la présence de GTP purifié, lors de la stimulation de membranes de cellules hépatiques de rat par du glucagon, permettait d'accélérer l'activité de l'adénylate cyclase (AC) comparativement à de l'ATP non purifiée. De plus, ils ont observé que sans GTP, le glucagon était incapable de stimuler l'AC. Toutefois, il fallut attendre quelques années avant de comprendre comment le GTP pouvait réguler l'AC. C'est en étudiant l'effet d'un traitement à la toxine cholérique sur les niveaux d'AMPc et suite à l'isolation de mutants résistants à ces toxines que fut pour la première fois décrite la présence de la composante régulatrice de l'AC [55-57]. Cette composante, maintenant nommée protéines G pour « guanine nucleotide binding protein », fut purifiée deux ans plus tard et séparée en trois protéines distinctes : une protéine qui migre à 45 kDa ( $G\alpha_s$ ), une protéine qui migre à 35 kDa ( $G\beta$ ) et une protéine migre à 8-10 kDa ( $G\gamma$ ) [58]. Pendant des années la communauté scientifique a cru que les protéines G étaient les uniques responsables de la signalisation intracellulaire lors de l'activation des RCPG. Toutefois, de plus en plus de preuves démontrent l'existence de mécanismes de signalisation indépendants de la protéine G [59]. Quoi qu'il en soit, les protéines G restent à ce jour un outil de transduction essentiel des RCPG.

Les protéines G sont donc composées de trois sous-unités,  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$  formant un hétérotrimère ancré à la membrane par la sous-unité  $G\gamma$  (figure 3). Elles sont activées suite au changement de conformation du récepteur vers sa forme active. L'activation de



ce dernier produit des changements moléculaires à l'intérieur de ses TM. Des études sur le récepteur Rhodopsine, et tout dernièrement sur le  $\beta_2$ AR [15], ont démontré que deux changements majeurs lors de son activation : un changement dans la position d'un noyau aromatique à l'intérieur du TM6 (figure 4) et le bris d'un verrou ionique entre le TM6 et le TM3 (figure 5) (résumé par [60]). Ces changements intramoléculaires permettent le déplacement de la partie intracellulaire du TM6 et l'ouverture d'une cavité. C'est dans cette cavité que la queue C-terminale de la transducin (protéine G liant la Rhodopsin) s'introduit [61] pour être activée. Le récepteur agit ainsi comme un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF pour guanine exchange factor) et produit l'échange d'un GDP pour un GTP sur la sous-unité  $\alpha$  [62]. Cette activation de la sous-unité  $\alpha$  permet le relâchement du dimère  $G\beta\gamma$ , les deux parties de la protéine G se retrouvant libre de stimuler leurs voies de signalisation respectives (Figure 6) [63]. Cependant la dissociation de la sous-unité  $G\alpha$  du dimère  $G\beta\gamma$  est de plus en plus contestée au profit d'une nouvelle théorie qui suggère que le récepteur, la protéine G et ses effecteurs formeraient un complexe multimérique ou signalosome [64-67]. Cette nouvelle théorie sera élaborée plus en détail dans la section 1.1.5 Complexes multimériques.

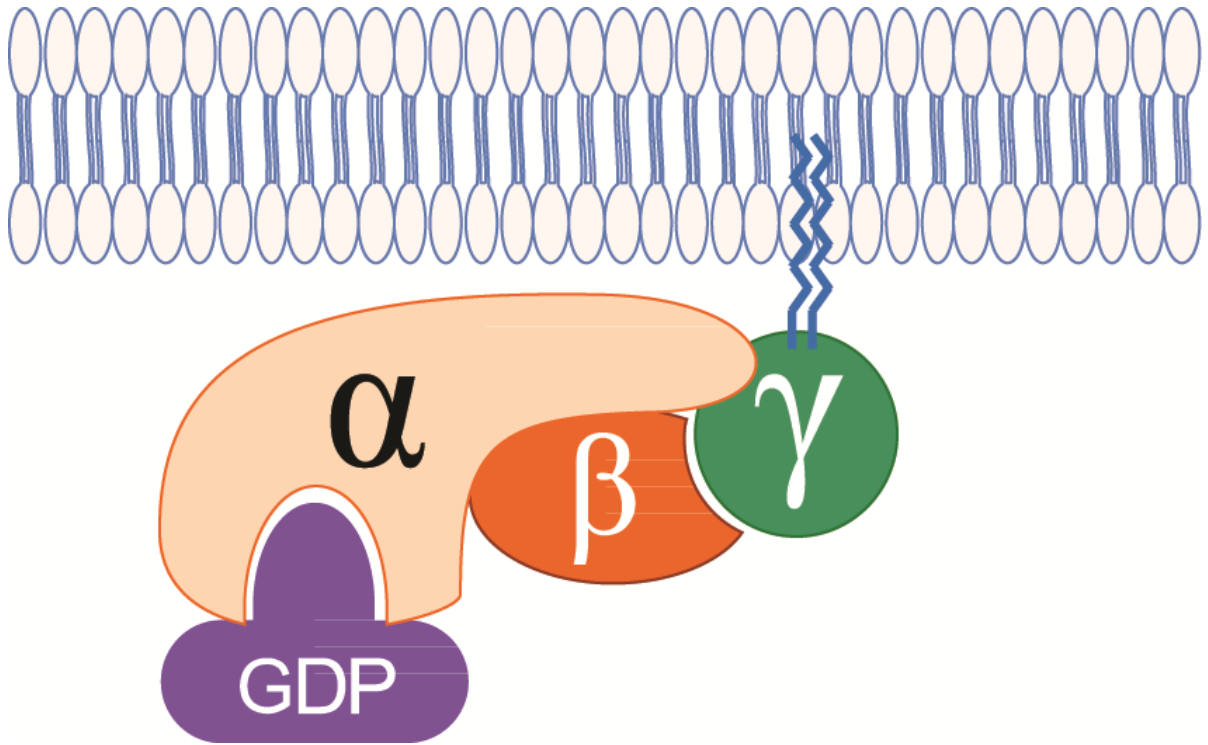


Figure 3 : Représentation schématique d'une protéine G hétérotrimérique ( $G\alpha\beta\gamma$ ) à la membrane plasmique.

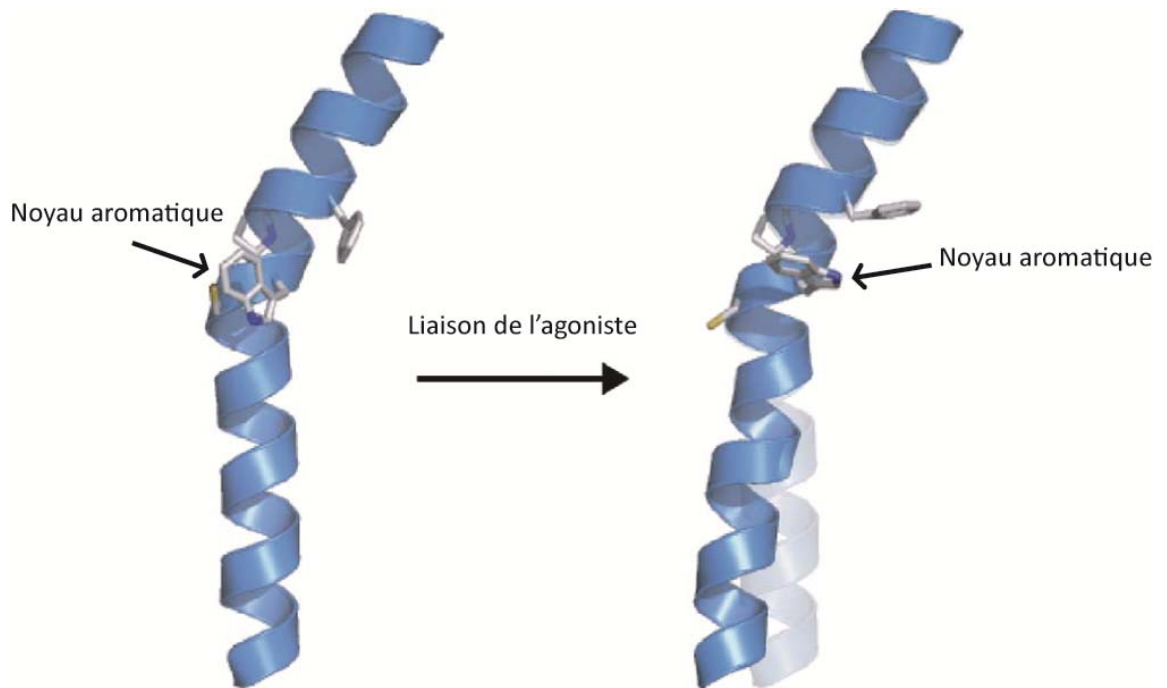


Figure 4 : La liaison de d'un agoniste sur un récepteur de la famille R provoque la rotation d'un noyau aromatique à l'intérieur du TM6 un changement dans l'angle de l'hélice (modifié de [60]).

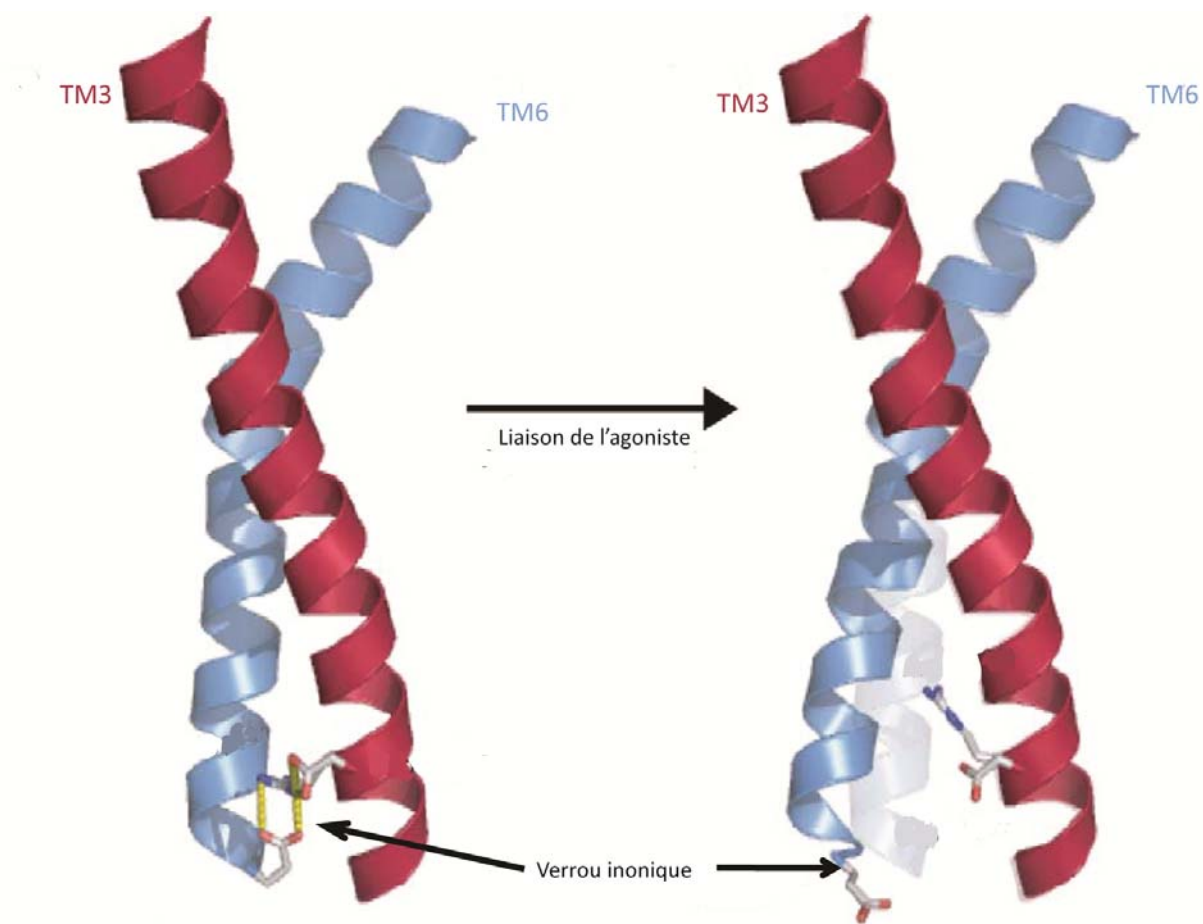


Figure 5 : L'activation du récepteur par un agoniste brise le lien ionique entre le TM3 et le TM6 qui maintient récepteur inactif (modifié de [60]).

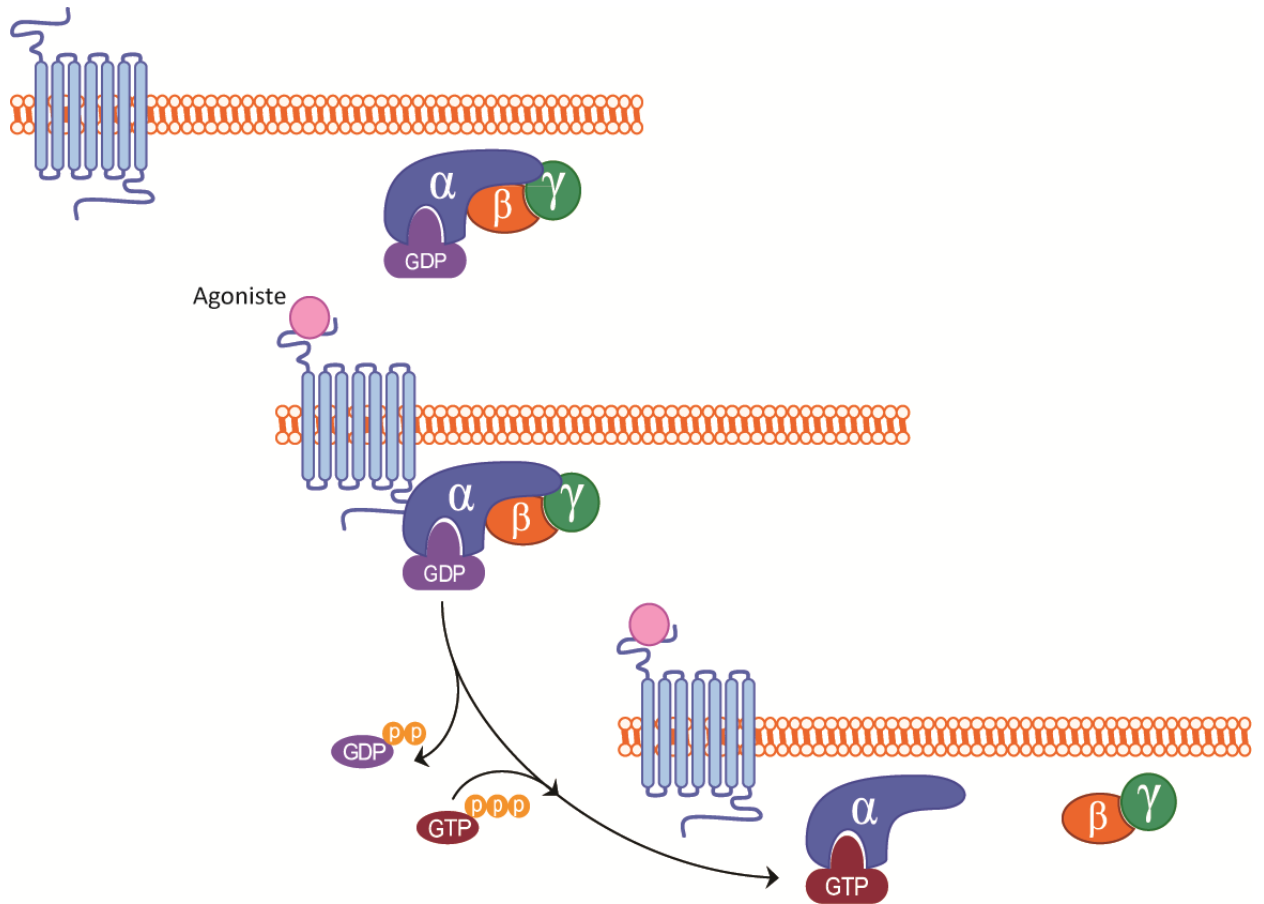


Figure 6 : Activation de la protéine G par un RCPG

Chacune des sous-unités des protéines G présente plusieurs isoformes. Jusqu'à maintenant, il y a en tout 16 sous-unités  $G\alpha$ , 5 sous-unités  $G\beta$  et 12 sous-unités  $G\gamma$  de clonées chez l'humain [68;69]. Les sous-unités  $\alpha$  possèdent deux domaines : un domaine GTPasique impliqué dans la liaison et l'hydrolyse du GTP ainsi qu'un domaine hélicoïdal qui retient le GTP à l'intérieur du noyau de la protéine. Ce dernier domaine est le moins constant chez les différentes familles des sous-unités  $G\alpha$  et il serait impliqué dans la reconnaissance du récepteur et le couplage des effecteurs [70]. La sous-unité  $G\beta$  possède une structure en feuillet  $\beta$  contenant sept répétitions WD-40 et interagit avec la sous-unité  $\gamma$  grâce à un faisceau d'hélices (de l'anglais « Coiled-coil ») [71]. Ce dimère  $G\beta\gamma$  lie une poche hydrophobe présente sur la sous-unité  $G\alpha$  non activée (donc avec un GDP). L'activation de la sous-unité  $G\alpha$  par le GTP fait disparaître la poche hydrophobe et réduit l'affinité de cette dernière pour le dimère  $G\beta\gamma$  [62;72].

Ils existent quatre familles différentes de sous-unité  $\alpha$ , les protéines  $G\alpha_s$ , les protéines  $G\alpha_{i/o}$ , les protéines  $G\alpha_q$  et les protéines  $G\alpha_{12/13}$ , toutes couplées à différents profils d'effecteurs à l'intérieur de la cellule. Sans entrer dans les détails de chaque famille, les protéines  $G\alpha_s$  seraient responsables de l'augmentation de l'activité de l'AC; les protéines  $G\alpha_i$  seraient responsables de l'inhibition de l'AC, la modulation des canaux calciques et la modulation et potassiques à rectification entrante (aussi appelé Kir3 ou GIRK pour G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels); les protéines  $G_q$  seraient responsables de l'activation de la phospholipase C $\beta$ ; et les protéines  $G_{12/13}$  seraient responsables de l'activation d'une protéine RhoGEF (GEF pour l'anglais « guanine-nucleotide exchange factor ») [20]. De plus, il existe des différences dans les profils d'activation des effecteurs à l'intérieur même de chaque famille. Pour une liste plus exhaustive des différents effecteurs couplés aux protéines  $G\alpha$ , voir [20].

Le cas des dimères  $G\beta\gamma$  est un peu plus complexe. Ils furent longtemps considérés comme ayant un rôle mineur dans la signalisation cellulaire, c'est-à-dire qu'ils ne devaient servir qu'à maintenir inactif la  $G\alpha$  et à augmenter l'affinité de cette dernière pour le récepteur [73]. Maintenant, il est reconnu que le dimère  $G\beta\gamma$  interagit et active une très grande quantité d'effecteurs incluant les canaux potassiques [74], calciques [75] ainsi que des AC [76], des phospholipases C (PLC) [77], la  $PI_3$  kinase (phosphoinositide 3-kinase) [78] et des composantes de la cascade des MAPK [67;79].

En général, la majorité des 5 différentes sous-unités  $G\beta$  peuvent dimériser avec les 12 différentes sous-unités  $G\gamma$  bien que quelques exceptions ont été observées. Par exemple,  $G\beta_2$  dimérise avec  $G\gamma_2$  mais pas avec  $G\gamma_1$  *in vitro* et  $G\beta_3$  ne dimérise pas avec  $G\gamma_1$  et  $G\gamma_2$  [80;81]. Ces différentes permutations entre sous unités ne sont pas vaines, elles ont une fonction très importante, car elles déterminent le type d'effecteurs couplés et l'efficacité de leur activation. Pour une liste des différents effecteurs des  $G\beta\gamma$ , voir [20;82].

### 1.1.3 Signalisation des RCPG et de leurs effecteurs

Pendant des années nous avons eu une vision linéaire de la transduction du signal des RCPG. Cette vision se limitait à la liaison d'un agoniste sur le récepteur produisant

l'activation du récepteur et des protéines G, qui à leur tour permettait l'activation de l'AC (pour les protéines  $G\alpha_s$ ), son inhibition (pour les protéines  $G\alpha_{i/o}$ ) ou l'activation des phospholipases (pour les protéines  $G\alpha_q$ ). L'amélioration des techniques de biologie moléculaire et de notre compréhension de la biologie cellulaire nous a toutefois permis d'ajouter plusieurs dimensions à cette vision linéaire. Un exemple de ses nouvelles découvertes est la capacité de certains RCPG de lier plusieurs types de protéines G, dont certaines ont des effets opposés (ex. le  $\beta_2$ AR peuvent se coupler aux protéines  $G\alpha_s$  ou  $G\alpha_i$  [83;84]). La possibilité que la protéine  $G\alpha$  puisse réguler d'autres effecteurs tels la PLC et les canaux potassiques s'est aussi ajoutée à la complexité de la signalisation des RCPG [20;85]. De plus, de nouveaux rôles de  $G\beta\gamma$  dans la signalisation des RCPG furent découverts, ce dimère aurait la capacité de moduler certains effecteurs tels les canaux potassiques, des AC et des PLC [76;86-88]. Finalement, des voies de signalisation indépendante des protéines G ont été démasquées, brisant ainsi le monopole que possédait la protéine G sur la transduction du signal. En l'espace de deux décennies, la science est passée d'une vision linéaire de la signalisation intracellulaire à une vision multidimensionnelle impliquant un réseau de cascade de signalisation complexe et finement régulé.

Les effecteurs des RCPG sont donc la troisième étape de la transmission des stimuli extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. Ces effecteurs, qui peuvent être des enzymes (ex. : AC, GC, phospholipases, phosphodiesterases), des canaux ioniques (ex. : canaux calciques et Kir3) ou des transporteurs (ex. : NHERF), stimulent ou inhibent la production de différents seconds messagers responsable de la réponse cellulaire. Ces seconds messagers peuvent être les ions  $Ca^{2+}$ , l'AMPc, le GMPc, l'inositol triphosphate (IP3), le diacyl glycérol (DAG) et l'acide arachidonique. Le but de cette thèse n'étant pas d'élaborer une liste exhaustive des différents effecteurs et voies de signalisations des RCPG (voir revues de littérature [20;70]), l'accent sera mis sur les effecteurs des principales cascades de signalisations des RCPG dépendantes des protéines  $G\alpha_i$  (adénylate cyclase, canaux calciques et canaux potassiques), sur les voies de signalisation indépendante des protéines  $G\alpha_i$  et finalement, un exemple d'intégration de la signalisation sera élaboré avec l'aide de la cascade de signalisation MAPK ERK1/2.

### 1.1.3.1 Voie de l'adénylate cyclase et de l'AMPc

C'est en 1957 que fut découverte pour la première fois l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) par l'équipe d'Earl Sutherland lors d'études sur la régulation hormonale du métabolisme des tissus cardiaques et hépatiques. Croyant premièrement être en présence d'une phosphatase du foie activé en présence de glucagon, de  $Mg^{2+}$  et d'ATP [89], il identifia par la suite l'enzyme comme étant le mononucléotide adenosine-3', 5'-acide phosphorique ou 3,5-AMP [90]. C'est ainsi qu'est né le concept de second messenger et sa capacité à influencer le métabolisme cellulaire, la forme des cellules et la transcription des gènes. Depuis, il a été établi que l'AMPc est présente et module l'activité physiologique de toutes les espèces vivantes. Chez les mammifères, l'AMPc régule l'activité des protéines kinases A (PKA), des protéines EPAC (Protéines d'échange activées par l'AMPc) ainsi que les canaux ioniques modulés par les nucléotides et non sélectif aux cations (CNG pour « cyclic nucleotide gated channel » et HCN pour « hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channel ») [91].

Les protéines G régulent la quantité d'AMPc produite dans les cellules par leur action sur différents types d'enzymes nommés AC. Ces enzymes catalysent la formation du second messenger AMPc à partir de l'adénosine triphosphate (ATP). Il existe six grandes classes d'AC, mais seulement la classe III est présente chez les mammifères. Chez ces derniers, la classe III est composée de neuf gènes codant pour des sous-classes d'AC transmembranaires et un gène codant pour une sous-classe d'AC soluble. Cette dernière, sensible au bicarbonate et au calcium, mais insensible aux protéines G, est probablement la plus ancienne au sein des mammifères, car sa séquence est plus rapprochée des cyanobactéries et des myxobactéries que des autres cyclases de mammifère [92].

Les AC transmembranaires présentes chez les mammifères possèdent une région N-terminale variable, suivie de six hélices transmembranaires (TM1), un premier domaine catalytique (C1), un deuxième domaine à six hélices transmembranaires (TM2) et un deuxième domaine catalytique (C2) [93]. Malgré leurs sensibilités divergentes aux différentes molécules ou protéines régulatrices, les AC de classe III possèdent un domaine

catalytique relativement bien conservé. Des études biochimiques et leurs structures cristallines ont permis de déterminer que la dimérisation des AC et de leur domaine catalytique est primordiale pour leur activité [94]. Chez les mammifères, les AC s'hétérodimérisent pour former les deux sites catalytiques, C1 et C2. Cependant, une étude de cristallographie a démontré que lorsque l'AC est activé par  $G\alpha_s$ , seulement le domaine C1 peut être actif, le domaine C2 ayant évolué pour lier des petites molécules régulatrices comme le forskolin [95]. L'isoforme AC IX ainsi que l'AC soluble sont toutefois insensibles au forskolin [96;97]

L'activité des AC chez les mammifères est régulée en majorité par les protéines G. Les protéines  $G\alpha_s$  activent tous les types d'AC, les  $G\alpha_i$  inhibent les types I, V et VI ; la  $G\alpha_o$  inhibe le type I ; les dimères  $G\beta\gamma$  activent les types II, IV, VII, mais inactive le type I [98]. D'autres protéines, qui ne sont pas nécessairement reliées à l'activation des protéines G, peuvent réguler l'activité des AC : les protéines kinases C peuvent activer les types II, V et VII ; la calmoduline peut activer les types I, III et VIII ; comme mentionné dans le paragraphe précédent, le forskolin active tous les types sauf IX ; le  $Ca^{2+}$  inhibe les types V et VI [94]. Une autre protéine a été ajoutée récemment aux protéines régulatrices des AC, la protéine régulatrice de la signalisation des protéines G RGS2, qui se lie directement sur le domaine C1 pour l'inhiber [99]. Finalement, la protéine kinase A, qui est activée par l'AMPC, peut aussi inhiber les types V et VI par phosphorylation complétant ainsi une boucle de rétro-inhibition [94].

Les niveaux d'AMPC sont aussi régulés par l'action des enzymes phosphodiésterases (PDE) qui en assure la dégradation. Chez les mammifères, ce sont les familles PDE1, 2, 3, 4, 7 et 8 qui hydrolyse l'AMPC en AMP [100]. Elles interagissent avec des protéines d'échafaudage pour réguler de façon locale la quantité d'AMPC produite. Une liste détaillée de ces différentes protéines et de leur région ciblée peut être consultée [100]. Une des protéines les plus connues pour recruter les PDE est la protéine d'ancrage AKAP (Anchoring Kinase A Protein) qui permet la formation d'un complexe localisé PKA-AKAP-PDE [101]. Ce complexe régule de façon locale les flux d'AMPC. La protéine d'échafaudage  $\beta$ -arrestine ( $\beta$ arr) peut aussi former un complexe avec PDE4 pour réguler l'AMPC [102].



L'AMPc possède différentes cibles et la plus connue est la protéine kinase A (PKA). Cette holoenzyme est composée de deux sous-unités catalytiques (C) actives liant de façon non covalente un dimère de sous-unités régulatrices (R). L'AMPc lie deux sites sur chacune des sous-unités R pour produire un changement de conformation permettant la dissociation des sous-unités C et leur activation [103]. Bien que certaines PKA soient solubles dans le cytoplasme, la majorité des PKA sont localisées dans des compartiments cellulaires à l'aide de protéine AKAP [101]. Les PKA régulent plusieurs fonctions cellulaires, allant de la contraction cardiaque, la régulation du cycle cellulaire, la polarisation des cellules épithéliales, la désensibilisation hétérologue des RCPG et même l'expression de certain gène par l'activation du facteur de transcription CREB [100].

L'AMPc peut aussi se lier sur les protéines EPAC (protéines d'échange activées par l'AMPc). Les deux isoformes de l'EPAC (EPAC1 et EPAC2) sont des GEF (guanine nucleotide exchange factor) pour des petites protéines G appelées Rap [104]. Elles sont présentes, à différents niveaux d'expression, dans la majorité des tissus : EPAC1 est abondant dans les vaisseaux sanguins, dans les reins, les tissus adipeux, le système nerveux central, les ovaires et l'utérus tandis que l'EPAC2 est exprimé principalement dans le système nerveux central, les glandes surrénales, et le pancréas [105]. La régulation spatiale des protéines EPAC est aussi contrôlée par différents mécanismes d'ancrage afin de distinguer leurs différentes fonctions cellulaires. Ces mécanismes permettent aussi de discriminer entre EPAC1 et EPAC2 [105]. Par exemple, en réponse au changement de conformation induit par l'AMPc, l'EPAC1 est envoyé à la membrane plasmique via son domaine DEP (de l'anglais dishevelled, Egl-10, and pleckstrin). Cette translocation est essentielle pour l'activation de Rap et pour une adhésion cellulaire efficace et dépendante de l'intégrine [106]. Tandis qu'EPAC2 se lie à la protéine Ras via son domaine RA indépendamment de son état d'activation (pour Ras association) pour être redirigé vers la membrane. Après sa liaison avec l'AMPc, EPAC2 activera un bassin spécifique de Rap1 [107;108]. Jusqu'à maintenant, les protéines EPAC se sont avérées importantes dans plusieurs fonctions cellulaires au niveau des tissus cardiaques, vasculaires, neuronaux, rénaux, ainsi que dans certains processus inflammatoires et dans la sécrétion de l'insuline (voir Gloerich et Bos, 2010 pour une revue détaillée).

Les canaux CNG sont aussi une cible importante de l'AMPC. Ils contribuent au contrôle du potentiel d'action des membranes ainsi qu'au niveau de calcium intracellulaire. Ils sont présents dans les reins, les testicules, le cœur et le système nerveux central [100]. Les CNG ont premièrement été identifiés comme étant un récepteur pour les nucléotides GMPc. Toutefois, des études ont démontré que l'AMPC pouvait aussi les activer dans le système olfactif [109] et dans le sperme [110]. Les CNG sont des canaux à multiples sous-unités et ils possèdent des similarités de structures avec les canaux  $K^+$  voltage dépendants [111]. Les nucléotides se lient de façon allostérique sur les canaux jusqu'à un maximum de quatre pour une activation maximale [112].

### **1.1.3.2 Les canaux calciques dépendant du voltage ( $Ca_v$ )**

L'influx calcique produit par les  $Ca_v$  médie un grand éventail de réponse cytoplasmique incluant la sécrétion d'enzyme, la relâche de neurotransmetteur, l'activation de kinases dépendantes du calcium et la contraction du muscle cardiaque [113-116]. Ces canaux sont une cible pharmacologique importante, car leur mauvais fonctionnement serait relié à plusieurs troubles neurologiques [117]. Ils sont aussi ciblés pour le traitement de maladie chronique comme l'hypertension et l'arythmie cardiaque [118] ainsi que pour certaines maladies génétiques comme les migraines familiales [119], l'ataxie [120], l'autisme et le syndrome Timothy [121].

Il existe en tout 6 types de  $Ca_v$  classés selon leur profil électrophysiologique et pharmacologique : T, N, L, Q, P et R. Le type T, aussi appelé LVA pour « low-voltage activated », est activé par un faible potentiel d'action et s'inactive rapidement suivant son ouverture. Ils sont responsables de la régulation de l'excitation cellulaire [122]. Inversement, les autres types de canaux calciques sont activés par un fort potentiel d'action et sont appelés HVA (de l'anglais « high-voltage activated »). Ils se distinguent par leur réponse aux agonistes et antagonistes dihydropyridine ainsi qu'à certains inhibiteurs peptidiques provenant de venin animal [123].

Les canaux calciques HVA sont des protéines hétéromultimériques composées de plusieurs sous-unités ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ - $\delta$  et  $\beta$ ) tandis que les LVA sont composés uniquement de

sous-unités  $\alpha_1$  (figure 7) [122]. La sous-unité  $\alpha_1$  consiste en 4 domaines homologues (I à IV) liés par des régions cytoplasmiques, chacune composée de 6 hélices membranaires (S1 à S6). C'est cette région cytoplasmique du canal calcique qui sert de site d'interaction pour les protéines régulatrices et la régulation des seconds messagers du type kinase et phosphatases [124]. La majorité des propriétés fonctionnelles et le sous-type du canal sont déterminés par la sous-unité  $\alpha_1$  tandis que les autres sous-unités modulent les propriétés de  $\alpha_1$  [122]. Il est possible de séparer les canaux calciques dépendant du voltage en 3 grandes familles : Cav1, Cav2 et Cav3. Les Cav3 (Cav3.1 à 3.3) sont composés des canaux de type T, les Cav2 (Cav2.1 à 2.3) sont composés des types N, P/Q et R tandis que les Cav1 (Cav1.1 à 1.4) représentent les canaux de type L [122].

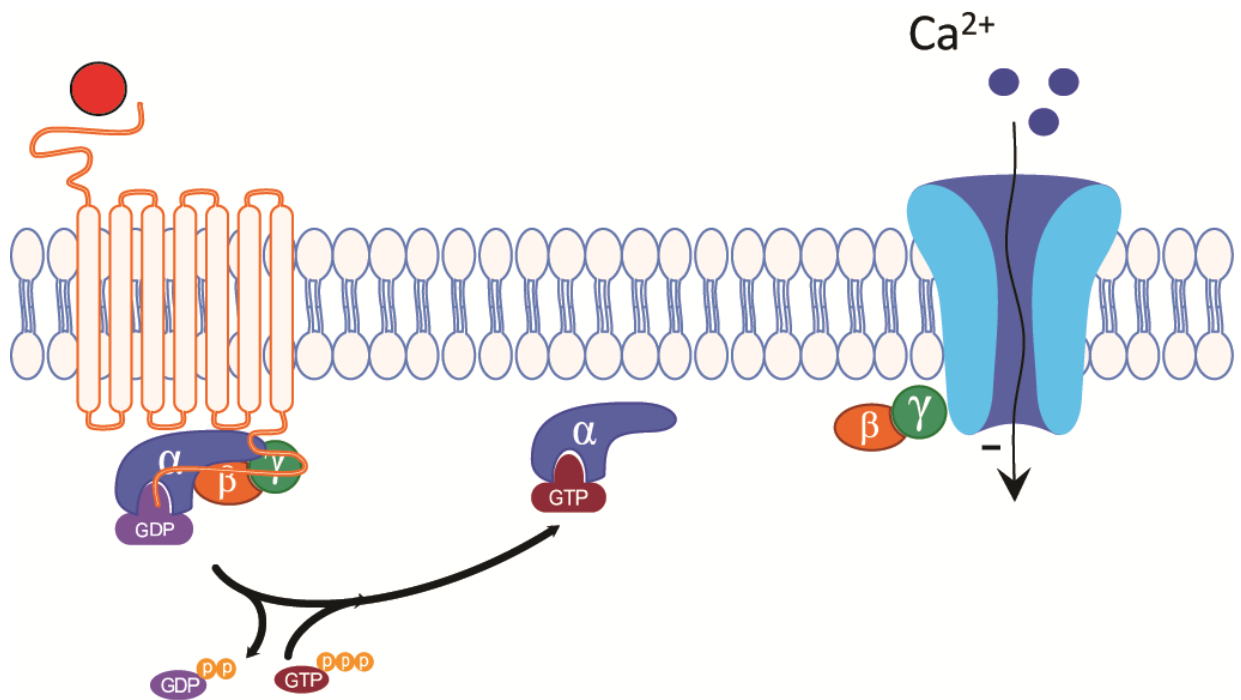


Figure 7 : Régulation d'un Cav2 par les G $\beta\gamma$  lors de l'activation d'un RCPG

L'activité des canaux calciques dépendant du voltage peut être régulée par l'activité de certains RCPG de plusieurs façons. Bien que cette régulation est plus souvent indirectement transmise par l'intermédiaire des kinases PKA, PKC ou Src, les protéines G peuvent également réguler de façon négative l'activité de ses canaux [122;124;125]. Par exemple, l'activité des canaux de type L est augmentée après l'activation des  $\beta$ AR via une phosphorylation dépendante de la PKA [126] tandis que les canaux de type P/Q et N sont

inhibé par le dimère  $G\beta\gamma$  [127]. L'emphase sera mise sur cette dernière famille, les Cav2, impliquée entre autres dans le processus de régulation de la neurotransmission dans le système nerveux central [128;129]

La famille des Cav2 peut donc être inhibée par l'interaction directe du dimère  $G\beta\gamma$  et de la sous-unité  $\alpha_1$ , constituant le pore principal du canal [75;130]. Cette liaison augmente le seuil d'activation du canal permettant à celui-ci d'être moins sensible aux modifications du potentiel d'action membranaire [131]. Les deux sous-unités du dimère semblent avoir des fonctions différentes. Alors que la  $G\beta$  semble primordiale pour inhiber le canal (une expression exogène de  $G\beta$  suffit à inhiber le canal),  $G\gamma$  semble plus impliquée dans la localisation du dimère à proximité du canal. De plus, la nature des sous-unités impliquées semble aussi jouer un rôle :  $G\beta_1$  et  $G\beta_2$  sont plus efficaces que les autres sous-unités  $G\beta$  à inhiber les canaux calciques [131] tandis que  $G\gamma_2$  est plus efficace que  $G\gamma_1$  pour localiser le dimère près du canal [132].

Initialement, le site de liaison des  $G\beta\gamma$  a été circonscrit au niveau de la boucle connectant les domaines I et II de la sous-unité  $\alpha_1$  du canal [133-136]. Cette région contient une séquence QXXER retrouvée aussi chez les AC et les GIRK [137] et constitue également la cible d'autres régulateurs important de l'activité des Cav2. Par exemple, en plus d'être la cible de  $G\beta$ , la PKC peut phosphoryler ce site pour favoriser l'ouverture du pore [136]. D'autres domaines de la sous-unité  $\alpha_1$  semblent aussi être impliqués dans son interaction avec  $G\beta\gamma$ , notamment ses régions N et C terminaux cytosoliques [124] démontrant ainsi que le modèle d'action de  $G\beta\gamma$  est plus complexe qu'il ne le paraît.

Cette complexité est démontrée par le clivage de la syntaxin 1 (STX1) par la toxine botulique qui prévient la régulation des canaux de type N par  $G\beta\gamma$  [124]. Lors de l'exocytose des neurotransmetteurs, la STX1 va s'associer à deux autres protéines, SNAP-25 et VAMP, par l'intermédiaire de faisceau d'hélices dans le but de se rapprocher la membrane vésiculaire, contenant les neurotransmetteurs, de la membrane plasmique. Ceci permet la fusion membranaire et la libération des neurotransmetteurs. Cette exocytose est étroitement dépendante de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et l'ancrage des vésicules à proximité des Cav (porte d'entrée des ions calcique dans la cellule) permettrait une conjugaison efficace de l'augmentation de la concentration

calcique au site de libération des neurotransmetteurs. Les protéines STX1A et SNAP25 sont aussi impliquées dans la régulation du canal en modulant son transport et sa localisation et peuvent inhiber l'activation de celui-ci en interagissant directement avec  $G\beta\gamma$  [132;135;138-141]. L'interaction des protéines de fusion avec  $G\beta\gamma$  pourrait également réguler le phénomène d'exocytose en aval de l'entrée de  $Ca^{2+}$  [132;138].

L'activité des Cav peut aussi être modulée par certains RCPG. Par exemple, l'adénosine peut réduire l'entrée de  $Ca^{2+}$  par l'inhibition des canaux de types P/Q [142] et le récepteur  $GABA_B$  peut inhiber les canaux de type N dans des neurones ganglionnaires de la racine dorsale de poulet. Ce dernier formerait un complexe de signalisation avec le canal qui, lors de l'activation de  $GABA_B$ , permettrait la translocation du canal vers des endosomes en plus de son inhibition [143]. Les récepteurs OLR1 (pour opioid like receptor 1), qui forment également un complexe de signalisation avec les Cav2, peuvent aussi réguler l'activité des canaux de type N d'une façon agoniste indépendante (par ses mécanismes de contrôle de densité) [144] ou agoniste dépendante (par l'internalisation du complexe OLR1/Cav2) [145]. Finalement, il est reconnu que l'activation du récepteur  $\mu$  opiacé (MOR) par des agonistes produit une inhibition des canaux calciques au niveau des neurones nociceptifs, ayant comme effet une diminution de la douleur [146;147].

### **1.1.3.3 Les canaux potassiques à rectification entrante activée par les protéines G (GIRK ou Kir3)**

Les canaux Kir3 font partie de la famille des canaux potassiques à rectification entrante (Kir1 à Kir7). Ces canaux ont pour rôle physiologique de maintenir le potentiel de repos membranaire et l'excitabilité des cellules neurales, cardiaques et endocrines.

Les mammifères expriment 4 canaux Kir3 : Kir3.1, Kir3.2, Kir 3.3 et Kir 3.4. Ils ne sont toutefois pas distribués également. Les canaux Kir3.1 à 3.3 sont distribués un peu partout dans le cerveau tandis que l'expression de Kir3.4 y est faible [148]. Ce dernier n'apporte pas une contribution significative à la signalisation des Kir3 dans le cerveau. Il existe 3 épissages alternatifs du gène de Kir3.2 dans le cerveau (a, b et c) et ils diffèrent par la longueur de leur domaine C-terminal : Kir3.2c contient un motif de liaison PDZ qui est

absent chez Kir3.2a et Kir3.2b [149-152]. Il existe aussi des variantes d'épissages pour Kir3.1 dans le cerveau, mais ces variantes n'ont pas encore été étudiées dans leurs détails [153]. Aucune variante d'épissage n'a été observée pour les deux autres Kir3 [154].

Les canaux sont formés de 4 sous-unités Kir3 dans des systèmes d'expression hétérologues et dans des tissus endogènes (figure 8) [155-160]. Les deux sous-unités Kir3.1 et Kir3.3 sont incapables de former un canal homotétramérique fonctionnel à la surface de la membrane, ils doivent impérativement former un canal tétramérique avec d'autres sous-unités Kir3 [158;161;162]. Des quatre sous-unités distinctes, seule la sous-unité Kir3.2 est capable de former un homotétramère fonctionnel [149;159;160], ce qui ne l'empêche pas de former un canal hétérotétramérique avec les autres.

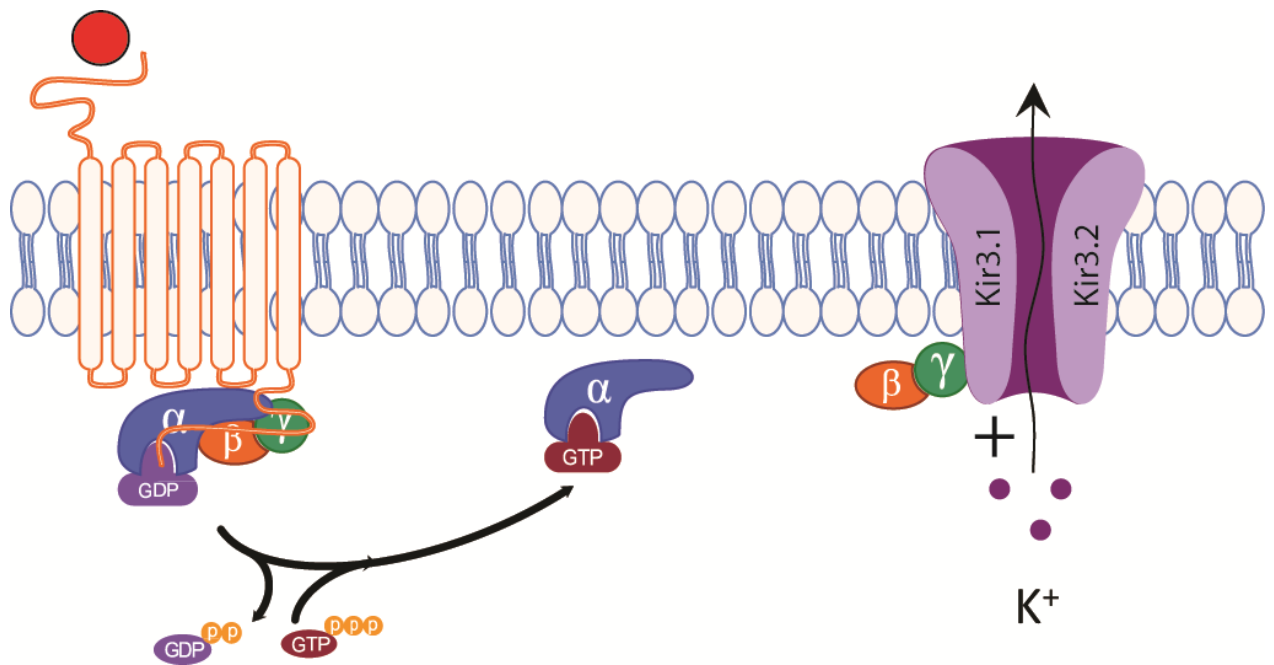


Figure 8 : Régulation d'un Kir3 par les Gβγ lors de l'activation d'un RCPG

Des études biochimiques et de génétique moléculaire ont démontré que la forme prédominante des canaux Kir3 dans le cerveau est l'hétérotétramère Kir3.1-Kir3.2 [156]. Jusqu'à maintenant, les tétramères observés sont toujours composés de 2 homodimères dans les systèmes hétérologues [154]. Dans le but de démontrer l'importance des différentes sous-unités de Kir3, leurs gènes ont été supprimés un à un dans des souris. Les résultats furent intéressants, car ils démontrèrent que Kir3.2 est primordial dans la genèse d'un courant Kir3 dans les neurones ; les souris qui ont subi une délétion du gène de Kir3.2

ne démontrant que très peu ou pas de courant Kir3 dans de nombreuses régions du cerveau incluant l'hippocampe, le cervelet, la substance noire, le locus coeruleus et l'aire tegmentaire ventrale (VTA) [163-169]. Tandis que les souris KO pour le gène Kir3.3 ne sont pas différentes des souris WT dans des tests comportementaux du type activité moteur en champs ouverts et lors de test de coordination motrice [170] et possèdent une activation par les agonistes semblables au WT. Toutefois, ces souris démontrent une diminution de l'autoadministration de cocaïne [171] et une diminution du syndrome de manque provenant de la prise de sédatif [172]. Ceci suggère que Kir3.3 aurait un rôle à jouer dans la régulation de la signalisation Kir3 dans le cerveau.

Un grand nombre de séquences d'acides aminés contrôlant le trafic intracellulaire des canaux Kir3 ont été identifiées. Kir3.2 contient un signal d'exportation du réticulum endoplasmique (RE) ainsi qu'un motif d'internalisation VL (Val-Leu) [173], permettant à cette sous-unité de former des homotétramères ou des hétérotétramères. Kir3.1 ne possède pas le signal d'exportation du RE [161;173], il doit donc former un canal avec d'autres sous-unités afin de se rendre à la membrane. Même si la sous-unité Kir3.3 ne peut former un homotétramère, elle peut s'assembler avec Kir3.1 ou Kir3.2 pour former un hétérotétramère fonctionnel [149;157;160;162]. De plus, cette sous-unité possède une séquence ciblant les lysosomes (Tyr-Trp-Ser-Ile ou YWSI) qui promeut la dégradation des canaux Kir3 [173]. Les sous-unités Kir3.2c et Kir3.3 possèdent aussi une séquence de liaison PDZ qui peut interagir directement avec certaines protéines de transport comme la sorting nexin 27 (SNX27) [174]. L'association de la SNX27 avec un canal contenant Kir3.3 mène à une réduction de la signalisation Kir3 à la membrane plasmique, probablement en favorisant l'internalisation du canal [174]. Il n'est pas encore clair si Kir3.2c et Kir3.3 interagissent avec les protéines de transport à domaine PDZ classique comme PSD4 (postsynaptic density protein 95) dans les neurones [151;175].

Jusqu'à présent, seulement les structures des domaines cytoplasmiques de Kir3.1, de Kir3.2 et de Kir2.1 (insensible aux protéines G) ont été élucidées [176-178]. La comparaison de ses structures met en évidence une structure secondaire conservée pour les canaux Kir. Cette structure consiste en 14 feuillets  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$ . De plus, ces domaines cristallisés obtenus en haute résolution ont révélé une nouvelle structure

importante dans l'ouverture du canal, la boucle G formée par le feuillet  $\beta$ H- $\beta$ I [177;179;180]. Ils ont aussi permis d'identifier plusieurs acides aminés impliqués dans la régulation du canal et la liaison du  $K^+$  [176;177;181-183]. Un canal chimérique contenant le domaine transmembranaire et le pore d'un Kir bactérien et le domaine N-terminal et C-terminal cytoplasmique d'un canal Kir3.1 de mammifère a aussi été cristallisé sous deux conformations différentes [184], révélant ainsi la position relative des composantes importantes du canal : le pore, la boucle G, la porte M2 et les sites d'interactions cytoplasmiques. Ces deux conformations, différentes au niveau de la position de la boucle G, ont été décrites comme étant l'état ouvert ou fermé du canal [184], bien que d'autres études seraient nécessaires pour démontrer ce fait. Pour l'instant, il semble que l'ouverture du canal implique l'hélice du N-terminal, les sites de liaisons pour le  $K^+$  et les polyamines [182-185] et le mouvement de la porte M2 et de la boucle G [177;181;184;186].

Les canaux Kir3 sont majoritairement fermés à l'état basal [154]. Suite à l'activation des protéines  $G_{i/o}$  par des RCPG, le dimère des sous-unités  $G\beta\gamma$  lie directement les Kir3 pour activer le canal [187-191]. Certaines séquences du canal ont été identifiées comme site de liaison, notamment un résidu Leu (Kir3.1-L333, Kir3.2-L344, Kir3.4-L339) situé dans le domaine C-terminal (feuillet  $\beta$ L- $\beta$ M) aurait un rôle crucial dans l'activation dépendante de  $G\beta\gamma$  [192-194]. Un domaine de liaison pour la sous-unité  $G\alpha$  a aussi été identifié au niveau du N et du C terminal des canaux GIRK [195-198]. Ce dernier site de liaison serait impliqué dans la régulation de l'ouverture du canal en empêchant le dimère  $G\beta\gamma$  de le lier [197-200].

Les canaux Kir3 ont plusieurs rôles physiologiques. L'activité basale des Kir3 contribue au potentiel de repos des neurones en augmentant la polarité de la membrane plasmique de 8V [162]. Cette hyperpolarisation du potentiel de repos membranaire contribue à la diminution de l'excitabilité électrique. De plus, l'activation des canaux Kir3 par des RCPG peut apporter trois autres niveaux d'inhibition de l'activité des neurones, produisant ainsi trois différents changements dans la signalisation.

L'auto-inhibition neuronale est un de ces niveaux. Elle se produit lors de l'activation de certains neurones. Ces neurones activés relâchent des neurotransmetteurs qui activent



les RCPG couplés aux protéines  $G_{i/o}$ , provoquant ainsi l'ouverture du canal, une hyperpolarisation de la membrane plasmique et finalement l'auto-inhibition du neurone. Par exemple, une suite de potentiel d'action produit par des interneurons du cortex provoque la relâche d'endocannabinoïde par les dendrites, l'activation des récepteurs cannabinoïde de type 1 et finalement l'activation des Kir3 [201]. Cette modulation des interneurons du cortex pourrait mener à des changements à long terme altérant la transmission glutamatergiques dans les neurones pyramidaux du cortex [154]. Les neurones dopaminergiques peuvent aussi montrer une forme d'auto-inhibition par les canaux Kir3. La relâche de dopamine active le récepteur  $D_2$  couplé au Kir3, menant à la diminution de l'activation neuronale [202].

L'activation postsynaptique des récepteurs  $GABA_B$  [203], des récepteurs dopaminergiques  $D_2$  [204] et des récepteurs métabotropiques aux glutamates de type 2 (mGLURII) [205] peut aussi mener à une inhibition des neurones adjacents aux neurones activés. Finalement, un dernier niveau implique une inhibition de l'activité synaptique à grande échelle. Par exemple, la somatostatine, agissant au travers du récepteur à la somatostatine 5, peut altérer le patron d'oscillation du réseau thalamique au travers d'une activation postsynaptique et d'une inhibition présynaptique des Kir3 [206].

Les Kir3 participent à la signalisation de plusieurs RCPG, y compris les opiacés. Des chercheurs ont démontré, à l'aide de souris KO pour le gène codant pour Kir3.2 et le gène codant pour Kir3.3, que l'effet inhibiteur de l'opiacé [Met](5)enképhalin dans les neurones du locus ceruleus est médié principalement par l'hétérodimère Kir3.1/3.2 [166]. Cette signalisation pourrait même être responsable du syndrome de manque observé lors d'un arrêt brusque d'un traitement chronique à la morphine des récepteurs opiacés par la morphine [167].

#### **1.1.3.4 Signalisation indépendante des protéines G**

Il a longtemps été cru que les protéines G fussent responsables de la totalité de la transduction du signal des RCPG. Toutefois, quelques exemples de signalisation indépendante des protéines G ont été découverts ces dernières années. Ces « nouvelles » signalisations dépendantes de la liaison des RCPG par des ligands sont produites par des

protéines pouvant lier de façon constitutive les récepteurs ou par des protéines recrutées lors de l'activation du RCPG. Il en existe plusieurs, dépendant des récepteurs étudiés. Cette thèse s'attardera plus spécifiquement aux signalisations produites par des protéines pouvant lier les récepteurs opiacés : les arrestines (plus spécifiquement les  $\beta$ arr), les protéines NHERF et la tyrosine kinase Src.

La famille des arrestines est composée de 4 membres séparés en deux groupes : les arrestines visuelles (arrestines 1 et 4) et les arrestines non visuelles (arrestines 2 et 3 aussi appelées  $\beta$ arr1 et  $\beta$ arr2). Alors que les premières sont exclusivement exprimées dans la rétine [207], les  $\beta$ arr sont exprimées dans la majorité des tissus et sont associées à la régulation négative de la signalisation de beaucoup de RCPG [208]. En fait, les  $\beta$ arr furent initialement identifiées comme étant les molécules qui permettent le découplage fonctionnel des protéines G du récepteur, bloquant ainsi la signalisation de celui-ci et permettant son internalisation. Toutefois, de nouveaux rôles pour les  $\beta$ arr dans la signalisation des RCPG ont été découverts ces dernières années [209;210]. Il est maintenant reconnu que ces protéines peuvent aussi servir de molécule d'échafaudages et adaptatrices dans la transduction du signal des RCPG. Une étude d'analyse protéomique parue en 2007 aurait même identifié jusqu'à 337 protéines différentes qui interagissent avec les  $\beta$ arr et 25,1% d'entre elles auraient une fonction au niveau de la transduction de la signalisation [211]. Par leur capacité à interagir avec une multitude de protéines, de pouvoir voyager du cytoplasme aux noyaux et de pouvoir réguler l'activation et la location des MAPK, les  $\beta$ arr sont devenus incontournables dans la signalisation de certains RCPG [212].

Les  $\beta$ arr ne sont toutefois pas les seules molécules capables de produire une signalisation indépendante des protéines G. Les protéines NHERF (de l'anglais «  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factor »), premièrement identifiées comme protéines favorisant la formation de complexes multiprotéiques permet la phosphorylation des échangeurs sodium/hydrogène de type 3 (NHE3) par PKA et leur régulation négative, peuvent aussi interagir avec plusieurs RCPG tels que le  $\beta_2$ AR, le récepteur opiacé kappa (KOR), le récepteur au nucléotide P2Y1 (P2Y1R) et le récepteur à la PTH (PTHrP) pour produire une signalisation indépendante des protéines G [213]. Cette famille de protéines adaptatrices

est caractérisé par la présence de deux domaines d'interaction de type PDZ en N-terminale et d'un domaine qui se lie aux protéines du cytosquelette de type ezrin, radixin, moesin et merlin en C-terminale [213]. Il est maintenant clair qu'en interagissant avec les 10 derniers acides aminés du C-terminale du  $\beta_2$ AR, NHERF permet la stimulation de NHE3 de manière indépendante des protéines G [214]. Un rôle similaire a été découvert pour NHERF envers les récepteurs P2Y1R et  $\kappa$ OR [215;216].

Finalement, il est maintenant reconnu que la tyrosine kinase Src, impliquée dans la prolifération, la survie et l'adhésion cellulaire, peut aussi produire ce type de signalisation indépendante des protéines G. Cette kinase peut s'associer directement avec des régions intracellulaires de RCPG (ou par des protéines interagissant avec le RCPG) possédant un domaine de liaison SH3 (de l'anglais « Src homology domain ») au niveau de leur 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire ou au niveau de leur C-terminale. Par exemple, le  $\beta_2$ AR peut aussi, sous l'effet d'une stimulation à forte concentration d'agoniste, recruter Src par l'intermédiaire de la  $\beta$ arr1 et stimuler les MAPK ERK1/2. Et contrairement au  $\beta_3$ AR, d'une façon indépendante de l'activité de sa protéine G [59]. Posséder un domaine SH3 ne permet toutefois pas nécessairement ce type de signalisation. Le récepteur  $\beta_3$ A possède un domaine SH3 sur sa queue C-terminale et lors de l'activation de ce récepteur, Src est recrutée au récepteur et produit l'activation de la voie des MAPK ERK1/2 [217] mais cette signalisation dépend de l'activation de la protéine G. Le P2Y2R possède ce domaine et recrute Src suite à son activation, mais cette liaison n'est pas impliquée dans la stimulation de la voie ERK1/2 [218].

Les RCPG possèdent donc plusieurs façons de produire une signalisation à l'intérieur de la cellule. Certaines sont dépendantes de l'activité de la protéine G, d'autres indépendantes. Toutefois, ces différentes voies peuvent converger, se croiser, s'inhiber ou même s'amplifier, dépendamment de la signalisation observée. C'est le cas de la signalisation des MAPK qui possède plusieurs voies de signalisation menant à son activation.

### **1.1.3.5 Voie de signalisation des MAPK de type ERK1/2, un exemple de convergence de la signalisation**

Les ERK1/2 ont été identifiées comme des protéines kinases stimulées par les facteurs de croissance qui phosphorylent les protéines associées aux protéines 2 (MAP-2) et les protéines myéline de base (MBP) il y a près de 20 ans. Ces kinases possèdent 83% d'homologie et sont exprimées de façon ubiquitaire chez les mammifères. Elles contrôlent la croissance, la différenciation et la survie des cellules en étant activées par une très grande variété de signaux extracellulaires tels les facteurs de croissance, les sérums, des esters phorbol, des cytokines, des stress cellulaires comme des chocs osmotiques et des RCPG [219-222]. Ces derniers peuvent d'ailleurs moduler les ERK1/2 avec différentes voies de signalisation qui convergent vers l'activation ou l'inhibition de ces kinases. Toutefois, il est maintenant clair que les voies de signalisation des RCPG ne produisent pas toutes la même activation des MAPK ERK1/2. Ces kinases peuvent être régulées de façon à produire différents effets sur les cellules, dépendamment des voies de stimulation empruntées. Pour les besoins de cette thèse, seulement les voies de signalisation des RCPG couplés aux protéines  $G_{i/o}$  seront mentionnées. Pour des renseignements sur les voies des autres protéines G menant aux ERK1/2, Goldsmith et Dhanasekaran ont publié une excellente revue de littérature concernant le sujet [223].

#### **1.1.3.5.1 Régulation des MAPK ERK1/2 par les protéines $G_{i/o}$**

##### **1.1.3.5.1.1 Stimulation par $G\alpha_{i/o}$**

Le premier lien découvert entre les protéines  $G_i$  et l'activation des MAPK fut la caractérisation de la protéine oncogène GIP2 comme étant un mutant actif de la protéine  $G\alpha_2$  dans des cellules tumorales d'ovaire et du cortex de la glande surrénale [224]. Par la suite, des études ciblant les bases moléculaires de cette activité mitogène ont identifié le rôle de  $G\alpha_i$  dans la régulation des MAPK ERK [225;226]. Depuis, de multitude d'études ont démontré les mécanismes impliquant les protéines  $G\alpha_i$  dans la stimulation des ERK1/2.

Cette activation des ERK1/2 implique principalement l'inhibition de deux voies de signalisation, c'est-à-dire l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et l'inhibition de RAP-1 par la protéine RAP-1-GAP. Le mécanisme le mieux caractérisé est celui de l'inhibition de l'AC [227;228]. Il consiste en l'inhibition de l'accumulation de l'AMPc dans la cellule ce qui engendre une diminution de l'activité de PKA. Cette diminution soulage la protéine C-Raf (une MAPKKK) de son inhibition causée par PKA, potentialise son association avec la protéine Ras permettant ainsi l'activation des ERK [229].

Le deuxième mécanisme serait aussi un mécanisme dépendant de Ras, mais indépendant de l'activation de cette dernière [230;231]. Le mécanisme sous-jacent à cette activation n'est cependant pas élucidé complètement. Toutefois, l'observation selon laquelle la protéine  $G\alpha_2$  est capable d'interagir avec la protéine Rap-1-GAP permet de postuler une base moléculaire pour un mécanisme où  $G\alpha_2$  est capable d'activer ERK à travers Ras sans pour autant l'activer [231]. Pour comprendre ce mécanisme, il faut premièrement savoir que Rap-1 fut initialement identifié comme une GTPase de type Ras atténuant la transformation cellulaire dépendante de Ras et agissant ainsi comme un suppresseur de tumeur [232;233]. Par la suite, il fut démontré que son activité antitumorale était produite par sa capacité d'atténuer l'activation de ERK dépendante de EGF et de LPA [234]. Il faut aussi savoir que Rap-1 possède un domaine effecteur homologue à Ras qui permet à Rap-1 de séquestrer C-Raf, empêchant cette dernière d'activer la cascade C-Raf/MEK/ERK [235;236]. Donc pour résumer ce mécanisme, l'activation de la  $G\alpha_2$  facilite le recrutement à la membrane d'une « Rap-1 GTPase activating protein II » (Rap-1-GAPII) qui va inhiber la protéine Rap-1 provoquant ainsi la dissociation du complexe Rap-1/C-Raf. La C-Raf ainsi libérée va s'associer avec Ras et permettre l'activation de la cascade des ERK1/2 [231].

#### **1.1.4.5.1.2 Stimulation par $G\beta\gamma$**

Les protéines Gi peuvent aussi stimuler la cascade des MAPK ERK1/2 par un mécanisme qui implique la dissociation des sous-unités  $G\beta\gamma$  [237;238]. C'est en exprimant la queue C-terminale de la protéine GRK2, domaine interagissant avec les sous-unités  $G\beta\gamma$ , que les

auteurs Crespo et Koch ont démontré l'implication des M2R,  $\alpha_2$ R, D2R, A1R et LPAR dans l'activation des MAPK ERK [237;238]. L'expression de ces protéines permet la séquestration des sous-unités G $\beta\gamma$  diminuant ainsi l'activation des ERK. Il a été aussi démontré que la surexpression des sous-unités G $\beta\gamma$  augmente l'activité basale des ERK dans les cellules COS-7 [239]. Il y a plusieurs mécanismes permettant l'activation des MAPK ERK1/2 par les sous-unités G $\beta\gamma$ , mais quel que soit le mécanisme, la protéine Ras y est toujours impliquée [237-239]. Le mécanisme implique aussi une tyrosine kinase, toutefois l'identité de celle-ci semble être fortement dépendante du contexte cellulaire étudié.

Pour la majorité des mécanismes, l'étape suivante l'activation des protéines G $\beta\gamma$  implique la PLC- $\beta$  et/ou la PI3K, les deux pouvant être activées par le dimère G $\beta\gamma$  [78;88;240;241]. Un modèle élaboré à partir du  $\alpha_2$ AR, exprimé dans des cellules COS-7 et HEK293, propose que le dimère G $\beta\gamma$ , libéré de la sous-unité G $\alpha_i$  après l'activation du récepteur, stimule la PLC- $\beta$  entraînant ainsi une augmentation du calcium intracellulaire et de la calmoduline (CaM). Cette augmentation est suivie par une série de cascade d'activation de kinases et de protéine adaptatrice menant à l'activation de Ras. Dans l'ordre les kinases sont la PyK2, la tyrosine kinase Src, la protéine adaptatrice Shc et la protéine mSOS, une Ras-GEF (GEF = guanine nucleotide exchange factor) [242-245].

D'autres contextes cellulaires ont permis d'observer que les sous-unités G $\beta\gamma$  peuvent stimuler les MAPK ERK1/2 par un mécanisme indépendant des kinases Src et de la protéine adaptatrice Shc. Ce mécanisme, démontré dans des cellules Rat1 et COS-7 avec le récepteur LPA et le récepteur thrombin comme modèle, impliquerait l'activation d'une tyrosine kinase non identifiée par la PI3K. Cette tyrosine kinase favoriserait la formation du complexe dynamin-Grb2, produisant ainsi l'activation de la protéine Ras et le déclenchement de la cascade de signalisation des MAPK [246-248]. Ce mécanisme est appuyé par le fait que la dynamine peut lier SOS à Ras [249], que la dynamine joue un rôle critique dans l'endocytose vésiculaire [250;251] et que l'endocytose est primordiale pour l'activation de la cascade des ERK1/2 par H-Ras [252].

### 1.1.3.5.2 Activation des MAPK par les RCPG à travers l'activation des récepteurs tyrosines kinase (RTK)

Les récepteurs couplés aux protéines G $\alpha$ i et G $\alpha$ q peuvent aussi activer les MAPK ERK1/2 par un mécanisme de transactivation impliquant un autre type de récepteur membranaire ayant un rôle dans la croissance et la division cellulaire, les récepteurs tyrosines kinases. La transactivation des RCPG vers les récepteurs tyrosine kinase fut pour la première fois observée dans des cellules Rat1a en présence de trois agonistes des RCPG : l'endothéline, la LPA et la thrombine [253]. L'ajout de ces agonistes produisait l'activation du récepteur au EGF (EGFR) et de la protéine Her2 conjointement avec l'activation de la MAPK ERK2. L'auteur de l'étude a pu démontrer, en utilisant un inhibiteur des EGFR, tyrphostin AG1478, ou un mutant négatif de l'EGFR, qu'il est possible de bloquer l'activation par la transactivation de ERK2. Des études subséquentes ont démontré l'importance de la transactivation dans l'activation de la cascade ERK par les RCPG, et ce, dans de nombreux types cellulaires [254-256].

Le mécanisme par lequel les RCPG stimulent les EGFR requiert l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire [255-259] et l'activation de la PKC, de Src et de Pyk2 [260]. Par la suite, ces protéines convergent vers l'activation d'une famille de désintégrines et de métalloprotéases transmembranaire (ADAM) et/ou une matrice protéinique de métalloprotéase (MMP) par phosphorylation et interaction entre les protéines [261;262]. La protéine ADAM ainsi stimulée coupe le domaine extracellulaire d'un ligand lié à la membrane tel le HB-EGF, ce qui provoque la relâche du EGF soluble dans le milieu extracellulaire et permet l'activation du EGFR [260-263].

Il a aussi été postulé que certaines protéines tyrosines kinases qui ne sont pas des récepteurs (NRTK) peuvent, suite à leur activation par certains RCPG, s'associer aux RTK et phosphoryler les résidus responsables de leur activation [264]. Par exemple, c-Src activé peut phosphoryler l'EGFR sur des résidus clés du domaine intracellulaire (Tyr845, Tyr1101) permettant ainsi une activation du RTK [265]. Un dernier mécanisme d'activation des RTK impliquant la formation de complexes protéiques entre une RCPG, un NRTK et un RTK a

aussi été postulé suite à l'immunoprécipitation du  $\beta_2$ AR avec l'EGFR [266]. Cette interaction serait nécessaire pour l'activation des ERK par transactivation.

Après son activation par ces différents mécanismes, les RTK utilisent leurs voies naturelles pour la stimulation des MAPK. Donc après la phosphorylation des résidus clés du domaine C-terminale, la molécule adaptatrice GrB2 se lie directement ou indirectement sur la molécule Shc et permet le recrutement de la molécule Sos. Celle-ci permet l'activation de Ras et ainsi débute la cascade de signalisation des MAPK [264].

### **1.1.3.5.3 Activation des MAPK ERK1/2 au travers de protéines d'échafaudage tel la $\beta$ arr**

Tel qu'indiqué précédemment, la  $\beta$ arr peut être impliquée dans l'activation de la cascade de signalisation des ERK1/2. Les premières indications sur le rôle de la  $\beta$ arr proviennent d'études sur l'internalisation des récepteurs. Dans ces études, certains dominants négatifs de la  $\beta$ arr1 et de la dynamine, ou encore certains inhibiteurs chimiques de l'internalisation étaient capables d'inhiber la voie ERK1/2, suggérant qu'un ou plusieurs composants de la voie d'internalisation étaient nécessaires à l'activation des ERK1/2 [267]. En démontrant ensuite que c-Src, une protéine mitogéniques, peut être recruté directement vers  $\beta$ arr1 en réponse à l'activation du récepteur  $\beta$ 2AR, le groupe de Lefkowitz a identifié la  $\beta$ arr comme nécessaire lors de la stimulation des ERK1/2 [210;268].

Il faut noter que les deux isoformes de la  $\beta$ arr peuvent posséder des rôles distincts dépendamment des récepteurs qu'elles lient. Pour certains récepteurs tels les AT1aR ou le V2R, la  $\beta$ arr1 possède un rôle activateur alors que la  $\beta$ arr2 est inhibitrice de l'activation des ERK1/2. Il a été postulé que cette dernière permettait l'inhibition de la signalisation en favorisant l'internalisation et la désensibilisation du récepteur [269;270]. Il est toutefois impossible de généraliser pour tous les récepteurs. Pour certains tels les PAR<sub>2</sub>, les PTH<sub>1</sub>R et les  $\beta_2$ AR, les deux isoformes sont impliquées dans la stimulation de la voie ERK1/2 [268;271;272] tandis que pour le PAR1, l'isoforme 1 est inhibitrice et l'isoforme 2 est activatrice [273].



Certains RCPG ont aussi la capacité de continuer d'activer les ERK1/2, même après leur internalisation, grâce à la  $\beta$ arr. Cette dernière aurait la capacité de séquestrer des composantes de la voie ERK lors de la formation du complexe d'internalisation du  $\beta_2$ AR ce qui lui permet de continuer d'activer ERK1/2 [274;275]. Cette activation des ERK1/2 par la  $\beta$ arr a aussi la particularité d'avoir une cinétique beaucoup plus lente que l'activation par les protéines G [210]. De plus, les ERK1/2 activés par les  $\beta$ arr ne sont pas impliqués dans la signalisation nucléaire [276;277]. Ainsi, l'activation des MAPK ERK1/2 produite par les  $\beta$ arr suite à la stimulation d'un RCPG est impliquée dans des réponses cytoplasmiques et permet une activation plus lente, mais persistante de ERK1/2.

#### **1.1.4 Complexes multimériques**

Nous avons vu dans les sections précédentes plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'activation des RCPG ainsi que plusieurs protéines impliquées. Une question se pose toutefois devant un si grand nombre de protéines et de voies de signalisation : quelle en est l'organisation? Est-ce que les éléments qui composent la cellule sont organisés en structures complexes ou bien ils se répartissent aléatoirement comme les ingrédients d'une soupe? Autrement dit, est-ce que le récepteur forme un complexe de signalisation avec sa protéine G et ses effecteurs ou bien il s'associe à eux selon un modèle de collision aléatoire? Bien que le modèle de collision aléatoire ait dominé pendant un certain temps, de plus en plus d'études démontrent la présence de complexe de signalisation entre certains récepteurs, leurs protéines G et leurs effecteurs à l'intérieur des cellules. Toutefois, comme la nature est faite d'exception, il ne semble pas avoir de modèle universel pour les RCPG, certains modèles semblent mieux fonctionner avec certains récepteurs et pas du tout pour d'autres.

Tel que mentionné dans le paragraphe précédent, le modèle de collision aléatoire du couplage entre le récepteur, ses protéines G et ses effecteurs impliquerait que les protéines membranaires et cytoplasmiques diffusent librement. L'activation du récepteur augmenterait son affinité pour la protéine G, permettant à celle-ci d'interagir avec le récepteur. Cette interaction aurait comme effet l'activation de la protéine G suivie par la

dissociation de cette dernière avec le récepteur permettant à ses sous-unités d'aller stimuler les différents effecteurs [278;279]. Toutefois, ce modèle concorde très mal avec la vitesse d'activation de certains effecteurs tels les canaux potassiques [280;281], qui s'effectuent durant la première seconde suivant l'activation des RCPG. En fait, il est impensable que tous ces événements décrits puissent se produire en moins d'une seconde sans qu'il y ait au préalable une proximité entre le récepteur, les protéines G et leurs effecteurs (révisé dans [282]).

Une des premières études démontrant une interaction constitutive entre le récepteur et les protéines G fut réalisée en 1999 [283]. À l'aide de techniques de coimmunoprécipitation, de chromatographie d'affinité et en utilisant le  $\beta_2$ AR, les auteurs ont démontré que l'interaction entre le récepteur et les protéines G ne dépend pas de l'activité du dit récepteur. Autrement dit, les récepteurs sont associés aux protéines G dans leur état basal et l'activation du récepteur n'entraîne pas une dissociation du complexe, mais plutôt un réarrangement de ce dernier. L'interaction basale fut par la suite confirmée grâce à des techniques de transfert énergétique par résonance de la fluorescence (FRET) sur les récepteurs muscariniques M4,  $\alpha_2$ A, adénosine A1 et le récepteur dopaminergique D<sub>2</sub> [284]. En 2006, une étude très innovante utilisant la technique de transfert énergétique par résonance de la bioluminescence (BRET) a pu démontrer clairement la réorganisation du complexe protéinique [65]. Les auteurs ont évalué l'interaction du  $\beta_2$ AR, marqué d'une protéine fluorescente GFP2, avec trois protéines G $\alpha_1$  marquées à des endroits différents. L'idée derrière cette expérience était de permettre d'évaluer les changements dans la distance des protéines, suite à l'activation du récepteur par un agoniste, selon 3 points de vue différents. Les auteurs ont pu démontrer que les protéines G restent associées au récepteur suite à leur activation et que l'activation de ce dernier produit un changement de conformation du complexe récepteur/G $\alpha_i$ /G $\beta\gamma$  permettant l'activation de la G $\alpha_i$ .

Sachant que les récepteurs forment un complexe stable avec les protéines G et que l'activation de leurs effecteurs se produit dans les secondes suivant l'activation du récepteur par un agoniste, il ne reste qu'un petit pas à franchir pour affirmer que les effecteurs peuvent aussi former un complexe stable avec le récepteur et les protéines G.

Le premier groupe à franchir ce pas fut dirigé par Johannes W. Hell en 2001. Ce groupe a démontré, grâce à des techniques de coimmunoprécipitation et d'immunofluorescence en microscopie confocale, que le récepteur  $\beta_2$ AR forme un complexe de signalisation à la membrane contenant un canal calcique de type L (Cav1.2), une protéine G et une AC [126]. Par la suite, il a été démontré que les canaux Kir3 peuvent former des complexes à la membrane avec plusieurs RCPG, incluant des complexes avec les récepteurs dopaminergiques  $D_2$ R,  $D_4$ R et le  $\beta_2$ AR [185]. Cette étude a d'ailleurs déterminé que la présence du dimère  $G\beta\gamma$  était primordiale pour la formation du complexe, mais pas pour son maintien.

Les protéines G hétérotrimériques peuvent aussi former des complexes stables avec les effecteurs sans l'activation de celles-ci. En utilisant les techniques de BRET et de coimmunoprécipitation, un groupe dirigé par le Dr Terence Hebert a permis de découvrir que les sous-unités  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G\beta_1$  et  $G\gamma_2$  peuvent interagir ensemble sans l'activation d'un RCPG pour former un complexe stable avec les canaux Kir3 et l'AC [285]. Bien que le signal BRET entre les sous-unités des protéines G et l'effecteur AC augmente après l'ajout d'isoprotérénol (agoniste du  $\beta_2$ AR), les auteurs associent cette hausse à un changement de conformation du complexe plutôt qu'à une formation de nouveaux complexes.

Le fait que les partenaires de signalisation des RCPG semblent interagir préalablement à l'activation des récepteurs amène la question suivante : ils s'assemblent où? Est-ce par collision aléatoire à la membrane après avoir voyagé individuellement vers celle-ci ou bien l'assemblage est déterminé avant l'arriver à la membrane? Plusieurs indices laissent penser que le complexe de signalisation est formé avant de rejoindre la membrane. Premièrement, il a été démontré que la sous-unité du canal Kir3.1 ne peut atteindre la membrane plasmique sans l'expression d'une sous-unité hétérologue (exemple Kir3.2 ou Kir3.4) [173]. Pourtant, les sous-unités  $G_{\alpha_i}$  et  $G\beta\gamma$  interagissent avec Kir3.1 sans l'expression d'une sous-unité hétérologue [285]. Deuxièmement, un agoniste du  $\beta_2$ AR perméable aux membranes, le cimaterol, est capable de modifier l'interaction entre la sous-unité Kir3.1, exprimée sans sous-unité hétérologue, et  $G\gamma_2$ , ce que l'agoniste isoproterenol (non perméable aux membranes) est incapable de faire sans la coexpression de la sous-unité Kir3.4 [285]. Finalement, il a été démontré que le  $\beta_2$ AR interagit avec

Kir3.1 avant d'atteindre la membrane [185]. Mis ensemble, ces résultats suggèrent que la formation du complexe se produit avant d'arriver à la membrane, mais dans quelle organelle?

La réponse à cette question fut donnée par des études utilisant une combinaison de BRET, de complémentation bimoléculaire de fluorescence et de microscopie confocale en inhibant des petites GTPase responsable du transport des protéines entre le RE et le Golgi, Rab1 et Sar1. La première étude a démontré que l'interaction entre le  $\beta_2$ AR et les protéines G $\beta\gamma$  s'effectue au niveau du RE et que cette interaction est primordiale pour le ciblage du récepteur à la membrane. L'interaction de la sous-unité G $\alpha$  est aussi importante pour le ciblage du récepteur à la membrane, mais cette interaction se produirait durant le transit entre le RE et le Golgi [286]. Par la suite, une seconde étude utilisant les mêmes méthodes a démontré que canal Kir3 interagit avec les protéines G $\beta\gamma$  à l'intérieur du RE et que la formation du complexe dépend du type de sous-unité G $\beta$  inclus dans ce complexe [287], suggérant ainsi que la formation du complexe de signalisation s'effectue avant l'exportation du RE.

Mises ensemble, ces études soutiennent l'hypothèse que les complexes de signalisation situés à la membrane ne dépendent pas de collision aléatoire suivant la liaison d'un agoniste sur un récepteur. Ces complexes seraient plutôt des unités de signalisation contenant de multiples protéines finement régulées et assemblées lors de leur synthèse. La préformation de ces complexes avant leur activation démontre donc que la cellule et les protéines qui la composent s'ordonnent de façon très précise et ne laisse que peu de place à l'aléatoire.

### **1.1.5 Régulation de la signalisation**

La régulation de la signalisation des RCPG joue un rôle aussi important que le déclenchement de cette signalisation. Sans cette régulation, la stimulation des cellules par ces récepteurs pourrait entraîner des conséquences néfastes pour celles-ci. Ces conséquences peuvent être représentées par certaines maladies (anomalie du développement, maladies inflammatoires chroniques, les allergies, la migration des

cellules cancéreuses, etc.) ou encore une prolifération excessive de certaines protéines et peuvent résulter à la mort cellulaire. Cette même régulation permettrait aussi d'adapter la réponse cellulaire au contexte biologique dans lequel se trouve la cellule. La désensibilisation de la signalisation se produit par étapes qui s'enchaînent afin de réguler la signalisation à court terme (quelques secondes à quelques minutes), à moyen terme (quelques minutes à quelques heures) et à long terme (quelques heures à quelques jours). Ces étapes débutent par la phosphorylation du récepteur, le découplage fonctionnel de la protéine G hétérotrimérique, l'internalisation des récepteurs qui amène le recyclage ou la dégradation du RCPG et finalement, la régulation de l'expression des gènes qui amène une adaptation à long terme de la cellule. Ces étapes se produisent dans cet ordre, mais ne sont pas nécessairement indispensables pour passer à l'étape suivante.

#### **1.1.5.1 Phosphorylation du récepteur**

Les RCPG peuvent être phosphorylés principalement par deux grands groupes de protéines kinases : les kinases dépendantes des seconds messagers et les protéines kinases des RCPG (GRK). Les kinases dépendantes des seconds messagers sont représentées par la famille des PKA et des PKC et leurs actions permettent le découplage des protéines G du récepteur. Comme leur nom l'indique, elles sont activées par les seconds messagers donc après l'activation du récepteur, et elles phosphorylent ces derniers pour bloquer l'activation des seconds messagers. Ces kinases participent donc à une boucle de rétro-inhibition permettant d'empêcher la signalisation de se prolonger dans le temps. Par exemple, la liaison de la morphine au MOR ne produit pas la phosphorylation du récepteur par une GRK comme avec des agonistes complets. Toutefois, la PKC est activée par la voie de signalisation passant par  $G\beta\gamma$  et la PLC- $\beta$ . Cette kinase produit la phosphorylation du récepteur et la désensibilisation de celui-ci [288]. Ce type de phosphorylation est appelé désensibilisation hétérologue, c'est-à-dire qu'elle ne dépend pas de la liaison de l'agoniste sur le récepteur pour se produire (figure 9). Autrement dit, ce type de désensibilisation peut se produire sur un récepteur inactif à cause de l'activation de la PKA ou de la PKC par un autre récepteur. Il a aussi été démontré

que la phosphorylation par PKA de certains récepteurs comme le  $\beta_2$ AR et le récepteur à la prostacycline [289] leur permettent de changer de type de protéine G à laquelle ils sont couplés. Ainsi, le récepteur  $\beta_2$ AR qui couple normalement à la protéine  $G_{\alpha_s}$ , se découple de celle-ci au profit de la protéine  $G_{\alpha_i}$  après sa phosphorylation par PKA [83;290].

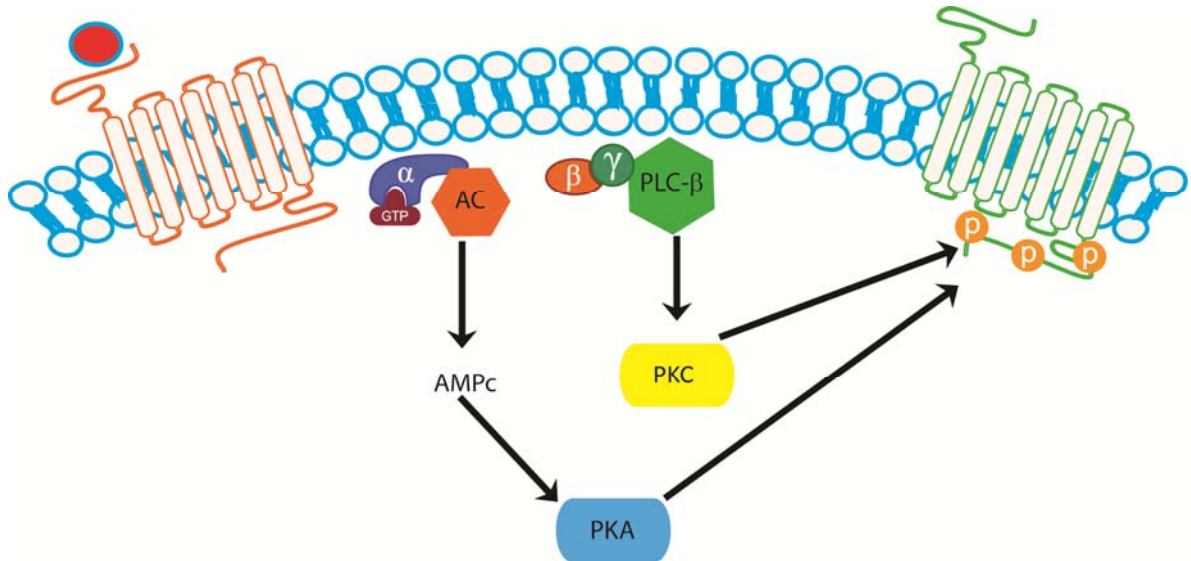


Figure 9 : Désensibilisation hétérologue des RCPG

Le cas des GRK est différent des kinases dépendantes des seconds messagers, car elles se lient seulement aux récepteurs activés par un agoniste. Jusqu'à présent, ces kinases participent seulement à la désensibilisation homologue des RCPG. Elles participent donc à la régulation fine de la signalisation des RCPG. La famille des GRK est composée de 7 isoformes différentes (GRK1-7). Alors que certaines isoformes sont exprimées de façon spécifique dans des tissus spécifiques (GRK4 est exprimé seulement dans les reins, les testicules et le cervelet alors que GRK1 est exprimée uniquement dans le système visuel), les GRK2-3-5-6 sont ubiquitaires dans les tissus des mammifères. Les GRK2 et 3 sont les deux kinases les plus impliquées dans la phosphorylation des récepteurs et la désensibilisation alors que GRK5 et 6 sembleraient être reliés à l'activation de la voie MAPK [270;291]. Toutefois, dépendamment des récepteurs et des tissus, les GRK impliquées dans la désensibilisation peuvent varier. Le mécanisme est relativement bien étudié. Il commence par l'activation du récepteur par un agoniste ce qui provoque le recrutement des GRK par les sous-unités  $G\beta\gamma$  liées au récepteur. La GRK ainsi recrutée se

lie au récepteur pour phosphoryler les résidus Ser/Thr de la queue C-terminale et de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur. Cette phosphorylation entraîne une augmentation de l'affinité du récepteur pour la  $\beta$ arr. Cette protéine, aussi impliquée dans la signalisation du récepteur tel qu'expliqué auparavant, provoque un découplage fonctionnel des protéines G par encombrement stérique et l'arrêt de la signalisation G dépendante. Par la suite, la  $\beta$ arr permet l'internalisation du récepteur (le mécanisme sera expliqué dans la prochaine section) (figure 10).

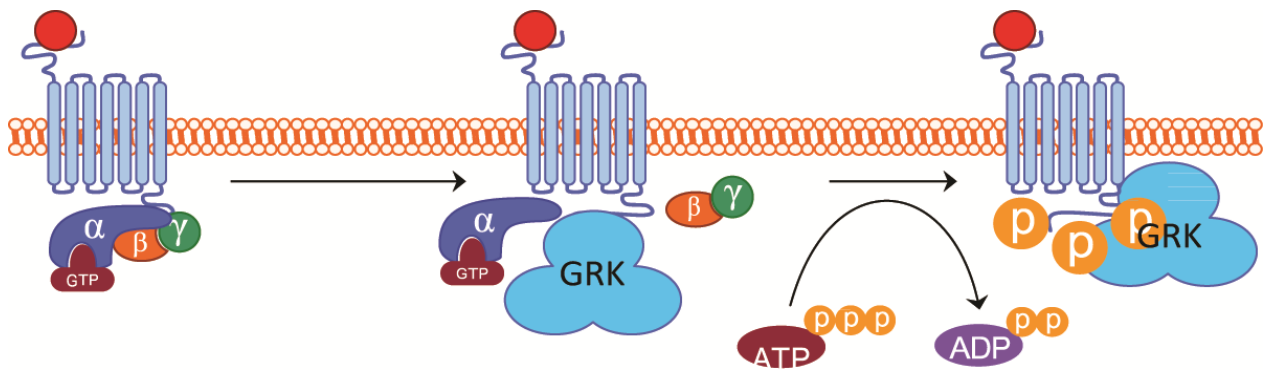


Figure 10 : Désensibilisation homologue des RCPG

Bien que la phosphorylation des récepteurs par GRK semble être le mécanisme prédominant dans la désensibilisation homologue des RCPG, de plus en plus d'étude démontre la présence d'une désensibilisation dépendante de GRK, mais pas de son activité catalytique [292]. Pour observer ce phénomène, des chercheurs ont utilisé une protéine GRK2 mutante au niveau de son site catalytique. Ils ont pu observer que la désensibilisation homologue du récepteur PTH dans les cellules COS-1 est dépendante de GRK2, mais indépendante de son activité catalytique. Ils ont également observé une désensibilisation d'un récepteur PTH muté au niveau de ses sites de phosphorylation par GRK2, démontrant ainsi que ce récepteur n'a pas besoin d'être phosphorylé pour être désensibilisé, du moins à l'intérieur des cellules COS-1 [293]. Un autre exemple nous provient des récepteurs GABA<sub>B</sub> qui peuvent être désensibilisés par un mutant de GRK4 qui ne possède pas de domaine catalytique [294].

Outre la phosphorylation des résidus Ser/Thr par des kinases dépendantes des seconds messagers et les GRK, certains RCPG peuvent être phosphorylés au niveau de résidus tyrosine (Tyr). C'est le cas entre autres des récepteurs opiacés. Cette phosphorylation par

des tyrosines kinases semble toutefois plus impliquer dans la régulation fine de la signalisation plutôt que dans l'arrêt de celle-ci. Par exemple, un traitement avec de l'insuline potentialise de 60% l'effet maximal de l'agoniste U69593 du récepteur KOR sans affecter son EC50. Cette potentialisation de la signalisation du KOR par l'insuline peut être bloquée par un inhibiteur non spécifique des tyrosines kinases, la genisteine, ou par la mutation de la tyrosine 87 (première boucle intracellulaire) ou 157 (2<sup>e</sup> boucle intracellulaire) par une phénylalanine [295]. La phosphorylation de ces résidus potentialiserait donc la signalisation du KOR. L'insuline peut aussi potentialiser la signalisation d'un autre récepteur opiacé, le MOR, mais selon un mécanisme différent. Dans ce cas-ci, la genisteine n'a aucun impact sur la potentialisation par l'insuline de la signalisation de l'agoniste DAMGO (D-Ala<sup>2</sup>, methyl-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol). Pourtant, la mutation des résidus Tyr106 ou Tyr166 en Phe bloque cette potentialisation. Seul un inhibiteur des MAPK (PD98m059) et un inhibiteur des phosphatases (orthovanadate) arrivent à bloquer l'effet de l'insuline, indiquant que cet effet serait médié par la déphosphorylation des résidus Tyr du MOR [296]. Il a été proposé quelques années plus tard que la phosphorylation du résidu Tyr166, du MOR réduit l'efficacité de couplage du MOR avec sa protéine G [297]. Ainsi, la phosphorylation des résidus Tyr du KOR potentialiserait sa signalisation tandis que la phosphorylation des résidus Tyr du MOR inhiberait sa signalisation.

La phosphorylation des Tyr peut aussi avoir des conséquences plus importantes sur la signalisation. Un groupe dirigé par Law a récemment démontré que la phosphorylation des résidus Tyr166 et Tyr336 contrôle le changement de la signalisation du MOR [298]. Un traitement aigu de ce récepteur par un agoniste produit une inhibition de la production d'AMPC alors qu'un traitement prolongé produit une augmentation de cette production [299]. Ce changement de signalisation peut être bloqué soit par l'inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase Src ou par la mutation des Tyr impliquées en Phe. La phosphorylation des Tyr du MOR serait donc la clé permettant de basculer sa signalisation  $G\alpha_i$  dépendante en signalisation ressemblant à  $G\alpha_s$ .

Finalement, la phosphorylation au niveau des tyrosines pourrait aussi influencer la régulation du récepteur. Des études suggèrent que la phosphorylation de ces résidus



augmenterait l'internalisation agoniste dépendante du MOR [300] et du DOR [301]. Une autre étude provenant de notre laboratoire a démontré que la phosphorylation Src dépendante de résidu tyrosine du DOR, suite à sa stimulation par l'agoniste DPDPE, ne contribue pas à son internalisation, mais contribue plutôt au tri postendocytique du récepteur [302]. L'inhibition pharmacologique de Src par le PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) produirait une augmentation du recyclage du DOR vers la membrane. Quoi qu'il en soit, il reste encore beaucoup d'étude à réaliser avant de connaître toutes les conséquences de la phosphorylation des résidus tyrosines des RCPG dans leur signalisation et leur régulation.

### **1.1.5.2 Le découplage fonctionnel par la $\beta$ arr**

Nous avons abordé précédemment la  $\beta$ arr comme une molécule de signalisation indépendante des protéines G. Toutefois, la fonction première de la  $\beta$ arr est l'arrêt de la signalisation des protéines G. C'est par cette fonction que les premières arrestines visuelles ont été découvertes [207;303;304] et ont été nommées (« arrest » pour arrêt). Par la suite, des analogues aux arrestines visuelles ont été découverts pour le récepteur  $\beta_2$ AR et furent nommés  $\beta$ arr [305].

Le modèle moléculaire de l'interaction entre le récepteur et l'arrestine a été proposé par Gurevich et Benovic en 1993. Après différentes études sur le récepteur visuel Rhodopsin, ils en ont conclu que l'arrestine possède deux sites qui servent de senseur permettant son interaction avec le récepteur : un site reconnaissant le récepteur activé et un autre senseur qui reconnaissent et lie les domaines phosphorylés (phosphate) du récepteur. L'activation d'un ou l'autre de ces senseurs permet aux arrestines de lier le récepteur avec une affinité relativement faible. Toutefois, l'activation de ces deux senseurs en même temps permet aux arrestines de lier les récepteurs dans un état de haute affinité. Cet état de haute affinité provoque un changement majeur de la conformation des arrestines et amène celle-ci dans une interaction semi-irréversible avec le récepteur (revue par [306]). Ces deux senseurs permettent d'expliquer pourquoi certains récepteurs n'ont pas besoin d'être phosphorylés pour être désensibilisés. De plus, le senseur à phosphate est conçu

pour réagir à au moins deux phosphates [25;307-309] se situant relativement proche l'un de l'autre [310]. Ce qui est intéressant avec ce mécanisme est que les arrestines ne discriminent pas le type de kinase qui phosphoryle le récepteur, seulement la quantité de phosphate ajouté sur celui-ci. Que ce soit les GRK [311], les PKC [312] ou la caséine kinase II [313] qui phosphoryle les récepteurs, les arrestines n'y voit aucune différence. Il faut toutefois prendre en considération que ces études n'ont regardée que la quantité de phosphorylation et la kinase activée. Une étude récente suggère que la phosphorylation s'effectuerait selon des motifs « codes bars » et pourrait avoir des conséquences sur la signalisation des RCPG [314-316].

Pour activer le senseur à phosphate, il est clair que le récepteur doit être phosphorylé, mais à quel endroit? Les premières données suggéraient que les sites principaux de phosphorylation du récepteur permettant l'activation de l'arrestine se situaient sur la queue C-terminale, du moins pour le récepteur Rhodopsin [317] et le  $\beta_2$ AR [305;318]. Dans ces deux modèles, seuls les GRK sont capables de phosphoryler correctement le récepteur. Toutefois, même si ce modèle fonctionne relativement bien pour une majorité des RCPG, plusieurs récepteurs peuvent être phosphorylés sur d'autres sites tels les trois boucles intracellulaires, et par d'autres kinases telle la PKC (voir [306] pour une revue détaillée).

Les RCPG possèdent donc plusieurs sites de phosphorylation permettant leurs interactions avec les arrestines. Cependant, ces différents sites ne semblent pas seulement servir à l'activation des arrestines, ils semblent aussi très importants dans la liaison des arrestines avec le récepteur. Certains domaines des RCPG serviraient de frein à l'interaction arrestine-récepteur et la phosphorylation de ces domaines servirait à enlever ce frein et permettre cette interaction. La première description d'un de ces freins fut faite par Whistler et al en 2001. En utilisant deux mutants du DOR, un mutant possédant une substitution des sérines et thréonines de la queue C-terminale par des alanines et un mutant possédant une délétion de sa queue C-terminale, les auteurs ont démontré que l'absence de phosphorylation sur la queue C-terminale empêche la liaison de la  $\beta$ arr et l'internalisation du récepteur tandis que la délétion de ces domaines permet une récupération de la liaison de la  $\beta$ arr et l'internalisation du récepteur. Cette expérience a

démontré que la queue C-terminale sert de frein à la liaison de la  $\beta$ arr et que la phosphorylation de cette queue permet de relâcher ce frein et permet l'interaction, indépendante de la phosphorylation, de la  $\beta$ arr avec le récepteur. Il existe d'autres exemples de ce type de frein stérique, entre autres le récepteur à la follitropin [319] et le récepteur dopaminergique  $D_1$  [320].

La  $\beta$ arr possède donc plusieurs modes de liaison aux RCPG, dépendamment du type de récepteur, de sa phosphorylation et du type cellulaire étudié. Comme décrit plus haut, la  $\beta$ arr a été premièrement identifiée comme étant responsable de l'arrêt de la signalisation des protéines G. Pour réussir dans sa tâche, elle devrait être capable d'occuper, du moins en partie, le domaine permettant l'activation de la protéine G par le récepteur. Tel qu'expliqué précédemment, l'activation du récepteur Rhodopsin produit une ouverture à l'intérieur des domaines hélicoïdaux par le mouvement du passage transmembranaire 6 (résumé par [321]) et que la queue C-terminale de la transducin (protéine G liant la Rhodopsin) s'introduit dans cette cavité [61]. Il y a toutefois d'autres sites important dans la liaison de la protéine G envers le récepteur. Un de ces sites est un motif de liaison DRY (Asp-Arg-Tyr) à la jonction de la 2<sup>e</sup> boucle intracellulaire et du passage TM3 [26]. Ce motif est aussi très important pour la liaison de la  $\beta$ arr sur le récepteur peptidique du N-formyle et pour le  $\alpha_2$ AR [26;27]. Certains récepteurs possèdent d'autres domaines primordiaux dans la liaison avec la protéine G ou la  $\beta$ arr. Entre autres, l'interaction de la  $\beta$ arr avec la 2<sup>e</sup> boucle intracellulaire du CCR5 [25]. La  $\beta$ arr serait donc la compétitrice directe des protéines G pour le récepteur activé et cette compétition, produite par la superposition de leurs sites de liaison, serait la clé de l'arrêt de la signalisation des protéines G [322].

### **1.1.5.3 L'internalisation du récepteur**

L'internalisation est sans contredit une étape importante dans la signalisation des RCPG, car elle est nécessaire à la resensibilisation ou à la dégradation de ces récepteurs [323]. En fait, sauf exception (le MOR peut être resensibilisé à la membrane [324]), les récepteurs ne peuvent être resensibilisés et déphosphorylés s'ils restent à la membrane plasmique, ils doivent absolument passer par l'étape de l'internalisation pour être dirigés vers un

endosome. C'est dans cette structure qu'ils pourront être libérés du ligand, être déphosphorylés pour ensuite être redirigés vers la membrane pour un autre cycle de signalisation. Dans le cas des récepteurs qui ne recyclent pas, ils sont alors dirigés en majorité vers les lysosomes où ils pourront être dégradés.

Les deux principaux mécanismes d'internalisation des RCPG sont l'internalisation par des puits tapissés de clathrines et l'internalisation par des compartiments lipidiques de type caveole. Pour les besoins de cette thèse, seulement l'internalisation par des puits de clathrines sera abordée. La  $\beta$ arr joue un rôle crucial dans ce mécanisme. Elle ne sert pas juste à bloquer l'accès de la protéine G au récepteur, elle est aussi en partie responsable de l'internalisation de ce dernier grâce à sa capacité à échafauder une multitude de protéines nécessaire à l'internalisation au travers des puits de clathrines. À la suite de l'activation de la  $\beta$ arr par la conformation active du récepteur, celle-ci interagit avec trois autres types de protéines : la chaîne lourde des clathrines [325], la sous-unité  $\beta_2$ -adaptin de la protéine adaptatrice 2 (AP-2) [326] et des phosphoinositides (phospholipides de la membrane plasmique) [327]. L'accumulation de clathrines autour de ce complexe permet la formation d'un puits de clathrines qui s'engouffre dans la cellule entraînant le complexe avec lui. Après sa formation, le puits est pincé à la surface par une large GTPase nommée dynamine et est libéré dans le cytoplasme [20]. La vésicule ainsi formée est ensuite dirigée vers les endosomes de triage pour être recyclée ou vers les lysosomes pour être dégradée [20].

#### **1.1.5.4 Le tri postendocytose**

Suite à leur internalisation, les récepteurs seront soit recyclés à la membrane plasmique pour un nouveau cycle de signalisation ou dégradés dans les lysosomes pour réduire la quantité à la surface des cellules. Les premières recherches sur les déterminants responsables du tri des récepteurs entre le recyclage ou la dégradation ont mené vers la  $\beta$ arr, plus spécifiquement à la force de son interaction avec le récepteur [328]. Cette recherche, basée sur une modélisation des profils de translocation de la  $\beta$ arr obtenue par microscopie confocale, conclue sur une classification basée sur cette interaction : la classe

A, qui recrute de manière transitoire la  $\beta$ arr (avec une préférence pour la  $\beta$ arr2), et la classe B, qui interagit fortement et sans préférence avec les deux  $\beta$ arr. Les récepteurs de classe A (par exemple les  $\beta_2$ AR,  $D_1$ R, MOR, LHR humain et  $NK_1$ R) se dissocient rapidement de la  $\beta$ arr ce qui leur permet de se resensibiliser et de retourner à la membrane plasmique pour une future stimulation, tandis que les récepteurs de classe B (par exemple les  $V_2$ R,  $D_2$ R, LHR rat et  $PAR_1$ ) forment des complexes stables avec la  $\beta$ arr et sont dégradés par les voies lysosomales [328-330]. Le déterminant majeur de cette différence d'affinité entre les deux types de récepteur serait le degré de phosphorylation au niveau de leur queue C-terminale. Les récepteurs de classe B posséderaient des regroupements de Ser/Thr au niveau de leur queue C-terminale qui, après phosphorylation, provoquerait une interaction extrêmement forte avec la  $\beta$ arr [331].

Il existe toutefois d'autres déterminants permettant de favoriser ou non le recyclage d'un récepteur à la membrane. Entre autres, il a été démontré que la présence d'un domaine PDZ peut faciliter le recyclage de certains récepteurs comme le  $\beta_2$ AR. Ce domaine situé sur la queue C-terminale du récepteur permet sa liaison avec la famille de protéine NHERF/EBP50 (Ezrin/radixin/moesin binding protein 50) [215;332]. Ces protéines sont primordiales à l'interaction entre le récepteur et le cytosquelette de la cellule [332] et un dérèglement de l'interaction entre le  $\beta_2$ AR, NHERF et EBP50 est assez pour diriger le récepteur vers la dégradation au lieu du recyclage [332]. Plusieurs protéines (exemple : GASP, NHERF et sorting nexin) et différents événements (par exemple la phosphorylation et l'ubiquitination) peuvent réguler le tri postendocytique des RCPG et en faire une liste exhaustive n'est pas le but de cette thèse (voir [333] pour de plus amples détails). Il faut toutefois retenir que la phosphorylation du récepteur et la stabilité de sa liaison avec la  $\beta$ arr semblent être un critère prépondérant pour le tri postendocytique de la majorité des RCPG.

## 1.2 Théorie pharmacologique

### 1.2.1 La naissance du concept des récepteurs

Le concept même des récepteurs expliquant l'effet d'une drogue est apparu au début du 20<sup>e</sup> siècle grâce aux travaux de l'Allemand Paul Ehrlich et de l'Anglais John Newport Langley, bien avant que la biologie ait développé les outils nécessaires à leur découverte. À l'époque, ce concept était très critiqué au détriment d'autres concepts qui paraissent aujourd'hui farfelus. Une de ces théories (la théorie physique) proposait que les toxines et les drogues affectent le gradient de concentration de la membrane de la cellule, provoquant ainsi un effet sur l'organe en question. Une autre théorie, la loi d'Arndt-Schulz, était influencée par un courant de pensée très présent dans l'Allemagne des années 20, l'homéopathie. Cette loi postulait qu'un stimulus faible excite, un stimulus partiel produit une faible inhibition et un stimulus fort produit une inhibition complète. Il faut comprendre que les travaux sur l'effet des drogues étaient très théoriques étant donné les techniques limitées de cette époque antérieure à la découverte de l'ADN [334].

C'est John Langley qui fut le premier à proposer que les toxines agissent sur une substance réceptrice qu'il nomma « side chain molecule ». Son expérience fut simple, il injecta de la nicotine à l'intérieur d'un muscle préalablement dénervé ce qui causa la contraction. Ensuite, il injecta du curare ce qui inhiba la contraction causée par la nicotine d'une manière dose dépendante. Finalement, il démontra que la présence de curare n'inhibe pas la contraction causée par un stimulus électrique. Il conclut donc que la nicotine et le curare agissent sur une substance accessoire et non sur la substance contractile [335]. Paul Ehrlich reprit les idées de Langley et en proposa une théorie. Il remplaça le terme « side chain » par récepteur, il postula l'existence de plusieurs types de récepteurs et il étendit le principe à différentes molécules chimiques (revue dans [334]). Ces travaux restaient toutefois hautement spéculatifs et furent contestés pendant des années, jusqu'à l'avènement des travaux de Alfred Joseph Clark.

### 1.2.2 La théorie de l'occupation

La théorie de Ehrlich, bien qu'avant-gardiste pour les moyens dont il disposait, était peu utile, car elle ne décrivait pas les effets des différentes drogues et n'avait aucun pouvoir de prédiction. Pour être efficace, une théorie ne doit pas rester abstraite, elle doit pouvoir se formuler dans un langage concret. En d'autres termes, elle doit être représentée par un modèle mathématique. Et c'est ce que le pharmacologue Alfred Joseph Clark a fait en appliquant l'approche mathématique utilisée en cinétique enzymatique pour décrire les effets des composés chimiques sur les tissus [336]. Son premier postulat fut que les récepteurs occupent qu'une infime partie de la surface des cellules. Ses travaux sur l'acétylcholine, ainsi que les travaux de J.H. Gaddum sur l'adrénaline, démontrèrent que la relation entre la concentration d'une drogue et son effet biologique correspond à une hyperbole [337-339] et que cette hyperbole suit l'équation de Langmuir décrivant l'adsorption d'un gaz à la surface d'un métal. Hill avait prédit cette relation pour la nicotine quelques années auparavant, mais il n'avait pas poursuivi ses recherches. Cette équation est maintenant connue sous le nom de Hill-Langmuir [340].

Ainsi, Clark proposa la première théorie des récepteurs : l'effet d'une drogue est directement proportionnel à la quantité de drogue liée au récepteur et l'effet maximal est atteint quand tous les récepteurs sont occupés. Cette théorie ne décrivait toutefois que l'effet des agonistes. Il a fallu attendre 10 ans avant que Gaddum ne décrive l'effet des antagonistes par un décalage vers la droite de la courbe dose-réponse d'un agoniste [340]. Ce décalage vers la droite démontrait clairement que les deux composées (l'agoniste et l'antagoniste) lient le même site. Les pharmacologues se retrouvèrent devant un problème de taille : comment expliquer que deux composés liant le même récepteur aient des effets opposés? Une réponse à cette question fut proposée dans les années 50 avec la découverte des agonistes partiels. Le fait que ces agonistes soient incapables de produire le même effet maximal que les autres agonistes dits complets indiquait qu'il manquait un élément dans l'équation, une constante indépendante de l'affinité de la molécule pour le récepteur. Ariens décrivit cette constante comme étant l'activité intrinsèque [341] tandis que Stephenson la décrivit comme étant l'efficacité de la drogue [342], terme qui est

employé encore de nos jours. À cette époque, la réponse d'un ligand A fut décrite selon la fonction suivante :

$$\text{Réponse} = \frac{f ([A] \times \varepsilon [R_t]}{([A] + K_A)}$$

où  $\varepsilon$  représente l'efficacité de la drogue,  $[R_t]$  la densité du récepteur,  $f$  la force de réponse du tissu et  $K_a$ , la constante de dissociation à l'équilibre du complexe ligand-récepteur [336].

### 1.2.3 Modèle des récepteurs à deux états

Suite aux modifications de la théorie de Clark par Ariens et Stephenson, les chercheurs del Castillo et Katz proposèrent un nouveau concept, moins mathématique et plus mécanistique, de l'activation des récepteurs [343]. Suite à leurs expériences avec différents dérivés cholinergiques, ils conclurent que la liaison de l'acétylcholine sur les récepteurs nicotiniques produit un changement de conformation résultant à l'ouverture du canal. Ainsi, le récepteur (dans ce cas ci un canal) existerait sous deux conformations, ouvert (actif) et fermé (inactif). Ce modèle fut rapidement accepté dans l'étude des canaux ioniques, cependant il fut rejeté pour les autres types de récepteurs, car les techniques de l'époque ne permettaient pas une analyse directe de leur activation. Une approche non mécanistique fut donc privilégiée durant plusieurs décennies et il fallut attendre jusqu'aux années 80 avant qu'il soit appliqué pour les autres récepteurs [344].

En fait, c'est le développement du clonage moléculaire et des systèmes d'expression hétérologue et recombinant dans des lignées cellulaires qui ont permis l'adoption de ce modèle mécanistique pour les récepteurs. Dans ce modèle, les récepteurs existent en équilibre sous deux conformations différentes : inactif et actif. L'agoniste possède une affinité plus grande pour la forme active du récepteur et déplace l'équilibre entre les deux états du récepteur vers la forme active tandis que l'antagoniste lie les deux formes avec la même affinité [344]. La particularité de l'antagoniste de lier les deux formes permet à celui-ci de déplacer l'agoniste, permettant le retour des récepteurs vers leurs formes



inactives. Ce modèle fut modifié légèrement suite à la découverte d'une nouvelle classe de ligands : les agonistes inverses [345]. Ces ligands, préalablement classés comme antagonistes avec les anciennes méthodes pour tester l'activation des récepteurs, sont capables de réduire le signal observé dans les systèmes de surexpression des récepteurs. Une modification du système s'imposait, c'est ainsi que fut ajoutée la notion d'activation basale des récepteurs.

Dans ce nouveau modèle à deux états, les récepteurs sont en équilibre entre un état inactif et un état actif. Les données de liaison ont démontré que les agonistes ont une plus grande affinité pour l'état actif, les agonistes inverses ont une plus grande affinité pour l'état inactif tandis que les antagonistes n'ont pas de préférence entre les deux états (figure 11) [346]. Ainsi, selon le principe de Le Chatellier, les agonistes favorisent un déplacement de l'équilibre vers l'état actif, les agonistes inverses déplacent l'équilibre vers l'état inactif et les antagonistes stabilisent l'équilibre selon l'état basal [344].

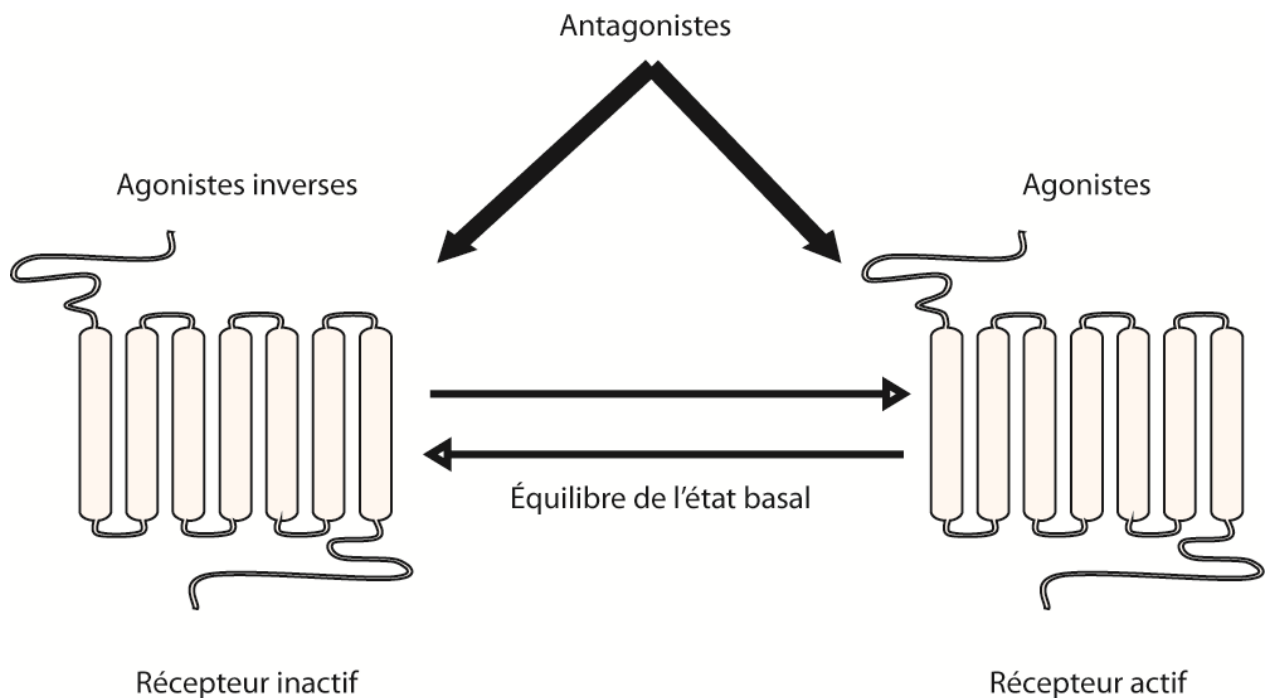


Figure 11 : Théorie pharmacologique des récepteurs à 2 états

#### 1.2.4 Les modèles ternaires

Le début des années 80 a également vu l'apparition d'une nouvelle théorie propre au RCPG, le modèle ternaire. Un groupe de recherche formé par le Dr DeLean et le Dr

Lefkowitz proposa l'existence d'une troisième composante essentielle à la signalisation des RCPG : la protéine G. En utilisant le  $\beta$ AR comme modèle, ils démontrèrent in vitro que la formation du complexe agoniste-récepteur favorise la formation d'un complexe avec une autre protéine, et que l'ajout de nucléotide guanine provoquait la dissociation du complexe ternaire [347]. Ils introduisirent donc un nouveau concept dans les modèles de récepteurs, c'est-à-dire que la sensibilité du système agoniste récepteur est sujette à la disponibilité d'une protéine externe (la protéine G). Autrement dit, la protéine G est essentielle à la signalisation des RCPG. Le modèle ternaire propose donc un équilibre entre 4 états : un premier état constitué de l'agoniste, du récepteur inactif et de la protéine G dissociée, un deuxième état constitué d'un complexe agoniste-récepteur inactif dissocié de la protéine G, un troisième constitué du complexe agoniste-récepteur actif dissocié de la protéine G et finalement, un quatrième état constitué d'un seul complexe agoniste-récepteur actif-protéine G (figure 12). Dans ce modèle, les antagonistes stabilisent la forme inactive du récepteur et favorisent sa dissociation de la protéine G. Ce modèle était supporté par d'autres données expérimentales démontrant l'augmentation de la grosseur du  $\beta$ AR suite à la liaison d'un agoniste, indiquant que l'agoniste produit la formation d'un complexe entre le récepteur et une autre protéine [348], et l'importance du nucléotide guanine-triphosphate dans l'activité de l'AC induite par le  $\beta$ AR [349].

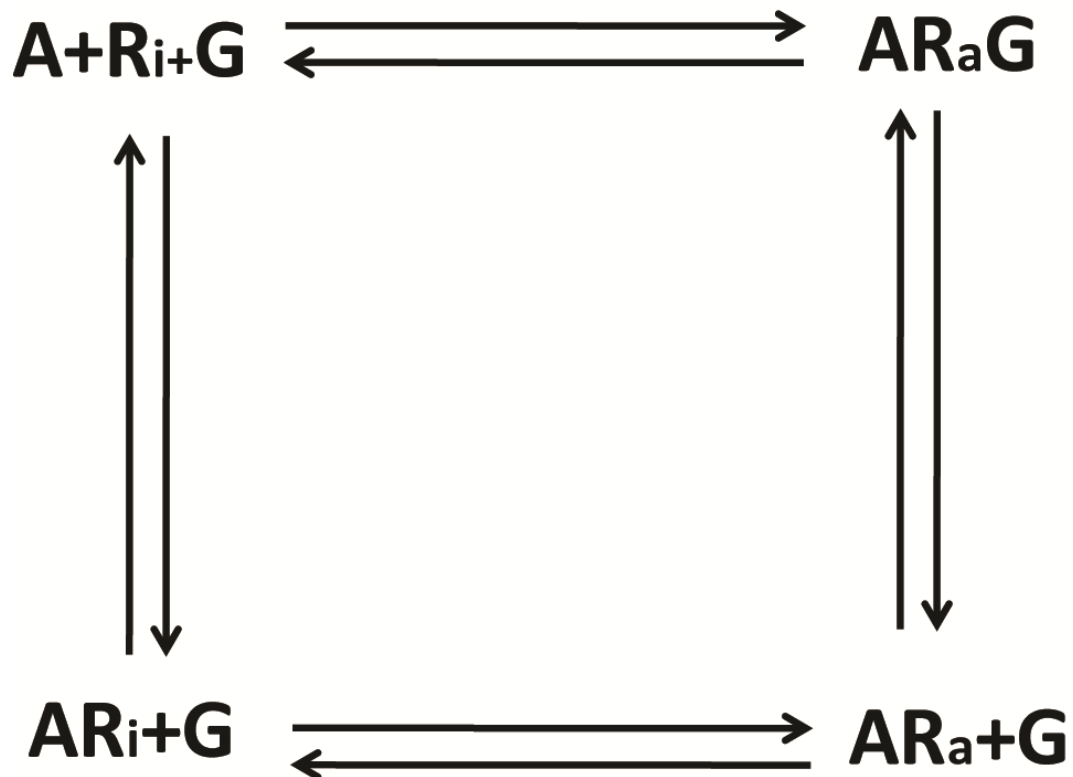


Figure 12 : Théorie pharmacologie : modèle ternaire (A = agoniste; Ri = récepteur inactif; Ra = récepteur actif; G = protéine G)

Le modèle ternaire fut modifié une première fois pour y intégrer la notion d'activité basale des récepteurs expliquant les agonistes inverses [345]. Deux autres états furent ajoutés aux quatre précédents : un état constitué de l'agoniste, du récepteur activé et de la protéine G dissociée et un état constitué de l'agoniste et du complexe récepteur activé-protéine G. Ce nouveau modèle fut nommé complexe ternaire étendu (CTE) (figure 13) [346]. Ce dernier n'expliquait toutefois pas tous les systèmes. Des études démontrèrent que certains récepteurs, par exemple le MOR [350] et le H<sub>2</sub>R [351], ont la possibilité de coupler la protéine G lorsqu'ils sont liés par des antagonistes spécifiques. D'autres récepteurs auraient la capacité de lier les protéines G sans ligand [352;353], ou en présence d'agonistes inverses [351;354]. Pour ces systèmes, un nouveau modèle fut développé pour intégrer deux nouveaux états composés d'un complexe récepteur inactif-protéine G et d'un complexe agoniste-récepteur inactif-protéine G. Ce nouveau modèle fut appelé complexe ternaire cubique (CTC) (figure 14) [253]. Évidemment, les modèles

ternaires sont grandement inspirés des principes allostériques des modèles à deux états et ils sont gouvernés par le principe de Le Chatelier des équilibres chimiques.

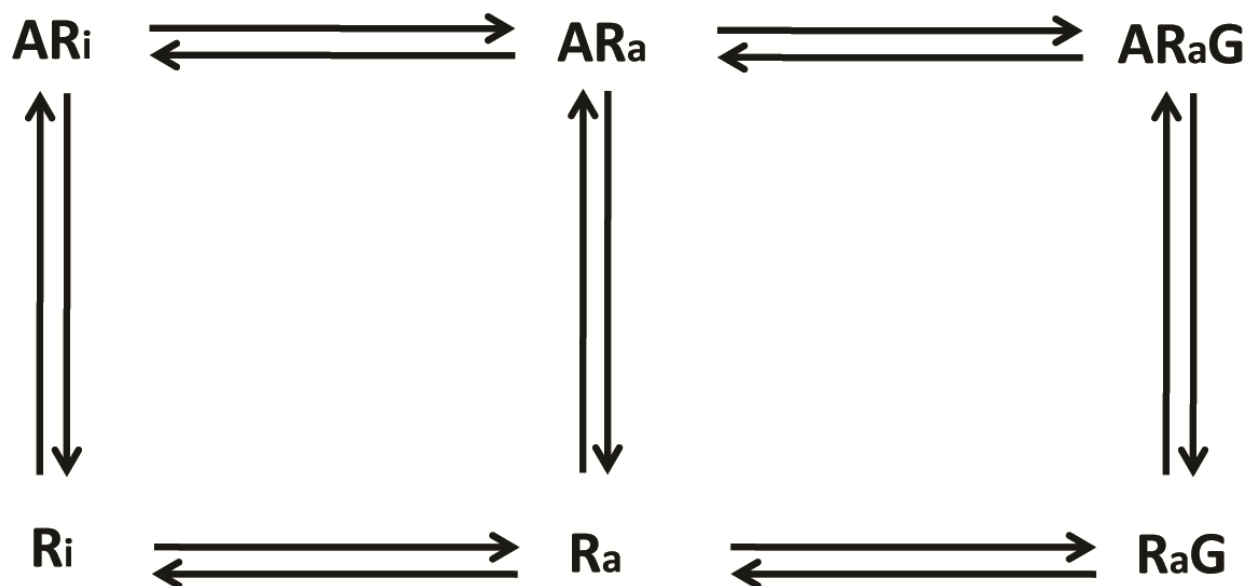


Figure 13 : Théorie pharmacologie : modèle ternaire étendu (A = agoniste;  $R_i$  = récepteur inactif;  $R_a$  = récepteur actif; G = protéine G)

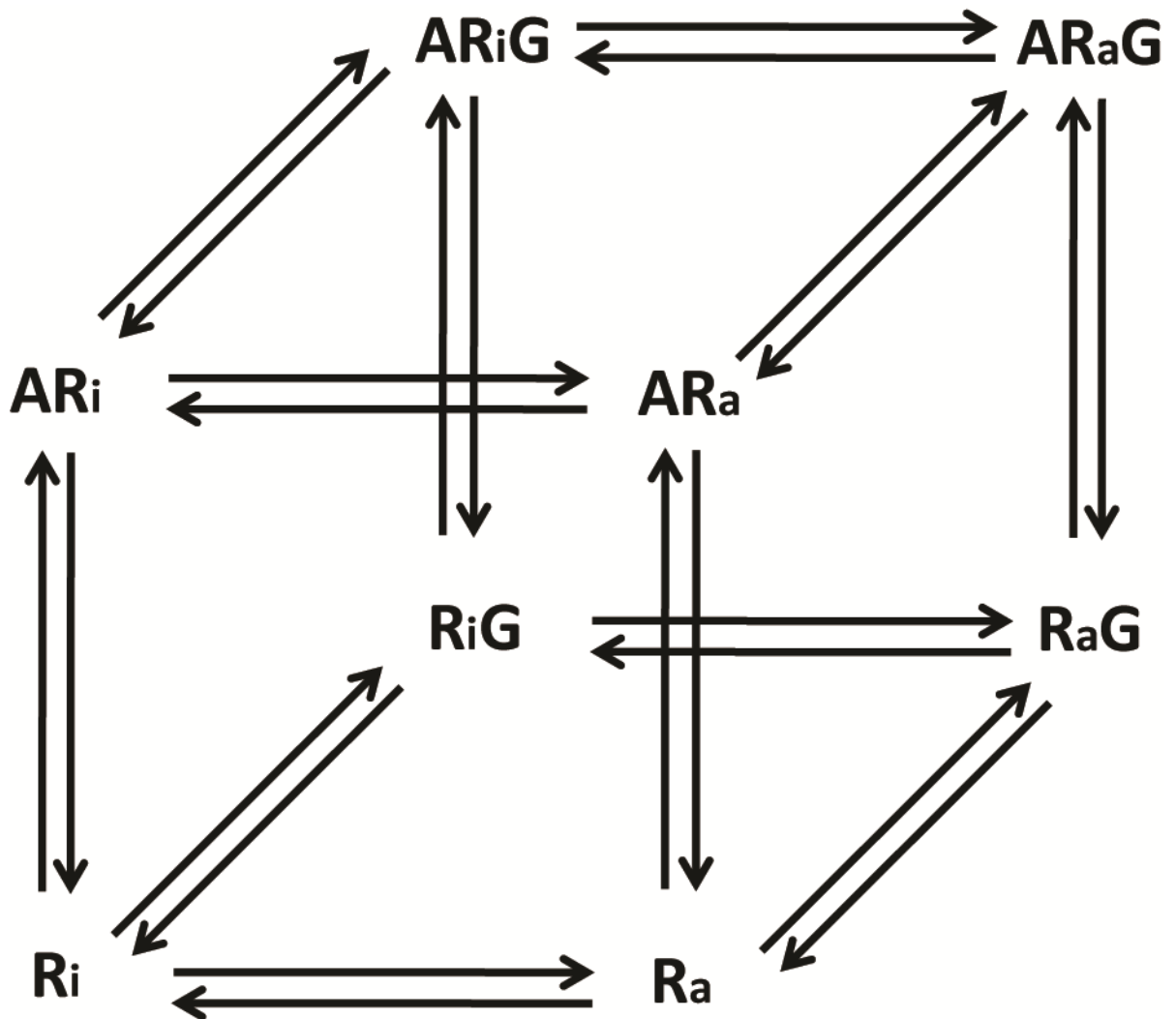


Figure 13 : Théorie pharmacologie : modèle ternaire étendu cubique (A = agoniste; Ri = récepteur inactif; Ra = récepteur actif; G = protéine G)

### 1.2.5 Le modèle « probabilistique »

Le plus gros avantage des modèles CTE et CTC est qu'il est possible d'en tirer une formule mathématique permettant de quantifier l'effet des différents ligands. Cependant, ils reposent sur la prémisse que les RCPG ne possèdent qu'une seule conformation active responsable de tous les effets dans la cellule. Ainsi, tant que l'effet des ligands n'était observé qu'au travers d'une seule voie de signalisation, par exemple l'activation de la protéine G ou l'activité de l'AC, ces modèles étaient adéquats. Cependant, le développement de différentes méthodes permettant de mesurer l'activité de différentes voies de signalisation, dépendante ou indépendante de l'activation de la protéine G allait

changer la donne au profit d'un autre modèle développé à la fin des années 90. Ce nouveau modèle, élaboré à partir de calcul de probabilité, possède comme base la capacité des protéines à adopter une multitude de microconformations dépendant de leur environnement [355]. Il assume qu'une population de récepteurs, qui ne sont pas liés à un ligand, n'existe pas sous seulement deux états de conformation (active et inactive). L'état de cette population serait plutôt représenté par une distribution d'une multitude de conformations différentes. L'ajout d'un ligand, le couplage à une protéine G ou encore à un effecteur auraient comme effet de changer l'état de distribution des conformations. Ainsi, la liaison d'un agoniste complet pour l'activation de la protéine G aurait comme effet de favoriser les conformations qui lient les protéines G actives (ou qui activent les protéines G) tandis qu'un agoniste partiel dans la même voie aurait tout simplement une autre distribution de conformation qui, au final, n'active que partiellement la voie de signalisation observée [356].

Ce modèle est plus versatile que les CTE et CTC car il peut prédire le comportement des récepteurs au-delà d'une seule voie de signalisation. Il fut d'ailleurs fortement validé cette dernière décennie par de nombreuses études démontrant la présence de multiples conformations actives pour plusieurs RCPG [357-373] et il donna naissance à un nouveau concept en pharmacologie : la sélectivité fonctionnelle des ligands (revue par [356;374]).

### **1.2.6 La sélectivité fonctionnelle**

La sélectivité fonctionnelle est la capacité d'un ligand de stabiliser des conformations actives d'un récepteur qui sont sélectives pour certaines voies de signalisation ou de régulation sans activer l'ensemble des voies associées au récepteur. Cette théorie a connu un essor considérable ces dernières années. Ce qui était considéré au départ comme des phénomènes isolés pour certains récepteurs est maintenant perçu comme un mécanisme général pour plusieurs récepteurs, si ce n'est la majorité [375;376]. Il faut toutefois comprendre que même si le concept est assez récent, des exemples de sélectivité fonctionnelle des ligands existent pour certains récepteurs depuis plus de 20 ans [377-

382]. Ces exemples étaient toutefois confondus avec un autre concept, la sélectivité fonctionnelle tissulaire.

Étant donné que les différences entre les ligands étaient observées au travers d'un seul point de vue (par exemple la réponse d'un tissu ou la production de l'AMPc), ces différences pouvaient être le reflet de l'efficacité des agonistes, de l'affinité de ceux-ci, de la densité des récepteurs sur la membrane cellulaire des différents tissus ou encore une combinaison de ces caractéristiques. Par exemple, l'oxotremorine est 2 fois plus puissant que le carbachol pour produire la contraction de l'iléon d'un cochon d'Inde au travers des récepteurs muscariniques. Toutefois, la réduction du nombre de récepteurs par alkylation a comme effet d'éliminer complètement la réponse à l'oxotremorine tandis que la réponse au carbachol reste présente, quoique sensiblement diminuée. La raison de cette perte de puissance de l'oxotremorine est très simple, l'oxotremorine est un agoniste à haute affinité, mais à faible efficacité tandis que le carbachol est un agoniste à faible affinité, mais très haute efficacité. Le premier est donc plus sensible à la diminution du nombre de récepteurs et perd complètement son effet tandis que le deuxième est capable de lier les quelques récepteurs restants et de produire un effet même si son efficacité est plus faible [383]. À première vue, ces données peuvent paraître comme étant un exemple de sélectivité fonctionnelle des ligands, elle ne représente cependant pas nécessairement la stabilisation de différentes conformations actives du récepteur, car elle s'explique facilement par les concepts d'affinité et d'efficacité au travers de deux systèmes différents : un système avec une forte concentration de récepteurs et un système avec une faible concentration de récepteurs. Et cette dernière condition est essentielle dans le concept de la sélectivité fonctionnelle des ligands [384].

Mais comment peut-on identifier plusieurs conformations actives d'un même récepteur? La réponse est assez simple, il suffit d'observer l'activité de différents ligands d'un récepteur sur plusieurs voies de signalisation à travers d'un système unique. La présence de plusieurs conformations actives dépendantes des ligands sera alors démontrée par une inversion de l'ordre d'efficacité et/ou de puissance des ligands [374;384]. Un des premiers exemples fut dévoilé par le récepteur au PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide). Des cellules LLC-PK1 furent transfectées avec le récepteur au PACAP et la

puissance relative des peptides PACAP1-27 et PACAP1-38 fut mesurée au niveau de l'accumulation de l'AMPc et de l'inositol phosphate. Les résultats furent que le peptide PACAP1-27 est plus puissant à produire de l'AMPc et moins puissant à produire l'inositol phosphate que le peptide PACAP1-38 [385], démontrant ainsi que les deux agonistes n'activent pas le récepteur de la même façon. Depuis, ce phénomène appelé agoniste dirigé ou « biased agonism » fut répertorié pour de nombreux récepteurs, et sur plusieurs voies de signalisation (voir [356] pour une liste détaillée).

Une deuxième démonstration de la présence de différentes conformations actives des récepteurs fut la découverte d'antagonistes capable de produire l'internalisation d'un récepteur. Jusqu'à cette découverte, la capacité d'un ligand à produire l'internalisation d'un récepteur avait été liée à son efficacité : un agoniste à haute efficacité internalise fortement le récepteur tandis qu'un agoniste à faible efficacité ne produit que peu ou pas d'internalisation. Pourtant, l'antagoniste D-Tyr-Gly-[(Nle<sup>28,31</sup>,D-Trp<sup>30</sup>)cholecystokinine-26–32]-phenethyl ester, un analogue de la cholecystokinine, est capable d'internaliser son récepteur sans activer ses voies de signalisation de l'AMPc et calcique. De plus, il ne produit pas la phosphorylation du récepteur [386]. Ce phénomène, aussi observé pour le récepteur 5HT2A (revue dans [387]) est incompatible avec le principe des modèles ternaires et à deux états. De plus, il suggère que les récepteurs n'ont pas besoin d'être activés pour subir l'internalisation. Ces découvertes ont bousculé beaucoup le concept pharmacologique que nous croyions bien établi.

Une de ses remises en question est la classification même des ligands selon leur efficacité à activer le récepteur en tant qu'agonistes, antagonistes ou agonistes inverses. Ce type de classification était idéal tant que les pharmacologues ne possédaient qu'un seul point de vue de l'activation des récepteurs (par exemple la contraction du muscle lisse de l'iléon ou encore l'activation de la protéine G). Cependant, il est désormais impossible de classer des ligands d'un récepteur sans en mentionner la voie de signalisation observée. Ainsi, les ligands ne doivent plus seulement être définis en fonction de leur efficacité relative aux différents récepteurs, ils doivent aussi être définis relativement aux différentes voies de signalisation activées [388].



Mais quel est l'utilité de ce concept, quel bénéfice la pharmacologie pourrait-elle en tirer? Les médicaments d'aujourd'hui possèdent plusieurs effets autres que l'effet thérapeutique recherché. Ces effets secondaires nuisent à l'observance de la posologie des patients et peuvent entraîner des problèmes graves chez certaines personnes. La sélectivité fonctionnelle permettrait de cibler la voie de signalisation responsable de l'effet thérapeutique tout en permettant de réduire l'activation des voies de signalisations produisant les effets secondaires. Cette nouvelle façon de voir la pharmacologie des RCPG rend maintenant obsolète l'idée de criblage à haut débit de ligands sur une seule voie de signalisation. Il est désormais impossible de prédire l'action d'un ligand à l'intérieur d'un organisme seulement en connaissant le récepteur cible. Nous devons maintenant convenir que chaque ligand peut avoir un profil pharmacologique distinct tout dépendant des conformations de récepteurs stabilisées par celui-ci [374]. Ceci implique que la recherche de nouveaux médicaments doit se faire en considérant plusieurs voies de signalisation cellulaire, et dans des systèmes cellulaires entiers et préférablement sur des cellules humaines en culture [356]. Évidemment, pour développer de tel essai de criblage, il faut pour cela connaître les voies de signalisations impliquées dans les effets thérapeutiques et les effets secondaires. Différentes voies de signalisation et de régulation pouvant permettre de réduire la tolérance et augmenter la durée de l'effet thérapeutique des opiacés seront explorées dans le prochain chapitre.

## **1.3 Les opiacés**

### **1.3.1 Historique et utilisation médicale**

Les opiacés et les opioïdes sont les substances qui agissent en se liant aux récepteurs opiacés. Les opiacés sont des dérivés naturels ou synthétiques de l'opium, substance obtenue à partir du latex du pavot somnifère, et les opioïdes sont des substances non dérivées de l'opium. L'utilisation de l'opium et de ses dérivés par l'humain n'est pas récente, elle remonte à plus de 3000 ans av. J.-C. comme en témoignent des tablettes sumériennes datant de cette époque [389]. L'effet sédatif de l'opium était très recherché et son commerce fut florissant durant des siècles, au point d'être à l'origine de deux

grandes guerres impliquant des puissances occidentales (Royaume-Uni, France et États-Unis) contre la Chine au milieu du 19<sup>e</sup> siècle.

Le composé le plus abondant et le plus utilisé dans l'opium est la morphine. Elle fut découverte par Armand Seguin, Bernard Courtois et Charles Derosne en 1804, mais c'est Friedrich W. Sertürner qui la décrit comme un alcaloïde végétal. De par ses effets, il lui donna le nom de morphium en l'honneur de Morphée, dieu des songes de la Grèce Antique. La propriété analgésique de la morphine en fit l'analgésique par excellence des syndromes douloureux aigus et chroniques. L'invention de la seringue hypodermique en 1850 permit à la morphine d'être le premier principe actif de plante à être injecté directement dans le sang, inaugurant ainsi l'ère moderne de la pharmacologie et de la médecine. Cette seringue a donc permis une utilisation massive de la morphine à l'hôpital et sur les champs de bataille, rendant ainsi les opérations, et surtout les amputations, supportables [389]. La morphine était aussi employée pour soigner différents types de maladies mentales tels la dépression, l'alcoolisme et les psychoses maniaco-dépressives. Certaines mères pouvaient même en donner à leurs enfants pour les endormir. Cette utilisation massive aura toutefois comme conséquence l'apparition de ce qui fut appelé « la maladie du soldat », plus tard décrit comme de la toxicomanie. Les États-Unis décidèrent alors de prohiber la production, le commerce et l'usage des opiacés en 1906 avec l'*Opium Act*. Cette loi mena au premier traité international visant le contrôle des drogues, la Convention internationale de l'opium adoptée en 1912 [389].

Les bienfaits de la morphine furent redécouverts dans les années 50 grâce au cocktail de Brompton qui fut utilisé pour soulager les souffrances de fin de vie. Cette décennie a aussi vu apparaître la synthèse chimique de la morphine et de ses dérivés tels le levorphanol ou le dextrorphan. Cependant, les opiacés connurent un essor considérable dans les années 70 par une augmentation de son utilisation médicale comme analgésique, l'identification de leurs récepteurs dans le système nerveux central [390] et la découverte des ligands endogènes [391]. Ces découvertes permirent de mieux comprendre le fonctionnement des opiacés et contribuèrent à des améliorations techniques telles des nouvelles voies d'administration ou des comprimés à action prolongée. Même si les soins aux patients furent améliorés suite à ses innovations, les effets secondaires tels la constipation, la

tolérance et la dépendance à la morphine et à ses dérivés incite toujours les médecins à rester prudent avec ces molécules.

### 1.3.2 Biologie des opiacés

Les récepteurs opiacés sont distribués dans le système nerveux central et dans le système nerveux autonome. Leur activation par des ligands endogènes ou exogènes est responsable d'une multitude de fonctions et de comportements biologiques. Ils ont démontré leur importance au niveau de la transmission de la douleur, du stress, de la dépendance, de l'apprentissage, de la mémoire, du sentiment de satiété et de la soif, du développement du système nerveux central, des maladies mentales et troubles de l'humeur, la locomotion, le système digestif, le système cardiovasculaire, la respiration et bien d'autres. La liste des systèmes biologiques influencés par l'activité des récepteurs opiacés est longue. Pour une revue de ces systèmes, voir [392;393]

#### 1.3.2.1 Les récepteurs

Il existe trois sous-types de récepteurs opiacés connus à ce jour : le  $\mu$  (MOR), le  $\delta$  (DOR) et le  $\kappa$  (KOR). Ils font tous partie du groupe  $\gamma$  de la famille de la Rhodopsin (groupe A de la classification A-F). Leur activation est associée à l'inhibition de l'adénylate cyclase par les sous-unités  $G\alpha_{i/o}$  [394-399] 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 MAPK ERK1/2[400], l'activation des PLC [401;402], l'inhibition des canaux calciques N et P/Q [403-407] et l'activation des Kir3 [408]. Les récepteurs opiacés peuvent aussi produire l'activation de la cascade ERK par la  $\beta$ arr, et ce, indépendamment de la protéine G [409].

Même si l'activation de ces trois sous-types de récepteur produit des effets antinociceptifs, la majorité des analgésiques généralement utilisés dans le traitement de la douleur cible préférentiellement le MOR. Toutefois, l'activation de ce dernier reste jusqu'à présent indissociable aux effets indésirables, limitant ainsi leur utilisation. Ces effets sont la constipation, la dépression respiratoire, la tolérance, la dépendance

physique ainsi que les risques d'abus [410-412]. Le KOR produit une analgésie qui est moins associée à un potentiel d'abus que celle produite par le MOR [412], toutefois les agonistes du KOR possèdent des propriétés psychomimétiques (qui provoquent des psychoses et des hallucinations) [413] et produisent également de la tolérance [414]. De plus, ces molécules peuvent produire des effets dysphoriques et anxiogènes [415] limitant encore plus leur utilisation en clinique. Finalement, le DOR possède un meilleur profil d'effets secondaires que les deux autres sous-types. Son activation par des agonistes provoque moins de dépression respiratoire [416], de constipation [417] et de dépendance physique [418] que les agonistes du MOR. De plus, les agonistes du DOR produisent aussi un meilleur effet analgésique dans des modèles de douleurs neuropathiques chroniques et inflammatoires [419-426]. Malheureusement, ces agonistes induisent aussi la tolérance à l'analgésie [427-430] ce qui limite leur utilisation prolongée. Quoiqu'il en soit, ce dernier sous-type de récepteur reste jusqu'à présent celui présentant le plus petit profil d'effets indésirables, il devient donc intéressant de développer des stratégies afin de réduire le développement de la tolérance aux agonistes du DOR. Pour y arriver, nous devons comprendre les causes biologiques de la tolérance aux opiacés. Différentes hypothèses seront relevées au cours des sections subséquentes.

### **1.3.2.2 Les ligands endogènes**

Les opiacés ne sont pas les seules molécules capables de lier et d'activer ces récepteurs. Les récepteurs opiacés possèdent aussi un système de ligands endogènes important pour certaines fonctions de l'organisme. Ces ligands sont impliqués dans la régulation de la douleur et de l'analgésie, la régulation du stress, l'apparition de la tolérance et de la dépendance, l'apprentissage et la mémoire, le sentiment de satiété et la soif, l'abus de drogues, le développement du système nerveux central et du système endocrinien, les troubles de l'humeur, l'activité du système digestif, etc. [392;393;431].

Les opioïdes endogènes se divisent principalement en trois groupes peptidiques se distinguant par leur précurseur. Les dérivées de la pro-enképhaline, la méthionine-enképhaline et la leucine enképhaline, possèdent une forte affinité pour le DOR et le MOR

( $K_i = 0,6$  à  $4$  nM) mais une très faible affinité pour KOR ( $K_i > 1$   $\mu$ M) [432]. Les dérivés de la pro-dynorphine, la dynorphine A, B et la néo-endorphine, se lient préférentiellement au KOR ( $K_i = 0,5$  nM). Ils ont aussi une affinité plus faible pour MOR ( $K_i = 32$  nM) mais pratiquement aucune affinité pour le DOR ( $K_i > 1$   $\mu$ M) [432]. Le troisième groupe est composé d'un seul peptide, la  $\beta$ -endorphine, dérivée de la pro-opiomelanocortine. Ce peptide possède une plus grande affinité pour le MOR et le DOR ( $K_i = 1$  nM) que pour le KOR ( $k_i = 52$  nM) [432].

Il existe aussi d'autres groupes d'opiacés endogènes possédant d'autres précurseurs. Un de ces groupes est composé des endomorphine-1 et 2. Ces peptides sont hautement sélectifs pour le MOR ( $K_i < 1$  nM) [433;434], cependant les voies de synthèse biochimique et leurs précurseurs ne sont pas encore connus. Pour un tableau illustrant les autres groupes d'opiacés endogènes et une revue plus en détail des endomorphines, voir [435].

### **1.3.2.3. La distribution cellulaire**

Les récepteurs opiacés sont situés en majorité dans le système nerveux central, mais aussi au niveau du système nerveux périphérique [436], du système digestif (seulement le MOR) [437] et du système immunitaire [438]. L'action analgésique des opiacés est toutefois principalement produite par l'activation des récepteurs du système nerveux central. Alors que leur localisation dans les différentes régions du cerveau dépend du sous-type étudié, les trois sont localisés dans la moelle épinière et peuvent contribuer à l'analgésie [439;440].

Plus spécifiquement, le DOR est localisé, au niveau du système nerveux central, dans l'amygdale, dans les bulbes olfactifs, dans le cortex, dans la protubérance annulaire du mésencéphale ainsi que dans la lamina I et II de la moelle épinière [439;440]. Le DOR possède toutefois une caractéristique qui le distingue des autres récepteurs opiacés. Contrairement à ceux-ci, le DOR serait absent de la membrane plasmique dans des conditions normales [441-446]. Suite à sa synthèse, le DOR serait plutôt transporté vers de larges vésicules denses (LDCV pour « large dense core vesicle ») [446;447] où il serait maintenu en réserve en attendant le signal lui permettant de se rendre à la membrane.

Ce signal peut prendre plusieurs formes. La stimulation du MOR est reconnue pour augmenter l'expression du DOR à la membrane des cellules [441-443]. Il est aussi connu que la bradykinine (un médiateur de l'inflammation) augmente l'expression du DOR dans les neurones du ganglion de Gasser [444] et qu'un stimulus nociceptif (activation des récepteurs vanilloïdes) produit une augmentation de l'expression du DOR dans des neurones des ganglions de la racine dorsale [447]. Un mécanisme impliquant le précurseur de la substance P (peptide relâché par les neurones lors de l'inflammation) a été proposé. Les auteurs de cette étude ont démontré que la protéine protachykynine est essentielle à l'expression du DOR à la membrane. En fait, le domaine de la protachykynine codant pour la substance P interagit avec la 3<sup>e</sup> boucle extracellulaire du DOR qui elle est responsable de la localisation du récepteur dans les LDCV [448]. Cette interaction permet au récepteur de quitter le LDCV pour se diriger vers la membrane [448]. Ce mécanisme fut toutefois mis en doute par des études sur des souris possédant une délétion du gène codant pour la protachykynine.

Dans une première étude, les auteurs ont utilisé des souris dont le gène du DOR a été remplacé par un DOR-eGFP dans le but de ne pas utiliser d'anticorps [449]. Le groupe de souris qui exprimait la protachykynine avait le même patron d'expression du récepteur que le groupe qui a une délétion du gène de la protachykynine, donc la protachykynine ne serait pas impliquée dans le transport du DOR à la membrane. Cette étude fut toutefois contestée à cause de la présence de la protéine eGFP au bout de la queue c-terminale du récepteur. Il a été démontré que la présence de cette protéine change l'expression du récepteur qui se dirige alors vers la membrane [450]. Une deuxième étude, cette fois-ci sur des souris possédant le DOR sans modifications, a démontré que l'analgésie produite par les agonistes du DOR n'est pas modifiée suite à la délétion du gène de la protachykynine [451]. La localisation exacte du DOR dans les cellules ainsi que son mécanisme d'export vers la membrane restent donc inconnus. D'autres études devront être tentées afin d'élucider les secrets de ce récepteur.

### **1.3.3 Signalisation de l'analgésie des opiacés**

Les opiacés peuvent produire de l'analgésie tout au long du système nerveux responsable de la transmission du stimulus nociceptif. Toutefois, comme indiqué précédemment, c'est dans le système nerveux central que s'effectue la majorité de l'analgésie. Leurs mécanismes d'action reposent essentiellement sur l'inhibition de la transmission nociceptive. Les récepteurs opiacés les plus étudiés sont ceux situés au niveau présynaptique et postsynaptique de la première synapse centrale de la moelle épinière.

Les récepteurs situés au niveau présynaptique ont comme fonction de diminuer la relâche des neurotransmetteurs par les neurones nociceptifs. Cette inhibition présynaptique est causée par l'effet des récepteurs opiacés sur les canaux ioniques, principalement la fermeture des canaux Cav2. Cet événement compromet la relâche des neurotransmetteurs, diminuant ainsi la transmission du signal nociceptif vers le neurone postsynaptique.

Les récepteurs situés au niveau postsynaptique produisent leur effet au travers des Kir3, conduisant ainsi à une hyperpolarisation du neurone. Cette hyperpolarisation empêche ce dernier d'être excité par les neurotransmetteurs présents dans la synapse, ce qui bloque la transmission du signal nociceptif [439;440].

### **1.3.4 Mécanisme de tolérance aux opiacés**

La tolérance aux analgésiques opiacés apparaît normalement après des administrations répétées de ces molécules. Cette tolérance, qui est un obstacle important pour la gestion des douleurs chroniques, est liée à une désensibilisation du récepteur et à des adaptations au niveau cellulaire qui neutralisent les effets de l'activation des récepteurs opiacés [452;453]. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'apparition de la tolérance à l'analgésie par les opiacés. D'ailleurs, ces molécules ne semblent pas produire la tolérance de la même façon. Certains opiacés provoquent une tolérance aiguë après une seule administration tandis que d'autres peuvent prendre plusieurs administrations réparties

sur plusieurs jours avant l'apparition de celle-ci [430]. Pour les besoins de cette thèse, le lien entre la désensibilisation du récepteur et la tolérance sera principalement exploré.

Tel qu'expliqué dans le premier chapitre, la désensibilisation du récepteur et de sa signalisation peut subvenir soit par la phosphorylation du récepteur, par son découplage fonctionnel de la protéine G, par son internalisation et finalement, par un tri postendocytique favorisant sa dégradation. Cette désensibilisation fut un des premiers mécanismes proposés pour expliquer la tolérance aux opiacés. Toutefois, cette hypothèse était mise à mal par le fait que la morphine, qui produit une forte tolérance à l'analgésie [454], était incapable de produire la désensibilisation [455;456] et l'internalisation [457;458] du MOR et du DOR dans des systèmes hétérologues. Ce fort potentiel pour la tolérance en absence de désensibilisation fut d'abord expliqué par une adaptation cellulaire qui neutraliserait la signalisation du récepteur [455;457;459]. Cependant, l'incapacité de la morphine à produire la désensibilisation des récepteurs opiacés ne peut être généralisée à tous les systèmes cellulaires. Les dernières années ont démontré que cette drogue peut produire le recrutement de la  $\beta$ arr, la désensibilisation et l'internalisation du MOR [460-462] ou la phosphorylation du DOR [463] dépendamment du système cellulaire étudié. Il a été démontré que la morphine peut produire l'internalisation du MOR dans les neurones du striatum [464] mais pas dans les neurones du locus coeruleus [465;466], de la racine dorsale des ganglions [467] ou du plexus entérique [468;469]. L'importance de l'internalisation dans la tolérance à la morphine reste encore à étudier. Quoi qu'il en soit, des études sur des souris avec une délétion du gène de la  $\beta$ arr2 ont démontré une augmentation de la durée de l'analgésie [470;471].

L'internalisation du récepteur n'est toutefois pas automatiquement synonyme de désensibilisation. Pour déterminer les conséquences fonctionnelles de l'internalisation, il faut en connaître le tri postendocytique. Ainsi, un récepteur ayant la capacité de recycler à la membrane plasmique peut se resensibiliser et produire de nouveau la signalisation [392;472], tandis qu'un récepteur qui se dirigera vers les mécanismes de dégradation après son internalisation se verra désensibilisé à long terme [473;474]. Autant le MOR [475] que le DOR [302;476;477] ont démontré qu'ils peuvent être recyclés à la suite de leur internalisation. Le DOR est toutefois particulier, car il a démontré différentes



capacités de recyclage dans un même système cellulaire, selon le ligand qui le lie [476]. Ainsi, l'agoniste SNC-80, qui provoque l'internalisation du DOR et sa dégradation [473;476], produit une tolérance aiguë [429] et chronique [430] à l'analgésie tandis que l'agoniste deltorphine II, qui provoque l'internalisation du DOR et possiblement son recyclage [478;479], ne produit pas de tolérance aiguë [428].

La tolérance à l'analgésie peut aussi subvenir à la suite de la désensibilisation de l'effecteur. Une étude a démontré qu'un ligand incapable de désensibiliser le DOR et de produire une tolérance aiguë à l'analgésie à court terme, l'AR-M1000390 [479], peut produire la tolérance à l'analgésie au bout de 5 jours de stimulation [430]. Cette tolérance à l'analgésie fut associée à la désensibilisation de l'effecteur (le canal calcique) car la quantité de DOR présent à la surface des neurones n'a pas été modifiée et l'effet de la stimulation de ce dernier sur l'activité locomotrice et anxiolytique a été conservé. Le DOR restait donc actif, mais il était incapable de bloquer les canaux calciques. Cette expérience démontre clairement que la tolérance à l'analgésie peut se produire selon plusieurs mécanismes différents et qu'une meilleure compréhension de ces mécanismes est nécessaire pour le développement d'analgésiques opiacés à efficacité prolongé.

## **2. Hypothèse et objectifs**

L'hypothèse générale de cette thèse est la suivante : les ligands du DOR stabilisent différentes conformations actives du récepteur et l'exploitation de la sélectivité fonctionnelle qui en découle permettrait de réduire les effets secondaires de ces analgésiques, en l'occurrence la tolérance à l'analgésie. Pour tester cette hypothèse, nous avons débuté par étudier l'activation des voies de signalisation du DOR par différents ligands. Deuxièmement, nous avons évalué les changements de l'interaction entre le DOR et sa protéine G suite à l'activation du récepteur par différents ligands. Finalement, nous avons caractérisé les conformations distinctes produites par un traitement prolongé avec deux agonistes complets au niveau de la régulation du DOR, de la désensibilisation de ses voies de signalisation et de la tolérance à l'analgésie produite par ces agonistes.

**1) Étude fonctionnelle des voies de signalisation activées par différents ligands du DOR : le récepteur peut adopter des conformations actives distinctes.** Cette étude fut effectuée à la suite des nombreux indices démontrant la possibilité que les ligands de certains RCPG puissent stabiliser différentes conformations actives de leur récepteur [480-483]. Certains ligands stabiliseraient des conformations de leur récepteur qui favoriseraient certaines voies de signalisations ou de régulation au détriment d'autres voies. Le potentiel thérapeutique d'une telle découverte était grand, nous avons donc voulu démontrer que le DOR pouvait aussi être stabilisé sous différentes conformations actives. Pour y arriver, nous avons testé l'efficacité de différents ligands, allant des agonistes complets aux agonistes inverses en passant par les agonistes partiels et les antagonistes, dans deux voies de signalisation, la voie des MAPK ERK1/2 et la voie de l'AMPC. Le but était de trouver une inversion de l'ordre d'efficacité des ligands indiquant la présence de différentes conformations actives du DOR (section 1.2.6 Sélectivité fonctionnelle). Par la suite, nous avons caractérisé les différences entre les conformations stabilisées par l'agoniste complet DPDPE et un ligand à double efficacité, le TICP. Les différences observées ont confirmé que ces deux ligands stabilisent des conformations actives distinctes du récepteur.

**2) Étude de l'interaction entre le DOR et sa protéine G : une vision 3D des changements de conformations du complexe.** Pour cette étude nous avons tiré avantage de la technique BRET qui permet d'évaluer partiellement la distance entre deux protéines qui interagissent. Nous avons donc observé les changements de l'interaction DOR/protéine G et les changements entre les sous-unités de la protéine G à la suite d'une exposition aiguë avec différents agonistes. Ces changements furent ensuite corrélés entre eux et avec l'efficacité des ligands à produire l'accumulation de l'AMPC ou la phosphorylation des MAPK ERK1/2.

**3) Étude de la régulation du DOR à la suite d'une stimulation prolongée par différents agonistes : la sélectivité fonctionnelle permet la réduction de la tolérance aiguë.** Cette étude fait suite à la découverte qu'une stimulation prolongée avec les agonistes complets DPDPE (peptide) ou SNC-80 (alkaloïde) stabilise des conformations distinctes du complexe DOR/protéine G. Nous avons caractérisé ces différentes conformations selon leur capacité

à internaliser, à recycler à la membrane, à se désensibiliser et finalement, à induire la tolérance à l'analgésie. Ainsi, nous avons pu établir que la conformation stabilisée par SNC-80 interagit fortement avec la  $\beta$ arr2 et G $\gamma$ 2. Cette interaction empêche le récepteur de recycler à la membrane produisant ainsi une plus grande désensibilisation qui est corrélée avec un développement de la tolérance aiguë à l'analgésie chez la souris.

### 3. Résultats

#### 3.1 Première publication

Audet et al. (2005). Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligand. *Journal of biological chemistry*, **280 (9)** : 7808-7816.

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

Le début du 21<sup>e</sup> siècle fut une période foisonnante pour la recherche sur les RCPG. Les progrès effectués en biologie moléculaire à la fin du 20<sup>e</sup> siècle ont permis le développement d'outils permettant d'analyser ce qui se passait réellement dans une cellule et également d'en contrôler la composition. Ces outils, entre autres le clonage des protéines et les systèmes hétérologues de surexpression, ont permis une refonte complète des théories pharmacologiques d'activation des récepteurs. Une de ces découvertes fut l'ajout d'une nouvelle classe de ligand, l'agoniste inverse. Pour expliquer cette nouvelle classe, le concept d'activité basal du récepteur fut ajouté. Dans des systèmes biologiques normaux où l'activité basale des récepteurs est faible, tels des vaisseaux sanguins ou des intestins de cobaye, ces ligands avaient été classés comme antagoniste. Les exemples de ligands initialement classés comme antagonistes, mais qui sont en réalité des agonistes inverses sont maintenant légion, au point où ce sont les antagonistes purs qui sont rares [356].

La classification des ligands sous les termes d'agonistes, d'antagonistes et d'agonistes inverses était basée sur leur efficacité dans une seule voie de signalisation. Cette vision en

une seule dimension était élégante et simple. Toutefois, l'augmentation des connaissances de la biologie de la cellule a permis d'associer plusieurs voies de signalisation pour chaque RCPG. Il ne fallut pas très longtemps avant qu'on découvre des ligands classés agoniste inverse dans la voie des AC mais ayant une signalisation agoniste dans d'autres voies de signalisation telle la cascade ERK1/2 [484]. Ou encore des antagonistes capables d'internaliser leurs récepteurs, donc agonistes dans la voie de régulation [485]. Aujourd'hui, il y a maints exemples de ligands à plusieurs efficacités au point où il est hasardeux de nommer l'efficacité d'un ligand sans nommer la voie de signalisation [388].

C'est donc dans ce contexte que nous avons décidé de comparer l'efficacité de différents ligands du DOR au travers de deux voies de signalisation : l'activation de l'AMPc et la phosphorylation des MAPK ERK1/2. Les résultats ont démontré une inversion de l'ordre d'efficacité entre les agonistes partiels et les agonistes inverses dans la voie de l'AMPc, ces derniers étant agonistes dans la voie des MAPK ERK1/2. Entre autres, le TICP qui est moins efficace que la morphine pour produire une diminution de l'AMPc est plus efficace que cette dernière pour activer la voie des MAPK ERK1/2. Ceci constitue en soit une preuve que le TICP stabilise une conformation active du DOR qui est différente des agonistes partiels. Nous avons ensuite comparé ce qui distingue la conformation stabilisée par TICP de celle stabilisée par DPDPE au niveau de la cinétique d'activation des MAPK ERK1/2.

Nous avons ainsi pu démontrer que le TICP produit une activation prolongée des MAPK ERK1/2 qui est dépendante de la protéine Gi et de l'activité de la tyrosine kinase Src tandis que le DPDPE produit une brève activation de cette voie de signalisation. Cette courte durée d'activation est régulée par l'internalisation du récepteur ainsi que sa phosphorylation par une tyrosine kinase dépendante de l'activité de Src. Cet article est un des premiers qui démontre clairement que deux ligands (le TICP et le DPDPE) peuvent stabiliser des conformations actives différentes au niveau de leur signalisation et de leur régulation, contredisant par le fait même la théorie pharmacologique dominante de l'époque, le modèle à deux états (actif et inactif). Il est maintenant acquis que les RCPG peuvent avoir plusieurs conformations actives.

### **3.1.2 Article 1**

**INTERNALIZATION AND SRC ACTIVITY REGULATE THE TIME COURSE OF ERK  
ACTIVATION BY DELTA OPIOID RECEPTOR LIGANDS.**

by

Nicolas Audet<sup>1</sup>, Mélanie Paquin-Gobeil<sup>1</sup>, Olivier Landry-Paquet<sup>2</sup>, Peter Schiller<sup>3</sup>  
and Graciela Piñeyro<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal.

<sup>2</sup> Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal

<sup>3</sup> Institut des Recherches Cliniques de Montréal, Université de Montréal.

<sup>4</sup> Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université de Montréal

**Corresponding author:**

Graciela Pineyro; MD, PhD  
Département de Psychiatrie  
Université de Montréal  
7331 Rue Hochelaga,  
Montréal, Qc, H1N3V2

**Running title:** Internalization and Src regulate kinetics of ERK stimulation

**Abbreviations:** BSA: Bovine serum albumine; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMSO: Dymethyl sulfoxide; DOR: delta opioid receptor; DPDPE: D-Pen 2,5 – Enkephalin; ERK: extracellular signal-regulated kinase; GPCRs: G protein couple receptors; GRKs: G protein couple receptor kinase; IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthine; MAPK: mitogen-activated protein kinase; PP2: 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4,d]pyrimidine; PTX: Pertussis Toxin; TICP: Tyr-Ticpsi [CH<sub>2</sub>-NH]Cha-Phe-OH.

## **ABSTRACT**

The present study showed that delta opioid receptor (DOR) ligands TICP and ICI174864 behaved as inverse agonists in the cyclase pathway but induced agonist responses in the ERK cascade. Unlike ligands that behaved as agonists in both pathways, and whose stimulation of ERK was marked but transient (10min), ERK activation by ICI174864 and TICP was moderate and sustained, lasting for more than one hr in the case of TICP. Biochemical experiments showed that duration of ERK activation by agonists and “dual efficacy ligands” was inversely correlated with their ability to trigger receptor phosphorylation and degradation. Thus, while TICP stabilized DORs in a conformation that did not incorporate  $^{32}\text{P}$ , was not a substrate for tyrosine kinase Src and was not down-regulated following prolonged exposure to the drug, the conformation stabilized by DPDPE incorporated  $^{32}\text{P}$ , was phosphorylated by Src and suffered degradation within the first two hrs of treatment. Inhibition of endocytosis by sucrose prolonged ERK activation by DPDPE increasing the decay half-life of the response to values that resembled those of “dual efficacy ligands” (from 2min decay  $t_{1/2}$  increased to 12min). Src inhibitor PP2 also prolonged ERK stimulation by DPDPE. It did so by maintaining a sustained activation of the kinase at  $\approx 20\%$  of maximum following an initial rapid reduction in the response. These results show that specific kinetics of ERK activation by agonists and “dual efficacy” ligands are determined, at least in part, by the differential ability of the two types of drugs to trigger mechanisms regulating DOR responsiveness.

## **INTRODUCTION**

Occupation of GPCRs by agonist ligands has two distinct consequences, the generation of an intracellular signal and the concomitant activation of a series of regulatory mechanisms that modulate receptor responsiveness over time. The chain of regulatory events triggered by agonist occupation of the receptor has been extensively characterized and has led to an established model of desensitization in which phosphorylation of the receptor by GRKs is the first step in the process (1,2). Phosphorylation then promotes the recruitment of  $\beta$ arrestin (3,4), which is responsible for uncoupling the receptor from the Gprotein (5) and for its targeting to clathrin-coated pits. From there receptors will be removed from the cell surface via dynamin-dependent endocytosis (6). Once inside the cell the receptor is either degraded or is quickly redirected to the cell membrane (7) for a new signalling cycle.

Despite the overwhelming evidence supporting this tightly knit model of activation and desensitization, there are also increasing number of observations indicating that activation and regulatory phenomena can be dissociated. For example, antagonist ligands for cholecystokinin (8) and endothelin receptors (9) selectively induce internalization without causing neither receptor activation nor phosphorylation. Agonists for parathyroid hormone type 1 receptor stabilize an active state that promotes signalling but does not recruit  $\beta$ arrestin or induce internalization (10). In contrast, certain beta2-adrenergic receptors ( $\beta_2$ AR<sub>s</sub>) ligands that preclude Gprotein activation are still able to recruit  $\beta$ arrestin to the receptor (11).



Ligands that stabilize GPCRs in a conformation that prevents activation of the Gprotein are classified as inverse agonists, and are commonly thought to induce an inactive conformation of the receptor (12,13). More recently, some of these drugs have been described as “proteans” or “dual efficacy ligands”, referring to their ability to display both agonist and inverse agonist behaviour (11,14-16). For example, we have recently shown that ICI118551 and propranolol, two ligands of the  $\beta_2$ AR display dual efficacy since they behave as inverse agonists in the cyclase pathway but produce agonist responses in the ERK cascade (11).

The observation that some “inverse agonists” may produce agonist responses indicates that the conformation they stabilize is not inactive, but rather a signalling state that is distinct from the one stabilized by classical agonists. If receptor states stabilized by agonists and dual efficacy ligands are distinct, then one would expect that the responses that they elicit also be regulated in a distinct manner. The present study focused on this question, assessing whether agonistic responses generated by "dual efficacy ligands" for the DOR were regulated as agonist responses induced by its classical agonists. Results show that ERK activation by dual efficacy ligands like TICP and ICI174864 was considerably longer, though more modest than the response induced by agonists such as SNC-80 and DPDPE. Differences in time course were associated with the distinct ability of dual efficacy ligands to stabilize DORs in an ERK stimulating conformation that eluded regulatory steps typically triggered by highly efficacious agonists.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

*Reagents.* Buffer chemicals, protease inhibitors, DPDPE, morphine, naloxone, forskolin, IBMX, PTX, sucrose, anti-FLAG M2 affinity resin, and FLAG peptide were purchased from Sigma. [486]GTP $\gamma$ S, [<sup>3</sup>H]adenosine and [<sup>32</sup>P]orthophosphoric acid were from Perkin-Elmer. ICI174864 and SNC-80 were obtained from Tocris Cookson, TIPP and TICP $\Psi$  were synthesized as previously described (17). 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) was from calbiochem. G418, DMEM, fetal bovine serum, fungizone, glutamine, penicillin, streptomycin were purchased from Wisent.

*DNA Constructs.* The human DOR cDNA was subcloned into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen) as previously described (18), and was tagged at the C-terminal end using CLONTECH site-directed mutagenesis kit to remove the stop codon and introduce the sequence coding for the FLAG epitope (DYKDDDDK). The construction was confirmed by restriction enzyme mapping and DNA sequencing, and its signalling properties shown to be identical to those of the wild type DOR (19,20). A truncated mutant of the murine DOR (DOR344T), was kindly provided by Dr. M. von Zastrow (UCSF). Wild-type and inhibitory mutant forms of c-Src (K295R/Y527F) were a gift from Dr Bouvier's laboratory (Université de Montréal).

*Cell Culture and Transfection.* HEK 293s cells were transfected using the calcium-phosphate precipitation method and clones stably expressing full length or truncated receptors were selected using 400  $\mu$ g/ml of G-418. Cell lines stably expressing full length DORs and wild type c-Src were similarly selected, following lipofectamine transfection (Invitrogen). The dominant inhibitory form of c-Src (K295R/Y527F) was transiently transfected (0.25-3  $\mu$ g DNA) onto cell lines

expressing the full length DOR using polyethylenimine as previously described (21). Cells were grown and maintained in complete DMEM containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 1000 units/ml penicillin, 1 mg/ml streptomycin, and 1.5 µg/ml fungizone) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 C.

*Phosphorylation and immunoprecipitation of flag-tagged receptors.* For [<sup>32</sup>P] incorporation assays, cells were incubated for 2 h in phosphate-free DMEM, after which [<sup>32</sup>P]orthophosphoric acid was added at a final concentration of 1 mCi/ml and incubation allowed to proceed for an additional hr. At this time, DPDPE (1µM), TICP (1µM) or vehicle (0,01% DMSO) were added to the incubation medium for 30 min. Cells were then recovered, membranes prepared as indicated below and finally suspended in solubilization buffer (0.5% n-DDM (w/v), 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 140 mM NaCl, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 10 µg/ml benzamidine, 2.µg/ml aprotinin, 0.5 mM PMSF, and 2 mM 1,10-phenantroline). Following agitation at 4°C for 60 min, the solubilized fraction was centrifuged at 12 000 g for 60 min and the receptor immunoprecipitated from the supernatant fraction using anti-FLAG M2 antibody resin. 40 µl of antibody-coupled resin equilibrated in solubilization buffer and supplemented with 0.1% BSA (w/v) were used to purify the receptor overnight at 4°C under gentle agitation. The next morning the resin was pelleted, washed twice with 500 µl of solubilization buffer and four times with 500 µl of modified solubilization buffer (containing 0.1% instead of 0.5% n-DDM (w/v)). The receptor was then eluted by incubating the resin for 10 min at 4°C with 100 µl of modified solubilization buffer containing 175 µg of FLAG peptide/ml. This elution was repeated three times, the eluates combined and concentrated by membrane filtration over Microcon-30 concentrators (Millipore). SDS sample buffer was then added, and samples used for SDS-PAGE. Similar immunoprecipitation procedure was used to assess TYR-phosphorylation of DORs.

*SDS-PAGE and Western Blotting.* SDS-PAGE was performed as described by Laemmli using a 4% stacking gel and 10% separating gel. Proteins resolved in SDS-PAGE were then transferred (50 mA, 16 h, Bio-Rad Mini-Trans Blot apparatus) from the gels onto nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech;). In the case of [<sup>32</sup>P] incorporation studies, membranes were first exposed for autoradiography (BIOMAX films; KODAK). When assessing TYR-phosphorylation of DORs, membranes were probed overnight at 4°C with monoclonal antibodies raised against phosphorylated TYR (1:500; PY99, Santa Biotechnologies, CA). In both cases antisera directed against the FLAG M2 antibody (1:1000; Sigma) was used in order to detect the total amount of receptor protein present in each sample. Horseradish peroxidase-conjugated antimouse secondary antibodies (1:4000, Sigma) and enhanced chemiluminescence detection reagents (NEN Life Science Products) were used to reveal the blotted proteins, and relative intensities of the labeled bands were analyzed by densitometric scanning using MCID (Imaging Research Inc). Receptor phosphorylation was expressed as the ratio between phosphorylation and FLAG signals in order to normalize to the amount of receptor protein present in each sample.

For detection of ERK1/2 activation, cells were grown in six well plates and serum starved overnight. The day of the experiment they were cultured for 2 hr in serum-free medium and then exposed to different ligands. Following treatment, cells were washed with ice-cold phosphate buffered saline and whole cell extracts prepared by lysis in SDS sample buffer. Samples were sonicated and then boiled for 5 min before loading for SDS-PAGE. Phospho-ERK1/2 detection was done by probing membranes with antiphospho-ERK1/2 antibody (1:1000; Santa Cruz, Biotechnology). Total ERK protein was determined after stripping by using 1:20,000 dilution anti-ERK1/2 antibody (Santa Cruz, Biotechnology). Secondary

antimouse (1:5000; Sigma) and antirabbit (1:40000; Amersham) horseradish-conjugated antibodies were used to visualize proteins by chemiluminescence. ERK1/2-phosphorylation was normalized according to protein contents by expressing results as the ratio between pERK1/2 and total ERK1/2.

To assess Src activation cells were grown in 100mm petri dishes and prepared for the experiment as described for ERK1/2. Following treatment with different ligands cells were washed, harvested, and solubilized in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% triton X100, 0,25% deoxycholate acid, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 10 µg/ml benzamidine, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) at 4°C for 90 min. After centrifugation of non-solubilized debris at 12 000 g for 20 min samples were concentrated, suspended in SDS sample buffer and separated in SDS-PAGE. Anti-phospho-Src (Y416) monoclonal antibody (Upstate Biotechnology, NY) at a dilution of 1:1000 was used in order to determine the presence of activated Src and total amount of protein loaded was detected by probing with antibody anti Src (1:1000; Upstate Biotechnology).

*cAMP accumulation assays.* Cells were labeled overnight (16 hours) with 1 µCi/ml of [<sup>3</sup>H]adenine in complete DMEM medium. The day of the experiment radioactive medium was replaced with fresh DMEM, cells mechanically detached, thoroughly washed (3 times) with PBS (4°C) and viability assessed using trypan blue (mortality was never higher than 5%). 5 x 10<sup>5</sup> cells were then incubated for 20 min at 37°C in 300 µl assay mixture containing PBS, 25 µM forskolin, 2.5 µM IBMX, and different drugs at the indicated concentrations. At the end of the incubation period, the assay was terminated by adding 600 µl ice cold solution containing 5% trichloroacetic acid, 5mM ATP and 5mM cAMP. [<sup>3</sup>H]ATP and [<sup>3</sup>H]cAMP were separated by sequential chromatography on Dowex exchange

resin and aluminum oxide columns. Results were expressed as the ratio of  $[^3\text{H}]\text{cAMP}/[^3\text{H}]\text{ATP} + [^3\text{H}]\text{cAMP}$ .

*[486]GTP $\gamma$ S binding assays* were carried out on whole cell membrane preparations as previously described (20), cells were suspended in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  soybean trypsin inhibitor, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  benzamidine) and homogenized with a Polytron homogenizer (Ultra-Turrax T-25, Janke and Kunkel) using three bursts of 5 s at maximum setting. Homogenates were centrifuged at  $700 \times g$  for 5 min, and the supernatant was further centrifuged at  $27,000 \times g$  for 20 min. Pellets were washed twice in lysis buffer and were immediately resuspended in [486]GTP $\gamma$ S assay buffer (50 mM HEPES; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0.5% BSA and 3  $\mu\text{M}$  GDP; pH 7.4) to yield 10  $\mu\text{g}$  protein/tube. [486]GTP $\gamma$ S<sup>[35]</sup> was used at 50nM and non-specific binding was determined in the presence of 100  $\mu\text{M}$  GTP. The test compound SNC-80 was introduced at a final concentration of 100 nM and incubation was allowed to proceed for one hour at RT. The reaction was terminated by rapid filtration onto Whatman GF/C glass filters pre-soaked in water. Filters were washed twice with ice-cold wash buffer (pH 7) containing 50 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM NaCl, and the radioactivity retained was determined by liquid scintillation.

*Data analysis.* Statistical analysis and curve fitting were done using GraphPad Prism 2.01 (San Diego, California)

## **RESULTS**

***Comparison of the effects of DOR ligands in cAMP and ERK signalling cascades.*** It has been previously shown that certain ligands for  $\beta_2$ ARs display dual efficacy, inducing inverse agonist responses in the cAMP signalling pathway, but producing agonist effects in the ERK cascade (11). To determine whether this type of dual behaviour was specific to Gs-coupled receptors or could be extended to receptors coupled to Gi/o proteins, different ligands for the DOR were compared in adenylyl cyclase and ERK signalling pathways. In the cAMP pathway ligands produced effects that spanned the complete spectrum of efficacy ranging from agonism to inverse agonism. At maximally effective concentrations (1 $\mu$ M) SNC-80 and DPDPE were highly efficacious agonists, morphine, TIPP and naloxone were partial agonists while ICI174864 and TICP displayed typical inverse agonist responses. Figure 1A shows these different ligands ranked according to magnitude and vectorial aspects of their efficacies (SNC-80  $\geq$  DPDPE > MOR  $\geq$  TIPP  $\geq$  Nx > ICI174864 > TICP). In contrast with the diversity of responses observed in cAMP accumulation assays all drugs tested in the ERK cascade behaved as agonists, except for naloxone that was neutral. Indeed, ERK phosphorylation was induced not only by drugs that behaved as agonists in the cyclase cascade but also by TICP and ICI174864, which had produced inverse agonist responses when tested in this pathway. Moreover, when ranked according to the magnitude of their effect on ERK phosphorylation, TICP, the most efficacious inverse agonist in the cyclase pathway was now more effective than partial agonists TIPP and morphine in activating ERK (SNC-80 > DPDPE > TICP  $\geq$  TIPP  $\geq$  ICI174864  $\geq$  MOR > Nx).

Dual efficacy ligands for the  $\beta_2$ AR produce ERK activation via  $\beta$ arrestin recruitment and independently of Gprotein activity (11). In order to determine whether this was also the case for Gi/o-coupled receptors, cells were treated overnight with PTX, and ERK activity assessed the following day. Without modifying basal activity of the kinase (pERK/totalERK ratio in controls:  $0.6 \pm 0.1$ ; following PTX:  $0.6 \pm 0.1$ ), PTX abolished ERK stimulation by classical agonist DPDPE and by dual efficacy ligand TICP (figure 1C). These results indicate not only that ERK stimulation by DPDPE and TICP requires Gi/o protein activity but also that simple inactivation of spontaneous Gi/o signalling cannot account for ERK stimulation. Neither TICP, ICI174864 nor classical agonists were able to evoke ERK activation in non-transfected cells (not shown), confirming that ligand-induced stimulation of ERK signalling was specifically mediated by the DOR.

***DOR ligands differ in their kinetics of ERK activation.*** To determine whether the time course of ERK activation by classical agonists differed from that of dual efficacy ligands cells were exposed to a maximally effective concentration (1  $\mu$ M) of each drug, and ERK phosphorylation measured following increasing periods of time. Two main types of kinetic profiles could be recognized. One was characteristic of highly efficacious ligands like SNC-80 and DPDPE which produced quick and pronounced ERK activation that peaked within 5 min (figure 2A), decaying right away with a calculated half-life ( $t_{1/2}$ ) of approximately 2 min (figure 2B and 2C). The other type of response, induced by partial agonists and dual efficacy ligands was less pronounced but more sustained, decaying with a  $t_{1/2}$  that ranged between 11 and 14 min (figure 2B and 2C). Among ligands inducing sustained responses, the effect of TICP could be distinguished from the rest of the



drugs in the same category, because its effect was more pronounced and particularly more sustained ( $p < 0.001$  two way ANOVA; figure 2A and 2B).

***The time course of ERK activation by highly efficacious agonists and dual efficacy ligands is correlated with desensitization parameters.*** One of the primary checkpoints that controls drug effects over time is the receptor itself. In particular, DOR signalling efficacy is regulated by phosphorylation of C-terminal Ser/Thr residues (22,23). In order to determine whether differences in the time course of ERK activation could be related to the distinct ability of different ligands to trigger phosphorylation of DORs cells were exposed for 30 min to DPDPE or TICP (1 $\mu$ M) in the presence of [ $^{32}$ P]orthophosphoric acid. Receptors were immunopurified, resolved on SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes that were first exposed for autoradiography and then used for western blot analysis using an anti-FLAG M2 antibody. Immunoblots revealed two broad bands at  $\cong 55$  and  $\cong 46$  kDa, corresponding to mature and immature monomeric forms of the receptor, respectively (24). Autoradiograms showed that 30 minutes incubation with DPDPE increased  $^{32}$ P incorporation by the  $\cong 55$  kDa species, but this effect was absent for TICP. Thus, at a time when the ERK response for the agonist was no longer present DORs were heavily phosphorylated. In contrast, ERK activation by the dual efficacy ligand was still at its maximum and no phosphorylation of the receptor could be detected.

Phosphorylation is an initial step in the process of desensitization, but if exposure to an agonist is allowed to proceed long enough DORs will start to be targeted for degradation (7). Hence, to confirm whether the different time course of ERK activation by DPDPE and TICP also correlated with later events in the process of desensitization cells were treated for 2 hrs either with the agonist or the

dual efficacy drug. Following treatment the total amount of DOR protein present in membrane preparations was assessed by immunoblot (figure 3B). While incubation with TICP caused no detectable change in the mature receptor species ( $\cong 55$  KDa) there was a decrease of the corresponding immunoreactive band following treatment with DPDPE. These results confirm that differences in the time course of ERK activation by DPDPE and TICP is inversely correlated with the ability of each ligand to trigger different events within the process of desensitization.

If indeed differences in time course of ERK activation by agonists and dual efficacy ligands were due to their distinct ability to trigger regulatory mechanisms of receptor responsiveness, interfering with these mechanisms should transform ERK activation by the agonist, into the more prolonged type of response observed for the dual efficacy ligand. To test this assumption the time course of ERK activation by DPDPE was assessed in presence of sucrose, which is an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. Though sucrose did not turn ERK activation into a stable response, it prolonged the effect of DPDPE by increasing the decay  $t_{1/2}$  of activation from 2 to 12 min ( $p < 0.001$  for interaction; two way ANOVA; figure 4), a value that falls within the 11-14 min range observed for dual efficacy ligands. Another means to modify mechanisms regulating DOR responsiveness is to mutate amino acids that are implicated in the process. For DORs, Ser/Thr residues located in the C-terminal domain of the receptor are the principal target for Gprotein-coupled receptor kinases and their phosphorylation is an essential step in the desensitization of full-length DORs (22,23,25). To explore the contribution of these residues to the kinetics of ERK activation by DPDPE experiments were repeated using a receptor truncated at its C-terminus (DOR344T). This approach also yielded results in which the DPDPE response decayed more slowly than in the

full-length receptor ( $t_{1/2}$  of 6 min; two way ANOVA;  $p < 0.01$  for interaction; figure 4). However, the effect of truncation was far less noticeable than that observed with sucrose on the full length DOR. Moreover, the addition of sucrose further prolonged the decay  $t_{1/2}$  for DPDPE in truncated receptors ( $t_{1/2}$  of 38 min; two way ANOVA;  $p < 0.02$  for interaction; figure 4).

***Agonists but not dual efficacy drugs induce TYR-phosphorylation of DORs.*** The fact that the time course of ERK activation by DPDPE was only modestly prolonged by removal of the C-terminus suggests that there could be a complementary mechanism capable of regulating ERK activation by agonists in the absence of C-terminal Ser/Thr residues. In this sense mutation of a TYR residue located proximal to Ser/Thr aminoacids of the C-terminus has been shown to attenuate agonist-induced internalization and down-regulation of the receptor (26). Thus, it was deemed of interest to determine whether DORs could be differentially phosphorylated at their tyrosine residues following exposure to agonists and dual efficacy ligands. To do so, cells expressing full-length receptors were incubated for 30 min either with DPDPE or TICP, receptors immunopurified and separated by SDS-PAGE. Immunoblots with antibodies that recognize phosphorylated TYR residues showed that TICP and DPDPE distinctively modified phospho-TYR contents of DORs (figure 5A). While 30 min incubation with TICP (1  $\mu$ M) produced no significant change, DPDPE induced an increase in immunoreactivity for phospho-TYR in the band corresponding to the mature receptor (figure 5A). Furthermore, the introduction of Src inhibitor PP2 (20  $\mu$ M) prior to exposure to DPDPE prevented the increase in phospho-TYR content (figure 5B), indicating that a non-receptor TYR-kinase of the Src family was involved in agonist-induced TYR-phosphorylation of DORs. In order to determine whether failure of TICP to induce TYR-phosphorylation of the receptor was due to its incapacity to stimulate Src,

cells overexpressing the kinase were exposed either to DPDPE or TICP and changes in Src activity assessed by immunoblot. Figure 5C shows that both, the agonist and the dual efficacy ligand increased immunoreactivity for the active form of Src, confirming that the observed difference in tyrosine phosphorylation of DORs was not related to diminished capacity of TICP to stimulate Src.

The goal of the next series of experiments was to assess whether Src could differentially regulate ERK responses generated by DPDPE or TICP. To accomplish this, cells were pretreated with increasing concentrations of Src inhibitor PP2 and ERK stimulation was assessed following exposure to each of the two DOR ligands. It was found that concentrations of 20-40  $\mu$ M PP2 had opposite effects on ERK activation by the dual efficacy ligand and the agonist. While the effect of TICP was blocked (figure 6A) that of DPDPE was enhanced, and it was only at a concentration of 80  $\mu$ M that PP2 interfered with ERK activation by DPDPE (figure 6B). The inhibitory effect of low, specific, concentrations of PP2 on the response to TICP is compatible with the notion that this drug induces ERK activation in Src-dependent manner. On the other hand, the higher non-specific concentrations needed to block the effect of DPDPE do not allow to conclusively implicate Src as an intermediate in agonist-induced ERK stimulation. So as to overcome this problem of specificity, ERK activation by DPDPE was re-assessed transfecting cells with increasing concentrations of a kinase-impaired Src mutant (K296R/Y528F). This procedure generated a similar biphasic pattern as described for PP2, with low levels of the mutant (0.25-0.5  $\mu$ g DNA) enhancing DPDPE responses and higher levels (3 $\mu$ g DNA) inhibiting ERK activation by the agonist. The observed inhibition of DPDPE responses by high levels of inactive Src confirms the idea that activity of this kinase is necessary for ERK activation by

agonists and is consistent with previous reports showing that pharmacological inhibition of Src interfered with agonist-induced ERK activation (27).

On the other hand, the fact that low levels of mutant Src or modest concentrations of PP2 enhanced ERK activation by DPDPE suggest that Src could also be involved in the negative regulation of agonist signalling. This possibility was assessed by pretreating cells with DPDPE (1  $\mu$ M; 30 min) in the presence or absence of PP2, and by then assessing the ability of SNC-80 to induce GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding. By itself, PP2 (20  $\mu$ M; 1hr) enhanced the ability of SNC-80 (100 nM) to promote GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding (Controls: 169  $\pm$  17 fmole/mg; PP2: 209  $\pm$  17 fmole/mg;  $p$  < 0.05; figure 7A), but this effect was accompanied by a marked increase in basal nucleotide binding (Controls: 86  $\pm$  9 fmole/mg; PP2: 128  $\pm$  17 fmole/mg;  $p$  < 0.05, figure 7A). Therefore, to avoid any possible confounding, subsequent comparisons of the ability of SNC-80 to promote GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding were expressed as percentual changes with respect to the corresponding non-stimulated condition under study. As shown in figure 7B, the efficacy of SNC-80 to induce nucleotide binding was greatly reduced following pre-treatment with DPDPE. However, if PP2 was introduced into the incubation medium before DPDPE, the ability of SNC-80 to induce GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding was not significantly modified, confirming that inhibition of Src activity had a protective effect against agonist-induced desensitization.

Finally, to specifically examine whether Src may have contributed to the distinct kinetic profile of ERK activation by DPDPE and TICP, time course for DPDPE was assessed in presence of 20  $\mu$ M PP2. In the absence of Src inhibition, ERK phosphorylation by DPDPE had completely disappeared within the first 30 min of incubation. In contrast, in the presence of PP2, ERK activity at 30 min was still 18  $\pm$  5% of the maximal response (which corresponds approximately to a 95%

increase above ERK activity in non-stimulated cells;  $p < 0.01$ ; two way ANOVA; figure 7C). Moreover, PP2 had a stabilizing effect on ERK activation by DPDPE since following 1 hr incubation with the agonist phosphorylation of the kinase was not significantly changed from the value observed 30 min before ( $16 \pm 5\%$  of maximal).

## **DISCUSSION**

The present study provides new insight into the regulation of agonistic responses induced by "double efficacy ligands". In particular, results presented indicate that when occupied by this type of dual ligands DORs elude phosphorylation and induce prolonged activation of the ERK cascade. These properties contrast with those of highly efficacious agonists, whose activation of the ERK cascade is transient and correlated with heavy phosphorylation and degradation of the receptor.

ERK was activated not only by drugs like SNC-80, DPDPE, TIPP and morphine which also produced agonistic effects in the cyclase pathway, but also by ligands like TICP and ICI174864 that stimulated ERK activity despite displaying inverse agonist behaviour in cAMP accumulation assays (figures 1A and 1B). Inverse agonists are commonly thought to produce their actions via an inactive receptor conformation that precludes Gprotein signalling (12,13). However, it is improbable that activation of the ERK cascade by TICP or ICI174864 could be due to inhibition of spontaneous Gi/o signalling since the inactivation of Gi/o proteins by PTX failed to produce any effect on ERK activity (figure 1C). Moreover, the fact that PTX abolished ERK activation by TICP indicates that similar to agonists, ERK activation by dual efficacy DOR ligands requires the activation of a Gi/o protein. This property is in marked contrast with dual efficacy ligands previously described for the  $\beta_2$ AR whose activation of the ERK cascade was not dependent on Gproteins (11).

The fact that TICP could stimulate Gi/o proteins to activate ERK signalling and simultaneously block Gi/o activity regulating the cyclase pathway may be

explained by the fact that DORs are promiscuous receptors, capable of interacting with more than one Gi/o protein subtype (28,29). Hence, it is possible for ligands like TICP or ICI174864 to simultaneously display opposite agonist and inverse agonist behaviours in ERK and cAMP cascades by respectively stabilizing a conformation of the receptor that activates one Gi/o subtype but inactivates another. In contrast, classical agonists would stabilize a conformation that activates Gi/o proteins responsible for the regulation of both pathways.

Consistent with the idea that classical agonists and dual efficacy ligands may stabilize DORs in different conformations is the observation that the rank order of efficacy with which TICP, TIPP and morphine modified cyclase signalling was reversed with respect to their efficacies to promote ERK activation (figures 1A and 1B). In fact, reversal in rank order of efficacy (or potency) for ligands that regulate more than one signalling cascade via the same receptor is considered as one of the most compelling proofs in favour of a model of ligand-specific active receptor states (30,31). In particular, the observed swap in position between TICP on the one hand and TIPP and morphine on the other make it possible to conclude that the conformation via which the dual efficacy ligand stimulated ERK signalling is different from the one(s) involved in ERK stimulation by the two partial agonists.

The observations that receptors stabilized by DPDPE but not those occupied by TICP incorporated [<sup>32</sup>P] (figure 3A) and were a target for the tyrosine kinase Src (figure 5A and figure 5B) further supports the idea that DORs may exist in ligand-specific conformations, and points to the fact that these different receptor states have distinct desensitization properties. The response observed for DPDPE is in keeping with previous reports showing that highly efficacious agonists promote



DOR phosphorylation by GRKs and tyrosine kinases (23,25,27,32,33). On the other hand, TICP resembles morphine in its ability to induce a receptor conformation that is poorly phosphorylated by receptor kinases (32). Though the failure of morphine to trigger phosphorylation of different opioid receptors has been frequently attributed to its stabilization of a receptor conformation that differs from the one stabilized by more efficacious agonists (34), there is some controversy as to whether lack of receptor phosphorylation is not just the reflection of the low efficacy of the drug (35,36). Given the fact that DPDPE and TICP induced similar levels of Src activity (figure 5C) differential tyrosine phosphorylation of DORs by the two ligands (figure 5A) cannot be attributed to drug efficacy, further pointing to the existence of distinct conformations that are differentially recognized as Src substrates. At the same time, similar magnitude of Src activation by TICP and DPDPE poses the question as to why do they differ in their ability to stimulate the MAPK (figure 1B). A possible explanation to this observation would be that DPDPE activates ERK via more than one pathway while TICP would only depend on Src.

Phosphorylation of Ser/Thr residues in the C-tail of DORs is a major regulatory event that triggers the internalization (22,33) and desensitization (22,23) of the full length receptor. Hence, it was reasoned that if the differential phosphorylation of these residues by TICP and DPDPE contributed to their distinct kinetics of ERK activation, removal of the C-terminus or interference with the process of internalization of the full-length receptor should convey ERK activation by DPDPE some of the characteristics of the TICP response. Both of these interventions resulted in prolonged ERK stimulation by DPDPE, but only inhibition of internalization by sucrose prolonged the decay  $t_{1/2}$  of ERK activity to values

within the range observed for dual efficacy ligands. Furthermore, the discrete increase in decay  $t_{1/2}$  associated with the effect of DPDPE in the truncated DOR could be further prolonged by sucrose, indicating that the time course of ERK responses generated by the truncated mutant was still dependent on internalization. The latter observation, that is consistent with previous studies showing that in HEK293 cells this truncated mutant internalizes as the wild-type (37), stresses the determinant role played by receptor sequestration in the kinetics of ERK stimulation by agonists. On the other hand, the prolonged decay  $t_{1/2}$  associated with the stimulation of ERK by dual efficacy ligands (figure 2B) is consistent with previous results showing that 30 min exposure to ICI174864 did not change the total amount of DORs present at the cell membrane (20).

Though inhibition of internalization slowed down the decay of ERK activity induced by the agonist, the response never attained the characteristic sustained profile observed for ERK activation by TICP (figure 2A). This incapacity to recreate the complete “phenotype” of TICP stimulation, together with the fact that DPDPE produced a very transient activation of ERK in the truncated mutant suggested that mechanisms different from phosphorylation of C-terminus, could also contribute to the distinct kinetics of ERK stimulation by DPDPE and TICP.

Since only DPDPE stabilized DORs in a conformation that was recognized by Src, and given that tyrosine residues have been implicated in the regulation of DOR signalling (26,27), one possibility that was assessed was whether Src could distinctively regulate ERK activation by agonists and dual efficacy ligands. Low concentrations of Src inhibitor PP2 (20-40  $\mu$ M) blocked ERK activation by TICP but enhanced the response to DPDPE (figure 6A and 6B) revealing that indeed, Src

had a distinct effect on ERK responses elicited by the two types of drugs. The ability of low concentrations of PP2 (figure 6B) or very discrete amounts of inactive Src (figure 6C) to increase the magnitude of ERK activation by DPDPE may be interpreted as an indication that Src negatively controls DOR responsiveness to agonists, an assumption that was confirmed in GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding assays, where PP2 was found to protect against agonist-induced desensitization. On the other hand, the fact that ERK activation by TICP was blocked at all levels of Src inhibition (figure 6A) not only indicates that this non-receptor tyrosine kinase is an intermediate in ERK stimulation by the dual efficacy ligand, but also argues against a regulatory role of Src in the effects of these drugs. The observation that DPDE-dependent activation of ERK was blocked by high concentrations of PP2 (figure 6B) or by the transfection of high quantities of inactive Src indicate that agonists too rely on Src for the stimulation of the MAPK. However, this effect is not apparent at the same level of Src inhibition at which the effect of TICP is blocked, due to the additional regulatory effect of Src on agonist responses.

The interpretation that Src may have contributed to determine the transient kinetics of ERK activation by DPDPE is supported by the fact that PP2 had a stabilizing effect on ERK stimulation by the agonist. Indeed, though PP2 had no significant effect on the decay  $t_{1/2}$  it was shown to prolong DPDPE responses by preventing complete fading of ERK activity after the first 10 min of stimulation (figure 7C). The mechanism whereby Src inhibition had this stabilizing effect on DPDPE responses is not clear. Though Src has been implicated in the regulation of receptor endocytosis including DORs (27,38,39), the fact that the effect of PP2 had no resemblance to that of sucrose indicates that inhibition of sequestration is

probably not the main mechanism involved. On the other hand, results from GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding assays showing that PP2 enhanced agonist-induced nucleotide binding as well as basal GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding activity (figure 7A) suggest that Src may also influence DOR signalling by reducing DOR-Gprotein coupling. It is possible then, that the stabilizing effect of PP2 on DPDPE-dependent activity could be linked to a better coupling between agonist stabilized receptors and the corresponding Gprotein.

In conclusion, this study showed that the agonistic responses of dual efficacy ligands for DORs were more sustained and decayed much slower than those of classical agonists. These kinetics were associated with the distinct ability of dual efficacy ligands to stabilize DORs in an active conformation that does not trigger the same regulatory mechanisms as classical, highly efficacious agonists.

**Aknowledgements:** The authors would like to thank G. Lamothe and K. Huard for their technical assistance. This work was supported by Grant MOP-57910 from Canadian Institutes of Health Research and a grant from Fonds de Recherche en Santé de Québec (FRSQ). MPG holds a studentship from FRSQ and GP is a recipient of a fellowship for young researchers from FRSQ.

## **LEGEND TO THE FIGURES**

**Figure 1: Comparison of the efficacy of DOR ligands in adenylyl cyclase and ERK cascades. (A)**, HEK293s cells stably expressing full length DORs (1-1.5 pmole/mg protein) were treated with saturating concentrations (1  $\mu$ M) of the indicated ligands and cAMP accumulation assays performed in presence of 25  $\mu$ M forskolin as detailed in *Experimental Procedures*. Statistical significance of drug effects on cAMP production was established by comparing the amount of cAMP counts obtained in the presence of each ligand to cAMP counts produced in the control situation (all drugs differed from control as determined using one way ANOVA and Dunnett's post hoc test;  $p < 0.05$ ; not shown). Drug effects as they appear in the figure are expressed as % change with respect to total amount of cAMP produced in absence of ligand ( $\% \text{ change in cAMP accumulation} = \frac{[\text{cAMP}_{\text{ligand}} - \text{cAMP}_{\text{no ligand}}]}{\text{cAMP}_{\text{no ligand}}} \times 100$ ) and correspond to mean  $\pm$  SEM of at least 9 experiments carried out in triplicates. Differences among drug effects were established by comparing % changes induced by different ligands using one way ANOVA and Tukey's post-hoc test. **(B)** HEK293s cells stably expressing full length DORs were serum starved (16 hrs) prior to exposure to saturating concentrations (1  $\mu$ M) of the indicated ligands for 5 min following which ERK signalling was assessed by immunoblot. Band immunoreactivity was quantified using MCID to measure optical density and ERK1/2 phosphorylation was normalized to the amount of protein loaded per lane, by expressing the data as a ratio of phosphoERK1/2 over total ERK1/2 optic density. The statistical significance of drug effects was established by comparing ratio obtained in the presence of each ligand to the ratio obtained in the basal condition (all drugs except naloxone differed from

basal using one way ANOVA and post hoc Dunnett's test;  $p < 0.05$ ; not shown). Drug effects as they appear in the figure were expressed as % of the basal ratio (% of basal =  $[[pERK/totalERK_{ligand}]/pERK/totalERK_{no\ ligand}] \times 100$ ), and represent mean  $\pm$  SEM of at least 7 experiments. Statistical differences that appear in the figure were established using one way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Immunoblots above the histogram bars correspond to representative examples of results obtained for each of the indicated drugs. **(C)** Effect of PTX (100 ng/ml for 16 hs) on DPDPE or TICP-induced ERK phosphorylation. Cells were serum-starved and exposed or not to PTX prior to treatment with either DPDPE or TICP (1  $\mu$ M; 5 min). Results, expressed as in B, correspond to mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. Statistical difference between drug effects obtained in presence and absence of PTX was determined using Student's *t* test and appear in the figure.

**Figure 2: DOR ligands differ in their kinetics of ERK activation.**

HEK293s cells stably expressing full length DORs were serum starved (16 hs) prior to exposure to saturating concentrations (1  $\mu$ M) of different ligands for the indicated times, and phosphoERK1/2 immunoreactivity measured as before. **(A)** Time course of ERK activation by different ligands. Results represent mean  $\pm$  SEM of at least 3 experiments and are expressed as % of basal as in 1B. **(B)** Decay of ERK responses represented in A. Results are expressed as % of maximal response observed with each drug. Curves were fit to one phase exponential decay using GraphPad Prism 2.01 and compared by to way ANOVA to generate statistics discussed in the text. Calculated  $t_{1/2}$  values appear in the figure. **(C)** Representative immunoblots of phosphorylated ERK1/2 bands obtained with indicated ligands at different time points

**Figure 3: DPDPE and TICIP differ in their ability to induce receptor phosphorylation and down-regulation. (A)** Effect of DPDPE and TICIP on the phosphorylation of full-length DORs. HEK293s cells stably expressing DORs (1 – 1.5 pm/mg protein) were metabolically labelled with  $^{32}\text{P}$  and exposed for 30 min (1  $\mu\text{M}$ ) to either of the drugs. The receptor was purified by immunoprecipitation using anti-FLAG M2 antibody resin and subjected to electrophoresis on 10% SDS-PAGE. Representative autoradiograms and corresponding western blots for different conditions are shown on the right panel. Band immunoreactivity was quantified using MCID, and receptor phosphorylation was normalized to the amount of protein loaded in each lane by expressing data as the phospho/protein ratio calculated from densitometric analysis of the autoradiogram and its corresponding western blot. Results represent mean  $\pm$  SEM of at least 5 experiments and are expressed as % of the phospho/protein ratio obtained in the basal condition (% of basal =  $[[\text{phospho-protein ratio}_{\text{ligand}}]/[\text{phospho-protein ratio}_{\text{basal}}]] \times 100$ ). Statistical significance of differences between drugs was established using Student's *t* test, and the result of the analysis appears in the figure. **(B)** Effects of DPDPE and TICIP on receptor protein contents. Immunoblots of flag-tagged DORS were performed on crude membrane preparations derived from cells that had been treated or not for 2 hrs with 1  $\mu\text{M}$  of the indicated drug. Identical amounts of membrane proteins were loaded for each condition (100  $\mu\text{g}$ /well) and the total amount of receptor protein was estimated by densitometric analysis of the mature monomeric band. Results represent mean  $\pm$  SEM of 4 experiments and are expressed as % of densitometric values obtained in basal conditions (% of basal =  $[[\text{densitometric values}_{\text{ligand}}]/[\text{densitometric values}_{\text{basal}}]] \times 100$ ). Statistical significance of differences between drugs was established using Student's *t* test, and the result of the analysis appears in the figure.

**Figure 4: ERK activation by DPDPE may be modified to yield a prolonged decay  $t_{1/2}$  typical of TICP.** HEK293 cells stably expressing wild type or truncated DORs (0.5 - 1 pmole/mg protein) were serum starved (16 hrs) and the day of the experiment were incubated or not with 0.4M sucrose for 4 hrs, followed by exposure to saturating concentrations (1  $\mu$ M) of DPDPE for the indicated times. PhosphoERK1/2 immunoreactivity was measured as described in previous figures. Results are expressed as % of maximal response and correspond to mean  $\pm$  SEM of at least 7 experiments. Curves were fit to one phase exponential decay using GraphPad Prism 2.01 and calculated  $t_{1/2}$  values appear in the figure to the right of representative immunoblots obtained for each condition. Statistical comparison among curves was done using two way ANOVA and p values are discussed in the text.

**Figure 5: Tyrosine kinase Src phosphorylates DORs occupied by DPDPE but not by TICP. (A)** HEK293s cells stably expressing flag-tagged DORs were exposed for 30 min to either of the drugs, and the receptor purified as described before. Tyrosine phosphorylation was assessed by immunoblot by calculating the ratio between phospho-TYR immunoreactivity of the mature species (shown on the right panel) and FLAG-immunoreactivity of the same band (not shown). Results represent mean  $\pm$  SEM of at least 5 experiments and are expressed as % of the ratio between phosphoTYR immunoreactivity and FLAG immunoreactivity obtained in basals. Statistical significance of differences between the two drugs was established using Student's *t* test, and the result of the analysis appears in the figure. **(B)** 20  $\mu$ M PP2 or vehicle (DMSO 0.01%) were introduced to cell cultures 1 hr before the experiment followed by stimulation by DPDPE (1  $\mu$ M; 30 min) and assessment of pTYR immunoreactivity in purified receptors. Results



are expressed as % of the of phosphoTYR/FLAG ratio obtained in basals of the corresponding control or PP2 condition, and represent mean  $\pm$  SEM of at least 5 experiments. Student's *t* test was used to compare phosphorylation induced in presence and absence of the Src blocker. The result of the analysis appears in the figure. **(C)** Effects of DPDPE and TICP on Src activity. Cells were serum starved overnight (16 hs) and then exposed to the indicated drug (1  $\mu$ M) for 5 min. Src activation was assessed as described in *Experimental Procedures* by measuring phospho-TYR<sup>416</sup> immunoreactivity. Src phosphorylation was normalized according to the amount of protein present in each sample by expressing the data as a ratio of phosphoTYR<sup>416</sup> over total Src immunoreactivity. Results represent mean  $\pm$  SEM of seven experiments, and are expressed as pSrc/totalSrc ratio. Statistical significance of drug effects was determined using one way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test to compare drugs to basal. \*\*  $p < 0.01$ .

**Figure 6: Src inhibitor PP2 produced opposite effects on ERK activation by DPDPE and TICP.** HEK293s cells stably expressing full-length DORs (0.5-1 pm/mg protein) were serum starved overnight (16 hrs) and the day of the experiment exposed to indicated concentration of PP2 or vehicle (DMSO, 0.01%) 1 hr before addition of TICP **(A)** or DPDPE **(B)** (1  $\mu$ M; 5 min). PhosphoERK1/2 immunoreactivity was measured as described before and expressed as % change of phosphoERK/ERKtotal ratio obtained in the absence of DOR ligand. Results represent mean  $\pm$  SEM of at least 4 experiments. Statistical significance of the effect of PP2 on DPDPE and TICP responses was established using one way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test to compare ERK activation in the absence of PP2 to activation induced in presence of increasing concentrations of the Src inhibitor. \*  $p < 0.05$ . **(C)** HEK293s cells stably expressing

full length DORs were transiently transfected with the indicated concentrations of DNA encoding for kinase-impaired Src mutant (K296R/Y528F). Results and statistical analysis as in **(B)**. On top of representative immunoblots for ERK activity are the blots corresponding to the total amount of Src immunoreactivity present in cell lysates following transfection with the indicated quantities of Src K296R/Y528F.

**Figure 7: PP2 protects against desensitization by DPDPE and modifies the time course of ERK activation by this agonist. (A).** Cells were exposed to PP2 (20  $\mu$ M) or vehicle (DMSO, 0.01%) for 1 hr following which membranes were prepared, and used to assess GTP $\gamma$ [<sup>35</sup>S] binding. Results are expressed as fmole of GTP $\gamma$ [<sup>35</sup>S] bound/mg of membrane protein and represent the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. Statistical differences between different conditions were established using two way ANOVA \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . **(B)** Cells were treated or not with PP2 as in (A) before adding DPDPE (1  $\mu$ M) for additional 30 min. Membranes were then prepared and SNC-80 effects (100 nM) assessed in naïve membranes and in membranes obtained from desensitized cells. Results are expressed as % change with respect to basal values obtained in each condition (% change with respect to basal =  $[(\text{GTP}\gamma^{[35]\text{S}}]_{\text{bound}_{\text{ligand}}} - \text{GTP}\gamma^{[35]\text{S}}]_{\text{bound}_{\text{no ligand}}}] / \text{GTP}\gamma^{[35]\text{S}}]_{\text{bound}_{\text{no ligand}}}] \times 100$ ) and represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Differences in SNC-80 actions among the different conditions were established using two way ANOVA and results appear in the figure. **(C)** HEK293 cells stably expressing wild type DORs were serum starved (16 hrs), and the day of the experiment exposed to PP2 (20  $\mu$ M) or vehicle (DMSO, 0.01%) 1 hr before addition of DPDPE (1  $\mu$ M) for the indicated times. ERK phosphorylation was measured as described previously and results are expressed as % of maximal response. They correspond to the mean  $\pm$  SEM of at least 4 experiments. Curves

were fit to one phase exponential decay using GraphPad Prism 2.01. Calculated  $t_{1/2}$  values appear in the figure to the right of representative immunoblots obtained for each condition. Statistical comparison among curves was done using two way ANOVA and p values are discussed in the text.

## References

1. Benovic, J. L., Regan, J. W., Matsui, H., Mayor, F., Jr., Cotecchia, S., Leeb-Lundberg, L. M., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 17251-17253
2. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3202-3211
3. Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Bodduluri, S. R., Laporte, S. A., Law, P. Y., and Caron, M. G. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7157-7162
4. Lowe, J. D., Celver, J. P., Gurevich, V. V., and Chavkin, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15729-15735
5. Cheng, Z. J., Yu, Q. M., Wu, Y. L., Ma, L., and Pei, G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24328-24333
6. von Zastrow, M., Svingos, A., Haberstock-Debic, H., and Evans, C. (2003) *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 348-353
7. Tsao, P. I., and von Zastrow, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 11130-11140
8. Roettger, B. F., Ghanekar, D., Rao, R., Toledo, C., Yingling, J., Pinon, D., and Miller, L. J. (1997) *Mol. Pharmacol.* **51**, 357-362
9. Bhowmick, N., Narayan, P., and Puett, D. (1998) *Endocrinology* **139**, 3185-3192
10. Bisello, A., Chorev, M., Rosenblatt, M., Monticelli, L., Mierke, D. F., and Ferrari, S. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38524-38530
11. Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 11406-11411
12. Chidiac, P., Hebert, T. E., Valiquette, M., Dennis, M., and Bouvier, M. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 490-499

13. Samana, P., Pei, G., Costa, T., Cotecchia, S., and Lefkowitz, R. J. (1994) *Mol. Pharmacol.* **45**, 390-394
14. Chidiac, P., Nouet, S., and Bouvier, M. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 662-669
15. Gbahou, F., Rouleau, A., Morisset, S., Parmentier, R., Crochet, S., Lin, J. S., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganelin, C. R., Schwartz, J. C., and Arrang, J. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 11086-11091
16. Pineyro, G., Azzi, M., deLéan, A., Schiller, P. W., and Bouvier, M. (2004) (*submitted in Mol. Pharm.*)
17. Schiller, P. W., Weltrowska, G., Berezowska, I., Nguyen, T. M., Wilkes, B. C., Lemieux, C., and Chung, N. N. (1999) *Biopolymers* **51**, 411-425
18. Valiquette, M., Vu, H. K., Yue, S. Y., Wahlestedt, C., and Walker, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18789-18796
19. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P., and Bouvier, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13727-13736
20. Pineyro, G., Azzi, M., De Lean, A., Schiller, P., and Bouvier, M. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60**, 816-827
21. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7297-7301
22. El Kouhen, O. M., Wang, G., Solberg, J., Erickson, L. J., Law, P. Y., and Loh, H. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 36659-36664
23. Law, P. Y., Kouhen, O. M., Solberg, J., Wang, W., Erickson, L. J., and Loh, H. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32057-32065
24. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P., and Bouvier, M. (2001) *J Biol Chem* **276**, 4416-4423
25. Kooroor, A., Nappey, V., Kieffer, B. L., and Chavkin, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27605-27611
26. Kramer, H. K., Andria, M. L., Kushner, S. A., Esposito, D. H., Hiler, J. M., and Simon, E. J. (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **79**, 55-66
27. Kramer, H. K., Andria, M. L., Esposito, D. H., and Simon, E. J. (2000) *Biochem. Pharmacol.* **60**, 781-792
28. Alves, I. D., Salamon, Z., Varga, E., Yamamura, H. I., Tollin, G., and Hruby, V. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48890-48897
29. Prather, P. L., McGinn, T. M., Erickson, L. J., Evans, C. J., Loh, H. H., and Law, P. Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21293-21302

30. Kenakin, T. (1995) *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 232-238
31. Berg, K. A., Maayani, S., Goldfarb, J., Scaramellini, C., Leff, P., and Clarke, W. P. (1998) *Mol. Pharmacol.* **54**, 94-104
32. Zhang, J., Ferguson, S. S., Law, P. Y., Barak, L. S., and Caron, M. G. (1999) *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **19**, 301-313
33. Whistler, J. L., Tsao, P., and von Zastrow, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34331-34338
34. Waldhoer, M., Bartlett, S. E., and Whistler, J. L. (2004) *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 953-990
35. Clark, R. B., Knoll, B. J., and Barber, R. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 279-286
36. Kooor, A., Celver, J. P., Wu, A., and Chavkin, C. (1998) *Mol. Pharmacol.* **54**, 704-711
37. Keith, D. E., Murray, S. R., Zaki, P. A., Chu, P. C., Lissin, D. V., Kang, L., Evans, C. J., and von Zastrow, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19021-19024
38. Ahn S., Maudsley S., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. and Daaka Y. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 1185-1188.
39. Wilde A., Beattie E.C., Lem L., Riethof D.A., Liu S.H., Mobley W.C., Soriano P. and Brodsky F.M. (1999). *Cell.* **96**, 677-687.

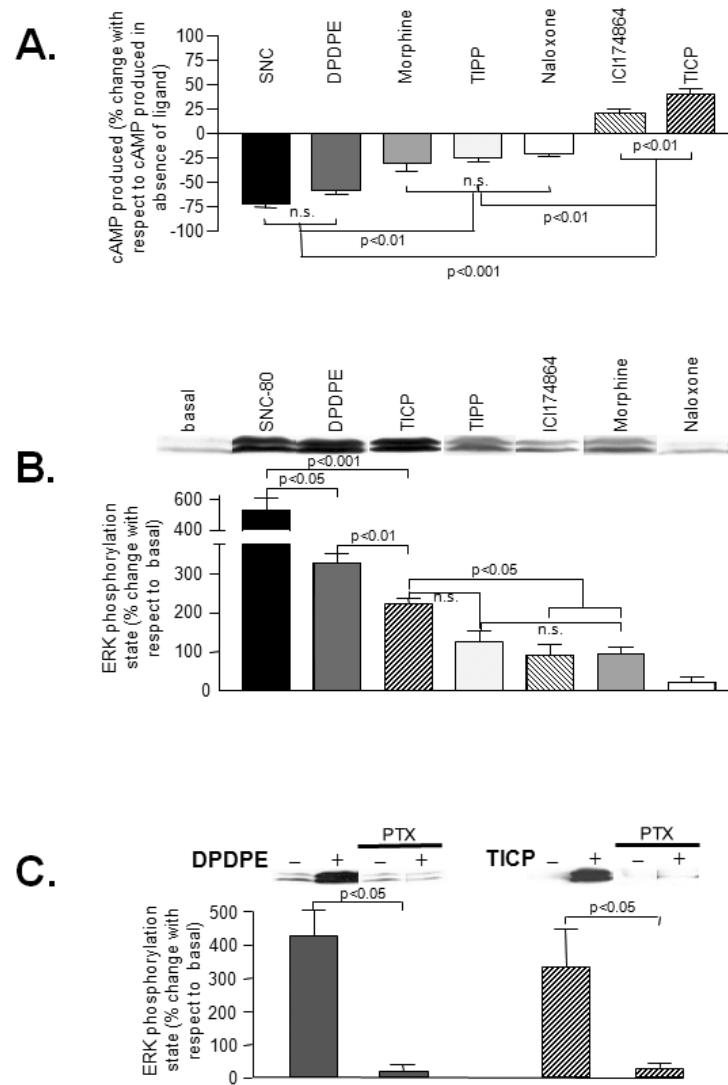


Figure 1

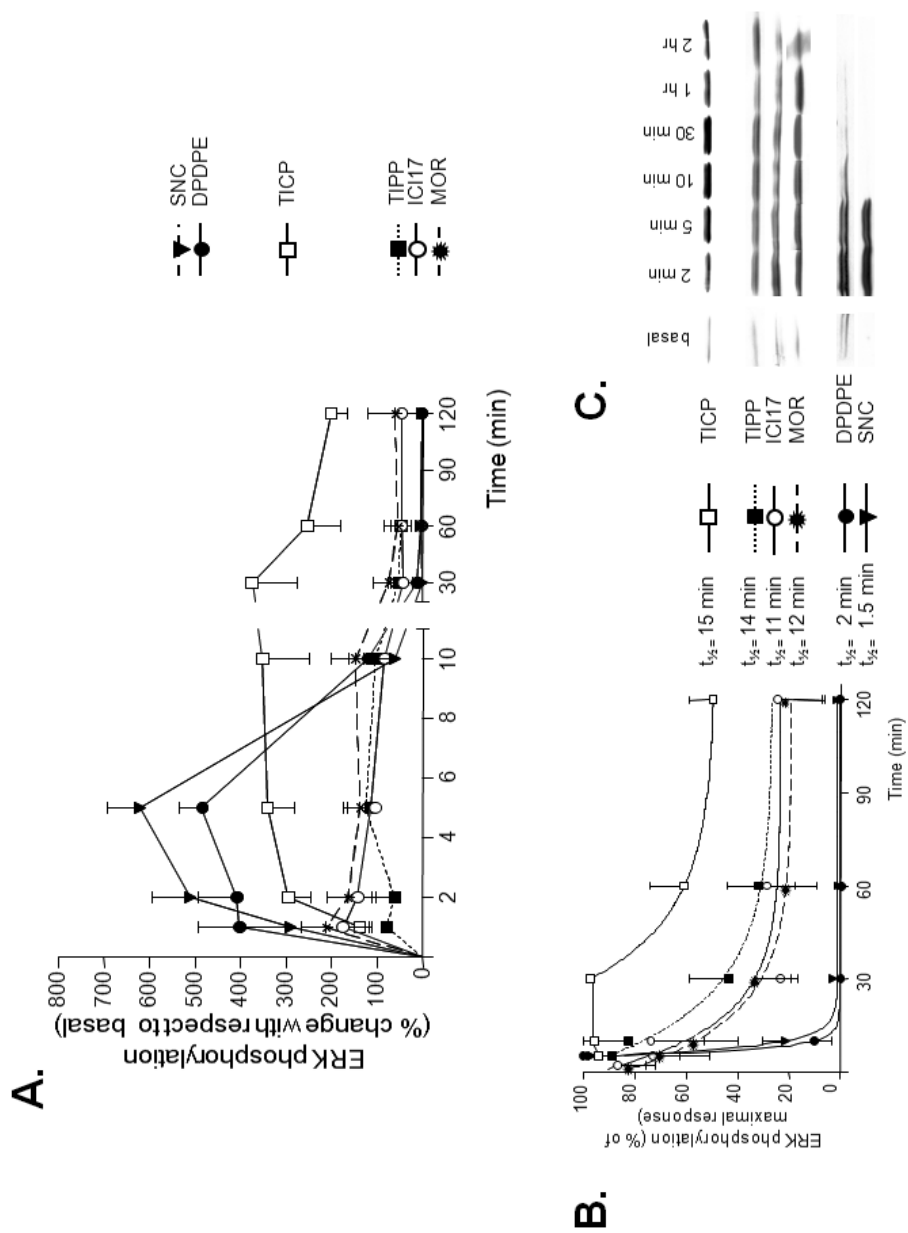
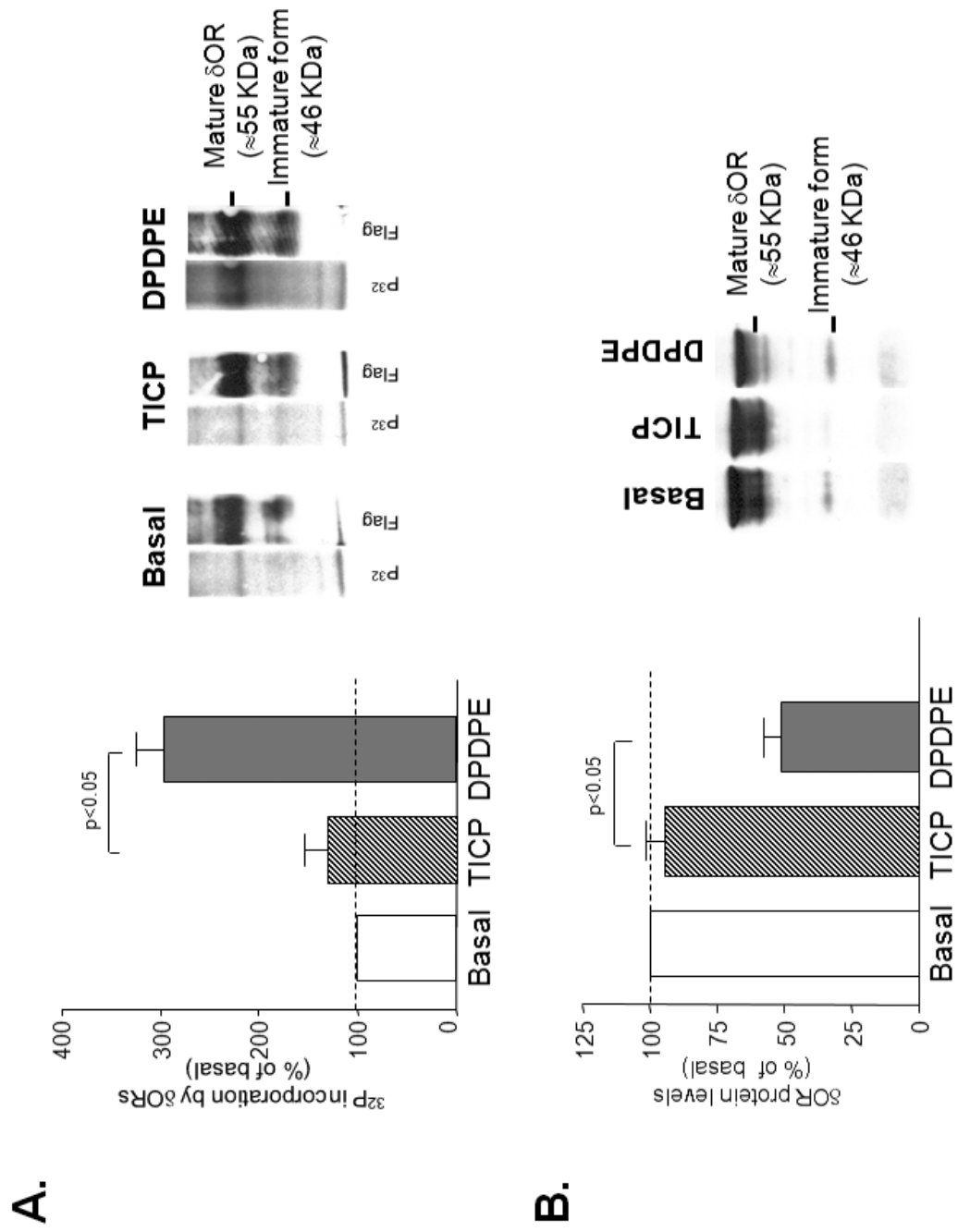


Figure 2





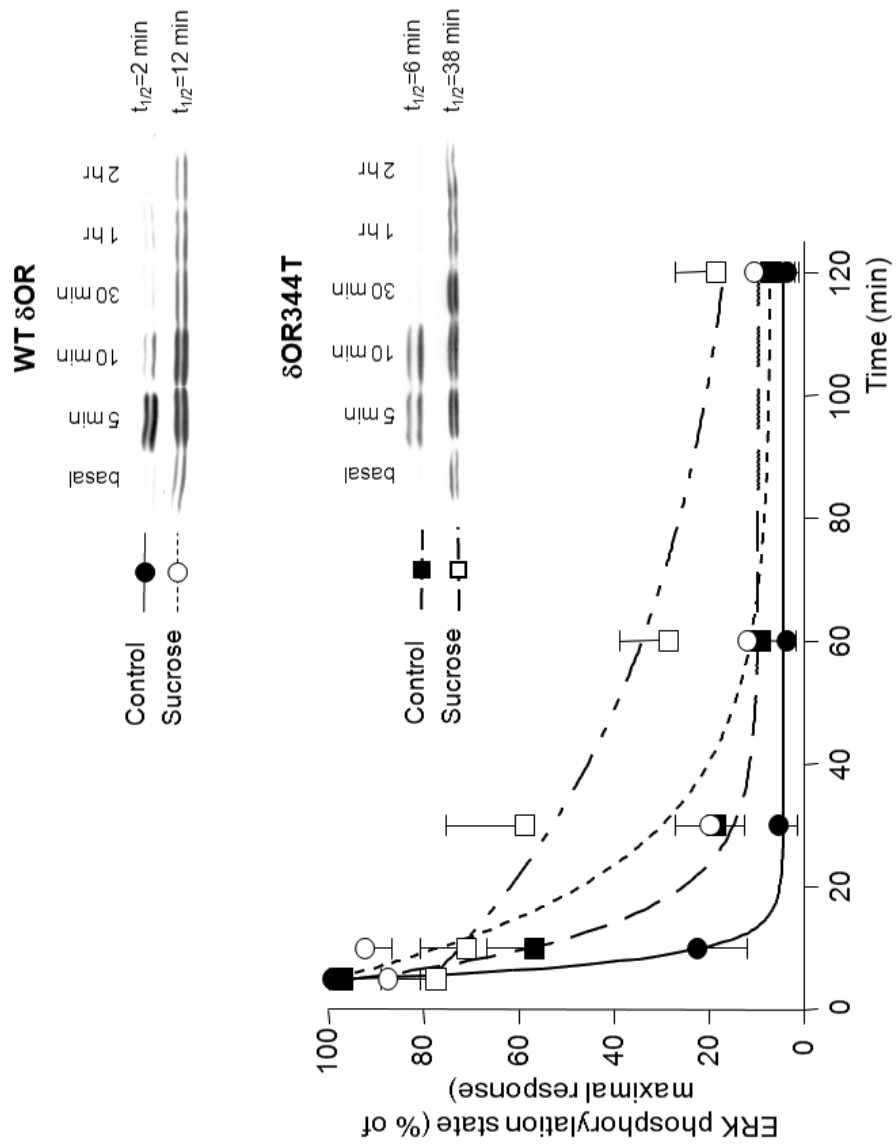


Figure 4

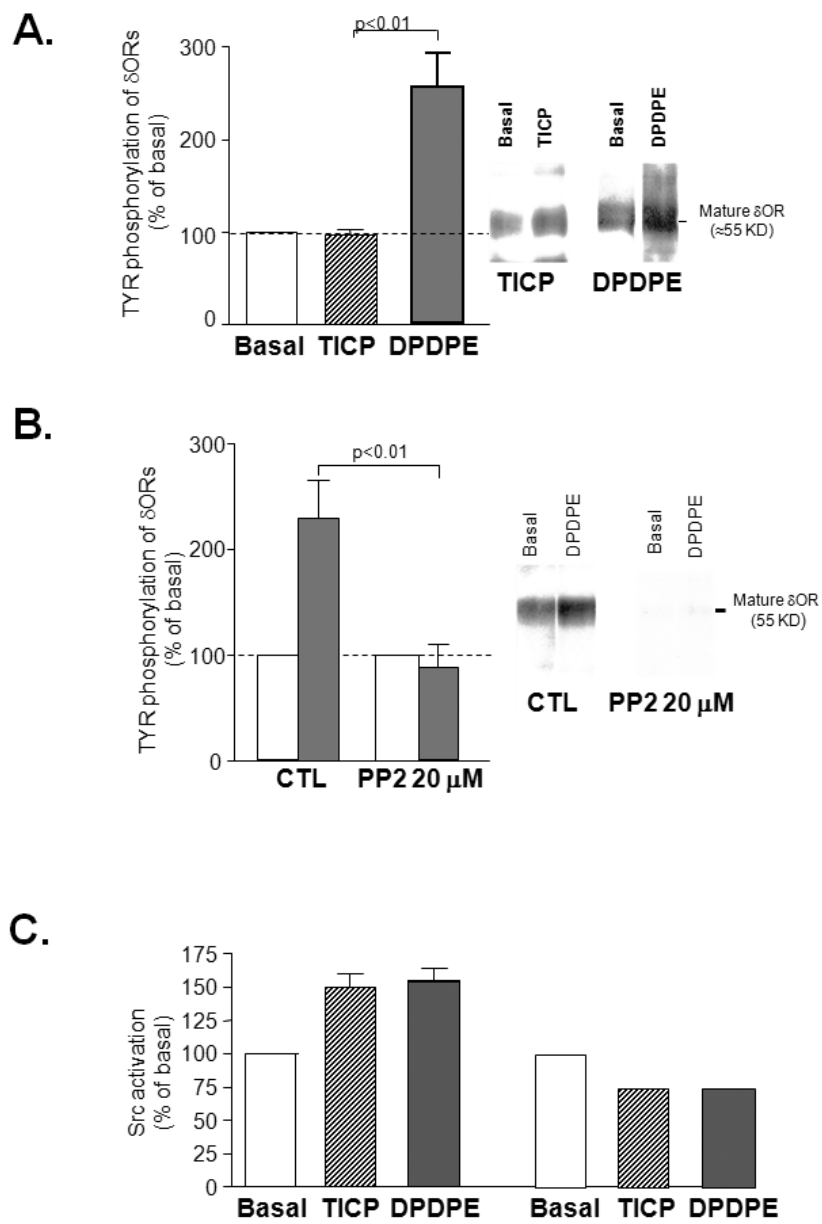


Figure 5

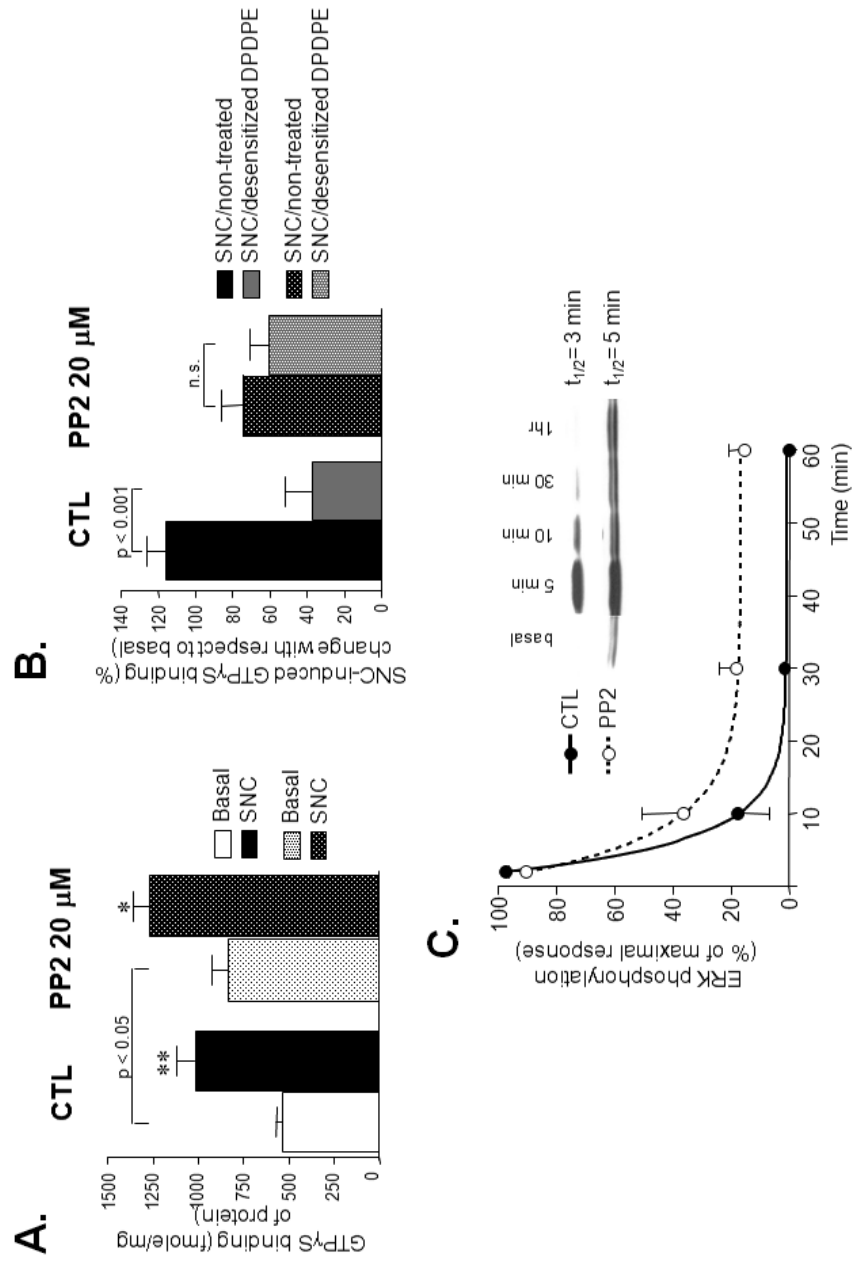


Figure 7

## 3.2 Deuxième publication

Audet et al. (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *Journal of biological chemistry*, **283 (22)** : 15078-15088.

### 3.2.1 Introduction et mise en contexte du 2<sup>e</sup> article

Bien que l'inversion de l'ordre d'efficacité des ligands pour un RCPG à l'intérieur d'un même contexte cellulaire soit une preuve de la présence de différentes conformations actives du récepteur, elle demeure indirecte, car les voies de signalisation sont le fruit d'une cascade d'évènements parfois amplifiés. Une démonstration directe de la stabilisation de conformations distincte par les ligands fut effectuée avec la technique de spectroscopie par résonance plasmonique [487;488], mais cette technique utilise des récepteurs et des protéines G purifiés, insérés à l'intérieur d'une membrane bi-couche lipidique artificielle. Aucune technique ne permettait d'évaluer le changement de conformation d'un récepteur à l'intérieur d'une cellule vivante. Le défi de ce 2<sup>e</sup> article était donc de démontrer les différentes conformations produites par les ligands du DOR dans un système vivant.

Nous avons décidé de prendre avantage d'une technique permettant d'évaluer l'interaction entre deux protéines à l'intérieur de cellules vivantes, le BRET ou transfert de la bioluminescence par résonance énergétique. Cette technique (adaptée du FRET ou transfert de la fluorescence par résonance énergétique) utilise la capacité d'une protéine (GFP pour green fluorescent protein) d'absorber l'énergie produite par l'oxydation du substrat (coelenterazine) de l'enzyme luciférase pour ensuite réémettre cette énergie sous forme de lumière verte. Ce transfert énergétique, qui se produit lorsque les deux protéines sont à moins de 100 Å, est représenté par le ratio entre la fluorescence produite par la GFP sur la luminescence produite par l'oxydation de la coelenterazine aussi appelée ratio BRET. Cette technique impose donc qu'une de nos protéines d'intérêt soit couplée avec une GFP et l'autre, avec une luciférase.

L'idée était d'évaluer les changements de l'interaction entre le récepteur et les différentes sous-unités de la protéine G suite à l'ajout de différents ligands pour déterminer si ces changements correspondent à une vision à deux états ou à une vision multiétats des RCPG. Nous avons ainsi évalué l'interaction entre le DOR et la sous-unité  $\alpha_{i1}$ , entre le DOR et la sous-unité  $\gamma_2$  et entre les sous-unités  $\alpha_{i1}$  et  $\gamma_2$  de la protéine G avant et après l'ajout de différents ligands du DOR. Nous avons aussi utilisé une stratégie permettant d'obtenir une évaluation en 3 dimensions des changements de conformation entre le récepteur et la sous-unité  $\alpha_{i1}$ . Cette stratégie consiste en l'utilisation de trois sous-unités  $\alpha_{i1}$  marquées par luciférase à trois endroits distincts (acides aminés 60, 91 et 122). Ainsi, nous obtenons trois points de vue différents sur l'interaction entre le récepteur et ses protéines G et entre les sous-unités de ces mêmes protéines G. Ces constructions avaient déjà permis d'établir que l'activation de plusieurs RCPG produit un changement de conformation à l'intérieur d'un complexe préformé RCPG-protéine G [65]. En utilisant la même stratégie que dans l'article précédent, c'est-à-dire une inversion de l'ordre d'efficacité des ligands, nous avons évalué l'efficacité de plusieurs ligands à changer le ratio BRET de chacun de ses points de vues et nous avons ensuite tenté de les corrélés entre eux dans le but de trouver une inversion de l'ordre d'efficacité indiquant la présence de différentes conformations actives du récepteur.

Les résultats nous ont permis d'établir que le DOR forme un complexe préformé à la membrane et que l'activation du récepteur par des ligands conduit à un changement de conformation du complexe récepteur/protéine G. Tel que nous avons démontré dans le premier article, nous avons pu confirmer que le DPDPE stabilise une conformation différente du complexe DOR/protéine G que le TICP. Toutefois, la technique nous a permis de découvrir que les agonistes partiels (morphine et TIPP), l'antagoniste (naltrindole) et l'agoniste à double efficacité (TICP) stabilisent tous des conformations différentes. Cette étude fut la première démonstration physique que les ligands des RCPG produisent des conformations différentes du complexe récepteur - protéine G à l'intérieur de cellules vivantes, elle ouvre donc la voie à la sélectivité fonctionnelle des ligands des RCPG et au développement de ligands sélectif à certaines voies de signalisation et/ou de régulation.

### **3.2.2 Article 2**

**BRET ASSAYS REVEAL LIGAND-SPECIFIC CONFORMATIONAL CHANGES WITHIN PREFORMED SIGNALLING COMPLEXES CONTAINING DELTA OPIOID RECEPTOR (DOR) AND HETEROTRIMERIC G PROTEINS .**

**Nicolas Audet <sup>a,b</sup>, Céline Galés <sup>c</sup>, Élodie Archer-Lahlou <sup>a,b</sup>, Marc Vallières <sup>a</sup>,**

**Peter W. Schiller <sup>b,d</sup>, Michel Bouvier <sup>e</sup> and Graciela Pineyro <sup>a,b,f,\*</sup>.**

<sup>a</sup> Centre de Recherche Fernand-Seguin, Hôpital Louis-H. Lafontaine, Montréal, Canada

<sup>b</sup> Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada and Groupe de Recherche Universitaire sur le médicament.

<sup>c</sup> INSERM Unité 858, équipe n°8, Institut Louis Bugnard

<sup>d</sup> Laboratory of Chemical Biology and Peptide Research, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada

<sup>e</sup> Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament

<sup>f</sup> Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Canada

Running title: Conformational diversity of DORs.

### **SUMMARY**

**Heptahelical receptors communicate extracellular information to the cytosolic compartment by binding an extensive variety of ligands. They do so through a series of conformational changes which propagate to intracellular signalling partners as the receptor switches from a resting to an active conformation. This active state had been classically considered**

**unique, and responsible for regulation of all signalling pathways controlled by any given receptor. However, recent functional studies showing that ligands may not conserve their apparent efficacies at all signalling endpoints have challenged this classical notion and called for an alternative paradigm where receptors would exist in more than one signalling conformation. This study used BRET assays in combination with ligands of different functional profiles**

**to provide *in vivo* physical evidence of conformational diversity of delta opioid receptors (DORs). DORs and  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  G-proteins subunits were tagged with Luc or GFP to produce BRET pairs that allowed monitoring DOR/G-protein interactions from different vantage points. Results showed that DORs and heterotrimeric G-proteins formed a constitutive complex that underwent structural reorganization upon ligand binding. Conformational rearrangements could not be explained by a two state model supporting the idea that DORs adopt ligand-specific conformations. In addition, conformational diversity that is encoded by the receptor is conveyed to the interaction among heterotrimeric subunits. The existence of multiple active receptor states adds unprecedented diversity to receptor signalling and has implications for the way we conceive specificity of signal transduction.**

## INTRODUCTION

Heptahelical receptors are versatile membrane proteins that play an important role in cellular communication. They do so by recognizing a large variety of extracellular ligands that convey information to the intracellular compartment by modifying receptor conformation upon binding. These structural modifications then trigger an array of biochemical changes that ultimately control vital processes within the cell. Traditionally, conformational changes induced by ligand binding have been thought to shift equilibrium between an active and an inactive conformation of the receptor. According to this classical view, all agonists would stabilize a single active state equally effective to stimulate signalling at all signalling pathways controlled by the receptor (1). In consequence, ligand ability to stabilize this

unique active state would be the only determinant of ligand efficacy at all functional readouts. Furthermore, this model predicts that ligand rank order of efficacy across different readouts should be maintained, representing a progressive accumulation (or decrease) of the single active state of the receptor (2).

However, recent data have challenged this view suggesting that the complexity of heptahelical receptor signalling cannot be based on the accumulation of a single active receptor conformation and efficacy cannot be restricted to only a quantitative dimension (3) (4). Evidence supporting this assertion has been largely based on functional studies whose results cannot be adequately rationalized by accumulation of a single active state but are intuitively explained by assuming the existence of conformational diversity among active forms of the receptor (4). In particular, these studies show that agonists acting at the same receptor may display different rank order of efficacies when tested at different functional readouts (5) (6) (7). In addition to this indirect body of evidence, the possibility that different agonists may stabilize different conformations of the same receptor is supported by *in vitro* physical data. In particular, fluorescence and spectroscopy approaches have confirmed that ligands of different efficacies impose distinct structural constraints upon purified  $\beta 2$ -adrenergic, DORs and muscarinic receptors (8) (9) (10). The problem with these observations is that they have not allowed to establish if ligand-specific receptor states exist in living cells and if so, whether these different conformations may be discriminated by post-receptor signalling partners.

In the present study we sought to determine whether DORs occupied by



different ligands would differ in the way they interact with heterotrimeric G proteins, the rationale being that if DORs were stabilized in ligand-specific conformations then each of these receptor states should distinctively interact with its immediate signalling partners. Interaction between DORs and  $\alpha\beta\gamma$  subunits was assessed using BRET assays, a technology that has been validated to study not only *in vivo* coupling of heptahelical receptors to  $\alpha\beta\gamma$  subunits (11) (12) but to monitor *in vivo* intermolecular interactions within the G-protein heterotrimer (13) (14). Results showed that DORs and  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  subunits formed a constitutive complex and BRET assays demonstrated that conformational changes imposed by different ligands were compatible with a multistate rather than a two-state model.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Reagents-* Buffer chemicals, protease inhibitors, DPDPE, morphine, naloxone, forskolin, IBMX, PTX, anti-FLAG M2 affinity resin, and FLAG peptide were purchased from Sigma. [486]GTP $\gamma$ S, [<sup>3</sup>H]adenosine and Coelenterazine were from Perkin-Elmer. SNC-80 was from Tocris Cookson, TIPP and TICP $\Psi$  were synthesized as previously described (15). G418, DMEM, fetal bovine serum, glutamine, penicillin, streptomycin were purchased from Wisent.

*DNA constructs-* Recombinant plasmids encoding for  $\alpha 1$ -Luc constructs were prepared as previously described (14), using flexible linkers (SGGGGS) to insert the coding sequence of humanized *Renilla* Luciferase (RLuc; PerkinElmer, Lifescience) into the coding sequence of human  $G\alpha 1$ , either between residues G60 and Y61 ( $G\alpha 1$ -60RLuc), L91 and K92 ( $G\alpha 1$ -91RLuc) or E122 and L123 ( $G\alpha 1$ -122RLuc). The

plasmid encoding  $\gamma 2$  with Green Fluorescent Protein (GFP10) fused to its N-terminus (11), and vectors encoding Flag, GFP2, RLuc fused in frame at the C-terminus of human DORs have been previously described (16). Generation of CD8-GFP2 and CD8-RLuc has also been reported (11) (14).

*Cell Culture and expression of heterologous proteins-* HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum and 2 nM L-glutamine. For transient expression of recombinant proteins, cells were seeded at a density of  $3 \times 10^6$  cells in 100 mm petri dishes, cultured for 24 h, and then transfected with vectors encoding BRET constructs for DORs and different G protein subunits along with untagged complementary heterotrimeric components. Transfections were done using FuGENE 6 reagent (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's protocol. Titration BRET assays were done as previously described (11), using a fixed amount of donor-tagged proteins (RLuc) that was co-expressed with increasing amounts of vector coding for the acceptor (GFP). Untagged subunits complementary to G protein BRET constructs were also included, at DNA levels that would support membrane expression of the heterotrimer at all points of the titration curve. Titration curves allowed to determine the relative amount of DNA constructs necessary to achieve a maximal BRET signal that was then used in transfections for single point assays. Forty-eight hours after transfection, cells were used in BRET, cyclase or immunopurification assays. Clones stably expressing Flag-tagged human DORs were generated as previously described (17) and transiently transfected with  $\alpha 1$ -Luc/GFP- $\gamma 2$  along with untagged  $\beta 1$  subunits.

*BRET measures-* Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice and mechanically detached with PBS, centrifuged 5 min at 300g followed by resuspension in PBS. Cells were then distributed into a 96-well microplate (white Optiplate, PerkinElmer, Lifescience) at a concentration of 50,000-100,000 cells/well which allowed to achieve luminescence levels suitable for BRET2 readings using different constructs. Treatments and BRET readings were done according to a previously established protocol that was optimized for assessing *in vivo* ligand effects on receptor interaction with heterotrimeric G proteins (11) (14). Briefly, intact living cells were suspended in PBS and kept at room temperature and incubated in the presence or absence of different ligands for 2 min, followed by addition of the *Rluc* substrate, DeepBlueC coelenterazine (PerkinElmer, Lifescience) at a final concentration of 5  $\mu$ M. Readings were obtained 2 minutes after coelenterazine addition, using a modified top-count apparatus (TopCount. NXTTM, Packard Bioscience) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370-450 nm and 500-530 nm windows using filters with the appropriate band pass (Chroma). The BRET2 signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by GFP2/GFP10 (500-530 nm) over the light emitted by the *Rluc* (370-450 nm). BRET2, values were corrected by subtracting the BRET background signal (detected when the *Rluc*-tagged construct was expressed alone) from the BRET signal detected in cells coexpressing both *Rluc*- and GFP (net BRET).

For titration experiments, the expression level of each tagged-protein was determined by direct measurement of total fluorescence and luminescence on

aliquots of the transfected cells. Total fluorescence was measured using a FluoroCount (PerkinElmer) with an excitation filter at 400 nm and an emission filter at 510 nm and the following parameters: gain 1; PMT 1100 V; time 1.0 s. After measuring fluorescence, the same cell samples were incubated with coelenterazine h (5 $\mu$ M; 8 min; Nanolight Technology) and total cell luminescence was measured using a LumiCount (PerkinElmer Life Sciences) with the following parameters: gain 1; PMT 900 V; time 1 s.

*Immunopurification assays and western blot analysis-* Cells recovered in PBS and treated with DPDPE or TICP (10  $\mu$ M, 5 min) as described in the previous section. Following treatment cells were suspended in lysis buffer (5mM Tris, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5  $\mu$ g/mL leupeptine, 5  $\mu$ g/mL soybean trypsin inhibitor, and 10  $\mu$ g/mL benzamidine) and homogenized using an ultraturax (IKA, Wilmington, NC). Following centrifugation at 300g for 5 minutes, the supernatant was centrifuged at 30 000g for 20 min and the resultant pellet was resuspended in lysis buffer for a second round of centrifugation (30 000g ; 20 min). The pellet obtained was then solubilized in 0.5% *n*-dodecyl-maltoside, 25 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5  $\mu$ g/mL leupeptine, 5  $\mu$ g/mL soybean trypsin inhibitor and 10  $\mu$ g/mL benzamidine. Following agitation at 4°C for 2 h, the solubilized fraction was centrifuged at 10 000 g for 30 min, and the receptor was immunopurified from the supernatant fraction using an anti-FLAG M2 antibody resin. 20  $\mu$ l of antibody-coupled resin equilibrated in solubilization buffer and supplemented with 0.1% bovine serum albumin (w/v) were used to purify the receptor overnight at 4°C under gentle

agitation. The next morning the resin was pelleted, washed twice with 500  $\mu$ l of solubilization buffer and four times with 500  $\mu$ l of modified solubilization buffer (containing 0.1% instead of 0.5% *n*-dodecyl-maltoside (w/v)). The receptor was then eluted by incubating the resin for 10 min at 4°C with 100  $\mu$ l of modified solubilization buffer containing of a FLAG peptide (150  $\mu$ g /mL). This elution was repeated three times, and the eluates were combined and concentrated by membrane filtration over Microcon-30 concentrators (Millipore). SDS sample buffer was then added and samples were used for SDS-PAGE. SDS-PAGE was performed using a 4% stacking gel and 10% separating gel. Proteins resolved in SDS-PAGE were then transferred (50 mA, 16 h, Bio-Rad Mini-Trans Blot apparatus) from gels onto nitrocellulose (GE Healthcare). The amount of endogenous or Luc-tagged Gai1 or G $\beta$  that was recovered with immunopurified DORs was assessed using 1:1000 polyclonal antibodies raised against Gai1 or G $\beta$  followed by secondary anti-rabbit horseradish-conjugated antibodies (1:40 000; Amersham Biosciences). Total amount of receptor loaded for each sample was detected by probing the samples with anti-Flag M2 antibody (1:5000) followed by secondary anti-mouse horseradish conjugated antibodies (1:40000; Amersham Biosciences).

*cAMP Accumulation assays-* cAMP accumulation assays were carried out according to a previously described protocol (18) and [ $^3$ H]ATP and [ $^3$ H]cAMP were separated by sequential chromatography on Dowex exchange resin and aluminium oxide columns. cAMP produced was estimated by calculating the ratio of [ $^3$ H]cAMP/[ $^3$ H]ATP plus [ $^3$ H]cAMP in each sample.

*[486]GTP $\gamma$ S binding assays-* Procedure for [486]GTP $\gamma$ S binding has been detailed in a previous report (18).

*Data analysis-* Statistical comparisons were done by one way analysis of variance using Dunnett's correction to compare drug effects to basal conditions, and Fisher's "least significance difference" adjustment in order to assess differences among drugs. Modification of drug effects by PTX was analyzed by covariance using basal values as co-regressor. Except for figure 2 all figures present data as differences or percentage changes with respect to basal, but in all cases statistical analyses were carried out on raw net BRET ratio, cAMP/cAMP + ATP ratio or pERK/totalERK ratio.

## RESULTS

*Signalling efficacy of DOR ligands.-* In a first series of experiments we sought to establish the signalling profile of peptidic (DPDPE, TIPP and TICP) and non-peptidic (SNC-80; morphine and naltrindole) DOR ligands that would then be tested in BRET assays. Consistent with previous reports (6) (7), ligand efficacy was influenced by the signalling pathway in which drugs were tested (Fig. 1). Naltrindole, classically considered a neutral antagonist (19) was without effect in the ERK cascade but displayed partial efficacy in the cAMP pathway. DPDPE and SNC-80 inhibited cAMP production and induced ERK phosphorylation, behaving as highly efficacious agonists in both cascades while morphine and TIPP displayed partial efficacy at both readouts. TICP on the other hand had a dual profile, sharing agonist capacity to induce ERK activation but opposing agonist ability to inhibit cAMP production. Comparison of ligand rank order of efficacy in cyclase (Fig. 1A) and ERK (Fig. 1B) cascades also revealed

that DOR ligands did not maintain their ordinal positions in the two assays, an observation that has been classically associated with the existence of ligand-specific receptor states (7) (4). We reasoned that if this interpretation of functional data was correct, then DORs occupied by different ligands should distinctively interact with intracellular signalling partners. To assess this possibility we required an experimental approach that would allow to monitor DOR interaction with signalling proteins under similar conditions as the ones used in cyclase and MAPK readouts. We therefore turned to BRET, since this technology offers the possibility of monitoring protein-protein interactions within living cells.

*Characterization of BRET constructs and signal specificity.*- BRET is a naturally occurring phenomenon resulting from the non-radiative transfer of energy between a luminescent donor and a fluorescent acceptor (20). In BRET2 assays *R*Luc catalyzes oxidation of cell permeable coelenterazine (DeepBlueC) resulting in luminescence emission within the excitation wavelength of GFP (21). Because the efficacy of energy transfer varies inversely with the sixth power of distance, fluorescence emission by GFP will only take place if donor excitation occurs in close proximity of the acceptor (100 Å). This property may be exploited to monitor interactions between different types of cellular proteins (22) (23), provided proteins of interest are tagged with donor/acceptor pairs. Increases (decreases) in the BRET signal imply formation (destruction) of new complexes or tags coming closer together (separating) within a preformed complex.

Supplementary figure 1A shows the different BRET constructs used in this

study. Specifically, DOR interaction with the  $G\alpha$  subunit was monitored from different vantage points, introducing the acceptor GFP at the receptor C-terminus while the donor Luc was inserted at three different locations within the  $\alpha 1$  subunit: i) linker 1 region which connects helical to GTPase domains ( $\alpha$ iLuc60); ii) loop connecting helices  $\alpha A$  and  $\alpha B$  of the helical domain ( $\alpha$ iLuc91) and iii) loop connecting helices  $\alpha B$  and  $\alpha C$  of the same domain ( $\alpha$ iLuc122). Interaction of the  $G\beta\gamma$  complex with DORs or  $\alpha 1$  subunits was assessed by respectively using DOR-Luc or  $\alpha 1$ -Luc as donors, while the acceptor GFP was introduced at the N-terminal domain of  $\gamma 2$ . Functionality of  $\alpha 1$ -Luc and GFP- $\gamma 2$  constructs had been previously established (11) (14) and that of receptor fusion proteins was assessed in cAMP assays. As indicated by their ability to support DPDPE-induced inhibition of cAMP production DOR-GFP and DOR-Luc were functional and adequately expressed at the membrane (Supplementary Fig. 1B). Their signalling capacity was comparable to that of DOR-Flag (Supplementary Fig. 1B), a carboxy-terminal tagged construct that had been previously shown to be indistinguishable from wild-type DORs (24).

In a first series of BRET assays DOR-GFP was separately co-expressed with each of the  $G\alpha 1$ -Luc constructs. Results showed the existence of a spontaneous BRET signal whose magnitude was dependent upon Luc location within  $\alpha$  subunit (Fig. 2A). In keeping with these findings, co-immunopurification of DORs with  $\alpha$ iLuc91 or with endogenously expressed  $\alpha 1$  subunits showed that the overexpressed  $\alpha 1$ -Luc construct and the native  $\alpha 1$  subunit were both recovered with the receptor (Fig. 2A; *inset*), indicating that the spontaneous interaction observed in BRET assays was not due to simultaneous

overexpression of the receptor with its G protein signalling partners.

The specificity of the observed interaction between DOR-GFP and  $\alpha 1$ Luc was further analyzed in BRET titration assays where donor/acceptor ratios were made to vary by progressively increasing the amount of acceptor constructs (DOR-GFP) available for interaction with a fixed amount of donor ( $\alpha 1$ -Luc91). Increasing amounts of DOR-GFP efficiently increased energy transfer until reaching a plateau (Fig. 2B), an observation consistent with the notion that donor molecules ( $\alpha 1$ Luc91) interact with acceptors (DOR-GFP) until reaching saturation (25). In contrast, co-transfection of  $\alpha 1$ Luc91 with increasing amounts of a CD8-GFP construct which has similar distribution as the receptor but does not interact with G $\alpha$  (11) (14), produced marginal transfer of energy that did not follow saturation kinetics. In addition, the fact that the highly efficacious DOR agonist SNC-80 (10  $\mu$ M; 2 min) modified BRET generated by DOR-GFP/ $\alpha 1$ Luc91 but not that corresponding to CD8-GFP, further indicates that the spontaneous transfer of energy obtained by co-expressing DOR/ $\alpha 1$  pairs was due to their specific interaction and not simply to their overexpression. It should be noted that BRET does not allow to identify the exact subcellular localization of interacting proteins, but the signal generated by DOR/ $\alpha 1$  BRET pairs most likely represents membrane as well as intracellular complexes in their way to the cell surface.

BRET assays also revealed a spontaneous in vivo interaction between DORs and the  $\beta\gamma$  complex as well as among  $\alpha 1$  and  $\beta\gamma$  subunits of the heterotrimeric G protein (Fig. 2C). Constitutive association between DORs and the  $\beta$  component of the  $\beta\gamma$  dimer was corroborated in

immunopurification assays where endogenous and overexpressed  $\beta 1$  subunits were recovered with the receptor (Fig. 2C, *inset*). Specificity of DOR-Luc/GFP- $\gamma 2$  interaction was confirmed in titration assays (Fig. 2D) in which this BRET pair was shown to generate a signal that could be saturated and modulated by DOR agonists while coexpression of CD8-Luc with GFP- $\gamma 2$  yielded a low, non-saturating energy transfer, that was unaffected by the presence of SNC-80.

The generation of a constitutive BRET signal among DOR and  $\alpha\beta\gamma$  constructs is consistent with the increasingly accepted notion that heptahelical receptors form part of constitutive multiprotein complexes containing transducers, effectors and regulators of G protein signalling (26). In the next series of experiments we assessed how ligands with different functional profiles modified the association between the receptor and heterotrimeric components of the complex.

*BRET changes induced by DPDPE and TICP are consistent with a conformational rearrangement of DOR- $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  complexes in living cells.*- The way in which TICP and DPDPE modified basal BRET values was dependent upon tag position within the different BRET pairs. In the case of DPDPE short-term incubation (2 min) at a maximal effective concentration (10  $\mu$ M) caused spontaneous energy transfer between DOR-GFP and  $\alpha 1$ -Luc to be increased at  $\alpha 1$ -Luc91, but reduced at the construct bearing Luc at position 122 (Fig. 3A). DPDPE also increased energy transfer at DOR-Luc/GFP- $\gamma 2$  (Fig. 3B) and  $\alpha 1$ -Luc60/GFP- $\gamma 2$  (Fig. 3C) while reducing the signal at  $\alpha 1$ -Luc91/GFP- $\gamma 2$  and  $\alpha 1$ -Luc122/GFP- $\gamma 2$  (Fig. 3C). Given the position of donor/acceptor moieties within each of the BRET constructs, these observations indicate

that DPDPE binding caused the accumulation of a receptor species in which the receptor C-terminus is closer to the N-terminus of  $\gamma 2$  than in the unstimulated state. At the same time, while approaching linker 1 region ( $\alpha i$ Luc60) and the loop connecting helices  $\alpha A$ - $\alpha B$  of  $\alpha i 1$  ( $\alpha i$ Luc91), the C-terminus of this agonist-activated receptor state separates from the loop connecting helices  $\alpha B$  and  $\alpha C$  ( $\alpha i$ Luc122) of the same subunit. DPDPE binding also modified the interaction between  $\alpha$  subunit and  $\beta\gamma$  complex, approaching the N-terminal region of  $\gamma 2$  to linker 1 region but separating it from the loops connecting helices  $\alpha A$ - $\alpha B$  and  $\alpha B$ - $\alpha C$ . As a whole, these BRET changes are better explained by a conformational reorganization of the constitutive signalling complex formed by the receptor and the heterotrimeric subunits than by a change in the absolute number of complexes (27) (11). The propensity of two proteins to form and/or remain in a complex may also be estimated by BRET50 values (25). Hence, the fact that DPDPE did not modify BRET50 for DOR-GFP/ $\alpha i 1$ Luc91 or DOR-Luc/GFP- $\gamma 2$  (Fig. 3D) further supported the notion that agonist binding did not modify the absolute number of DORs interacting with G proteins.

These observations contrast with accepted models of G-protein activation which predict recruitment of G proteins to agonist-occupied receptors and the subsequent dissociation of the  $\alpha\beta\gamma$  trimer upon activation (28) (29). Divergence between BRET results and predictions of currently accepted theoretical models could be related to the fact that BRET monitors receptor/G-protein interaction *in vivo* while the prevailing conceptual framework has been largely constructed upon structural and *in vitro* data. Hence, it was of interest to assess how similar

exposure to DPDPE as the one used in BRET assays would modify DOR/G-protein interaction as monitored by an *in vitro* assay. To do so cells were exposed to the agonist *in vivo* and the amount of  $\alpha i 1$  and  $\beta$  subunits recovered with immunopurified DORs was measured by western blot analysis. As shown in figure 3E, agonist treatment increased bands corresponding to  $\alpha i 1$ -Luc91 or endogenous  $\alpha i 1$  immunoreactivity. Similarly, the agonist increased the amount of endogenous or overexpressed  $\beta\gamma$  subunits that co-purified with the receptor (Fig. 3F). Both observations are consistent with formation of new DOR-G protein complexes or with an increase in stability of pre-existing ones, but only the latter are compatible with *in vivo* BRET data.

DPDPE and TICP shared an agonistic functional profile when both compounds were tested in the ERK cascade but had opposing actions in the cyclase pathway (Fig. 1). Hence it was of interest to determine whether these distinct functional phenotypes would be associated to different BRET profiles. Incubation with TICP (10  $\mu$ M, 2 min) reduced energy transfer at: i) DOR-GFP/ $\alpha i 1$ Luc pairs bearing tags at positions 60 and 122 (Fig. 3A), ii) BRET pair evaluating DOR interaction with the  $\beta\gamma$  complex (DOR-Luc/ $\gamma 2$ -GFP; Fig. 3B) and iii) one of the BRET pairs monitoring  $\alpha\beta\gamma$  interactions (DOR GFP- $\gamma 2$ / $\alpha i 1$ -Luc60; Fig. 3C). At the same time, TICP produced no significant changes in energy transfer at  $\gamma 2$ -GFP/ $\alpha i 1$ -Luc122 (Fig. 3C) or DOR-GFP/ $\alpha i 1$ -Luc91 (Fig. 3A) and increased BRET between this same donor and GFP- $\gamma 2$  (Fig. 3C). TICP-induced increases and decreases in energy transfer were determined by tag position within different BRET pairs, indicating that similar to DPDPE, the dual efficacy ligand did not modify the number of DOR  $\alpha i 1\beta 1\gamma 2$

complexes. In keeping with this notion, BRET50 values for the DOR-Luc/ $\alpha$ 1-Luc91 pair were not modified by TICP treatment (BRET50 CTL:  $0.011 \pm 0.002$ ; BRET50 TICP:  $0.010 \pm 0.002$ ). Moreover, immunopurification assays indicated that TICP did neither modify the amount of endogenous or overexpressed  $\beta$  subunits recovered with the receptor (Fig. 3F) indicating that binding of this ligand did not disrupt DOR- $\beta$  interaction. Although similar results were obtained when evaluating how TICP modified recovery of overexpressed  $\alpha$ 1 subunits with immunopurified DORs, the observation that the amount of endogenous  $\alpha$ 1 subunits recovered with the receptor were reduced by treatment with this ligand suggests a possible reduction in the stability of DOR- $\alpha$ 1 interaction.

TICP and DPDPE induced different changes in basal BRET at six of the seven pairs tested. At four of these pairs the effects of DPDPE were of opposite direction as those induced by TICP. Donor/acceptors at which these opposing changes took place indicate that both drugs differed in the way they modified DOR interaction with  $\alpha$  subunit (DOR-GFP/ $\alpha$ 1-Luc60; Fig. 3A) and  $\beta\gamma$  complex (DOR-Luc/GFP $\gamma$ 2; Fig. 3B). Furthermore, these differences were carried over to the way  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits positioned themselves with respect to each other since TICP caused the N-terminal domain of  $\gamma$ 2 to separate from  $\alpha$ 1 at the linker 1 region while DPDPE caused the same sites on the two subunits to become closer to one another ( $\alpha$ 1-Luc60/GFP $\gamma$ 2; Fig. 3C). Divergences between the effects of both drugs were also observed for the  $\alpha$ 1-Luc122/GFP $\gamma$ 2 pair, where TICP and DPDPE respectively approached and separated GFP- $\gamma$ 2 and  $\alpha$ 1-Luc122 tags.

*Ligand-induced changes in BRET are associated with G $\alpha$ i activation.*- Dose response curves for DPDPE showed that this agonist modified BRET signals generated by DOR-GFP/ $\alpha$ 1-Luc91, DOR-Luc/GFP- $\gamma$ 2 and  $\alpha$ 1-Luc91/ GFP- $\gamma$ 2 in a concentration dependent manner, and that EC50 values at each of these BRET pairs were less than one logarithm apart (Fig. 4A). DPDPE potency to modify energy transfer was also compared to agonist potency to promote G protein activation, revealing that EC50 at the different BRET pairs was within the same range as agonist potency to promote GTP $\gamma$ [486] binding (Fig. 4A). This observation suggests a direct link between agonist-induced conformational reorganization of the DOR-G protein complex and activation of the heterotrimer. Moreover, DPDPE potency to modify energy transfer at the different BRET pairs was in better agreement with its potency to promote GTP $\gamma$ [486] binding (EC50  $224 \pm 70$  nM; Fig. 4A) than its potency to induce cyclase inhibition (EC50  $7.4 \pm 0.6$  nM; supplementary figure 1), most probably reflecting lack of amplification between conformational changes revealed by BRET and G protein activation.

An association between ligand-induced changes in energy transfer and G protein activity was further supported by experiments in which BRET assays were performed following exposure to PTX. Indeed, G-protein inactivation by the toxin interfered with BRET changes at pairs evaluating DOR interaction with the  $\alpha$ 1 subunit and the  $\beta\gamma$  complex. This effect was particularly evident for ligands displaying high agonist efficacy both at cAMP and ERK readouts (Fig. 4B). In contrast, inactivation of the  $\alpha$ i subunit did not modify the basal BRET signal (*insets* figure 4B), indicating that spontaneous

energy transfer was not a consequence of constitutive G protein activation.

*Ligand rank order of efficacy to modify energy transfer was not maintained across all BRET pairs tested.*- DPDPE and TICP imposed different conformational changes upon the DOR/G-protein complex (Figs 3A, 3B and 3C), indicating that these ligands stabilized different receptor states. However, these observations by themselves do not allow to conclude whether DORs are stabilized in multiple, ligand-specific conformations (2) (30) or if these BRET changes were the consequence of DPDPE and TICP imposing opposite shifts in the equilibrium between two receptor species (31). To distinguish between these two possibilities it was necessary to monitor changes in energy transfer by a larger number of ligands. Theoretically, if the two-state alternative is correct and drugs simply differ in their ability to enrich (or deplete) one conformation over the other, then any group of ligands with different signalling efficacies would be expected to induce a progressive modification of BRET values, corresponding to the accumulation (or depletion) of one of the two conformations. In other words, these ligands should produce progressive BRET changes whose rank order should be maintained across all donor/acceptor pairs tested. Failure to comply with these restrictions would falsify the two state hypothesis in favour of the existence of ligand-specific conformations.

BRET changes induced by ligands with different signalling efficacies at cAMP and ERK readouts (Fig. 1) were tested at seven different sets of BRET pairs and ordered according to magnitude and direction of maximal energy transfer (Fig. 5), which are the parameters that indicate the degree to

which tags present in the different BRET pairs are either brought together or separated following ligand binding to the receptor. SNC-80 and DPDPE were always the most efficacious ligands maintaining ordinal positions to modify basal energy transfer across all BRET pairs, with the exception of DOR-GFP/ $\alpha$ i1-Luc122 (Fig. 5A), where none of the drugs tested differed in their ability to modify basal BRET. Unlike highly efficacious ligands energy transfer by morphine, TIPP, naltrindole and TICP was observed only at some of the pairs tested (5B and 5C). However, careful analysis of BRET pairs at which energy transfer by these drugs significantly differed from one another indicated that rank order of efficacy was not maintained. Indeed, naltrindole preceded TIPP and TICP at GFP- $\gamma$ 2/DOR, GFP- $\gamma$ 2/ $\alpha$ i1-Luc60 and GFP- $\gamma$ 2/ $\alpha$ i1-Luc91 but followed both drugs at GFP- $\gamma$ 2/ $\alpha$ i1-Luc122. Similarly, TIPP preceded TICP at GFP- $\gamma$ 2/ $\alpha$ i1-Luc60 but the order was reversed at GFP- $\gamma$ 2/ $\alpha$ i1-Luc122. Unlike changes in maximal energy transfer, ligands did not modify basal BRET50 values (see Table 1).

## DISCUSSION

An increasing number of reports indicate that modulation of intracellular signalling pathways through heptahelical (7TM) receptors may involve multiple active conformations of the same receptor. However, most of this evidence is based on functional data (3) (4), and physical proof of whether intracellular signalling partners are able to structurally discriminate among ligand-specific receptor states has remained limited. We have previously provided functional support to the idea that  $\beta_2$ AR<sub>s</sub> and DORs may be stabilized in ligand-specific states with distinct signalling and regulatory properties (6) (7).



In the following paragraphs we discuss how results obtained in this *in vivo* study of DOR- $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2 interactions rules out the two-state model and favours the existence of ligand-specific conformations.

Macromolecular complexes containing receptors,  $\alpha\beta\gamma$  subunits (27) (11), effectors (32) (33) (34) and signalling regulators (35) have been described for numerous 7TMR. In addition, *in vivo* molecular imaging techniques have allowed to establish that these complexes are preassembled before reaching the membrane (26) where they remain associated during initial phases of agonist-promoted signal transduction (36) (27) (14) (12). Several of our observations are consistent with this notion, since they can only be explained by the existence of constitutive DOR-G protein complexes whose number is not modified by short term exposure to different ligands. Indeed, a spontaneous interaction between DORs and different subunits of heterotrimeric G proteins is supported not only by the existence of a specific basal BRET signal at pairs evaluating DOR/ $\alpha$ 1, DOR/ $\beta$ 1 $\gamma$ 2 and  $\alpha$ 1/ $\beta$ 1 $\gamma$ 2 interaction, but also by reduction of these signals following binding of some of the ligands tested. The constitutive association of DORs with the  $\alpha$ 1 subunit and  $\beta\gamma$  complex is further reinforced by *in vitro* results showing that receptors and endogenous or overexpressed  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 1 subunits were co-immunopurified from untreated cells. In fact, in the case of the  $\beta$ 1 subunit its spontaneous association with DORs remained unchanged even following exposure to TICP. Finally, the idea that the total number of DOR-G protein complexes remains constant at early stages of ligand exposure is supported by the observation that 2 min incubation with different ligands induced position-dependent changes in maximal BRET. Intuitively, this type of observation

is better explained by a conformational rearrangement of donor/acceptor tags within a pre-existing complex than by a change in the total number of DORs interacting with G proteins (14). Constant BRET50 values across different treatments are also consistent with this notion. BRET50 is a proximity parameter calculated from experiments in which a fixed amount of donor-tagged proteins is co-expressed with increasing amounts of proteins carrying the acceptor. If energy transfer reaches saturation and the curve is defined by a quadrangular hyperbola, then BRET50 values corresponds to the ratio of donor/acceptor molecules producing 50% of energy transfer observed at maximal saturated BRET (25). By analogy with saturation binding assays this parameter may be used to estimate the ease with which complexes are formed or destroyed. Hence, the stability of this parameter across all pharmacological treatments reinforces the notion that ligand binding does neither promote complex formation or disintegration.

However, it is difficult to reconcile BRET results in which ligand binding does not modify the total amount of complexes, and *in vitro* data indicating that exposure to DPDPE changes the amount of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits recovered with immuno-purified DORs. A possible explanation for this divergence could be related to the nature of protein-protein interactions within multimeric arrays. Specifically, we propose that formation or disintegration of a multimeric complex is not exclusively determined by the propensity of any two of its components to interact with one another but through a network of forces linking all of its constituents. For example, evidence from this and other studies indicates that shortly after ligand binding heptahelical receptors remain associated

to heterotrimeric G proteins (11) (37), G-protein subunits remain associated with each other (27) (38) (14) and to effectors (34), while effectors maintain their interaction with receptors (32) (39) (40). Under these circumstances, the common interacting partner (effector) would be able to keep a structured complex and proximity between DORs and heterotrimeric subunits even if ligand binding modifies DOR affinity for G proteins. On the other hand, even if a change in their tendency to interact does not modify the total number of DORs associated with  $\alpha\beta\gamma$ , it could still modify complex stability. Indeed, if ligand binding changes the affinity with which DOR interacts with  $\alpha$  subunit it could modify resistance of the complex to detergents and the amount of  $\alpha\beta\gamma$  subunits recovered by DOR immunopurification. Thus, considering the proximity of complex components as the result of a network of forces and not simply as a consequence of individual relative affinities provides a plausible explanation to the observed divergence between BRET and immunopurification data.

Apart from DPDPE, BRET changes by SNC-80, morphine, TICP and naltrindole were also compatible with a conformational rearrangement of the constitutive DOR/G-protein complex. Overall, changes in energy transfer induced by the complete series of tested compounds were characterized by differences in magnitude, direction and by a failure to maintain the same rank order of efficacy across the different interactions tested. The latter observation is particularly relevant because it falsifies the notion that DOR ligands produce differential accumulation of a single active receptor state. Indeed, if the only difference among the tested drugs were

their ability to shift equilibrium between two receptor species (active and inactive), then one would expect the increasing ability of different ligands to enrich (or reduce) one of the species at the expense of the other to transpire as correlated, progressive changes in energy transfer at all donor/acceptor pairs tested. Results summarized in tables 2 and 3 indicate that BRET changes induced by DOR ligands across different interactions within the DOR-G protein complex do not fulfill these expectations. In particular, table 2 shows correlation analysis for ligand-induced BRET changes at pairs assessing the same protein-protein interaction from different vantage points (i.e.: DORs with different  $\alpha$ -Luc constructs or  $\beta\gamma$  complex with different  $\alpha$ iLuc constructs). The fact that non-correlated changes could be detected at both set of interactions is inconsistent with a two state model and favour an alternative view in which not only the receptor but heterotrimeric subunits may adopt ligand-specific conformations.

Ligand-induced BRET changes at pairs evaluating DOR interaction with different components of the heterotrimeric G protein were blocked by PTX, and agonist potency to modify energy transfer at these constructs was very similar to EC50 values obtained at GTP $\gamma$ [486] binding assays. Both these observations point to a close association between ligand-induced BRET changes and G protein activation (14) (12). Hence, if different ligands were to induce a progressive increase (or depletion) of a unique active receptor conformation they would also be expected to produce an incremental accumulation (or depletion) of the same active state of the G protein. In other words, one would expect ligand-induced BRET changes at pairs evaluating DOR interaction with different  $\alpha$ iLuc constructs to be correlated with ligand-

induced BRET changes at pairs evaluating interaction of the same  $\alpha$ Luc constructs with the  $\beta\gamma$  complex. Table 3 shows the correlation analysis of BRET pairs assessing how conformational information encoded at DOR/ $\alpha$ i1 interaction is channelled to  $\alpha$ i1 interactions with the  $\beta\gamma$  complex. Results indicate that ligand-induced BRET changes at DOR interaction with  $\alpha$ iLuc60 or  $\alpha$ iLuc122 were not consistently correlated with downstream conformational changes imposed upon  $\alpha$ iLuc/GFP- $\gamma$ 2 pairs following ligand binding to the receptor. Finally, the two state model would also predict ligand-induced BRET changes at pairs evaluating conformational rearrangement within the G protein heterotrimer to be correlated with DOR ligand efficacy to modify cyclase and MAPK signalling, both of which are G protein dependent (41) (7) (42). Table 4 shows that ligand-induced change in cAMP production or in ERK phosphorylation were not consistently correlated across the different BRET pairs evaluating  $\alpha\beta\gamma$  interaction. Interestingly, ligand-induced BRET changes at the single BRET pair that did not correlate with cAMP responses ( $\alpha$ iLuc122/GFP- $\gamma$ 2) were the only to correlate with ligand ability to induce ERK phosphorylation. A three dimensional representation of the correlation between each of the functional responses and  $\alpha\beta\gamma$  interactions as evaluated by  $\alpha$ iLuc122 and the construct bearing the Luc tag at the linker region ( $\alpha$ iLuc60) are shown in figure 6. It is quite remarkable that conformational changes evaluated from each of these positions correlated with just one of the functional responses assessed, as if the ERK effector recognized the  $\alpha\beta\gamma$  heterotrimer from the same “perspective” as the tag on position 122 while adenylyl cyclase shared its vantage point with the tag on position 60 (as well as position 91; table 4). This interpretation is consistent

with the notion that different effectors interact with very specific residues within the G-protein (43) (44) which would not necessarily be equally exposed by conformational changes induced by different ligands.

In conclusion, this study showed that DORs and  $\alpha$ i1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2 subunits are contained within multimeric signalling complexes and provided evidence indicating that the constitutive association between DORs and G proteins is a viable platform whereby conformational diversity encoded by ligand binding to the receptor may be conveyed to downstream signalling relays. This type of organization adds unprecedented diversity to receptor function and has implications for the way we conceive specificity of signal transduction. In particular, since composition of multiprotein arrays is influenced by factors such as expression levels of interacting partners, presence of scaffolding proteins (45) and membrane compartmentalization (46), not all signalling complexes harbouring a specific receptor would be expected to be the same. Thus, a ligand that preferentially recognizes a receptor conformation within a particular type of signalling complex would confine modulation of receptor signalling to cells that express that specific type of array. Alternatively, stabilization of a conformation which allows activation of a specific subset of complexes containing a definite type of effector would restrict consequences of receptor activation to a distinct signalling pathway, and to the vital functions it may regulate. Exploiting this signalling diversity could prove effective in developing therapeutic ligands with reduced side effects.

## References

1. Furchgott, R. (1966) *The use of haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor agonist complexes*, Academic Press, New York
2. Kenakin, T. (2004) *Trends Pharmacol Sci* **25**, 186-192
3. Pineyro, G., and Archer-Lahlou, E. (2007) *Cell Signal* **19**, 8-19
4. Urban, J. D., Clarke, W. P., von Zastrow, M., Nichols, D. E., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J. A., Roth, B. L., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Miller, K. J., Spedding, M., and Mailman, R. B. (2007) *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 1-13
5. Berg, K. A., Maayani, S., Goldfarb, J., Scaramellini, C., Leff, P., and Clarke, W. P. (1998) *Mol. Pharmacol.* **54**, 94-104
6. Azzi, M., Charest, P. G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11406-11411
7. Audet, N., Paquin-Gobeil, M., Landry-Paquet, O., Schiller, P. W., and Pineyro, G. (2005) *J Biol Chem* **280**, 7808-7816
8. Ghanouni, P., Gryczynski, Z., Steenhuis, J. J., Lee, T. W., Farrens, D. L., Lakowicz, J. R., and Kobilka, B. K. (2001) *J Biol Chem* **276**, 24433-24436
9. Alves, I. D., Salamon, Z., Varga, E., Yamamura, H. I., Tollin, G., and Hruby, V. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48890-48897
10. Li, J. H., Han, S. J., Hamdan, F. F., Kim, S. K., Jacobson, K. A., Bloodworth, L. M., Zhang, X., and Wess, J. (2007) *J Biol Chem*
11. Gales, C., Rebois, R. V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hebert, T. E., and Bouvier, M. (2005) *Nat Methods* **2**, 177-184
12. Ayoub, M. A., Maurel, D., Binet, V., Fink, M., Prezeau, L., Ansanay, H., and Pin, J. P. (2007) *Mol Pharmacol* **71**, 1329-1340
13. Dupre, D. J., Robitaille, M., Ethier, N., Villeneuve, L. R., Mamarbachi, A. M., and Hebert, T. E. (2006) *J Biol Chem* **281**, 34561-34573
14. Gales, C., Van Durm, J. J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006) *Nat Struct Mol Biol* **13**, 778-786
15. Schiller, P. W., Weltrowska, G., Berezowska, I., Nguyen, T. M., Wilkes, B. C., Lemieux, C., and Chung, N. N. (1999) *Biopolymers* **51**, 411-425
16. Breit, A., Gagnidze, K., Devi, L. A., Lagace, M., and Bouvier, M. (2006) *Mol Pharmacol* **70**, 686-696

17. Pineyro, G., Azzi, M., De Lean, A., Schiller, P., and Bouvier, M. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60**, 816-827
18. Pineyro, G., Azzi, M., deLean, A., Schiller, P. W., and Bouvier, M. (2005) *Mol. Pharmacol.* **67**, 336-348
19. Quock, R. M., Burkey, T. H., Varga, E., Hosohata, Y., Hosohata, K., Cowell, S. M., Slate, C. A., Ehlert, F. J., Roeske, W. R., and Yamamura, H. I. (1999) *Pharmacol Rev* **51**, 503-532
20. Angers, S., Salahpour, A., Joly, E., Hilairet, S., Chelsky, D., Dennis, M., and Bouvier, M. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3684-3689
21. Bertrand, L., Parent, S., Caron, M., Legault, M., Joly, E., Angers, S., Bouvier, M., Brown, M., Houle, B., and Menard, L. (2002) *J Recept Signal Transduct Res* **22**, 533-541
22. Milligan, G., and Bouvier, M. (2005) *Febs J* **272**, 2914-2925
23. Marullo, S., and Bouvier, M. (2007) *Trends Pharmacol Sci* **28**, 362-365
24. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P., and Bouvier, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 13727-13736
25. Mercier, J. F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 44925-44931
26. Dupre, D. J., and Hebert, T. E. (2006) *Cell Signal* **18**, 1549-1559
27. Bunemann, M., Frank, M., and Lohse, M. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 16077-16082
28. Gilman, A. G. (1987) *Annu Rev Biochem* **56**, 615-649
29. Bourne, H. R. (1997) *Curr Opin Cell Biol* **9**, 134-142
30. Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. P. (1965) *J Mol Biol* **12**, 88-118
31. Koshland, D. E., Jr., Nemethy, G., and Filmer, D. (1966) *Biochemistry* **5**, 365-385
32. Davare, M. A., Avdonin, V., Hall, D. D., Peden, E. M., Burette, A., Weinberg, R. J., Horne, M. C., Hoshi, T., and Hell, J. W. (2001) *Science* **293**, 98-101
33. Lavine, N., Ethier, N., Oak, J. N., Pei, L., Liu, F., Trieu, P., Rebois, R. V., Bouvier, M., Hebert, T. E., and Van Tol, H. H. (2002) *J Biol Chem* **277**, 46010-46019
34. Rebois, R. V., Robitaille, M., Gales, C., Dupre, D. J., Baragli, A., Trieu, P., Ethier, N., Bouvier, M., and Hebert, T. E. (2006) *J Cell Sci* **119**, 2807-2818
35. Abramow-Newerly, M., Roy, A. A., Nunn, C., and Chidiac, P. (2006) *Cell Signal* **18**, 579-591

36. Lachance, M., Ethier, N., Wolbring, G., Schnetkamp, P. P., and Hebert, T. E. (1999) *Cell Signal* **11**, 523-533
37. Nobles, M., Benians, A., and Tinker, A. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18706-18711
38. Frank, M., Thumer, L., Lohse, M. J., and Bunemann, M. (2005) *J Biol Chem* **280**, 24584-24590
39. Roy, A. A., Baragli, A., Bernstein, L. S., Hepler, J. R., Hebert, T. E., and Chidiac, P. (2006) *Cell Signal* **18**, 336-348
40. Dupre, D. J., Baragli, A., Rebois, R. V., Ethier, N., and Hebert, T. E. (2007) *Cell Signal* **19**, 481-489
41. Selley, D. E., Breivogel, C. S., and Childers, S. R. (1998) *J Recept Signal Transduct Res* **18**, 25-49
42. Archer-Lahlou, E., Audet, N., Amraei, M. G., Huard, K., Paquin-Gobeil, M., and Pineyro, G. (2008) *Journal of cellular and molecular medicine* **submitted**
43. Ford, C. E., Skiba, N. P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L. R., Rosal, R., Weng, G., Yang, C. S., Iyengar, R., Miller, R. J., Jan, L. Y., Lefkowitz, R. J., and Hamm, H. E. (1998) *Science* **280**, 1271-1274
44. Sunahara, R. K., Tesmer, J. J., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1997) *Science* **278**, 1943-1947
45. Kreienkamp, H. J. (2002) *Curr Opin Pharmacol* **2**, 581-586
46. Ostrom, R. S., and Insel, P. A. (2004) *Br J Pharmacol* **143**, 235-245

## FOOTNOTES

This work was supported by Grants from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to GP, MB and PWS. PWS also holds funds from National Institutes of Health (NIH). EAL received a postdoctoral fellowship and GP is recipient of young investigator award from Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). MB holds a Canada Research Chair in Molecular Pharmacology and signal transduction. The authors will like to thank Martin Audet for his help with MatLab program.

The abbreviations used are: BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer ; DOR, Delta Opioid Receptor; *RLuc*, *Renilla* Luciferase ; DPDPE, D-Pen-2,5-enkephalin; IBMX, 3-Isobutyl-1-methylxanthine ; TIPP, Tyr-Tic-Phe-Phe-OH ; TICP $\Psi$ , Tyr-Tic $\Psi$ [CH<sub>2</sub>NH]Cha-Phe-OH ; EDTA, Ethylenediamine tetracetic acid; ERK, Extracellular signal-Regulated Kinase ; GFP, Green Fluorescent Protein ; 7TMR, seven TransMembrane Receptor ;  $\alpha_{2AR}$ ,  $\alpha_2$ -adrenergic receptor ; FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer; PTX, pertussis toxin; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium;  $\beta_{2AR}$ ,  $\beta_2$ -adrenergic receptor.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. Functional responses of DOR ligands in adenylyl cyclase and ERK pathways. (A)** HEK293 cells expressing DOR-Flag were treated with saturating concentrations (10  $\mu$ M) of indicated ligands and cAMP accumulation assays performed in presence of 25  $\mu$ M forskolin as detailed in *Experimental Procedures*. Drug effects are expressed as % change with respect to total amount of cAMP produced in absence of ligand (% change in cAMP accumulation =  $[\text{cAMP}_{\text{ligand}} - \text{cAMP}_{\text{no ligand}}] / \text{cAMP}_{\text{no ligand}} \times 100$ ) and correspond to mean  $\pm$  SEM of seven experiments carried out in triplicates. **(B)** HEK293 cells expressing DOR-Flag were exposed to saturating concentrations of indicated ligands for 5 min following which ERK signalling was assessed by immunoblot. ERK phosphorylation was normalized to the amount of protein loaded per lane, by expressing the data as phosphoERK/totalERK ratio. Drug effects were expressed as % of the basal ratio (% of basal =  $[\text{pERK}/\text{totalERK}_{\text{ligand}}] / [\text{pERK}/\text{totalERK}_{\text{no ligand}}] \times 100$ ), and represent mean  $\pm$  SEM of at least six experiments. **(C)** *Representative immunoblots*: pERK and total ERK bands observed in presence and absence of indicated drugs. Each drug was paired to its corresponding experimental control from the same blot. To achieve this pairing lanes containing information not presented in the study were removed by splicing. Examples for different drugs were not necessarily all from the same blot but they were all matched for total ERK contents and time of film exposure. Statistical analysis is detailed in materials and methods. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

**Fig. 2. Spontaneous signals generated by different BRET pairs. (A)** HEK 293 cells were transfected with recombinant plasmids for DOR-GFP, indicated  $\alpha_1$ -Luc constructs and untagged  $\beta_{1\gamma_2}$  subunits. Spontaneous interaction between DORs and  $\alpha_1$  subunits was measured by assessing net BRET values in the absence of ligand. Values correspond to mean  $\pm$  SEM of 5-9 experiments carried out in duplicates. *Inset*: HEK 293 cells expressing or not DOR-Flag were transfected with  $\alpha_1$ -Luc $\beta_{1\gamma_2}$  or vector, and DORs

immunopurified as described in experimental procedures. The amount of  $\alpha 1$ -Luc91 ( $\cong$  75KD) or endogenous  $\alpha 1$  ( $\cong$  39KD) subunits recovered with each purification product was assessed by immunoblot. Results correspond to a representative example of 4 independent experiments. Blots for  $\alpha 1$ -Luc91 and endogenous  $\alpha 1$  were scanned from separate films. **(B)** BRET titration assays were performed by measuring net energy transfer in HEK 293 cells transfected with increasing concentrations of DOR-GFP or CD8-GFP and a fixed amount of  $\alpha 1$ -Luc91, in combination with untagged  $\beta 1\gamma 2$  subunits. **(C)** Basal interaction between the  $\beta \gamma$  complex and DORs was assessed by measuring the spontaneous BRET signal generated by HEK 293 cells expressing GFP- $\gamma 2$  and DOR-Luc in combination with untagged  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunits. Interaction between the  $\beta \gamma$  complex and  $\alpha 1$  subunits was assessed by co-transfecting  $\alpha 1$ -Luc60,  $\alpha 1$ -Luc91 or  $\alpha 1$ -Luc122, with GFP- $\gamma 2$ ;  $\beta 1$  subunits and DOR-Flag into HEK 293 cells. Values correspond to mean  $\pm$  SEM of 4-9 experiments carried out in duplicates. *Inset*: HEK 293 cells expressing or not DOR-Flag were transfected with  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  or vector, and DORs immunopurified as described in experimental procedures. The amount of endogenous or overexpressed  $\beta 1$  ( $\cong$  32 KD) subunits recovered with each purification product was assessed by immunoblot. Results correspond to a representative example of 4 independent experiments. **(D)** BRET titration assays were performed by measuring net energy transfer in HEK 293 cells transfected with increasing amounts of GFP- $\gamma 2$  and a fixed amount of DOR-Luc or CD8-Luc, in combination with untagged  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunits.

**Fig. 3. BRET changes promoted by DPDPE and TICP are consistent with conformational reorganization of preformed DOR- $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  complexes.** HEK 293 cells were transfected as in Fig. 2 and net BRET signals generated by **(A)** DOR-GFP and specified  $\alpha 1$ -Luc partners, **(B)** GFP- $\gamma 2$  and DOR-Luc or **(C)** GFP- $\gamma 2$  and specified  $\alpha 1$ -Luc constructs, were assessed in presence or absence of DPDPE or TICP (10  $\mu$ M; 2 min). Results were expressed as the difference between measures obtained in presence or absence of ligand and correspond to mean  $\pm$  SEM of at least six experiments carried out in duplicates. \*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$  **(D)** BRET titration assays were carried out as in Fig. 2, in presence or absence of DPDPE. BRET 50 values represent the calculated ratio of donor/acceptor molecules producing 50% of the energy transfer observed at saturation. **(E)** Following transfection with DOR-Flag,  $\alpha 1$ -Luc91 or vector, in combination with  $\beta 1\gamma 2$  cells were exposed or not to saturating concentrations of DPDPE or TICP as above. Following treatment receptors were immunopurified and the product separated by electrophoresis SDS-PAGE. The amount of  $\alpha 1$ -Luc91 or endogenous  $\alpha 1$  subunits recovered with the receptor was then assessed by immunoblot. DOR interaction with transfected or endogenous  $\alpha 1$  subunits was assessed by calculating the immunoreactivity ratio  $\alpha 1$ /FLAG present in each sample. Results were expressed as % of basal values and represent mean  $\pm$  S.E.M. of four experiments. Blots for  $\alpha 1$ -Luc91 and endogenous  $\alpha 1$  were scanned from separate films. **(F)** Cells stably expressing DOR-Flag were transfected with  $\alpha 1\beta 1\gamma 2$  or vector and exposed or not to DPDPE or TICP. Following DOR immunopurification the amount endogenous or overexpressed  $\beta 1$  subunits recovered with the receptor was assessed by immunoblot. Results are expressed as in **(E)** and correspond to 4 experiments. Blots for endogenous and overexpressed  $\beta 1$  subunits were scanned from separate films.



**Fig. 4. Ligand-promoted BRET changes are associated with G protein activation. (A)** HEK 293 cells were transiently transfected with the indicated BRET constructs and complementary heterotrimeric subunits and exposed to increasing concentrations of DPDPE to establish dose response curves at each of the donor/acceptor pairs. Results are expressed as the difference of BRET ratios obtained in presence and absence of drug and are represented in the left y-axis. The effect of increasing concentrations of DPDPE on G protein activation was assessed by GTP $\gamma$ <sup>35</sup>S binding in cells transfected with Flag-tagged-DORs. Results are expressed as % change with respect to basal and are represented on the right axis. **(B)** Cells expressing DOR-GFP/ $\alpha$ i1-Luc91 (n=5 to 6) or DOR-Luc/GFP- $\gamma$ 2 (n=5 to 6) were exposed or not to PTX as indicated on the figure (100 ng/ml; 16 hrs) following which ligand-promoted BRET changes were assessed. *Inset*: netBRET values obtained in controls and PTX-treated cells.

**Fig. 5. Comparison of ligand-induced BRET changes across different donor/acceptor pairs.** HEK 293 cells were transfected as detailed in previous figures and BRET signals generated by **(A)** DOR-GFP and specified  $\alpha$ i1-Luc partners were obtained in absence and presence of indicated ligands (10  $\mu$ M; 2 min exposure). Results are expressed as the difference between measures obtained in presence and absence of ligand and correspond to mean  $\pm$  SEM of 5-9 experiments carried out in duplicates. **(B)** BRET changes promoted by different classical agonists in cells expressing DOR-Luc/GFP- $\gamma$ 2 (n=5 to 7) and in cells expressing **(C)** GFP- $\gamma$ 2 and specified  $\alpha$ i1-Luc partners (n=6). Note: DPDPE and TICP results that appear in Fig.3 were included here for comparison. \*= $p$ < 0.05; \*\*= $p$ <0.01.

**Fig. 6. Three dimensional representations of ligand-induced changes in energy transfer at donor/acceptor pairs monitoring the interaction between (A)**  $\alpha$ i1-Luc60/GFP- $\gamma$ 2,  $\alpha$ i1-Luc122/GFP- $\gamma$ 2 and ligand efficacy in cAMP assays. **(B)**  $\alpha$ i1-Luc60/GFP- $\gamma$ 2,  $\alpha$ i1-Luc122/GFP- $\gamma$ 2 and ligand efficacy at ERK activation assays. Points representing different ligands were connected by a line that follows their rank order of efficacy in respective functional assays. Insets to the right show two dimensional representations for BRET/functional data. Thick lines in two dimensional plots illustrate linear regression for correlated pairs of data sets. Data are expressed as % changes with respect to values observed in absence of ligand.

**Supplementary Fig. 1. Characterization of different BRET constructs used to probe DOR interaction with the G protein heterotrimer. (A)** Schematic representation of a GPCR (purple, Rhodopsin PDB code 1L9H) and heterotrimeric  $\alpha$ <sub>1</sub> (light blue),  $\beta$ <sub>1</sub> (red) and  $\gamma$ <sub>2</sub> (yellow) subunits (PDB code 1GG2) fused to luciferase (blue; PDB code 1LC1) or to GFP (green; PDB code 1GFL) as indicated. Note different Luc orientation in  $\alpha$ i1-Luc60;  $\alpha$ i1-Luc91 and  $\alpha$ i1-Luc122. **(B)** Functional competence of receptor constructs. HEK cells were transiently transfected with recombinant plasmids to express DOR-Flag, DOR-Luc or DOR-GFP in combination with  $\alpha$ i1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2 and exposed to increasing concentrations of DPDPE. Results represent mean  $\pm$  SEM, of three experiments carried out in triplicate. Data for each construct was normalized to corresponding E<sub>max</sub> values where maximal inhibition of cAMP production by DPDPE was 24%  $\pm$  2% in cells expressing DOR-Flag, as compared to 34%  $\pm$  3% and 36%  $\pm$  3% in cells respectively expressing DOR-Luc or DOR-GFP. EC<sub>50</sub> values were calculated using GraphPad Prism and appear in the figure.

**Table 1.** Effect of different classical agonists on BRET50 values calculated from titration assays carried out in cells expressing DOR-GFP/ $\alpha$ 1-Luc91 and DOR-Luc/GFP- $\gamma$ 2.

Drugs	DORGFP vs $\alpha$ 1Luc91	DORLuc vs $\gamma$ 2GFP
Basal	0.011 $\pm$ 0.002	0.083 $\pm$ 0.006
DPDPE	0.009 $\pm$ 0.002	0.054 $\pm$ 0.003
SNC-80	0.013 $\pm$ 0.002	0.058 $\pm$ 0.004
Morphine	0.012 $\pm$ 0.002	0.069 $\pm$ 0.004
TIPP	0.009 $\pm$ 0.001	0.066 $\pm$ 0.004
TICP	0.010 $\pm$ 0.002	†

† = Not assessed

**Table 2.** Correlations analysis of ligand-induced-BRET changes at donor/acceptor pair. Evaluating interaction with DORs or  $\beta\gamma$  complex from different vantage points on the  $\alpha$  subunit

DORGFP vs $\alpha$ 1Lucs constructs	R <sup>2</sup>	p
<i><math>\alpha</math>1Luc60 vs <math>\alpha</math>1Luc91</i>	0.614	0.065
<i><math>\alpha</math>1Luc60 vs <math>\alpha</math>1Luc122</i>	0.134	0.476
<i><math>\alpha</math>1Luc91 vs <math>\alpha</math>1Luc122</i>	0.018	0.802
$\gamma$ 2GFP vs $\alpha$ 1Lucs constructs		
<i><math>\alpha</math>1Luc60 vs <math>\alpha</math>1Luc91</i>	0.916	0.003
<i><math>\alpha</math>1Luc60 vs <math>\alpha</math>1Luc122</i>	0.554	0.090
<i><math>\alpha</math>1Luc91 vs <math>\alpha</math>1Luc122</i>	0.774	0.021

**Table 3.** Correlation analysis of ligand-induced BRET changes at donor/acceptor pairs monitoring conformational information transferred from the receptor to  $\alpha$  subunits and from  $\alpha$  subunits to the  $\beta\gamma$  complex

Correlation for DOR- $\alpha$ 1Luc60 and $\alpha$ 1Lucs/ $\gamma$ 2GFP pairs	R <sup>2</sup>	p
<i><math>\alpha</math>1Luc60-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.712	0.035
<i><math>\alpha</math>1Luc91-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.614	0.065
<i><math>\alpha</math>1Luc122-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.400	0.178
Correlation for DOR- $\alpha$ 1Luc91 and $\alpha$ 1Lucs/ $\gamma$ 2GFP pairs		
<i><math>\alpha</math>1Luc60-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.767	0.022
<i><math>\alpha</math>1Luc91-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.886	0.005
<i><math>\alpha</math>1Luc122-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.866	0.007
Correlation for DOR- $\alpha$ 1Luc122 and $\alpha$ 1Lucs/ $\gamma$ 2GFP pairs		
<i><math>\alpha</math>1Luc60-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.000	0.969
<i><math>\alpha</math>1Luc91-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.064	0.629
<i><math>\alpha</math>1Luc122-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.109	0.523

**Table 4.** Correlation analysis of ligand-induced change at BRET pairs evaluating conformational change within the G protein heterotrimer and ligand efficacy to modulate cAMP accumulation and ERK phosphorylation

<b>Correlation for cAMP signalling and <math>\alpha</math>iLuc/<math>\gamma</math>2GFP constructs</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
<i><math>\alpha</math>i1Luc60-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.954	0.008
<i><math>\alpha</math>i1Luc91-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.798	0.017
<i><math>\alpha</math>i1Luc122-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.442	0.150
<b>Correlation for ERK signalling and <math>\alpha</math>iLuc/GFP constructs</b>		
<i><math>\alpha</math>i1Luc60-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.344	0.226
<i><math>\alpha</math>i1Luc91-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.507	0.112
<i><math>\alpha</math>i1Luc122-<math>\gamma</math>2GFP</i>	0.659	0.049

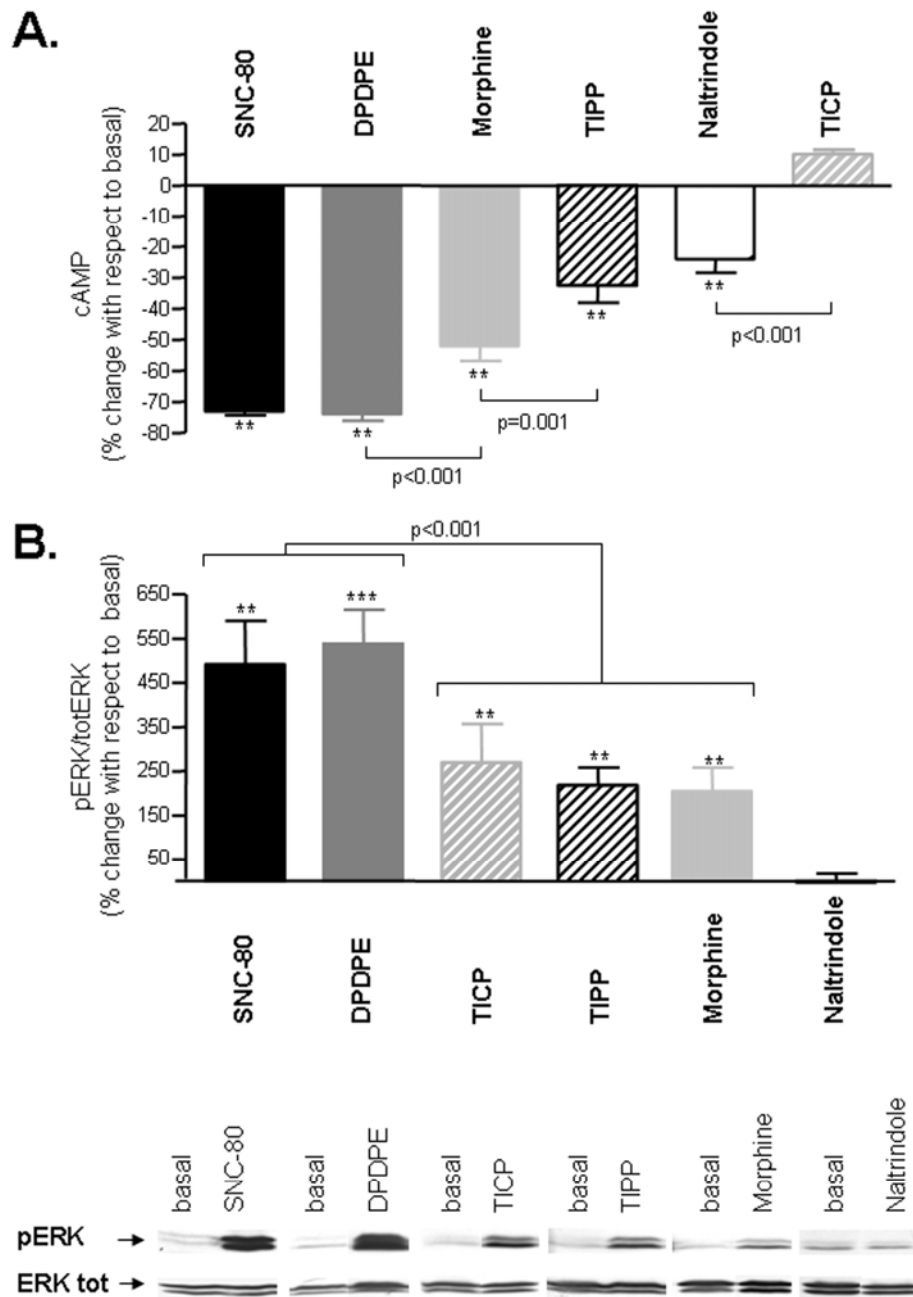


Figure 1

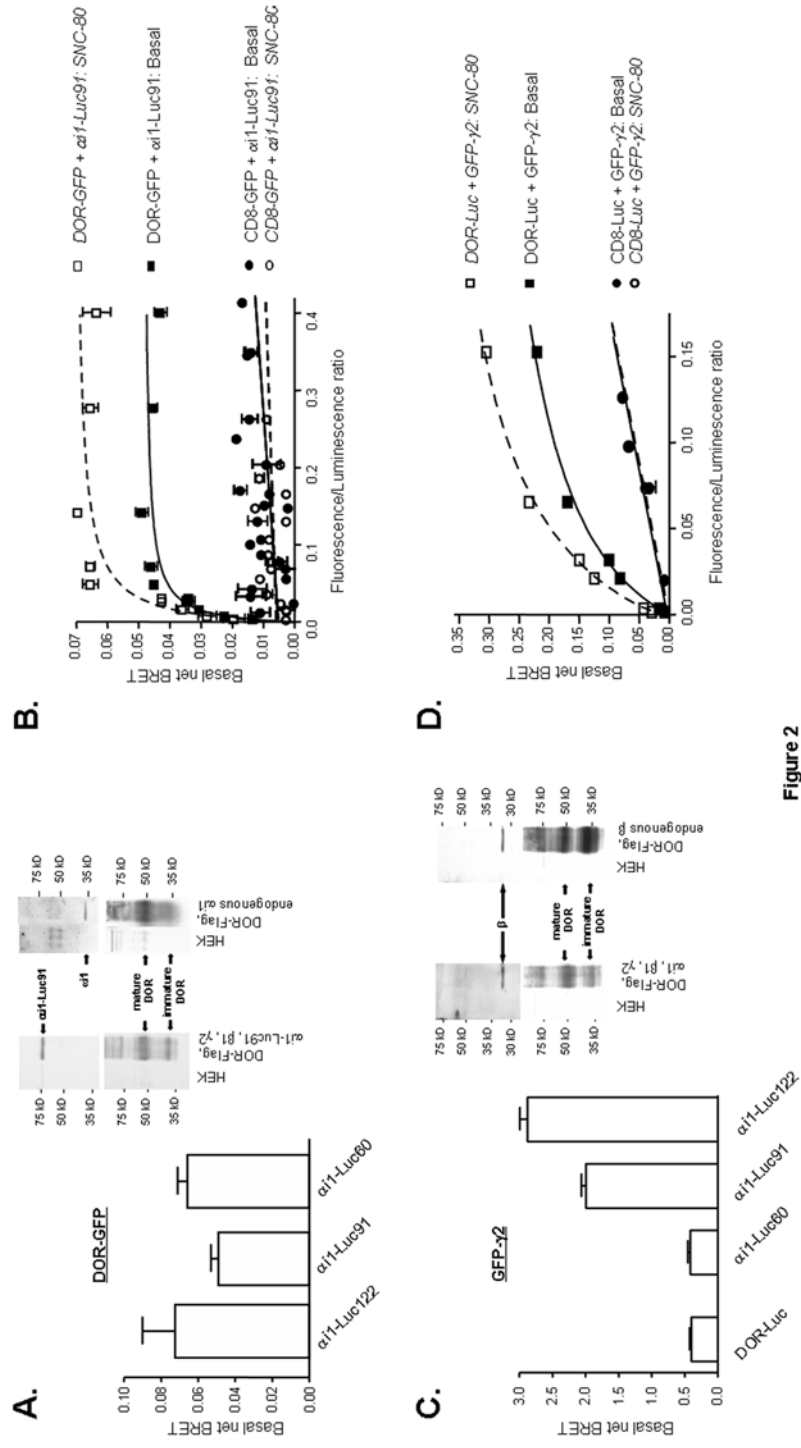
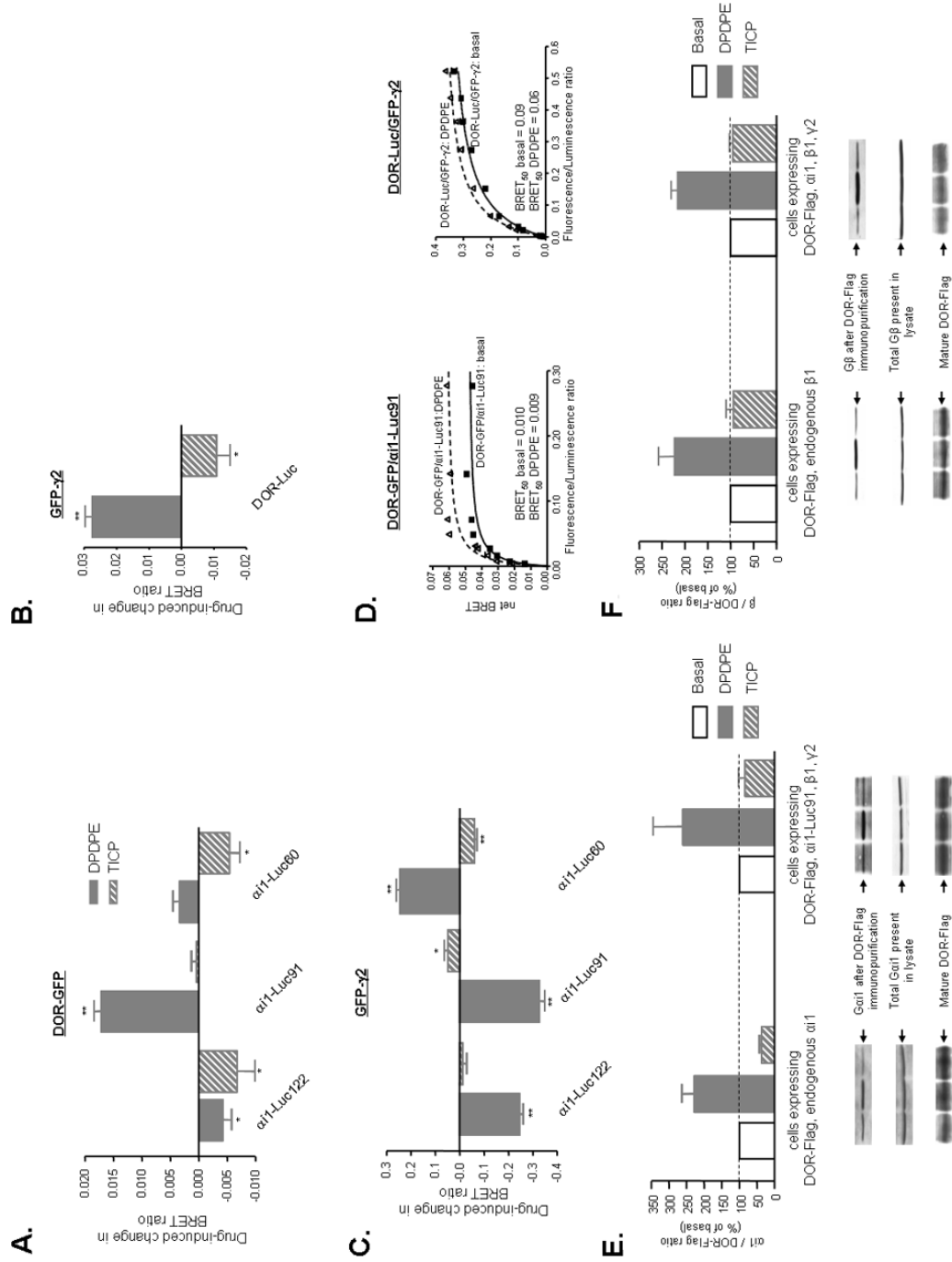
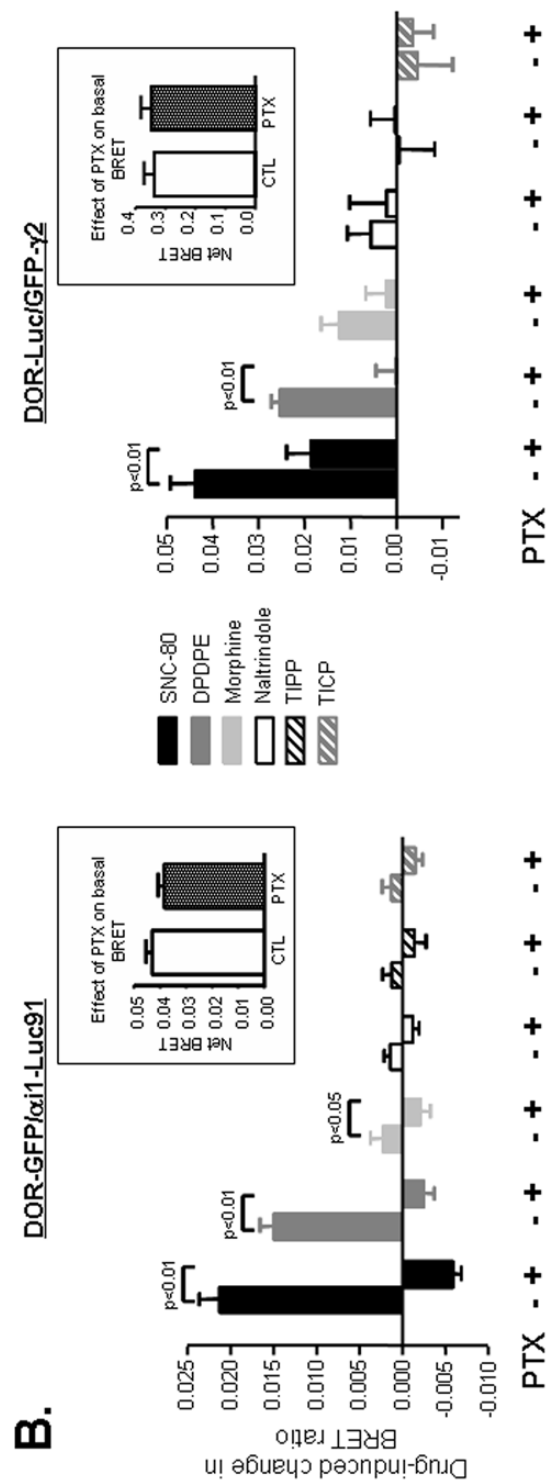
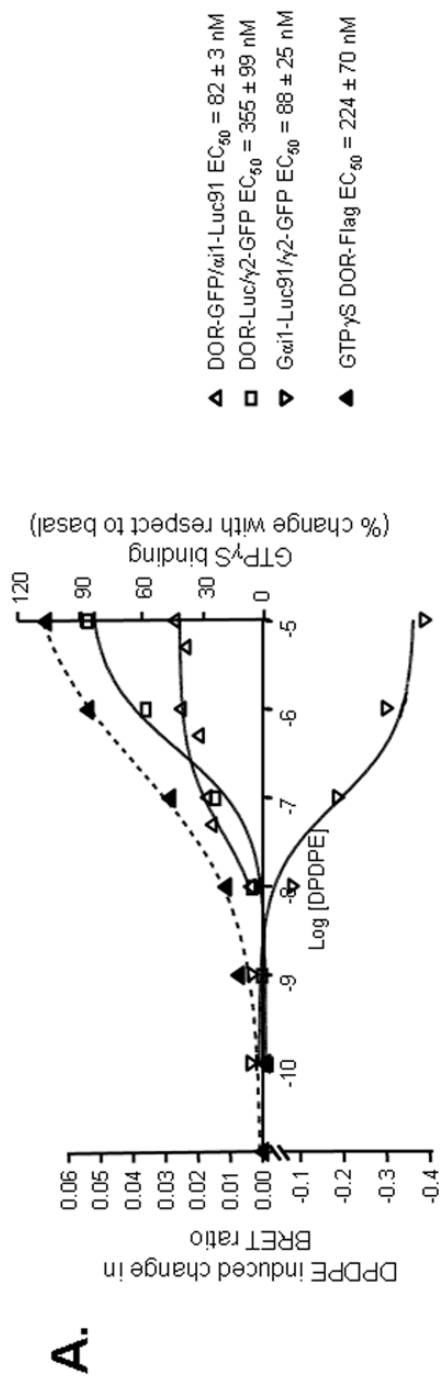
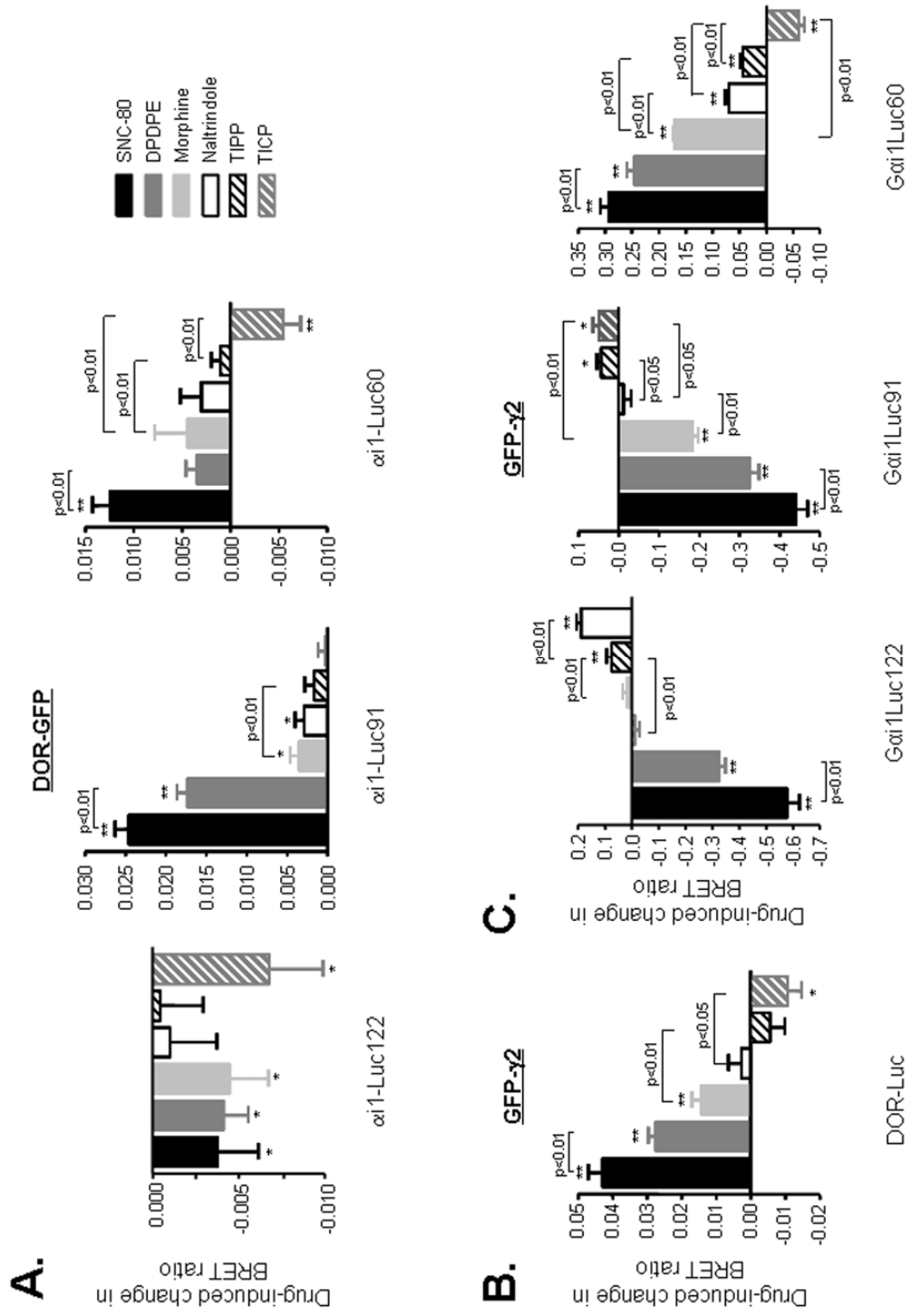


Figure 2



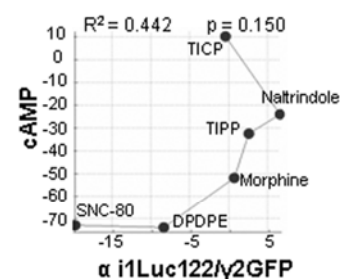
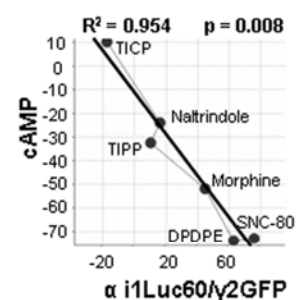
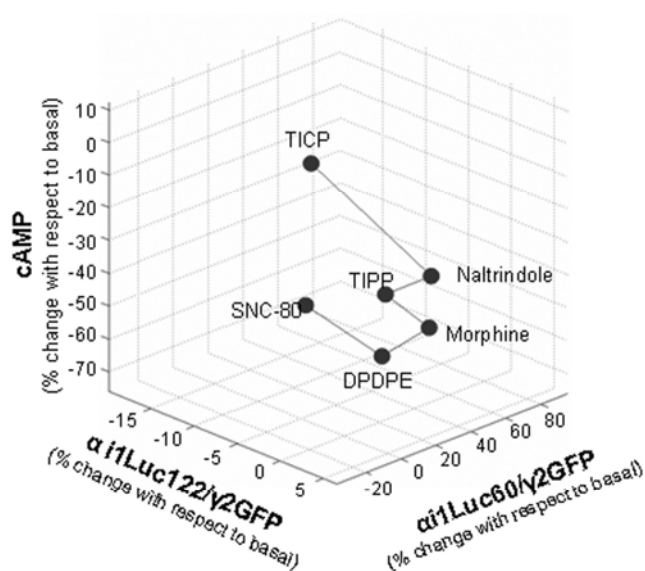


**Figure 4**





### A. cAMP vs $\alpha$ iLuc/GFP- $\gamma$ 2



### B. MAPK vs $\alpha$ iLuc/GFP- $\gamma$ 2

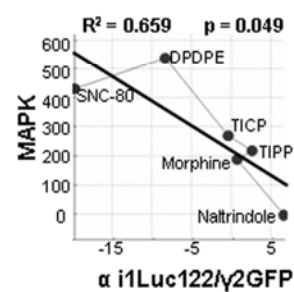
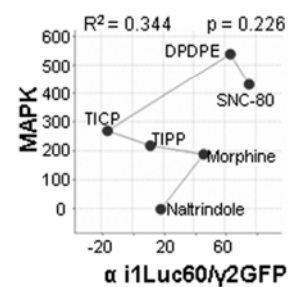
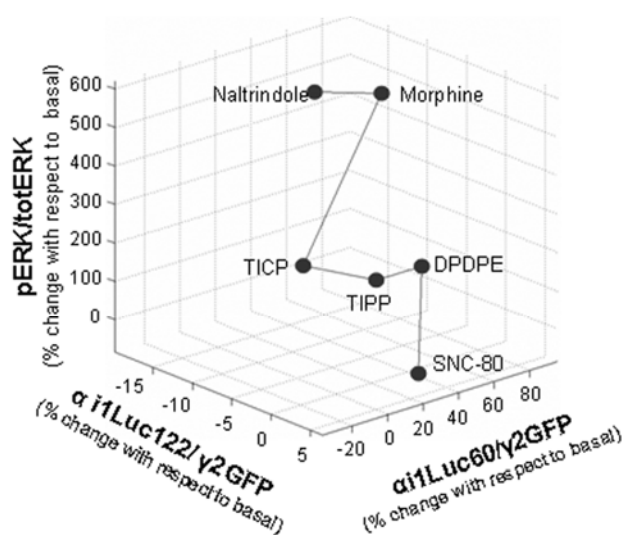
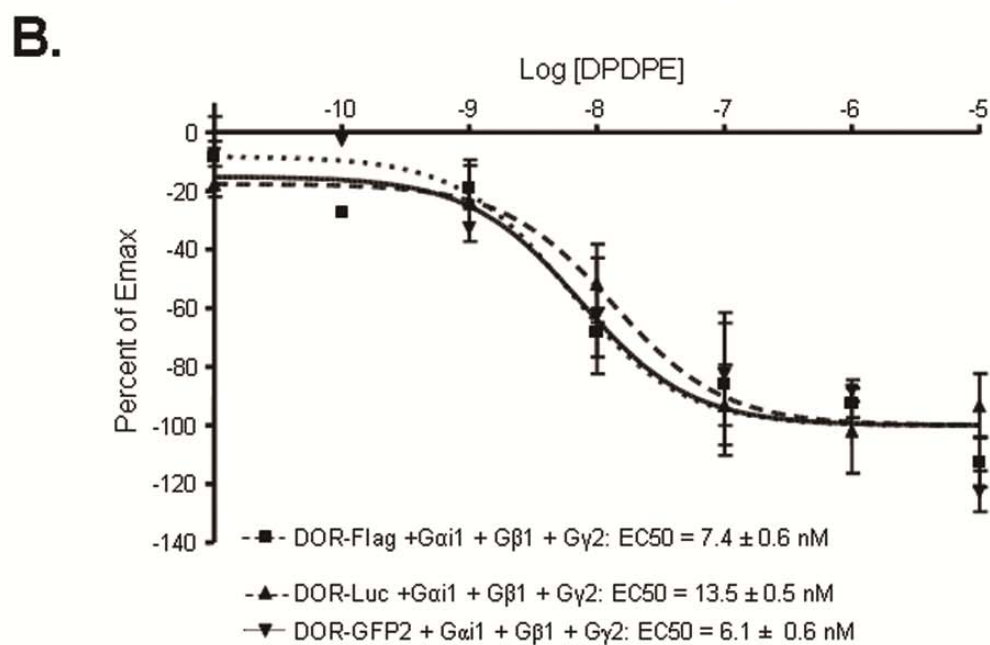
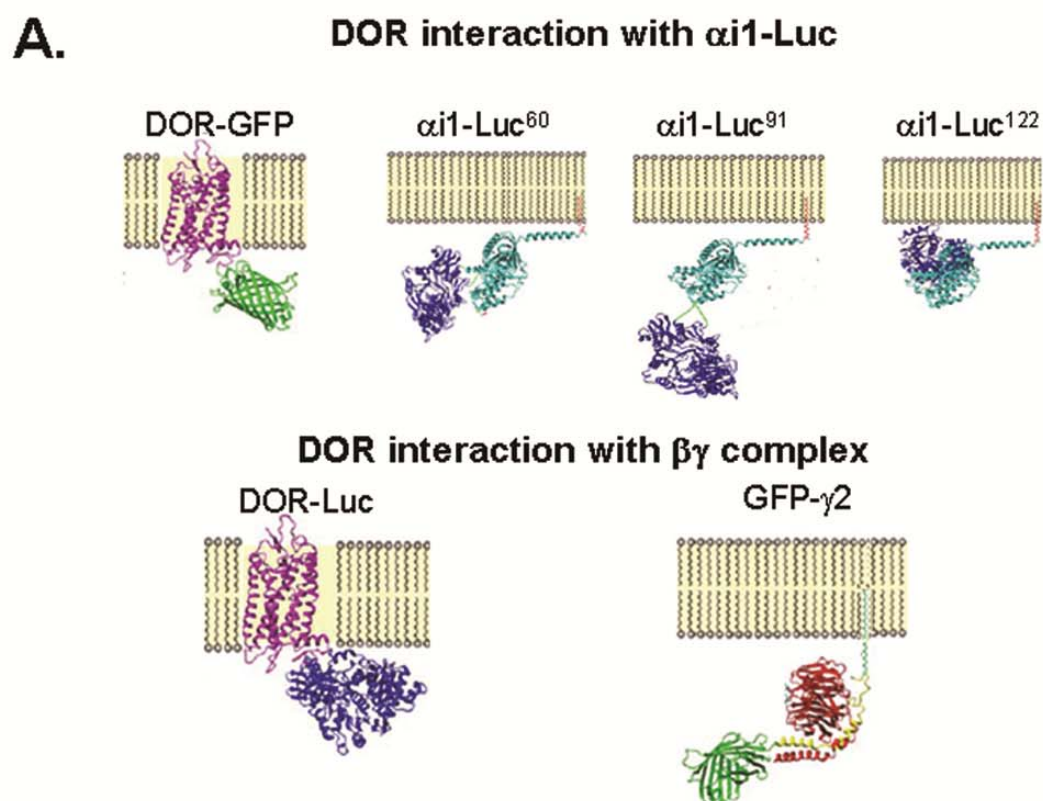


Figure 6



**Supplementary Figure 1**

### 3.3 Troisième publication

Audet et al. (2012) Differential association of receptor-G $\beta\gamma$  complexes with  $\beta$ -arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonist. *Journal of neuroscience*, **32 (14)** : 4827-4840.

#### 3.3.1 Introduction et mise en contexte du 3<sup>e</sup> article

Nous avons démontré avec l'article précédent que les ligands du DOR peuvent stabiliser différentes conformations du complexe récepteur-protéine G et, par déduction, différentes conformations du récepteur même. Il nous restait à démontrer si ces différentes conformations peuvent se traduire en une propriété exploitable d'un point de vue thérapeutique. Un des effets secondaires les plus importants pour les agonistes du DOR est le développement de la tolérance à l'analgésie. Cette tolérance est reliée à la perte de la signalisation du récepteur produite par sa régulation déclenchée par une stimulation prolongée de celui-ci. L'idée de l'article était donc d'évaluer deux agonistes, capables de produire l'analgésie, mais distinct dans leur capacité à développer la tolérance à celle-ci, stabilisent des conformations qui vont être régulé différemment.

Nous avons donc commencé par utiliser la technique BRET utilisée dans l'article précédent pour évaluer les conformations stabilisées par une incubation prolongée avec différents agonistes. Nous avons retenu deux agonistes complets, le DPDPE et le SNC-80, qui diffèrent dans leur capacité à interagir avec la sous-unité G $\gamma_2$ . Alors que cette sous-unité s'approche du C-terminal du DOR après un traitement prolongé avec le SNC-80, elle s'éloigne du récepteur traité avec le DPDPE. Cette inversion indique que les deux agonistes stabilisent des conformations distinctes, il nous restait à trouver ce qui différencie ces deux conformations d'un point de vue fonctionnel. La différence fut découverte au niveau de la récupération du DOR à la membrane suite à son internalisation par les deux ligands. Même s'il n'y a aucune différence observée lors de l'internalisation du DOR par un ou l'autre des ligands, seul le DPDPE permet au récepteur de recycler à la membrane plasmique, le SNC-80 produisant une séquestration prolongée du récepteur à l'intérieur des cellules HEK293. L'utilisation de culture primaire de neurone du cortex préfrontal de rats naissant nous a permis d'observer que cette différence n'est pas un

artefact cellulaire. Cette absence de recyclage à la membrane du DOR stimulé par le SNC-80 fut ensuite associée à une perte de la signalisation de la voie de l'AMPc contrairement au DPDPE permet le retour du DOR à la membrane procurant au récepteur une protection contre la désensibilisation.

Sachant que la  $\beta$ arr est une protéine déterminante dans le tri postendocytique des RCPG, nous avons regardé l'interaction de la  $\beta$ arr2 avec le DOR et la sous-unité  $G\gamma_2$  à la suite d'une stimulation prolongée avec ces deux agonistes. Nous avons pu observer que les deux ligands provoquent un recrutement de la  $\beta$ arr2 vers le récepteur, mais seul le SNC-80 produit un recrutement vers la  $G\gamma_2$ . De plus, lorsque les ligands sont retirés du milieu, seule la conformation stabilisée par SNC-80 maintient son interaction avec la  $\beta$ arr2 et la sous-unité  $G\gamma_2$ .

La différence dans la désensibilisation et la régulation du DOR produite par ces deux agonistes suggérait que le DPDPE induirait moins de tolérance à l'analgésie que le SNC-80. Nous avons donc collaboré avec le laboratoire de Laura Stone à l'Université McGill afin de tester notre hypothèse sur un modèle de douleur neuropathique chez des souris. Les résultats ont confirmé notre hypothèse, le SNC-80 produit une tolérance aiguë à l'analgésie après une 2<sup>e</sup> injection consécutive tandis que le DPDPE ne produit aucune tolérance aiguë observable après cette 2<sup>e</sup> injection.

Cette étude est très importante, car elle démontre la pertinence de la sélectivité fonctionnelle pour la réduction de la tolérance à l'analgésie. Nous espérons ainsi que l'impact de cet article permettra le développement de nouvelles molécules spécifiques non seulement aux récepteurs, mais aussi aux voies de signalisation et de régulation de ces derniers.

### **3.3.2 Article 3**

**Differential association of receptor-G $\beta$  complexes with  $\beta$ -arrestin2  
determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid  
receptors.**

Running title: Recycling bias of opioid receptor agonists

Nicolas Audet<sup>1,2</sup>, Iness Charfi<sup>1,2</sup>, Ouissame Mnie-Filali<sup>1,2</sup>, Mohammad Amraei<sup>1</sup>,  
Anne-Julie Chabot-Doré<sup>3</sup>, Magali Millecamps<sup>3</sup>, Laura S. Stone<sup>3,4,5</sup> and Graciela  
Pineyro<sup>1,2,6,&</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Qc H3T 1C5, Canada.

<sup>2</sup> Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Qc H3T 1J4, Canada.

<sup>3</sup> Alan Edwards Centre for Research on Pain, McGill University, Montreal, Qc H3A 1A4, Canada

<sup>4</sup> Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Qc H3G 1Y6, Canada.

<sup>5</sup> Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Qc H3A 2B2, Canada.

<sup>6</sup> Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Qc H3T 1J4, Canada.

<sup>&</sup> Corresponding author: Graciela Pineyro; Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Qc, Canada, H3T 1C5. Tel: 514-345-4931 #6289; Fax: 514-345-4801.

Number of pages: 45

Number of figures: 10

Number of words for Abstract: 242

Number of words for Introduction: 497

Number of words for Discussion (separately): 1437

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Dr M. Bouvier, L. Devi and T. Hébert for kindly providing BRET pairs used in this study. We thank Dr LE Trudeau and Dr E. Archer-Lahlou for valuable advice on immunocytofluorescence in neurons and Dr R. Élie for insightful comments on statistical analysis. I.C received a studentship from Ste-Justine Research Center and A-J.C-D from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). O.M-F received a fellowship from Fonds de la Recherche en Santé de Québec (FRSQ). Research was funded by NSERC grant 311997 and CIHR MOP 79432 to G.P. and CIHR MOP 86691 to LSS.

## ABSTRACT

Opioid tendency to generate analgesic tolerance has been previously linked to biased internalization. Here we assessed an alternative possibility; whether tolerance of delta opioid receptor agonists (DORs) could be related to agonist-specific recycling. A first series of experiments revealed that DOR internalization by DPDPE and SNC-80 was similar, but only DPDPE induced recycling. We then established that the non-recycling agonist SNC-80 generated acute analgesic tolerance which was absent in mice treated with DPDPE. Further, both agonists stabilized different conformations, whose distinct interaction with  $G\beta\gamma$  subunits led to different modalities of  $\beta$ -arrestin2 ( $\beta$ arr2) recruitment. In particular, Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assays revealed that sustained activation by SNC-80 drew the receptor C-terminus in close proximity of the N-terminal domain of  $G\gamma 2$ , causing  $\beta$ arr2 to interact with receptors and  $G\beta\gamma$  subunits. DPDPE moved the receptor C-tail away from the  $G\beta\gamma$  dimer, resulting in  $\beta$ arr2 recruitment to the receptor but not in the vicinity of  $G\gamma 2$ . These differences were associated with stable DOR- $\beta$ arr2 association, poor recycling and marked desensitization following exposure to SNC-80 while DPDPE promoted transient receptor interaction with  $\beta$ arr2 and effective recycling which conferred protection from desensitization. Taken together these data indicate that DORs may adopt ligand-specific conformations whose distinct recycling properties determine the extent of desensitization and are predictive of analgesic tolerance. Based on these findings, we propose that the development of functionally selective DOR ligands which favor recycling could constitute a valid strategy for the production of longer acting opioid analgesics.



## INTRODUCTION

Opioids are the most efficacious analgesics known but their use is restricted by the development of tolerance (Dworkin, 2009). Analgesic tolerance is defined as the loss of efficacy following repeated drug administration. Depending on the time frame for its development, tolerance may be classified as acute (minutes to hours) or chronic (days to weeks) (Christie, 2008). Reports showing that knock out of  $\beta$ arr2 reduced acute and chronic tolerance induced by morphine indicate that  $\beta$ arr2 plays an important role in the generation of each of these functional adaptations (Bohn et al., 1999; Bohn et al., 2000; Bohn et al., 2002). At the molecular level,  $\beta$ arrs participate in the regulation of opioid receptor signaling (Dang et al., 2011; Raehal and Bohn, 2011), contributing to functional desensitization (Lowe et al., 2002; Qiu et al., 2007) and triggering internalization (Zhang et al., 2005; Qiu et al., 2007). In the case of DORs, internalization may lead to lysosomal trafficking for subsequent degradation (Whistler et al., 2002; Hislop et al., 2009) or may result in receptor recycling (Gomes et al., 2000; Zhang et al., 2008) via a Rab11-dependent mechanism (Archer-Lahlou et al., 2009). The sorting of DORs to these alternative destinations has also been shown to involve  $\beta$ arr2 (Zhang et al., 2008).

The exact mechanism by which  $\beta$ arrs contribute to analgesic tolerance remains unclear (Dang et al., 2011; Nagi and Pineyro, 2011). Studies using MOR agonists indicate that different opioids induce different degrees of tolerance. For example, morphine produces similar analgesic tolerance as oxycodone (Madia et al., 2009), but more so than methadone (Kim et al., 2008) or etorphine (Madia et al., 2009). Since internalization efficacy of these agonists is also distinct (Arttamangkul et al., 2008), tolerance has been linked to differences in agonist

ability to recruit  $\beta$ arrs and induce MOR sequestration (Martini and Whistler, 2007). DOR agonists with distinct internalization profiles also differ in the generation of tolerance. In particular, administration of the internalizing agonist SNC-80 resulted in acute analgesic tolerance that was not observed following the administration of non-internalizing AR-M1000390 (Pradhan et al., 2009). On the other hand, alternative reports indicate that DOR internalization and tolerance may not be strictly related. For example, deltorphin II and SB235863 have similar internalization capacity as SNC-80 but, unlike the latter, they maintain their analgesic efficacy after acute administrations (Beaudry et al., 2009; Bradbury et al., 2009). Further, despite differences in triggering internalization, long term administration of SNC-80 and of AR-M1000390 both eventually result in the generation of tolerance (Pradhan et al., 2010).

In the present study, we tested the hypothesis that biased recycling could predict the degree of tolerance induced by DOR agonists. Our results indicate that SNC-80 generated acute analgesic tolerance whereas DPDPE did not. Assays monitoring DOR trafficking in HEK293 cells and neurons revealed that maximal internalization by both agonists was the same, but only DPDPE elicited receptor recycling. Importantly, BRET assays showed that differences in recycling resulted from stabilization of ligand-specific conformations which established distinct interactions with  $G\beta\gamma$  subunits and  $\beta$ arr2.

## MATERIALS AND METHODS

### DNA constructs

Constructs encoding human DORs fused to either the green fluorescent (GFP) or yellow green fluorescent protein (YFP) were generated by subcloning the entire coding sequence (excluding the stop codon) of the receptor into pGFP-N2 (PerkinElmer Life) or pEYFP-N2 (BD Biosciences) vectors, to produce a fusion protein in which the receptor was separated from the corresponding fluorophore by a seven-amino acid linker (Breit et al., 2006). Plasmids encoding GFP or YFP fused at the N terminus of human Gy2 were obtained by subcloning the human Gy2 coding sequence into GFP or YFP vectors (Gales et al., 2005). The recombinant plasmid encoding for human  $G\alpha_{i1}$ -Luc91 was prepared using a flexible linker to insert the coding sequence of humanized *Renilla* luciferase (RLuc; PerkinElmer Life Sciences) into that of human  $G\alpha_{i1}$  between residues Leu91 and Lys92 (Audet et al., 2008). The GFP10-Epac-RLuc BRET<sup>2</sup>-cAMP biosensor was constructed in three steps as described in (Leduc et al., 2009). First, GFP10, the linker GSAGT-(Acc65I/HindIII)-KLPAT, and RLuc were inserted in pcDNA3.1<sup>TM</sup>/Zeo (Invitrogen) (Hamdan et al., 2007). Part of human Epac1 (residues 144-881) was then amplified by PCR, digested by Acc65I-HindIII, and inserted using the same restriction sites between GFP10-GSAGT and KLPAT-RLuc3 in pcDNA3.1<sup>TM</sup>/Zeo. Finally, the substitutions T781A and F782A were introduced by PCR to remove the Rap1 binding site of Epac1. Murine DORs tagged with the Flag epitope at the N-terminus were a generous gift from Dr. M. von Zastrow (University of California at San Francisco).

## Cell culture and transfections

*Immortalized cell lines.* Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit/ml penicillin-streptomycin, at 37°C in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. For transient expression of recombinant proteins HEK293 cells were seeded at a density of  $3 \times 10^6$  cells in 100 mm petri dishes, cultured for 24 h and transfected with vectors encoding BRET constructs for DORs, G protein subunits or  $\beta$ arr2 in combination with complementary signaling partners as detailed below. Transfections were done with polyethylenimine (Polysciences, Warrington, PA) according to a previously published protocol (Boussif et al., 1995). For trafficking and binding assays HEK293 cells were stably transfected with Flag-DORs. Monoclonal cell lines were produced using lipofectamine (Invitrogen) to transfect 6  $\mu$ g of DNA/100 mm petri dish followed by selection with G418 (500  $\mu$ g/ml). For cAMP accumulation assays HEK293-Flag-DOR cells were plated onto 100 mm petri dishes and transfected with 3  $\mu$ g of the GFP10-Epac-Rluc BRET2-cAMP biosensor using lipofectamine (Invitrogen), Cells were then subject to selection using hygromycin (50  $\mu$ g/ml).

*Primary neuronal cultures* for use in immunofluorescence assays were prepared from rat postnatal prefrontal cortex (P0-P2) using a procedure adapted from a previously described method (Fasano et al., 2008). Briefly, pups were cryoanaesthetized, their brains rapidly removed and transferred into ice-cold dissociation solution (NaSO<sub>4</sub> 90mM; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30 mM; MgCl<sub>2</sub> 5,8 mM; CaCl<sub>2</sub>; Hepes 10 mM; glucose 20 mM; pH 7,4). The prefrontal cortex was dissected and digested in papain solution (20 units per ml; 40 min at 37°C) following which the product

was passed through Pasteur pipettes of progressively decreasing diameter for mechanical dissociation. The suspension obtained was centrifuged, cells resuspended and diluted to a density of 2.5 million per milliliter before plating on glass coverslips precoated with collagen/poly-L-lysine (each at 0.1 mg/mL). Cells were cultured in neurobasal A medium supplemented with B27 (4%), 100 unit/ml penicillin-streptomycin, Glutamax (2%) and fetal bovine serum (10%) for 24 hs. At this time coverslips were transferred from their home dish to a 6-well plate containing 2 mL of neurobasal A medium/well and transfected with Flag-DORs (8 µg of DNA/well) by means of a modified calcium phosphate transfection protocol (Shieh et al., 1998). Briefly, a calcium phosphate/DNA precipitate was formed in HEPES buffered saline (pH 7.03) and was added drop wise to the neurobasal A medium. After 30 min transfection, neurons were washed in Hank's balanced salt solution and returned to their original culture medium.

### **Evaluation of DOR trafficking in HEK293 cells**

*ELISA-based assays.* Measurement of surface-expressed receptors and quantification of receptor internalization was also assessed using an ELISA-based method adapted from a previously published protocol (Archer-Lahlou et al., 2009). HEK293 cells stably expressing Flag-DORs were seeded at a density of  $10^5$  cells/well and grown on 24-well polylysine-coated plates for 48 h. The day of the experiment, vehicle, DPDPE or SNC-80 (1 µM) were introduced in new incubation medium containing DMEM/HEPES 20 mM for the indicated times. The internalization reaction was stopped by addition of cold PBS. After three PBS washes, cells were fixed for 15 minutes at 4°C in paraformaldehyde (3%) and non

specific binding was blocked by incubation with PBS/BSA 1%/CaCl<sub>2</sub> 1mM at RT for 30 minutes. Cells were subsequently incubated with anti-FLAG M1 antibody (1:1000; Sigma-Aldrich) for 1 hour (RT), washed three times and incubated with peroxidase-conjugated (HRP) anti-mouse antibody (1:8000; Amersham Biosciences) for 30 minutes. After extensive washing, 200 µL of the HRP substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride (*SIGMA FAST<sup>TM</sup> OPD*, Sigma-Aldrich) was added to each well. The reaction was allowed to proceed for 8 minutes and stopped using 50 µL of 3N HCl. 200 µL of the mix were then transferred to a 96-well plate for optical density (OD) evaluation at 492 nm in a microplate reader (Victor3; Perkin Elmer). OD readings corresponded to the signal generated by receptors at the cell surface. The amount of surface receptors internalized following exposure to agonists was calculated by subtracting OD obtained in the presence of agonist from the one obtained in its absence. Results were expressed as % of receptors initially present at the membrane according to the following calculation:  $100 \times (OD^{Basal} - OD^{Stimulated}) / (OD^{Basal})$  where  $OD^{Basal}$  and  $OD^{Stimulated}$  correspond to the signal obtained in absence or presence of agonist respectively.

Recycling of internalized receptors to the plasma membrane was estimated using a variant of the assay described above. One hour before inducing internalization with a single dose of DPDPE or SNC-80 (1 µM; 30 minutes), protein synthesis was blocked with 10 µM cycloheximide that remained present throughout the duration of the assay. At the end of the internalization period the agonist was removed by washing with DMEM at 37°C (3 X 1 min). Cells were then placed within the incubator to recover in an agonist-free medium (DMEM/HEPES/cycloheximide) for increasing periods of time. In experiments

using naltrindole (1  $\mu\text{M}$ ), naloxone (1  $\mu\text{M}$ ) or morphine (10  $\mu\text{M}$ ), these drugs were introduced immediately after agonist washout and remained present in the incubation medium throughout recovery. Experiments were stopped by addition of cold PBS, and the steps to label membrane DORs proceeded as described in the previous paragraph. The amount of internalized receptors that recycled back to the surface was expressed as percentage of receptors internalized following exposure to the agonist.

*Flow cytometry assays.* HEK293 cells stably expressing FLAG-DORs were incubated with vehicle (DMSO 0,01%), D-Pen-2,5-enkephalin (DPDPE) or (+)-4-[(aR)-a-((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC-80) (1  $\mu\text{M}$ ) for the indicated time periods. At the end of treatment cells were washed three times in ice-cold phosphate buffered solution (PBS) and subsequently resuspended in Tyrode's solution (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 12mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,6mM D-glucose, 0,49mM MgCl<sub>2</sub>, 0,37mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25mM HEPES pH 7,4) at 4°C. Non specific sites were blocked with Tyrode containing 1% BSA for 30 min (4°C) and surface receptors were then labeled by successive incubation with first (1:1000; anti-FLAG rabbit Sigma-Aldrich) and second (1:1000; goat anti-rabbit, Alexa Fluor® 488, Invitogen) antibodies (30 min). After labeling, cells were washed two times with Tyrode's solution and Flag-DORs present at the membrane were quantified by flow cytometry on a FACsCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Internalization was calculated by subtracting membrane fluorescence generated by treated samples from fluorescence produced in vehicle-treated cells. Results were expressed as a percentage of membrane labeling in the absence of ligand.

## Evaluation of DOR trafficking in neurons

*Immunofluorescence (IF) microscopy.* Immunocytochemistry experiments were carried out 2 days after transfection. Labeling of surface Flag-DORs was done by introducing Ca<sup>2+</sup>-dependent mouse anti-Flag M1 antibody (1:100; Sigma) to the incubation medium 30 min prior to vehicle (DMSO 0,01%), DPDPE or SNC-80 (10 µM). Following treatments of increasing durations (15-120 min) neurons were washed in Ca<sup>2+</sup>-free phosphate buffered solution (PBS) (3 X 1 min, at 37°C). These washes allowed to remove treatment drugs as well as antibody bound to surface receptors, thus ensuring that only internalized Flag-DORs that were protected from washes conserved their first antibody labeling (Vargas and Von Zastrow, 2004). In experiments monitoring internalization, washed cells were immediately fixed with 4% PFA and permeabilized in PBS/0.1% triton. Non-specific sites were blocked with PBS/BSA 1% (10 min at RT) and neurons then exposed to second antibody (donkey anti-mouse Alexa-488; 1:1000; Molecular Probes). Images were acquired using a FluoView 1000 confocal laser-scanning microscope (Olympus). Mean cytosolic labeling intensity was quantified in cells that had been exposed to vehicle or agonist for 60 min, using ImageJ according to a previously described method (Scherrer et al., 2006). Briefly, nuclear integrated intensity was subtracted from the integrated intensity present within the perimeter of the neuron soma. The resulting value was divided by the area comprised between the nuclear and outer perimeters of the cell to yield mean cellular intensity. Nuclear fluorescence was considered as the background, and its mean intensity subtracted from the quotient described above.



In experiments assessing receptor recycling, cells were labeled with first antibody as above and exposed to agonist or vehicle for 60 min. Following treatment neuron cultures were washed in  $\text{Ca}^{2+}$ -free PBS (3 X 5 min, at 37°C) and returned to the incubator for 60 min recovery in neurobasal medium. After recovery cells were fixed and processed as above in order to assess intracellular fluorescence. For evaluation of surface labeling neurons that had recovered from agonist exposure were washed with PBS and exposed to second antibody without being permeabilized. Recycling was determined from two complementary measures: a) evaluating intracellular fluorescence that remained present after recovery from agonist exposure and b) counting the number of cells that recovered surface labeling following incubation in the absence of ligand. In total four independent experiments were carried out in which 8-28 neurons/condition were sampled.

### **Intermolecular BRET assays**

All BRET assays were carried out in HEK293 cells. The effect of sustained agonist exposure on DOR-G protein interaction was assessed using a methodology that we had previously developed and validated for detection of ligand-induced conformational changes within DOR-G protein complexes (Gales et al., 2005; Gales et al., 2006; Audet et al., 2008; Audet and Pineyro, 2011). Briefly, 100 mm petri dishes plated with HEK293 cells were transfected with: a) DOR-GFP (8 µg), Gai1-Luc (1 µg), Gβ1 (4 µg) and Gγ2 (4 µg) or b) DOR-Luc (0.25 µg), GFP-Gγ2 (6 µg), Gai1 (4 µg) and Gβ1 (4 µg). These BRET constructs have been previously shown to support normal signaling and to establish specific interactions

among themselves (Gales et al., 2005; Gales et al., 2006; Audet et al., 2008). Two days after transfection HEK293 cells expressing different BRET pairs and their accessory subunits were exposed to vehicle, DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M) for 60 min. At the end of treatment cells were washed three times (1 min each) with PBS at 37°C, before distributing them into 96-well microplates (white Optiplate; PerkinElmer Life Sciences). The *Rluc* substrate, DeepBlueC coelenterazine (PerkinElmer Life Sciences), was manually added into each well to a final concentration of 5  $\mu$ M, and BRET2 readings obtained 2 min after substrate addition (Gales et al., 2005; Audet et al., 2008). In experiments assessing the acute effect of naltrindole (1  $\mu$ M) on cells that had been pre-exposed to DPDPE and SNC-80, HEK293 cells were treated and washed as above and the antagonist was introduced 2 min prior to coelenterazine. BRET2 readings were obtained using a modified top-count apparatus (TopCount. NXTTM, Packard Bioscience) that allows the sequential integration of the signals detected in the 370-450 nm and 500-530 nm windows. The BRET2 signal generated by each sample was determined by calculating the ratio of the light emitted by GFP (500-530 nm) over the light emitted by *Rluc* (370-450 nm). BRET2 values were then corrected by subtracting the background signal (detected when the *Rluc*-tagged construct was expressed without acceptor) from the BRET signal detected in cells coexpressing both *Rluc*- and GFP (netBRET).

For assessing  $\beta$ arr2 recruitment, BRET1 assays were conducted using a modified version of a protocol that we had previously optimized for this purpose (Azzi et al., 2003). HEK293 cells grown in 100 mm petri dishes were transfected with: a)  $\beta$ arr2-Luc (0.5  $\mu$ g), DOR-YFP (6  $\mu$ g), Gai1 (3  $\mu$ g), G $\beta$ 1 (3  $\mu$ g) and Gy2 (3

$\mu\text{g}$ ) or *b*)  $\beta\text{arr2-Luc}$  (0.5  $\mu\text{g}$ ), YFP-G $\gamma$ 2 (3  $\mu\text{g}$ ), G $\alpha$ i1(3  $\mu\text{g}$ ), G $\beta$ 1(3  $\mu\text{g}$ ) and Flag-DORs (6  $\mu\text{g}$ ). The ability of  $\beta\text{arr2-Luc}$  construct to support normal DOR internalization as well as the specificity of its interaction with DOR-YFP or YFP-G $\gamma$ 2 were established prior to its use (data not shown). Two days after transfection, HEK293 cells were used to monitor one of the following: i) the kinetics of  $\beta\text{arr2-Luc}$  recruitment to DOR-YFP or YFP-G $\gamma$ 2; ii) the effect of sustained agonist exposure on each of these BRET pairs or iii) the BRET signal generated by  $\beta\text{arr2-Luc/DOR-YFP}$  and  $\beta\text{arr2-Luc/YFP-G}\gamma$ 2 pairs at different times during recovery from agonist treatment. For kinetic assays cells were suspended in PBS (RT), transferred to 96 well plates and introduced into a Victor3 plate reader (PerkinElmer Life Sciences) in which coelenterazine h (1  $\mu\text{g/mL}$ ) was automatically injected into each well. DPDPE or SNC-80 (10  $\mu\text{M}$ ) were injected five minutes later, and BRET1 measures obtained every 18 seconds for a period of 6 min. For the two other assays cells were kept in the incubator at 37°C and treated with DPDPE or SNC-80 (1  $\mu\text{M}$ ) for 30 or 60 min. At the end of treatment cells were washed with PBS (3 X 1 min, DMEM, 37°C) and either immediately re-distributed to 96 well plates for BRET1 readings, or were returned to the incubator to recover from treatment before BRET measures were taken. BRET1 readings were obtained five min after manual addition of coelenterazine h using 440-480 and 520-550 nm filters, to respectively monitor Rluc and YFP emissions. Corrected netBRET1 values were obtained as above.

## **Intramolecular BRET for evaluation of cAMP accumulation**

Changes in intracellular cAMP levels were assessed by means of an Epac-BRET2 biosensor (Leduc et al., 2009) which undergoes conformational changes upon cAMP binding (Barak et al., 2008). These conformational changes modify the basal signal generated by donor-acceptor pairs located at the C- and N-terminal ends of the biosensor, thus allowing to monitor variations in second messenger levels by monitoring changes in BRET (Barak et al., 2008; Leduc et al., 2009). Specifically, HEK293 cells stably expressing Flag-DORs and the Epac-BRET cAMP biosensor (Leduc et al., 2009) were seeded at a density of 5,000 cells/well and grown on 96-well polylysine-coated plates for 48 h. The day of the experiment, medium was replaced with fresh DMEM/20 mM HEPES and one hour before exposure to DPDPE, SNC-80 (1  $\mu$ M; 60 min) or vehicle (DMSO 0.01%) cells were treated with 10  $\mu$ M cycloheximide, which was allowed to remain in the incubation medium throughout the experiment. In experiments in which monensin (50  $\mu$ M) was used, the drug was introduced into the incubation medium together with cycloheximide and also remained present throughout the experiment. At the end of treatment with DPDPE or SNC-80 cells were washed (2 X 1 min) with PBS at 37°C and were immediately incubated with Tyrode's solution containing 20  $\mu$ M forskolin, 750  $\mu$ M isobutyl-methyl-xanthine (IBMX) and indicated DPDPE concentrations. After 3 min incubation with forskolin, IBMX and DPDPE, DeepBlueC coelenterazine was added into each well to a final concentration of 5  $\mu$ M. BRET2 readings were obtained 9 min after substrate addition to allow for cAMP accumulation to take place. Alternatively cells were washed (3 x 1 min) with DMEM/20 mM HEPES at 37°C and returned to the incubator to recover for 30 min

before cAMP production was assessed. Inhibitory dose response curves were obtained by subtracting BRET ratios obtained in the presence of increasing concentrations of DPDPE from basal ratios. Values obtained in presence or absence of monensin, were each normalized to the maximal inhibition induced by DPDPE in their corresponding controls. Prior to carrying out experiments, the ability of the biosensor to detect changes in cAMP production was compared to a previously described radiometric method (Audet et al., 2005) EC50 values for DPDPE-mediated modulation of cAMP production were  $7 \pm 1$  and  $4 \pm 1$  nM for radiometric and BRET-based assays, respectively (n=3-6).

### **Co-immunopurification and western blot**

This procedure was adapted from a previously described method (Archer-Lahlou et al., 2009). Briefly, HEK293 cells were transfected with  $\beta$ arr2-Luc (0.5  $\mu$ g), YFP-G $\gamma$ 2 (3  $\mu$ g), G $\alpha$ i1 (3  $\mu$ g), G $\beta$ 1 (3  $\mu$ g) and Flag-DORs (6  $\mu$ g). Two days later HEK293 cells were treated with DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M; 30 min) and, at the end of incubation, they were either immediately used for membrane preparation or washed (3 X 1 min, DMEM, 37°C) and allowed to recover for 30 min prior to their use. Membranes were prepared by suspending cells in lysis buffer (5 mM Tris pH 7.4, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 g/mL leupeptine, 5  $\mu$ g/mL soybean trypsin inhibitor, and 10  $\mu$ g/mL benzamidine;) and homogenizing them in an ultraturax (IKA, Wilmington, NC). Following a short centrifugation at 500 g to pellet mitochondria and nuclei, the supernatant containing membranes and cytosol was recovered and centrifuged at 30,000 g for 20 minutes. The resulting membrane pellet was resuspended in lysis buffer for a second round of

centrifugation (30,000 g; 20 minutes). At the end of this second round, the membrane pellet was suspended in solubilization buffer (0.5% *n*-dodecyl-maltoside, 25 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 µg/mL leupeptine, 5 µg/mL soybean trypsin inhibitor and 10 µg/mL benzamidine) and agitated at 4°C for 2 hours, following which the solubilized material was centrifuged at 20,000 g for 30 minutes. Flag-DORs were immunopurified from the supernatant by means of an anti-FLAG M2 antibody resin. Briefly, 40 µl of antibody-coupled resin equilibrated in solubilization buffer and supplemented with 0.1% bovine serum albumin (w/v) were added to 500 µl of solubilized membranes and overnight at 4°C under gentle agitation. The next morning the resin was centrifuged, washed twice with 500 µl of solubilization buffer and four times with 500 µl of modified solubilization buffer (containing 0.1% instead of 0.5% *n*-dodecyl-maltoside (w/v)). The receptor was then eluted by incubating the resin for 10 minutes at 4°C with 100 µl of modified solubilization buffer containing the FLAG peptide (150 µg/mL). This elution was repeated three times, and the eluates were combined and concentrated by membrane filtration over Microcon-30 concentrators (Millipore). SDS sample buffer was then added and samples were used for SDS-PAGE. Resulting gels were transferred onto nitrocellulose (GE Healthcare) and βarr2-Luc or YFP-Gγ2 recovered with Flag-DORs were revealed using mouse anti-Luc (1:1,000 Millipore) or rabbit anti-GFP (1:10,000; Abcam) antibodies followed by corresponding secondary HRP-conjugated antibodies (1:40,000; Amersham Biosciences). Flag-DORs in each sample were detected by probing membranes with rabbit anti-FLAG antibody (1:5,000; Sigma) and the corresponding secondary antibody (1:40,000; Amersham Biosciences).

Chemiluminescence detection reagents (GE Healthcare) were used to reveal the blotted proteins and relative intensities of the labeled bands were analyzed by densitometric scanning using MCID (Imaging Research Inc). Densitometric values were used to calculate  $\beta$ arr2-Luc/Flag-DOR and YFP-G $\gamma$ 2/Flag-DOR ratios for each condition.

### **Radioligand binding assays.**

Binding assays were carried out in HEK293 cells stably transfected with Flag-DORs. The method used has been previously described (Pineyro et al., 2001). Briefly, saturation curves were obtained by suspending 25  $\mu$ g of protein in 300  $\mu$ l of PBS and incubating cells for one hour (21°C) at RT with increasing concentrations of [<sup>3</sup>H]naltrindole (0.05-5 nM). For competition binding assays cells were similarly diluted and incubated with 1.5 nM [<sup>3</sup>H]naltrindole together with increasing concentration of the unlabeled antagonist. Nonspecific binding was determined in the presence of 10  $\mu$ M naltrindole. Incubation was terminated by rapid filtration in a cell harvester (Inotech) through GF/C filters (Whatman, Clifton, NJ) presoaked in 0.1% polyethylenimine. Bound radioactivity was measured by scintillation counting and binding parameters calculated from nonlinear least-squares analysis of the experimental data using Prism (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

## **Surgical procedures, drug treatments and behavioral measures**

The spared nerve injury model of neuropathic pain was induced in male CD-1 mice as previously described (Decosterd and Woolf, 2000; Shields et al., 2003). Nerve injury-dependent induction of mechanical hypersensitivity was measured using calibrated von Frey filaments according to the up-down method (Chaplan et al., 1994) using filaments selected for mice (Millecamps et al., 2010) and expressed as the 50% withdrawal threshold in grams. Lower thresholds indicate increased sensitivity. The induction of mechanical hypersensitivity was confirmed 1 month following surgery and DPDPE (10 nmoles), SNC-80 (60 nmoles) or vehicle (0.3% tartaric acid in distilled water) were injected intrathecally by direct lumbar puncture (Hylden and Wilcox, 1980). Animals were tested at 15 minute intervals for 60 min and then a second injection was administered. Injections and behavioral measures were performed by two different experimenters, each blind to experimental group.

## **Statistical analyses**

BRET, binding and coimmunoprecipitation experiments as well as FACs and ELISA-based assays were analyzed using one-way or two-way ANOVA. cAMP accumulation data were analyzed using three-way ANOVA. Mean cytosolic labeling intensity in neurons was analyzed by two-way ANOVA and the number of cells displaying surface labeling was analyzed with a two-tail paired *t*-test. In every case unequal groups were orthonormalized by Gram-Schmidt procedure. Post-hoc Bonferroni tests were used as required to compare selected groups.



## RESULTS

### ***DPDPE and SNC-80 display similar internalization but distinct recycling profiles***

Recent reports suggest that biased internalization may predict DOR agonist ability to induce tolerance (Pradhan et al., 2009; Pradhan et al., 2010). Here we were interested in establishing the extent to which tolerance may be predicted from the recycling profile of DOR agonists. DPDPE and SNC-80 were chosen as test ligands as they phosphorylate DORs at different residues (Okura et al., 2003), differences that may influence both, DOR internalization (Zhang et al., 2005) and recycling (Zhang et al., 2008). Trafficking induced by each agonist was assessed in HEK293 cells and cortical neurons in order to ensure that if differences between ligands were observed, they would not be due to the cellular background in which receptors were expressed. Internalization was first assessed in cortical neurons, using an antibody feeding technique that allowed us to specifically label surface DORs before exposing them to drug or vehicle (Vargas and Von Zastrow, 2004). At the end of treatment all receptors remaining at the membrane were stripped of first antibody such that only DORs that were protected from the wash by internalization would be revealed by subsequent immunofluorescence labeling. Figure 1A, shows that exposure to vehicle induced a modest, time-dependent increase in intracellular labeling, which is consistent with constitutive internalization of DORs. Exposure to SNC-80 or DPDPE induced a greater time-dependent increase in intracellular immunoreactivity, which was similar for both agonists. Quantification of immunoreactivity confirmed that 60 min exposure to DPDPE or SNC-80 resulted in similar internalization by both agonists (Fig. 1B).

To corroborate that the internalization capacity of DPDPE and SNC-80 were similar, endocytosis was assessed in HEK293 using flow cytometry (Fig. 1C) or an ELISA-based assay (Fig. 1D) as alternative approaches. Independent of the method used, internalization measured at 30 and 60 min was the same for both agonists. At a shorter incubation time (15 min), internalization induced by DPDPE was less than that observed for SNC-80, although the difference was only evident in the flow cytometry assay (Fig. 1C).

Several studies carried out in heterologous expression systems have shown that internalized DORs are rapidly committed for degradation (Whistler et al., 2002; Hislop et al., 2009). However, data shown in figure 1A indicate that internalized DORs steadily accumulate within the neuron soma, suggesting the possibility that neuronal DORs could be available for recycling even after prolonged periods of agonist exposure. To verify this possibility DOR recycling was assessed in neurons in which internalization had been previously induced by 60 min exposure to DPDPE or SNC-80 (10  $\mu$ M). Recycling was evaluated by taking two complementary measures: a) the proportion of internalized receptors that remained trapped in the cytosol 60 min after agonist removal (Figs. 2A and 2B) and b) the number of agonist-treated cells that recovered surface labeling following incubation in the absence of agonist (Figs. 2C and 2D). To obtain the first measure we quantified intracellular immunoreactivity in neurons that were labeled immediately after exposure to agonist and in neurons that were allowed to recover in the absence of ligand. Intracellular labeling was  $44 \pm 7$  immediately after internalization by SNC-80 and  $37 \pm 5$  after recovery, indicating that  $84 \pm 8\%$  ( $n=4$ ) of sequestered DORs remained trapped in the cytosol (Fig. 2B). In the case of DPDPE this

proportion dropped to  $47 \pm 6\%$  ( $n=4$ ) with intracellular intensity values of  $19 \pm 5$  and  $40 \pm 7$  with and without recovery, respectively (Fig. 2B). To ascertain whether receptors that disappeared from the intracellular compartment were indeed recycling, we verified if internalized DORs were able to regain the membrane after recovery from treatment. To do so, neurons were exposed to agonist or vehicle and, at the end of treatment the agonist was removed and DORs remaining at the membrane were stripped of their first antibody, such that subsequent labeling would only reveal receptors that regained the membrane during recovery from internalization. Neurons that were exposed to vehicle displayed no surface labeling, which is consistent with the observation that ligand-independent internalization was minimal (Fig. 1A). On the other hand membrane immunoreactivity was evident in cells that had been pre-exposed to DPDPE and SNC-80 indicating a certain level of recycling for each ligand (Fig. 2C). The amount of receptors that recycled to the membrane following exposure to each of the agonists was estimated by means of a "recovery ratio". This ratio was calculated by dividing the number of immunoreactive neurons that recovered labeling in agonist-treated slides by the total number of surface-labeled neurons present in slides that were not subject to treatment. Figure 2D shows that the recovery ratio in DPDPE-treated neurons was larger than the one obtained in those exposed to SNC-80. Taken together, results from these experiments indicate that following internalization by SNC-80 DORs remained predominantly trapped within the cytosol, while those internalized by DPDPE abandoned the intracellular compartment to regain the membrane.

DOR recycling was also assessed in HEK293 following 30 min exposure to DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M). As shown in figure 3A, none of the receptors internalized by SNC-80 were able to recycle while 53%  $\pm$  3% of those internalized by DPDPE reappeared at the membrane. Moreover, saturation and displacement binding assays using [3H]naltrindole confirmed that the absence of recycling observed for SNC-80 could not be simply attributed to incomplete drug washout, since Kd (Fig. 3B) and Bmax (Fig. 6A) values for the radioligand were restored to pre-treatment levels following removal of this agonist.

***Differences in DOR recycling are consistent with agonist propensity to induce desensitization and acute analgesic tolerance.***

Studies using recycling inhibitor monensin or dominant negative Rab11 mutants indicate that recycling helps reduce the impact of desensitization on DOR responsiveness (Archer-Lahlou et al., 2009). To determine whether the extent of desensitization induced by the two agonists was consistent with their respective recycling patterns we monitored how one hr treatment with SNC-80 or DPDPE (1 $\mu$ M) modified DOR responsiveness to subsequent stimulation by DPDPE. Changes in cAMP production were examined using an Epac-BRET2 biosensor (Barak et al., 2008; Leduc et al., 2009) that allows to monitor intracellular variations in second messenger levels through changes in BRET. In naïve cells that had been pre-exposed to vehicle, incubation with increasing concentrations of DPDPE induced a dose dependent decrease in second messenger levels (Figs. 4A and 4B). Pre-exposure to either agonist modified DOR responsiveness to DPDPE, as evidenced by a decrease in the agonist's potency and efficacy to inhibit cAMP

production. In particular, SNC-80 induced a larger right shift and more pronounced decrease in  $E_{max}$  than those induced by DPDPE (Fig. 4A), indicating greater desensitization by the former. Importantly, both agonists displayed similar ability to inhibit forskolin-stimulated cAMP production (maximal inhibition ( $E_{max}$ ) SNC-80:  $-70 \pm 2$ ; maximal inhibition ( $E_{max}$ ) DPDPE:  $-69 \pm 3$ ;  $EC_{50}$  SNC-80:  $5 \pm 1$  nM;  $EC_{50}$  DPDPE:  $8 \pm 1$  nM;  $p > 0.05$ ; two-way ANOVA;  $n=6$ ), which suggests that the observed differences in desensitization were not necessarily efficacy-related. On the other hand, desensitization by DPDPE and SNC-80 were distinctively modified by monensin. In particular, monensin enhanced desensitization by DPDPE but not SNC-80, indicating that only the former relied upon recycling to mitigate functional consequences of desensitization. Apart from its protective role during the actual process of desensitization (Archer-Lahlou et al., 2009), DOR recycling has also been shown to support resensitization once the agonist has been removed (Trapaidze et al., 2000). In contrast, studies carried out on MORs indicate that resensitization can take place at the membrane, independent of any type of receptor trafficking (Dang and Christie, 2011). We found that the presence of monensin did not significantly modify resensitization following exposure to either agonist (Figs. 4B). Although these data do not allow to conclude whether DOR resensitization takes place at the membrane, they show that recovery of DOR responsiveness in the first 30 min after agonist removal does not require recycling.

Based on the data obtained with monensin, it is possible to conclude that recycling mitigates loss of receptor responsiveness during desensitization by DPDPE but not SNC-80. Thus, one would expect repeated administration of SNC-80 to cause larger loss of functional DORs as compared to DPDPE and

consequently a larger degree of tolerance. The latter assumption was tested using an animal model of chronic pain. Several lines of evidence indicate that DORs are specifically involved in modulating chronic pain of inflammatory and neuropathic origin: i) DOR function is enhanced in both of these conditions (Cahill et al., 2007), ii) mice with global DOR knock out (Nadal et al., 2006) or with genetic ablation of DORs in nociceptive sensory neurons display enhanced pain behavior in both models (Gaveriaux-Ruff et al., 2011) and iii) administration of selective DOR agonists attenuates pain hypersensitivity, particularly mechanical allodynia (Scherrer et al., 2006; Gaveriaux-Ruff et al., 2011). Consequently, we used a murine model of neuropathic pain in order to determine if antiallodynic effects of DPDPE and SNC-80 displayed different degrees tolerance. Since mechanisms regulating receptor responsiveness are typically involved in the generation of acute analgesic tolerance (Christie, 2008), we determined whether two successive i.t. injections of equianalgesic doses of DPDPE or SNC-80 resulted in differential loss of analgesic efficacy. Figure 4C shows that mice which received saline injections displayed marked hypersensitivity to mechanical stimuli over the course of repeated testing. Administration of the first injection of DPDPE or SNC-80 similarly reduced pain sensitivity. However, while DPDPE maintained its analgesic efficacy after a second injection SNC-80 did not, indicating the development of acute analgesic tolerance for the non-recycling agonist.

***Sustained activation by DPDPE and SNC-80 stabilized DORs into conformations that distinctively interact with G $\beta$  $\gamma$  subunits.***

The idea that agonist bias in trafficking could contribute to distinct potential for tolerance presupposes the existence of agonist-specific conformations (Urban et al., 2007; Kenakin and Miller, 2010). However, there is no physical evidence confirming whether conformations stabilized by ligands that display distinct trafficking profiles do indeed stabilize different conformations. To design an experiment that would allow to assess whether DPDPE and SNC-80 stabilized DORs into different conformations we reasoned that the regulatory events which take place during the development of acute tolerance typically involve desensitization, and consequently changes in receptor G protein coupling. Hence, if the two agonists were to stabilize DORs into different conformations, then each of these conformations would be expected to distinctively modify DOR interaction with the G protein. We have previously shown that BRET assays constitute a valuable tool to evaluate acute conformational changes undergone by DORs upon binding of different ligands (Audet et al., 2008; Audet and Pineyro, 2011). We now used a similar approach to monitor how sustained activation by DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M; 60 min) modified DOR interactions with G $\alpha$  $\beta$  $\gamma$  subunits. G $\alpha$ i1-Luc/DOR-GFP and DOR-Luc/GFP-G $\gamma$ 2 were the biosensors used to respectively monitor DOR interaction with G $\alpha$ i1 and G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 subunits. In keeping with our previous observations, both BRET pairs displayed spontaneous energy transfer, confirming that DORs constitutively associate with G $\alpha$ i1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2 subunits (Audet et al., 2008). Spontaneous netBRET values generated by G $\alpha$ i1-Luc/DOR-GFP and DOR-Luc/GFP-G $\gamma$ 2 were  $0.051 \pm 0.01$  and  $0.37 \pm 0.03$  (n=4-5), respectively. Sustained

exposure to either agonist reduced netBRET at the DOR  $G\alpha i1$  interface (Fig. 5A). In contrast, both agonists had opposing effects at the DOR-Luc/GFP- $G\gamma 2$  pair, with DPDPE decreasing and SNC-80 increasing the spontaneous netBRET signal (Fig. 5C). Given the position of donor/acceptor tags in the different BRET pairs it is possible to conclude that both agonists caused the receptor C-terminus and  $G\alpha$  subunit to separate from one another. On the other hand, the BRET increase induced by SNC-80 at the DOR-Luc/GFP- $G\gamma 2$  pair indicated that the receptor C-terminus was drawn closer to the N-terminal domain of  $G\gamma 2$ . The reduction of this signal by DPDPE implied a separation of the same two regions. These opposing BRET changes indicate that both agonists induced distinct orientation of the receptor C-terminus relative to  $G\gamma 2$ .

The idea that DORs were distinctively modified by sustained exposure to either agonist (1  $\mu$ M; 60 min) was also supported by binding assays carried out in HEK293 cells stably expressing Flag-DORs. As shown in figure 6A, exposure to DPDPE caused a decrease in the total number of sites labeled by [ $^3$ H]naltrindole, a reduction that took place without change in the total amount of receptor protein (Fig. 6B). The latter observation together with the fact that naltrindole affinity for the receptor also remained unchanged (Fig. 3B), allowed us to rule out down-regulation and lingering free agonist as possible causes for the apparent loss of antagonist binding sites. Alternatively, [ $^3$ H]naltrindole may have failed to recognize all conformational states stabilized by DPDPE, a phenomenon that has been previously reported for other DOR ligands (Pineyro et al., 2001). Unlike DPDPE, pre-exposure to SNC-80 allowed complete recovery of  $B_{max}$  binding (Fig. 6A), suggesting that [ $^3$ H]naltrindole similarly recognized DORs stabilized by the agonist



and those present in naïve cells. Further, if reduction in naltrindole binding capacity were due to the radioligand being incapable of recognizing all the conformational states stabilized by DPDPE, one would expect that the population of DORs reacting to naltrindole would be smaller following treatment with this agonist than after exposure to SNC-80. Consistent with this interpretation, biosensors assessing DOR interaction with  $G\beta\gamma$  subunits indicated that addition of naltrindole to cells that had been pre-exposed to SNC-80 resulted in larger BRET changes than addition of the antagonist to cells that were pre-treated with DPDPE (Fig. 5D).

***Sustained exposure to SNC-80 and DPDPE induced agonist-specific interactions among DORs,  $G\beta1\gamma2$  subunits and  $\betaarr2$ .***

Having confirmed that DPDPE and SNC-80 stabilized DORs into distinct conformations, we next sought to characterize the interactions established between each of these conformations and proteins that like  $\betaarr2$  participate in the development of tolerance (Zhang et al., 2008; Dang et al., 2011). To compare  $\betaarr2$  recruitment to receptors stabilized by DPDPE and SNC-80 we turned to BRET assays, using  $\betaarr2$ -Luc/DOR-YFP as a biosensor. The use of BRET assays to monitor *in vivo* interaction between receptors and  $\betaarrs$  has been validated for numerous GPCRs (Pfleger and Eidne, 2003; Kocan and Pfleger, 2011), including opioid receptors (Qiu et al., 2007; Molinari et al., 2010; Groer et al., 2011). As shown in figure 7A, DPDPE and SNC-80 both induced  $\betaarr2$  recruitment with a half-life of less than two min, which is in reasonable agreement with previous reports (Molinari et al., 2010). The BRET change induced by SNC-80 was larger

than the one induced by DPDPE, a difference that was clearly established within the first two minutes of receptor activation and remained present after sustained exposure to the agonist (Fig. 7B).

BRET data assessing agonist effects on DOR-G protein interaction indicated that only SNC-80 caused the receptor C-terminus to approach to the free end of the  $G\beta\gamma$  dimer. We were therefore interested in finding out whether  $\beta$ arr2 recruitment by the two agonists would entail differential interaction with  $G\beta\gamma$ . To assess this possibility we used a biosensor that would allow to monitor  $\beta$ arr2 recruitment from the vantage point of the  $G\beta\gamma$  dimer, i.e.:  $\beta$ arr2-Luc/YFP- $G\gamma$ 2. Interestingly, only SNC-80 increased BRET at the  $\beta$ arr2-Luc/YFP- $G\gamma$ 2 pair (Figs. 7C and 7D), indicating that this agonist was the only one bringing the regulatory protein in close proximity of the N-terminal domain of  $G\gamma$ 2. As for  $\beta$ arr2 interaction with the receptor, differences between DPDPE and SNC-80 appeared rapidly after agonist addition (Fig. 7C) and were maintained over one hr of receptor stimulation (Fig. 7D). At this time, BRET changes induced by SNC-80 at  $\beta$ arr2-Luc/DOR-YFP and  $\beta$ arr2-Luc/YFP- $G\gamma$ 2 pairs were respectively two- and six-fold higher than those induced by DPDPE.

$\beta$ arrs are known to influence receptor recycling such that receptors that establish a stable interaction with these regulatory proteins are those that recycle the least (Oakley et al., 1999; Zhang et al., 1999). Moreover, the stability of receptor- $\beta$ arr association is partly determined by the specific phospho-residues different receptor subtypes make available for  $\beta$ arr binding (Oakley et al., 1999; Hanson and Gurevich, 2006). Given that DPDPE and SNC-80 phosphorylate

DORs at different amino acids (Okura et al., 2003), and since both agonists induce different modalities of  $\beta$ arr2 recruitment, we sought to determine if DOR- $\beta$ arr2 association promoted by each agonist displayed different stability. In a first series of experiments we used BRET assays to determine the stability of DOR- $\beta$ arr2 association. To do so we induced  $\beta$ arr2 recruitment by DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M, 30 min), and then measured the time required by  $\beta$ arr2-Luc/DOR-YFP and  $\beta$ arr2-Luc/YFP-G $\gamma$ 2 pairs to recover their basal BRET values upon the removal of each agonist. As before, BRET changes monitored at the  $\beta$ arr2-Luc/DOR-YFP pair revealed significant  $\beta$ arr2 recruitment by DPDPE (Fig. 8A ) and by SNC-80 (Fig. 8B). Further, cells that were exposed to DPDPE recovered pre-stimulation BRET values within 30 min of agonist removal (Fig. 8A), while the signal remained unchanged in cells that recovered from exposure to SNC-80 (Fig. 8B). Also in keeping with our previous observations, SNC-80 was the only of the two agonists to increase BRET at the  $\beta$ arr2-Luc/YFP-G $\gamma$ 2 pair (Figs. 8C) and, similar to  $\beta$ arr2 interaction with the receptor, BRET levels did not attain pre-stimulation values upon agonist removal (Fig. 8D). Finally, we verified whether co-expression with  $\beta$ arr2 could have modified agonist-induced conformational changes at the DOR-G $\beta\gamma$  interface. Results from these experiments are shown in figures 8E-F and indicate that SNC-80 and DPDPE conserved their ability to respectively increase or reduce the BRET signal generated by DOR-Luc/YFP-G $\gamma$ 2. Furthermore, only DPDPE allowed this BRET pair to attain pre-stimulation values during recovery (Fig. 8D). Thus, taken together observations obtained with these three BRET pairs indicate that receptor activation by SNC-80 induced a stable DOR-G $\beta\gamma$ - $\beta$ arr2

association while DPDPE induced a transient interaction between the receptor and the regulatory protein.

To confirm observations obtained using BRET technology, we carried out co-immunopurification assays in which we assessed how DPDPE and SNC-80 modified the amount of  $\beta$ arr2-Luc and YFP-G $\gamma$ 2 that co-purified with Flag-DORs. Purifications were carried out either immediately after receptor stimulation (30 min, 1 $\mu$ M) or following 30 min recovery in the absence of ligand (Fig. 9). Consistent with *in vivo* observations, stimulation by SNC-80 resulted in increased recovery of G $\gamma$ 2-YFP and  $\beta$ arr2-Luc (Fig. 9A), while incubation with DPDPE only increased the amount of  $\beta$ arr2 associated to the receptor (Fig. 9B). Copurification assays carried out following recovery from agonist pre-treatment were also consistent with BRET data. Thus, in cells that recovered from exposure to DPDPE the amount of  $\beta$ arr2-Luc that co-precipitated with the receptor was reduced to pretreatment values (Fig. 9B). In contrast, in cells that recovered from exposure to SNC-80, the amounts of  $\beta$ arr2-Luc or G $\gamma$ 2-YFP that co-purified with DORs was not different from those obtained immediately after recruitment (Fig. 9A), thus confirming the stable association of DORs, G $\beta\gamma$  and  $\beta$ arr2.

Data analyzed thus far indicate that each agonist caused the receptor C-terminus to distinctively position itself with respect to the G $\beta\gamma$  dimer. SNC-80 caused  $\beta$ arr2 to be recruited in the proximity of the N-terminal domain of G $\gamma$ 2 and was accompanied by stable  $\beta$ arr2 association to the receptor and poor recycling. In the case of DPDPE,  $\beta$ arr2 did not approach the BRET tag present in G $\gamma$ 2, and its association to the receptor was transient. Moreover, kinetics of DOR- $\beta$ arr2

dissociation ( $t_{1/2}$ =12 min) were similar to those of receptor recycling ( $t_{1/2}$ =12 min), suggesting a correlation between recycling and  $\beta$ arr2 dissociation upon DPDPE removal. The C-terminal domain of DORs has been previously shown to actively contribute to DOR recycling (Zhang et al., 2008; Trapaidze et al., 2000), raising the possibility that distinct positioning of the C-terminus by the two agonists could lead to differential stability of DOR- $\beta$ arr2 interactions. If this were the case, changing the orientation of the receptor C-terminus should modify the stability with which DORs activated by SNC-80 associate with  $\beta$ arr2. To test this assumption we assessed whether naltrindole (1  $\mu$ M), the ligand that only modified DOR-G $\gamma$ 2 interaction induced by SNC-80 (Fig. 5C), had any effect on the stability of the DOR-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2 complex promoted by this agonist. The effect of naltrindole on BRET signals generated by the different pairs of interest is shown to the right hand side of each series of SNC-80 histograms presented in figure 8 (panels B, D, E). The presence of the antagonist during recovery from exposure to SNC-80 caused the DOR-G $\gamma$ 2- $\beta$ arr2 complex to fall apart, as indicated by the recovery of pre-treatment BRET signals at pairs monitoring different interactions within the complex (Figs. 8B, 8D, 8F). In contrast, the addition of naltrindole to cells recovering from exposure to DPDPE was without effect at each of the BRET pairs tested (Figs. 8A, 8C, 8E).

Finally, we reasoned that if the ability to induce a stable DOR- $\beta$ arr2 association were contributing to poor recycling by SNC-80, then introducing naltrindole during recovery from treatment should not only destabilize the DOR-G $\beta$  $\gamma$ - $\beta$ arr2 complex but also rescue recycling. Figure 10A shows that naltrindole (1  $\mu$ M) was able to rescue DOR recycling in SNC-80 treated cells, an effect that was mimicked by the antagonist naloxone (1  $\mu$ M), but not by the agonist morphine (10

$\mu\text{M}$ ). On the other hand, naltrindole did not modify DOR recycling by DPDPE, an observation that was consistent with naltrindole's lack of effect on DOR- $\beta\text{arr}2$  interaction that was promoted by this agonist.

## **DISCUSSION**

Results obtained in this study indicate that agonist-specific recycling patterns conferred distinct protection from desensitization, and were associated with different tendencies to induce acute analgesic tolerance. Agonist-related differences in recycling were supported by the adoption of different conformations whose distinctive interaction with  $\text{G}\beta\gamma$  subunits led to specific modalities of  $\beta\text{arr}2$  recruitment by DOR/ $\text{G}\beta\gamma$  complexes.

### **DORs adopt agonist-specific conformations.**

The idea that ligand-specific trafficking could determine opioid potential for generating tolerance has raised considerable attention since this type of bias could provide the basis for developing opioid ligands with longer lasting analgesic actions. However, in order to design this type of ligands a better understanding of the molecular determinants of biased trafficking is needed. In fact, although agonist-specific conformations are currently recognized as the molecular bases of functional bias (Urban et al., 2007; Kenakin, 2007a), there is little knowledge of how agonist-specific receptor states may determine distinct trafficking patterns elicited by different agonists. In the present study, we showed that sustained activation by SNC-80 and DPDPE resulted in the stabilization of receptors states in which the receptor C-

terminus adopted different spatial orientations. Such differences were revealed by ligand-specific BRET changes at a biosensor monitoring DOR interaction with the G $\beta\gamma$  dimer. At this interface, SNC-80 and DPDPE were respectively shown to approach or separate the C-terminal end of the receptor and the N-terminal domain of G $\gamma$ 2, indicating distinct conformational changes by each agonist.

The notion that the population of cellular DORs was distinctively modified by each agonist was also supported by binding data. On the one hand, the conservation of [<sup>3</sup>H]naltrindole binding capacity following exposure to SNC-80 indicated that the total number of DORs and their ability to recognize the radioligand was unaffected by treatment with this agonist. On the other hand, pretreatment with DPDPE caused a reduction in B<sub>max</sub> that was not determined by down-regulation of receptor protein. The fact that naltrindole's apparent affinity for the receptor remained unchanged indicated that the decrease in B<sub>max</sub> could neither be explained by lingering free agonist. It is also unlikely that slow dissociation kinetics may have accounted for B<sub>max</sub> reduction by DPDPE. Actually, if slow agonist dissociation were the basis for the loss of naltrindole binding sites, k<sub>off</sub> values would predict a B<sub>max</sub> reduction by both agonists (Knapp et al., 1991; Knapp et al., 1996). Furthermore, based on dissociation kinetics, SNC-80 would be expected to produce a greater loss of [<sup>3</sup>H]naltrindole binding sites than DPDPE, which was clearly not the case since treatment with SNC-80 did not modify radioligand binding. Alternatively, the DPDPE-dependent decrease in B<sub>max</sub> may have resulted from the adoption of a conformation that was poorly recognized by [<sup>3</sup>H]naltrindole. Data showing that naltrindole-induced BRET changes at the DOR-G $\gamma$ 2 interface were much smaller in cells that had been pre-treated with DPDPE

than SNC-80 support this line of thinking. Differential recognition of the radioligand could have been determined by DPDPE and SNC-80 distinctively modifying receptor ability to isomerize into [<sup>3</sup>H]naltrindole-binding conformations. Changes in DOR isomerization constants have been previously reported following prolonged incubation with other DOR ligands (Pineyro et al., 2001). Further, it is also possible that each agonist may have caused receptors to traffic to different subcellular compartments, which need not be equally accessible to the radioligand probe. Differences in isomerization and/or sorting could both be determined by the distinct DOR-Gβγ-βarr2 interactions promoted by each agonist.

**Distinct modalities of βarr2 recruitment support agonist-related differences in recycling.**

βarrs interact both with the C-terminal domain and intracellular loops of GPCRs (Hanson and Gurevich, 2006; Bennett et al., 2000). For example, βarrs may associate with the second intracellular loop of the receptor and displace Gα (Krupnick et al., 1997). In doing so they provide a mechanism that supports the classical idea of βarrs causing desensitization by disrupting the physical association between receptor and G protein. In keeping with this notion and with previous reports (Okura et al., 2003; Gales et al., 2005; Ayoub et al., 2007), sustained exposure to DPDPE or SNC-80 both reduced the spontaneous BRET signal generated by the Gαi-Luc/DOR-GFP pair by more than two thirds. On the other hand, we found that DOR interaction with the Gβγ dimer persisted during prolonged periods of agonist stimulation. In fact, 60 min exposure to SNC-80



increased the basal signal at the DOR-Luc/GFP-G $\gamma$ 2 pair, indicating not only that DORs and G $\beta\gamma$  subunits remained in close proximity of one another, but that the receptor C-terminus was drawn closer to G $\gamma$ 2. The decrease in energy transfer that was caused by DPDPE at the same BRET pair was a low percentage of the spontaneous signal ( $\leq 10\%$ ), and as such more akin to a conformational rearrangement than to a disruption of pre-existing DOR-G $\beta\gamma$  complexes (Audet et al., 2008). Previous studies have shown that opioid receptors remain associated to G $\beta\gamma$  subunits during recruitment of G protein receptor kinases (Li et al., 2003). Data provided herein indicate that DOR/G $\beta\gamma$  association may persist into subsequent steps of the desensitization cascade, during  $\beta$ arr recruitment and even later on, after receptor uncoupling from G $\alpha$  has taken place.

The G $\beta\gamma$  dimer directly interacts with GPCRs (El Far et al., 2001; Mahon et al., 2006). This association does not necessarily involve the same residues as those implicated in  $\beta$ arr recruitment (e.g.:Kouhen et al., 2000; Qiu et al., 2007), conferring receptors the ability to simultaneously associate both with  $\beta$ arrs and G $\beta\gamma$ . Conversely,  $\beta$ arrs may interact with G $\beta$  subunits (Yang et al., 2009) through residues that do not necessarily contribute to G $\beta$  association to the receptor (Hanson and Gurevich, 2006; Mahon et al., 2006), thus allowing for the regulatory protein to simultaneously associate with receptors and the G $\beta\gamma$  dimer. BRET and co-ip data obtained in this study are consistent with such scenario inasmuch as both DOR agonists promoted  $\beta$ arr2 recruitment to receptors that remained at least partly associated to the G $\beta\gamma$  dimer. However, only SNC-80 supported recruitment of  $\beta$ arr2 in close proximity of the N-terminal domain of G $\gamma$ 2, underscoring a role for

DOR-G $\beta\gamma$  complexes in establishing ligand-specific interactions with regulatory proteins. G $\beta\gamma$  contribution to producing ligand-specific modalities of DOR- $\beta$ arr2 association was further evidenced by results obtained with naltrindole. Indeed, this antagonist caused the receptor C-terminus to move away from G $\gamma$ 2 and destabilized the DOR- $\beta$ arr2 interaction promoted by SNC-80. The antagonist was without effect on the stability of DOR- $\beta$ arr2 association by DPDPE, which did not involve G $\gamma$ 2 in the first place. Together with conformational changes that disrupted the DOR-G $\beta\gamma$ - $\beta$ arr2 complex, naltrindole changed the recycling phenotype of the conformation stabilized by SNC-80 into one that resembled recycling elicited by DPDPE. The inter-conversion from one conformational/functional phenotype to the other provides a causal link between the conformations stabilized by different ligands and their distinct recycling profiles.

**Agonist-specific recycling patterns determine differences in DOR desensitization, and are predictive of agonist potential for inducing acute analgesic tolerance.**

Previous studies have shown that distinct internalization patterns could contribute to agonist differences in producing DOR desensitization and analgesic tolerance (Pradhan et al., 2009; Pradhan et al., 2010). Here we showed that desensitization and acute analgesic tolerance produced by DPDPE and SNC-80 were quite distinct, despite similar ability to induce DOR internalization. On the other hand, tendency to induce tolerance was inversely correlated with agonist ability to induce recycling. In particular, the non-recycling agonist SNC-80 produced acute

analgesic tolerance that was absent in mice treated with the recycling agonist DPDPE. We have also shown that recycling protected DORs from desensitization caused by DPDPE but not SNC-80. Since desensitization is thought to actively contribute to the development of tolerance (Bohn et al., 2004; Christie, 2008; Nagi and Pineyro, 2011), it is tempting to speculate that agonist potential for generating tolerance could result from distinct recycling patterns that determine ligand tendency to induce desensitization.

Although DOR ability to undergo recycling has been frequently reported (Trapaidze et al., 2000; Zhang et al., 2008; Archer-Lahlou et al., 2009), these receptors have also been described as being committed for degradation via interaction with G protein coupled receptor associated sorting proteins (GASPs) (Whistler et al., 2002; Hislop et al., 2009). The data obtained in this study allows reconciling both types of observations by showing that post-endocytic trafficking might not be a fixed property of the receptor, but a quality determined by the adoption of agonist-specific conformations. In this sense, it is interesting to note that GASPs' ability to target opioid receptors for downregulation is subject to conformational restraints (Thompson et al., 2007).

In summary, the data presented in this study shows that recycling patterns which result from stabilization of agonist-specific conformations are predictive of analgesic tolerance. These observations are consistent with the notion that development of biased agonists that favor recycling may help produce novel, longer acting opioid analgesics.

## **Reference List**

- Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, Huard K, Paquin-Gobeil M, Pineyro G (2009) Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *J Cell Mol Med* 13:147-163.
- Arttamangkul S, Quillinan N, Low MJ, von Zastrow M, Pintar J, Williams JT (2008) Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices. *Mol Pharmacol* 74:972-979.
- Audet N, Pineyro G (2011) Using BRET to Detect Ligand-Specific Conformational Changes in Preformed Signalling Complexes. *Methods Mol Biol* 756:149-163.
- Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller PW, Pineyro G (2005) Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *J Biol Chem* 280:7808-7816.
- Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M, Pineyro G (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 283:15078-15088.
- Ayoub MA, Maurel D, Binet V, Fink M, Prezeau L, Ansanay H, Pin JP (2007) Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galpha1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Mol Pharmacol* 71:1329-1340.
- Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, Pineyro G (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11406-11411.
- Barak LS, Salahpour A, Zhang X, Masri B, Sotnikova TD, Ramsey AJ, Violin JD, Lefkowitz RJ, Caron MG, Gainetdinov RR (2008) Pharmacological

characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor. *Mol Pharmacol* 74:585-594.

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

Bennett TA, Maestas DC, Prossnitz ER (2000) Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence. *J Biol Chem* 275:24590-24594.

Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2002) Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. *J Neurosci* 22:10494-10500.

Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408:720-723.

Bohn LM, Dykstra LA, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS (2004) Relative opioid efficacy is determined by the complements of the G protein-coupled receptor desensitization machinery. *Mol Pharmacol* 66:106-112.

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

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7297-7301.

Bradbury FA, Zelnik JC, Traynor JR (2009) G protein independent phosphorylation and internalization of the delta-opioid receptor. *J Neurochem* 109:1526-1535.

- Breit A, Gagnidze K, Devi LA, Lagace M, Bouvier M (2006) Simultaneous activation of the delta opioid receptor (deltaOR)/sensory neuron-specific receptor-4 (SNSR-4) hetero-oligomer by the mixed bivalent agonist bovine adrenal medulla peptide 22 activates SNSR-4 but inhibits deltaOR signaling. *Mol Pharmacol* 70:686-696.
- Cahill CM, Holdridge SV, Morinville A (2007) Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci* 28:23-31.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- Christie MJ (2008) Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol* 154:384-396.
- Dang VC, Christie MJ (2011) Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br J Pharmacol*.
- Dang VC, Chieng B, Azriel Y, Christie MJ (2011) Cellular morphine tolerance produced by betaarrestin-2-dependent impairment of mu-opioid receptor resensitization. *J Neurosci* 31:7122-7130.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Dworkin RH (2009) Introduction: Recommendations for the diagnosis, assessment, and treatment of neuropathic pain. *Am J Med* 122:S1-2.
- El Far O, Bofill-Cardona E, Airas JM, O'Connor V, Boehm S, Freissmuth M, Nanoff C, Betz H (2001) Mapping of calmodulin and Gbetagamma binding domains within the C-terminal region of the metabotropic glutamate receptor 7A. *J Biol Chem* 276:30662-30669.
- Fasano C, Thibault D, Trudeau LE (2008) Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3:Unit 3 21.

- Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2:177-184.
- Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13:778-786.
- Gaveriaux-Ruff C, Nozaki C, Nadal X, Hever XC, Weibel R, Matifas A, Reiss D, Filliol D, Nassar MA, Wood JN, Maldonado R, Kieffer BL (2011) Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* 152:1238-1248.
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 20:RC110.
- Groer CE, Schmid CL, Jaeger AM, Bohn LM (2011) Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J Biol Chem* 286:31731-31741.
- Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA, Bouvier M (2007) Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* 282:29089-29100.
- Hanson SM, Gurevich VV (2006) The differential engagement of arrestin surface charges by the various functional forms of the receptor. *J Biol Chem* 281:3458-3462.
- Hislop JN, Henry AG, Marchese A, von Zastrow M (2009) Ubiquitination regulates proteolytic processing of G protein-coupled receptors after their sorting to lysosomes. *J Biol Chem* 284:19361-19370.

- Hylden JLK, Wilcox GL (1980) Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67:313-316.
- Kenakin T (2007a) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol* 72:1393-1401.
- Kenakin T, Miller LJ (2010) Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* 62:265-304.
- Kim JA, Bartlett S, He L, Nielsen CK, Chang AM, Kharazia V, Waldhoer M, Ou CJ, Taylor S, Ferwerda M, Cado D, Whistler JL (2008) Morphine-induced receptor endocytosis in a novel knockin mouse reduces tolerance and dependence. *Curr Biol* 18:129-135.
- Knapp RJ, Sharma SD, Toth G, Duong MT, Fang L, Bogert CL, Weber SJ, Hunt M, Davis TP, Wamsley JK, et al. (1991) [D-Pen<sup>2,4</sup>-125I-Phe<sup>4</sup>,D-Pen<sup>5</sup>]enkephalin: a selective high affinity radioligand for delta opioid receptors with exceptional specific activity. *J Pharmacol Exp Ther* 258:1077-1083.
- Knapp RJ, Santoro G, De Leon IA, Lee KB, Edsall SA, Waite S, Malatynska E, Varga E, Calderon SN, Rice KC, Rothman RB, Porreca F, Roeske WR, Yamamura HI (1996) Structure-activity relationships for SNC80 and related compounds at cloned human delta and mu opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1284-1291.
- Kocan M, Pflieger KD (2011) Study of GPCR-protein interactions by BRET. *Methods Mol Biol* 746:357-371.
- Kouhen OM, Wang G, Solberg J, Erickson LJ, Law PY, Loh HH (2000) Hierarchical phosphorylation of delta-opioid receptor regulates agonist-induced receptor desensitization and internalization. *J Biol Chem* 275:36659-36664.



- Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL (1997) Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J Biol Chem* 272:18125-18131.
- Leduc M, Breton B, Gales C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S, Heveker N (2009) Functional selectivity of natural and synthetic prostaglandin EP4 receptor ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 331:297-307.
- Li J, Xiang B, Su W, Zhang X, Huang Y, Ma L (2003) Agonist-induced formation of opioid receptor-G protein-coupled receptor kinase (GRK)-G beta gamma complex on membrane is required for GRK2 function in vivo. *J Biol Chem* 278:30219-30226.
- Lowe JD, Celver JP, Gurevich VV, Chavkin C (2002) mu-Opioid receptors desensitize less rapidly than delta-opioid receptors due to less efficient activation of arrestin. *J Biol Chem* 277:15729-15735.
- Madia PA, Dighe SV, Sirohi S, Walker EA, Yoburn BC (2009) Dosing protocol and analgesic efficacy determine opioid tolerance in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 207:413-422.
- Mahon MJ, Bonacci TM, Divieti P, Smrcka AV (2006) A docking site for G protein betagamma subunits on the parathyroid hormone 1 receptor supports signaling through multiple pathways. *Mol Endocrinol* 20:136-146.
- Martini L, Whistler JL (2007) The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr Opin Neurobiol* 17:556-564.
- Millecamps M, Laferriere A, Ragavendran JV, Stone LS, Coderre TJ (2010) Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). *Pain* 151:174-183.
- Molinari P, Vezzi V, Sbraccia M, Gro C, Riitano D, Ambrosio C, Casella I, Costa T (2010) Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin interactions. *J Biol Chem* 285:12522-12535.

- Nadal X, Banos JE, Kieffer BL, Maldonado R (2006) Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* 23:830-834.
- Nagi K, Pineyro G (2011) Regulation of opioid receptor signalling: implications for the development of analgesic tolerance. *Mol Brain* 4:25.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274:32248-32257.
- Okura T, Varga EV, Hosohata Y, Navratilova E, Cowell SM, Rice K, Nagase H, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI (2003) Agonist-specific down-regulation of the human delta-opioid receptor. *Eur J Pharmacol* 459:9-16.
- Pfleger KD, Eidne KA (2003) New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors. *Pituitary* 6:141-151.
- Pineyro G, Azzi M, De Lean A, Schiller P, Bouvier M (2001) Short-term inverse-agonist treatment induces reciprocal changes in delta-opioid agonist and inverse-agonist binding capacity. *Mol Pharmacol* 60:816-827.
- Pradhan AA, Walwyn W, Nozaki C, Filliol D, Erbs E, Matifas A, Evans C, Kieffer BL (2010) Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. *J Neurosci* 30:16459-16468.
- Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2009) In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS One* 4:e5425.
- Qiu Y, Loh HH, Law PY (2007) Phosphorylation of the delta-opioid receptor regulates its beta-arrestins selectivity and subsequent receptor internalization and adenylyl cyclase desensitization. *J Biol Chem* 282:22315-22323.

- Raehal KM, Bohn LM (2011) The role of beta-arrestin2 in the severity of antinociceptive tolerance and physical dependence induced by different opioid pain therapeutics. *Neuropharmacology* 60:58-65.
- Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Laustriat D, Cao YQ, Basbaum AI, Dierich A, Vonesh JL, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2006) Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9691-9696.
- Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20:727-740.
- Shields SD, Eckert WA, 3rd, Basbaum AI (2003) Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 4:465-470.
- Thompson D, Pusch M, Whistler JL (2007) Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 282:29178-29185.
- Trapaidze N, Gomes I, Bansinath M, Devi LA (2000) Recycling and resensitization of delta opioid receptors. *DNA Cell Biol* 19:195-204.
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1-13.
- Vargas GA, Von Zastrow M (2004) Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor. *J Biol Chem* 279:37461-37469.
- Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, Von Zastrow M (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297:615-620.

- Yang M, He RL, Benovic JL, Ye RD (2009) beta-Arrestin1 interacts with the G-protein subunits beta1gamma2 and promotes beta1gamma2-dependent Akt signalling for NF-kappaB activation. *Biochem J* 417:287-296.
- Zhang J, Barak LS, Anborgh PH, Laporte SA, Caron MG, Ferguson SS (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 274:10999-11006.
- Zhang X, Wang F, Chen X, Chen Y, Ma L (2008) Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. *J Neurochem* 106:781-792.
- Zhang X, Wang F, Chen X, Li J, Xiang B, Zhang YQ, Li BM, Ma L (2005) Beta-arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors. *J Neurochem* 95:169-178.

## FIGURES LEGEND

**Figure 1. Internalization induced by DPDPE and SNC-80 is similar. (A)** Cortical neuron cultures were incubated with primary antibody to label surface Flag-DORs. Neurons were then treated with DPDPE or SNC-80 (10  $\mu$ M) for the indicated times. After stopping treatment antibody bound to surface receptors was stripped, cells were fixed, permeabilized and labeled with secondary antibody for visualization of intracellular labeling. A representative example from three independent experiments is shown. **(B)** Histograms correspond to mean intracellular fluorescence intensity quantified in neurons that were exposed to agonists or vehicle for 1 hr and represent mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. Internalization data were analyzed together with recycling results shown in figure 2B by means of repeated measures 2-way ANOVA (interaction  $F_{(2,15)}=13.02$ ,  $p<0.001$ ). Bonferroni *post hoc* for multiple comparisons among internalization groups: \*\*\* $p<0.001$  comparing drugs to vehicle;  $p>0.05$  comparison among drugs. **(C)** HEK293 cells expressing Flag-DORs were exposed to DPDPE or SNC-80 (1 $\mu$ M) for the indicated time periods. Receptors at the cell surface were measured by FACs. Results correspond to loss of surface receptors and are expressed as a % of receptors present at the membrane before internalization. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments that were analyzed by repeated measures 2-way ANOVA (interaction  $F_{(2,15)}=5.33$ ,  $p<0.05$ ). Bonferroni *post hoc* for multiple comparisons: \* $p<0.05$  comparing DPDPE to SNC-80 at 15 min. **(D)** HEK293 cells expressing Flag-DORs were exposed to DPDPE or SNC-80 (1 $\mu$ M) for the indicated time periods. Receptors at the cell surface were measured by an ELISA-based method, as described in the experimental section. Results

correspond to loss of surface receptors and are expressed as a % of receptors present at the membrane before internalization. Data represent mean  $\pm$  S.E.M. of six independent experiments that were analyzed by repeated measures 2-way ANOVA (interaction  $F_{(5,55)}=0.8$ ,  $p>0.05$ ; difference among drugs  $F_{(1,55)}=0.2$ ,  $p>0.05$ ).

**Figure 2. Recycling of neuronal DORs is different following exposure to DPDPE and SNC-80. (A)** Neurons were treated as in figure 1A following which they were washed and either immediately processed for intracellular labeling (stimulated) or were first allowed to recover for 60 min in the absence of ligand (stimulated + recovery). Labeling of intracellular DORs was done as in Fig. 1A. The image shows a representative example of one of four independent experiments. **(B)** Histograms represent mean intracellular intensity in neurons that were stimulated and immediately labeled (dashed), or in neurons that were first allowed to recover in the absence of ligand (filled). Note: dashed bars correspond to internalization values in figure 1B. Results represent mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. Recycling data were analyzed together with internalization results shown in figure 1B by means of repeated measures 2-way ANOVA (interaction  $F_{(2,15)}=13.02$ ,  $p<0.001$ ). Bonferroni *post hoc* for multiple comparisons: \*\*\* $p<0.001$  comparing recovery by DPDPE and SNC-80; # $p<0.001$  comparing stimulated vs stimulated + recovery for DPDPE. **(C)** Neurons were treated and washed as indicated above before allowing them to recover in the absence of ligand. At the end of the recovery period, cells were processed for surface labeling as described in the experimental section. The image shows a representative example of surface labeling obtained in different treatments

conditions and corresponds to a representative example of four independent experiments. **(D)** Histograms represent “recovery ratios” obtained following recovery from exposure to DPDPE or SNC-80 and correspond to mean  $\pm$  S.E.M. of four independent experiments. “Recovery ratios” were calculated by dividing the number of labeled neurons present in agonist-treated slides by the total number of surface-labeled neurons present in slides that were not subject to treatment. Recovery ratios were analyzed by paired *t* test; \*\* $p < 0.01$ .

**Figure 3. DPDPE and SNC-80 elicit different DOR recycling in HEK293 cells.** **(A)** Cells stably expressing wild-type DORs were incubated with SNC-80 or DPDPE (1  $\mu$ M; 30 min) in order to induce internalization. At the end of treatment cells were washed to remove agonist and allowed to recover for the indicated periods of time before membrane receptors were assessed using an ELISA-based method. Results were expressed as % of internalized DORs and represent mean  $\pm$  S.E.M. of 4-8 independent experiments. Curves were compared by mixed two-way ANOVA (interaction  $F_{(4,50)} = 23.8$ ,  $p > 0.001$ ; difference among drugs  $p < 0.001$ ). **(B)** HEK293 cells were treated and washed as above before being used in [<sup>3</sup>H]naltrindole displacement assays in which the radioligand (1.5nM) was displaced with the indicated concentrations of cold naltrindole.  $K_d$  values were calculated from concentrations that inhibited [<sup>3</sup>H]naltrindole binding by 50% ( $IC_{50}$ ) using the Cheng-Prusoff equation.  $K_d$  CTLs:  $223 \pm 40$  pM;  $K_d$  following SNC-80:  $302 \pm 42$  pM;  $K_d$  following DPDPE:  $280 \pm 40$  pM.

**Figure 4. DPDPE and SNC-80 differ in their ability to induce desensitization and acute analgesic tolerance.** HEK293 cells were incubated with 10 $\mu$ M cycloheximide and treated or not with monensin (50  $\mu$ M) before exposing them to vehicle (DMSO 0.01%), DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M; 60 min). At the end of treatment cells were washed and either immediately used to monitor cAMP accumulation after agonist-induced desensitization **(A)** or were first allowed to recover in the absence of ligand so as to evaluate resensitization **(B)**. Results are expressed as % of maximal inhibition obtained in corresponding untreated controls, and correspond to 5-6 independent experiments carried out in duplicates. **(A)** Desensitization data were analyzed by means of three way ANOVA (agonist x monensin x concentration). Interaction for agonist x monensin groups ( $F_{(2,188)}=7.20$ ,  $p<0.01$ ). Bonferroni *post hoc* for multiple comparisons: Control vs desensitization by DPDPE  $p<0.001$ ; Control vs desensitization by SNC-80  $p<0.001$ ; desensitization by DPDPE vs desensitization by SNC-80  $p<0.001$ ; desensitization by DPDPE vs desensitization by DPDPE + monensin  $p<0.001$ ; desensitization by SNC-80 vs desensitization by SNC-80 + monensin  $p>0.05$ . **(B)** Resensitization data were analyzed as above. Interaction for agonist x monensin groups was non significant ( $F_{(2,235)}=1.7$ ,  $p>0.05$ ). Effect of agonist factor ( $F_{(2,235)}=267$ ,  $p<0.001$ ), effect of monensin factor ( $F_{(1,235)}=0.75$ ,  $p>0.05$ ). Bonferroni for *post hoc* comparisons showed resensitization following DPDPE vs resensitization following SNC-80  $p<0.001$ . **(C)** One month following induction of the spared nerve injury model of neuropathic pain, calibrated von Frey filaments were used to evaluate the reversal of mechanical hypersensitivity following administration of an intrathecal injection of either vehicle, DPDPE or SNC-80. The 50% withdrawal thresholds (g)



were then evaluated three times every 20 minutes, before administering a second identical dose of the corresponding treatment followed by similar assessment. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=10-20/treatment group. Data were analyzed using three-way ANCOVA (treatment x testing over time x injection) using basal thresholds (t=0) as coregressor ( $F_{(1,231)}=22.0$ ,  $p<0.001$ ; heterogeneity of regression slope:  $F_{(17,214)}=1.15$ ,  $p>0.05$ ). Treatment x injection interaction ( $F_{(1,231)}=5.3$ ,  $p<0.05$ ) allowed the following comparisons: effect of first DPDPE injection vs effect of first SNC-80 injection:  $p>0.05$ ; effect of second DPDPE injection vs effect of second SNC-80 injection:  $p<0.01$ ; effect of first vs second DPDPE injection:  $p>0.05$ ; effect of first vs second SNC-80 injection:  $p<0.05$ .

**Figure 5. Sustained exposure to DPDPE and SNC-80 stabilized DORs into conformations that distinctively interact with G $\beta\gamma$  subunits.** HEK293 cells were transfected with G $\alpha_i$ -Luc/DOR-GFP (**A, B**) or DOR-Luc/GFP-G $\gamma_2$  (**C, D**) plus indicated accessory proteins. On the day of the experiment they were exposed to DPDPE (1 $\mu$ M), SNC-80 (1 $\mu$ M) or vehicle (0.01% DMSO) for 60 min. At the end of treatment cells were resuspended, washed and transferred to a microplate where coelenterazine was added 2 min prior to BRET2 measures. Results were expressed as the difference between netBRET values obtained in vehicle and agonist-treated cells, and correspond to mean  $\pm$  SEM of 4-5 independent experiments (A, C). In experiments assessing the acute effect of naltrindole (1  $\mu$ M) in cells that had been pre-exposed to DPDPE or SNC-80, the antagonist was introduced 2 min prior to coelenterazine. Results were expressed as the difference

between netBRET values obtained in presence or absence of naltrindole (B, D). Statistical comparisons were done by repeated measures two-way ANOVA on netBRET values. **(A, B)**: agonist x naltrindole interaction was not significant ( $F_{(2,20)}=1.9$ ,  $p>0.05$ ); effect of agonist factor ( $F_{(2,20)}=32.9$ ,  $p<0.001$ ), effect of naltrindole factor ( $F_{(1,20)}=0.6$ ,  $p>0.05$ ); Bonferroni for post *hoc* comparisons showed \*\*\* $p<0.001$  comparing drugs to vehicle. **(C, D)**: agonist x naltrindole interaction ( $F_{(2,15)}=9.3$ ,  $p<0.01$ ), Bonferroni for post *hoc* comparisons showed \* $p<0.05$ ; \*\*\* $p<0.001$  comparing agonist to vehicle; # $p<0.01$  comparing DPDPE vs SNC-80 in CTL groups and in naltrindole groups; & $p<0.01$  comparing netBRET values in presence and in absence of naltrindole.

**Figure 6. Sustained exposure to DPDPE and SNC-80 stabilized DORs into conformations that were distinctively recognized by [<sup>3</sup>H]naltrindole.** **(A)** HEK293 cells stably expressing Flag-DORs were exposed to DPDPE, SNC-80 (1  $\mu$ M; 1h) or vehicle (0.01% DMSO). Following treatment cells were washed and [<sup>3</sup>H]naltrindole binding was then assessed. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of Bmax binding obtained in four independent experiments. Statistical comparisons were done by repeated measures one-way ANOVA ( $F_{(2,6)}=20.9$ ,  $p<0.01$ ) using Bonferroni for post *hoc* comparisons: \* $p<0.05$  comparing SNC-80 vs DPDPE; \*\* $p<0.01$  comparing control vs DPDPE. *Right panel* corresponds to a representative example of four independent saturation experiments. **(B)** HEK293 cells expressing Flag-DORs were exposed to agonist or vehicle as above. Following treatment cells were washed and membrane lysates prepared. The solubilisation product was then separated by electrophoresis SDS-PAGE and

receptor protein revealed by immunoblot. A representative example of four independent experiments is shown.

**Figure 7. DORs stabilized by DPDPE and SNC-80 distinctively interact with  $\beta$ arr2.** HEK293 cells were transfected with recombinant plasmids for the BRET pairs and accessory proteins as indicated in the figure in order to assess  $\beta$ arr2 recruitment from the vantage point or the receptor (**A, B**) or the  $G\beta\gamma$  dimer (**C, D**). (**A**) On the day of experiment HEK293 cells were suspended in PBS and distributed into a microplate following which they were introduced into the plate reader and incubated with coelenterazine for five min prior to adding DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M). BRET1 measures were obtained every 18 seconds following agonist addition. Data corresponds to one of three independent experiments. (**B**) HEK293 cells were incubated with DPDPE or SNC-80 (1  $\mu$ M; 37°C) before re-suspending them in PBS and taking BRET1 readings five min after manual addition of coelenterazine h. Results were expressed as the difference between netBRET values obtained in vehicle and agonist-treated cells and correspond to mean  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. NetBRET values obtained in vehicle-treated cells:  $0.021 \pm 0.004$ . Statistical comparisons were done by repeated measures one-way ANOVA on netBRET values. ( $F_{(4,16)}=262.3$ ,  $p<0.001$ ) using Bonferroni for post *hoc* comparisons: \*\*\* $p<0.001$  comparing drugs to vehicle; # $p<0.001$  comparing DPDPE vs SNC-80. (**C**) Cells were processed as in A and BRET measures similarly taken. (**D**) Treatment, BRET measures, expression of results and statistical analyses were carried out as in B. Results correspond to mean  $\pm$  SEM of five independent. netBRET values in vehicle-treated cells:  $0.019 \pm$

0.002. Repeated measures one-way ANOVA ( $F_{(4,16)}=23.6$ ,  $p<0.001$ ), using Bonferroni for post *hoc* comparisons: \*\*\* $p<0.001$  comparing SNC-80 to vehicle; # $p<0.001$  comparing DPDPE vs SNC-80.

**Figure 8. The duration of  $\beta$ arr2 association with DOR-G $\beta$  complexes depends on the activating agonist.** HEK293 cells were transfected with recombinant plasmids for the indicated BRET pairs and accessory proteins. On the day of the experiment, they were exposed to 1 $\mu$ M DPDPE (**A, C, E**) or SNC-80 (**B, D, F**) for 30 min. Treatment was stopped and cells washed by addition of PBS, following which they were either immediately used for BRET measures or were first allowed to recover in presence or absence of naltrindole (1  $\mu$ M) for the indicated periods of time. BRET1 readings were taken five min after manual addition of coelenterazine. All data are expressed as % of mean netBRET values observed in vehicle-treated controls, and correspond to mean  $\pm$  SEM of three to six independent experiments. Statistical comparisons for each BRET pair were done on netBRET values using repeated measures one-way ANOVA. (**A, B**): ( $F_{(14,56)}=36.7$ ,  $p<0.001$ ), # $p<0.001$ ; & $p<0.001$ ; \*\*\* $p<0.001$  comparing treatments to vehicle. (**C, D**): ( $F_{(14,70)}=20.5$ ,  $p<0.001$ ); & $p<0.001$ ; \*\*\* $p<0.001$  comparing treatments to vehicle. (**E, F**): ( $F_{(10,20)}=33.9$ ,  $p<0.001$ ); & $p<0.001$ ; \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$  comparing treatments to vehicle.

**Figure 9. The stability of  $\beta$ arr2 association to DOR-G $\beta$  complexes depends on the activating agonist.** HEK293 cells expressing or not Flag-DORs,

$\beta$ arr2-Luc, YFP-G $\gamma$ 2 and accessory heterotrimeric G $\alpha$ i1 and G $\beta$ 1 subunits were treated with 1 $\mu$ M SNC-80 (**A, B**) or DPDPE (**C, D**) for 30 min. At the end of treatment cells were washed and immediately used in co-immunopurification assays or were first allowed to recover for 30 min in the absence of agonist. Cells were then lysed, Flag-DORs purified and the resulting product separated by SDS-PAGE. Blots show representative examples of the amounts of  $\beta$ arr2-Luc and YFP-G $\gamma$ 2 that were co-purified with Flag-DORs in: (1) non-transfected HEK293 cells; (2) transfected cells that were not exposed to agonist; (3) transfected cells that were exposed to agonist during 30 min and (4) transfected cells that were exposed to agonist and then allowed to recover for 30 min in the absence of ligand. Insets show control blots of proteins amounts present in lysates before immunopurification and amount of Flag-DOR immunopurified for each sample. Histograms show results obtained by compiling densitometric measures of 8 independent experiments. Data are expressed as percentage of  $\beta$ arr2-Luc/Flag-DOR or YFP-G $\gamma$ 2/Flag-DOR ratios in controls. Statistical comparisons of immunoreactivity ratios were done by repeated measures one-way ANOVA.  *$\beta$ arr2-Luc association with Flag-DORs (A,C):* ( $F_{(4,28)}=10.0$ ,  $p<0.001$ ); \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  comparing treatments to vehicle; # $p<0.05$  comparing  $\beta$ arr2-Luc/Flag-DORs ratios following recovery or not from DPDPE treatment. *YFP-G $\gamma$ 2 association with Flag-DORs (B, D):* ( $F_{(4,28)}=13.8$ ,  $p<0.001$ ); \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  comparing treatments to vehicle.

**Figure 10. Naltrindole allows to rescue DOR recycling following SNC-80 exposure.** HEK293 cells stably expressing wild-type DORs were incubated with **(A)** SNC-80 or **(B)** DPDPE (1  $\mu$ M; 30 min) in order to induce internalization. At the end of treatment cells were washed to remove agonist and allowed to recover for the indicated periods of time in the presence or absence of the indicated ligands. At the end of each recovery period membrane receptors were assessed using an ELISA-based method. Receptors recovered at the membrane were expressed as % of internalized DORs and represent mean  $\pm$  S.E.M. of 4-9 independent experiments. Data were analyzed with mixed two-way ANOVA. **(A)** Time x treatment interaction for SNC-80 ( $F_{(15,156)}=4.3$ ,  $p<0.001$ ); using Bonferroni for post *hoc* comparisons:  $p<0.001$  comparing SNC-80 to SNC-80 + naloxone or to SNC-80 + naltrindole;  $p>0.05$  comparing SNC-80 to SNC-80 + morphine. **(B)** No time x treatment interaction was observed for DPDPE ( $F_{(5,48)}=0.4$ ,  $p>0.05$ ),  $p>0.05$  comparing DPDPE to DPDPE + naltrindole.

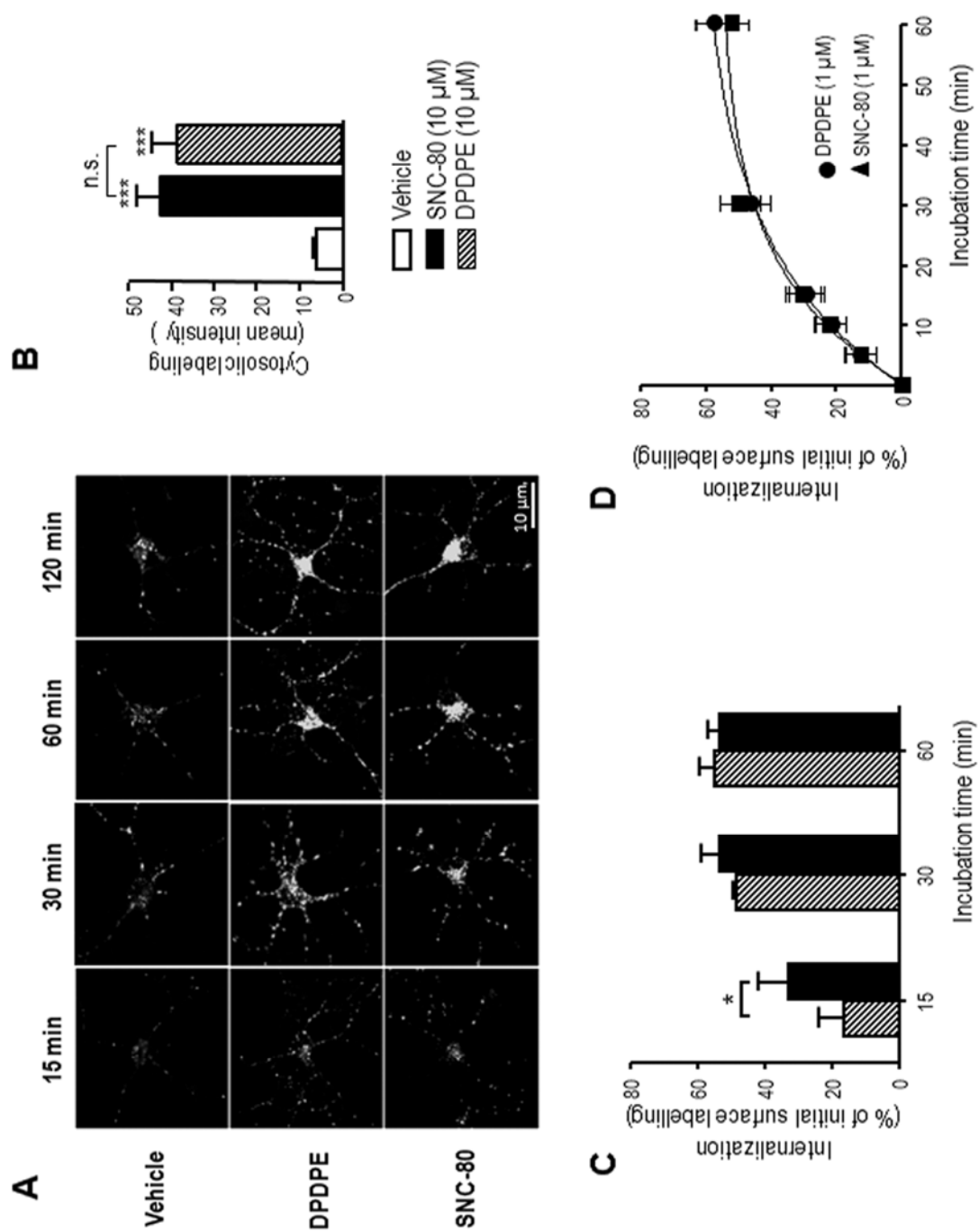


Figure 1

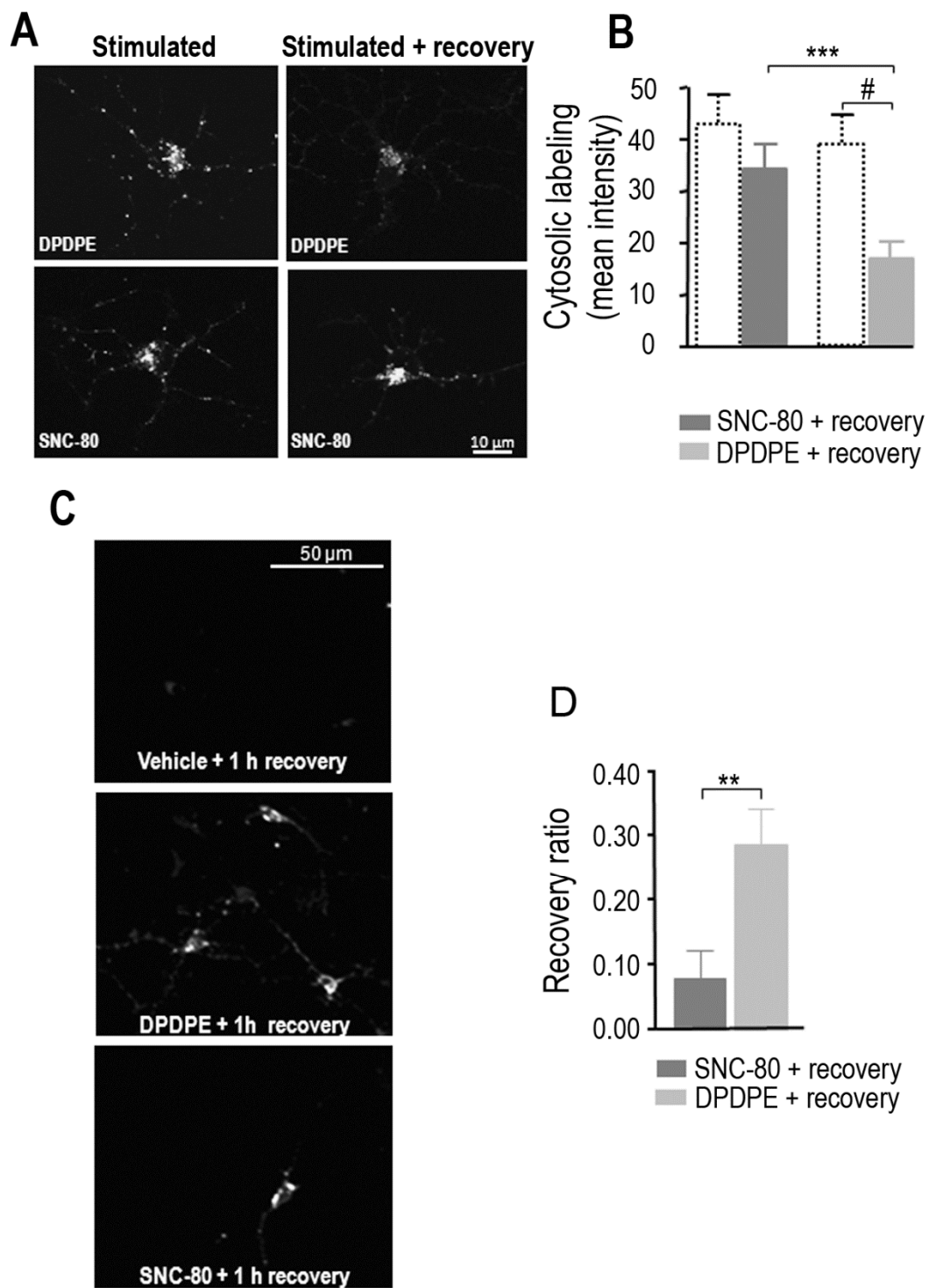
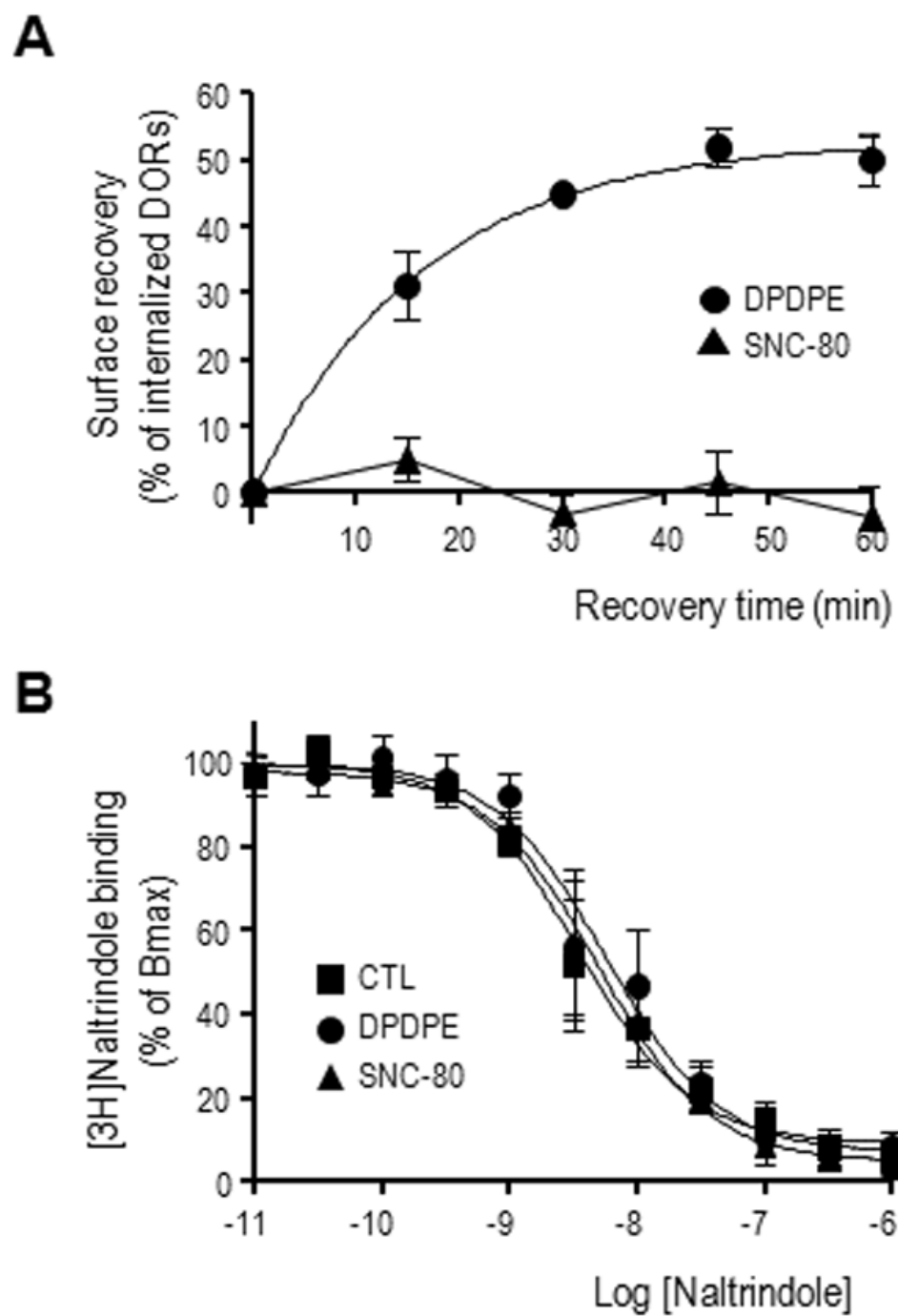


Figure 2



**Figure 3**

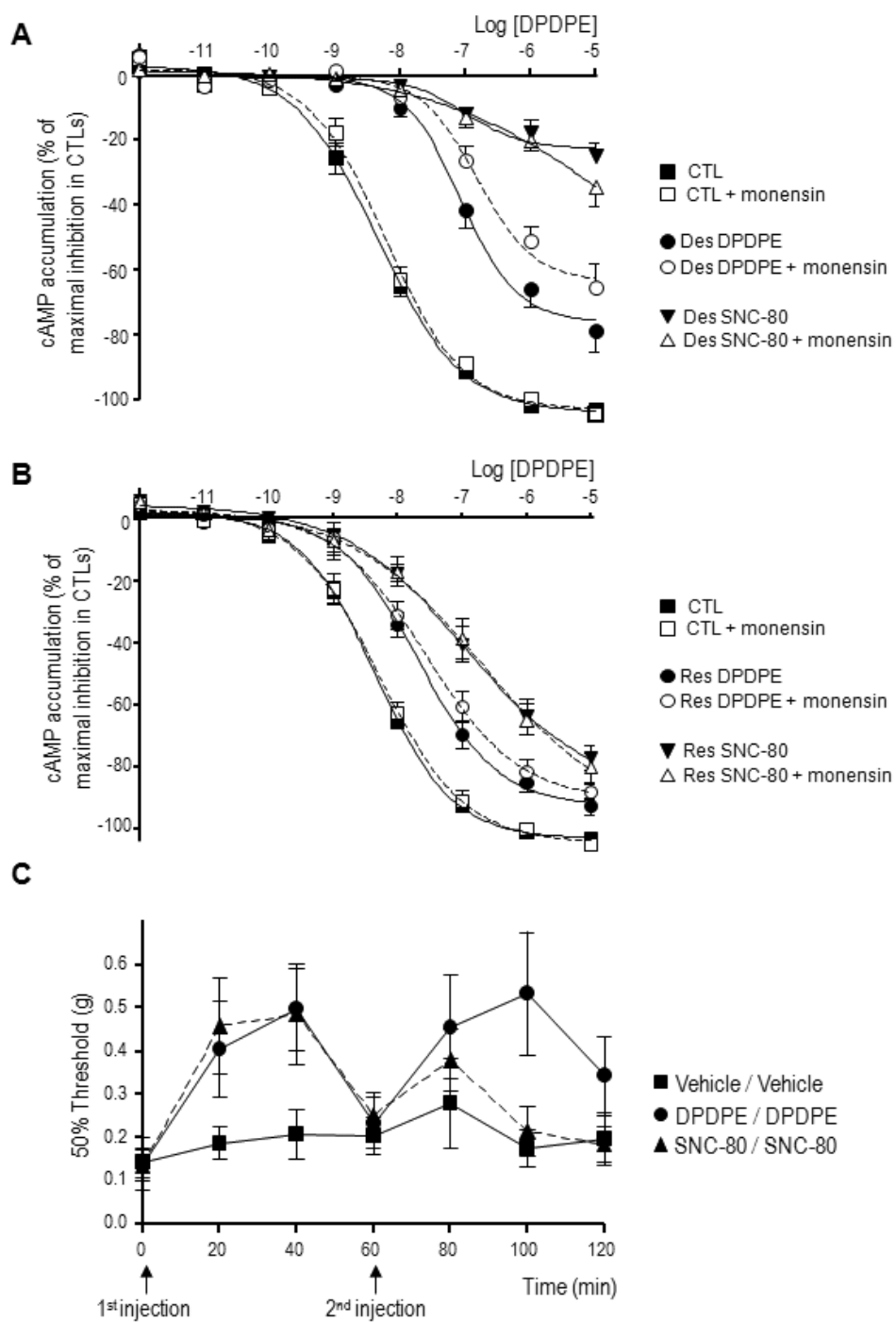
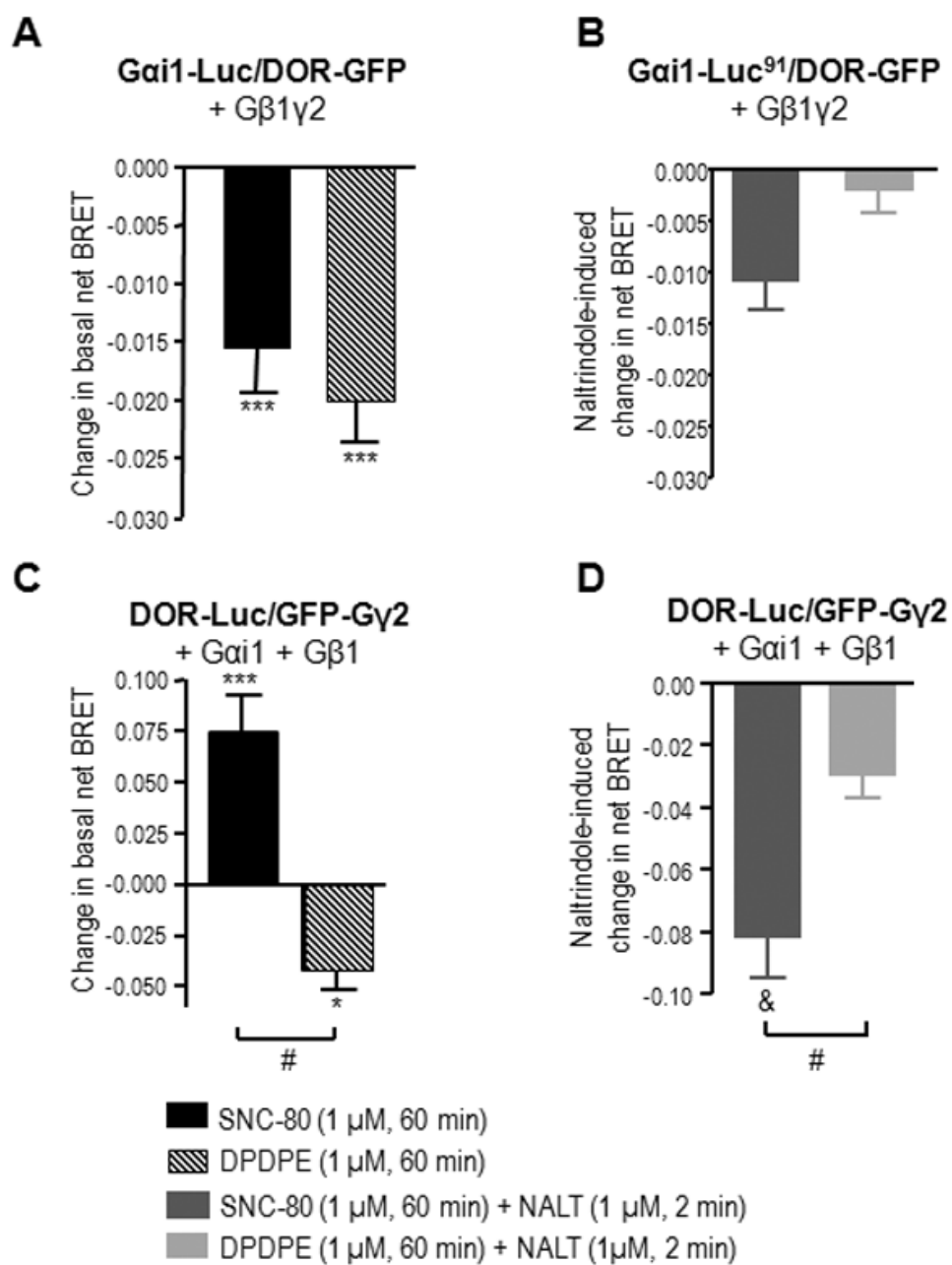
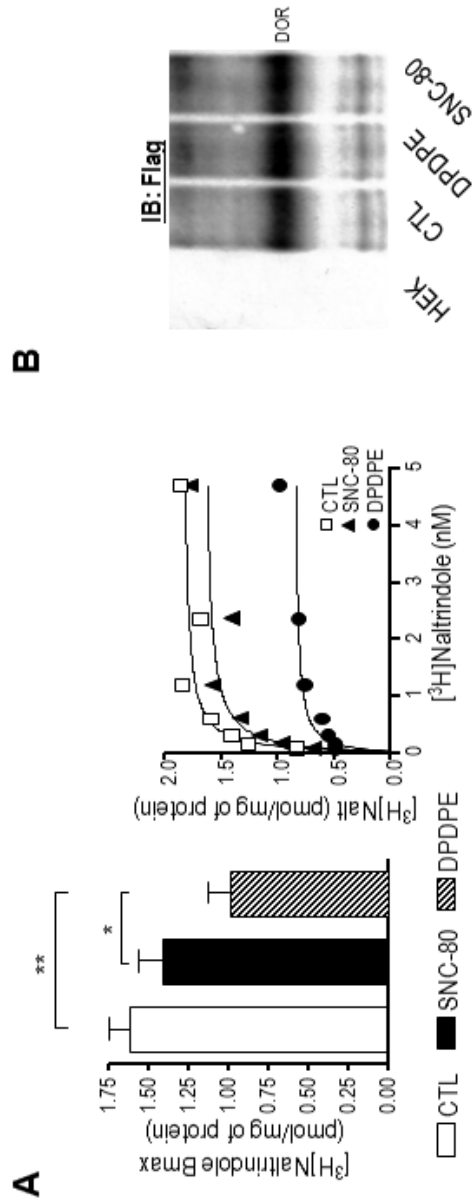


Figure 4



**Figure 5**



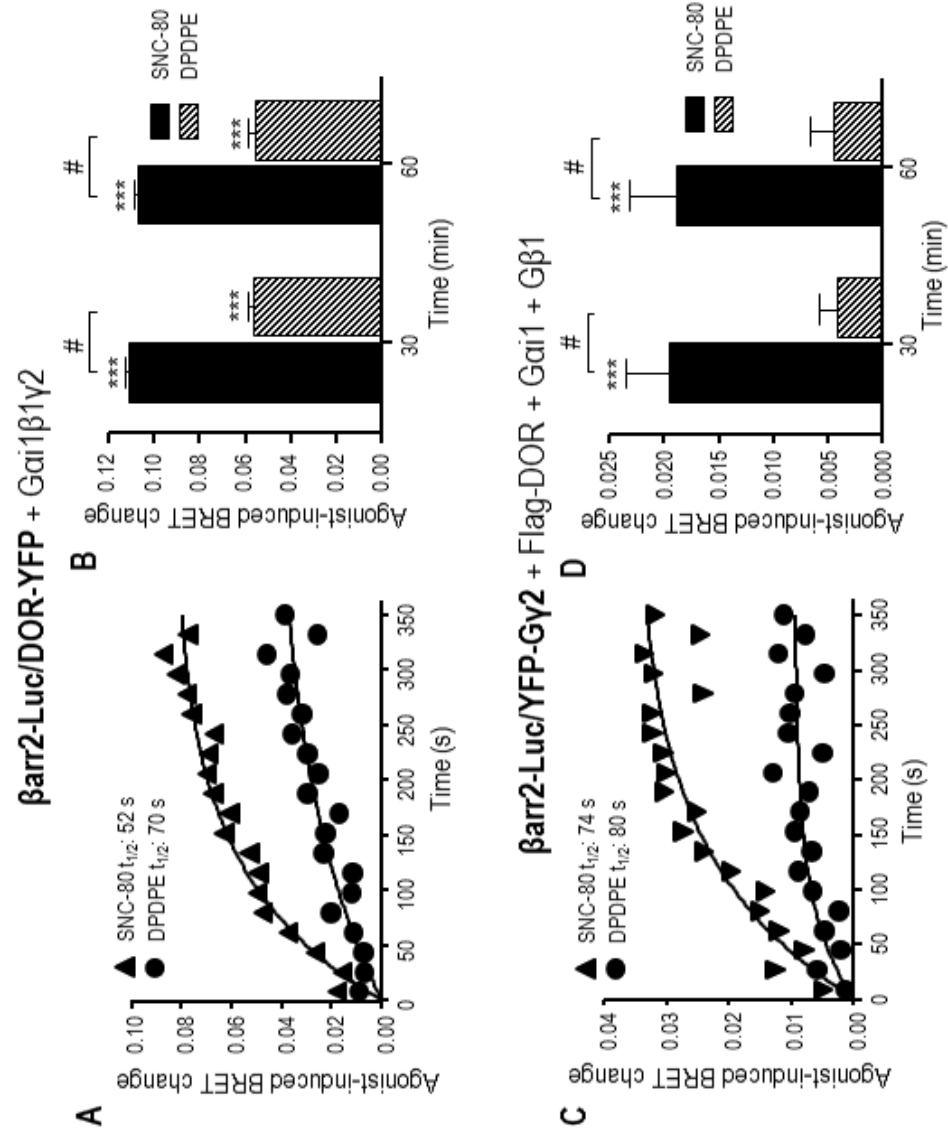


Figure 7

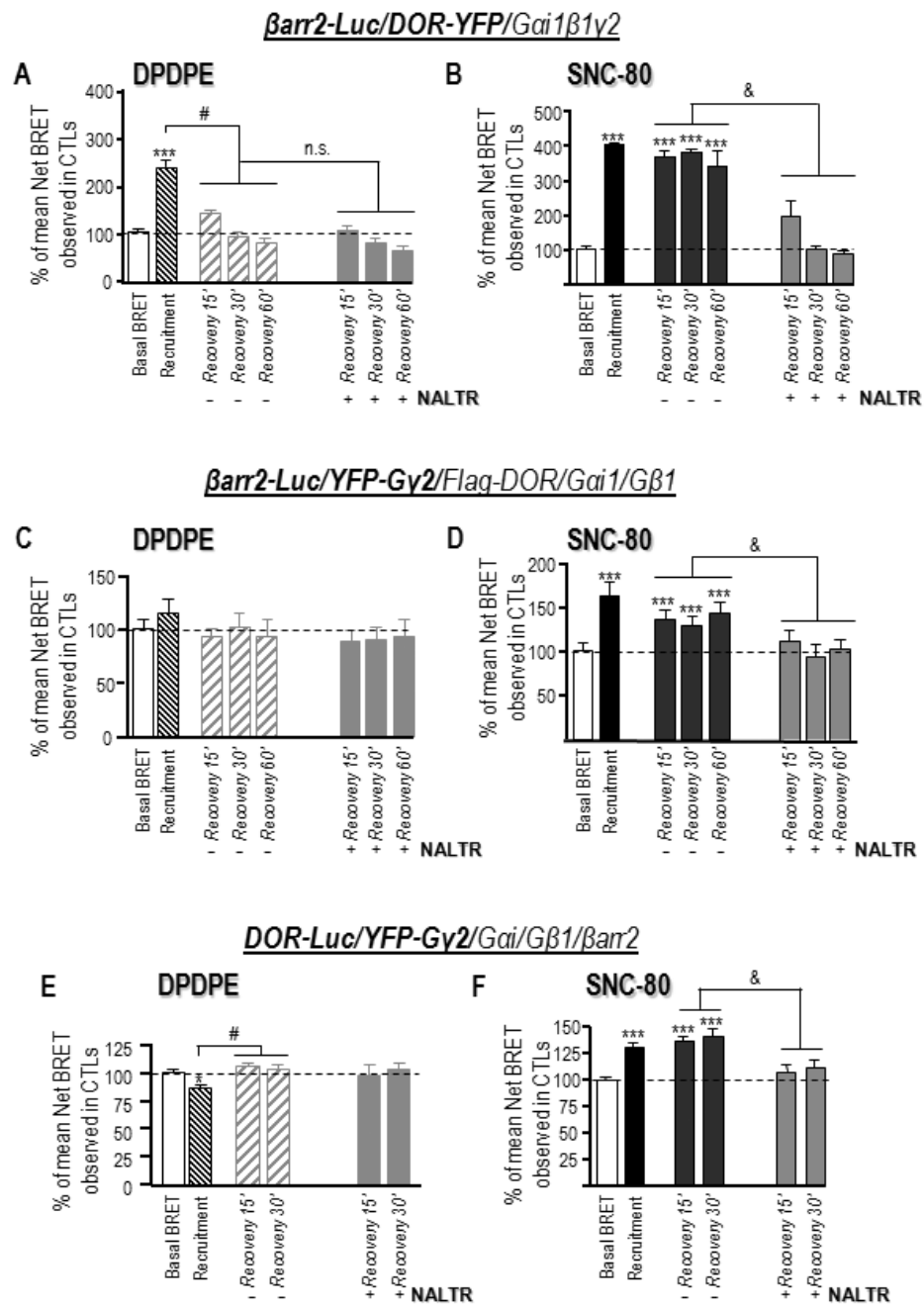


Figure 8

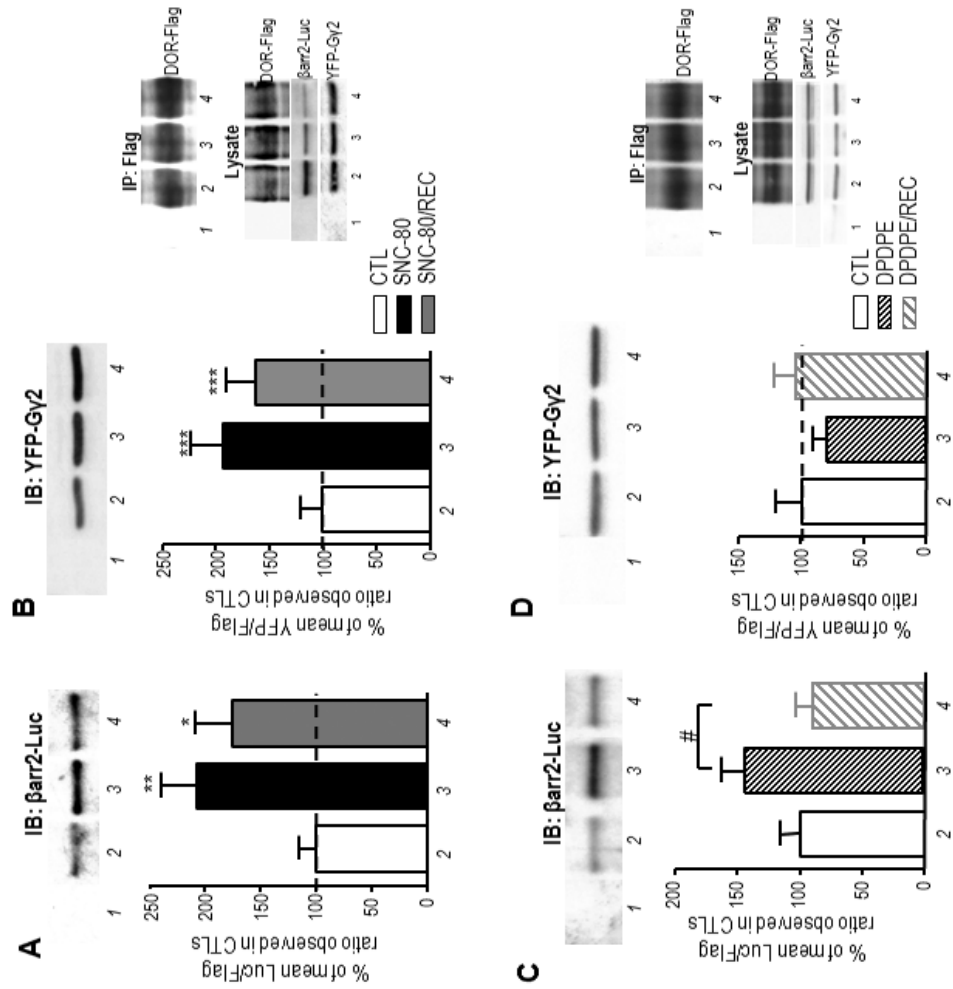


Figure 9

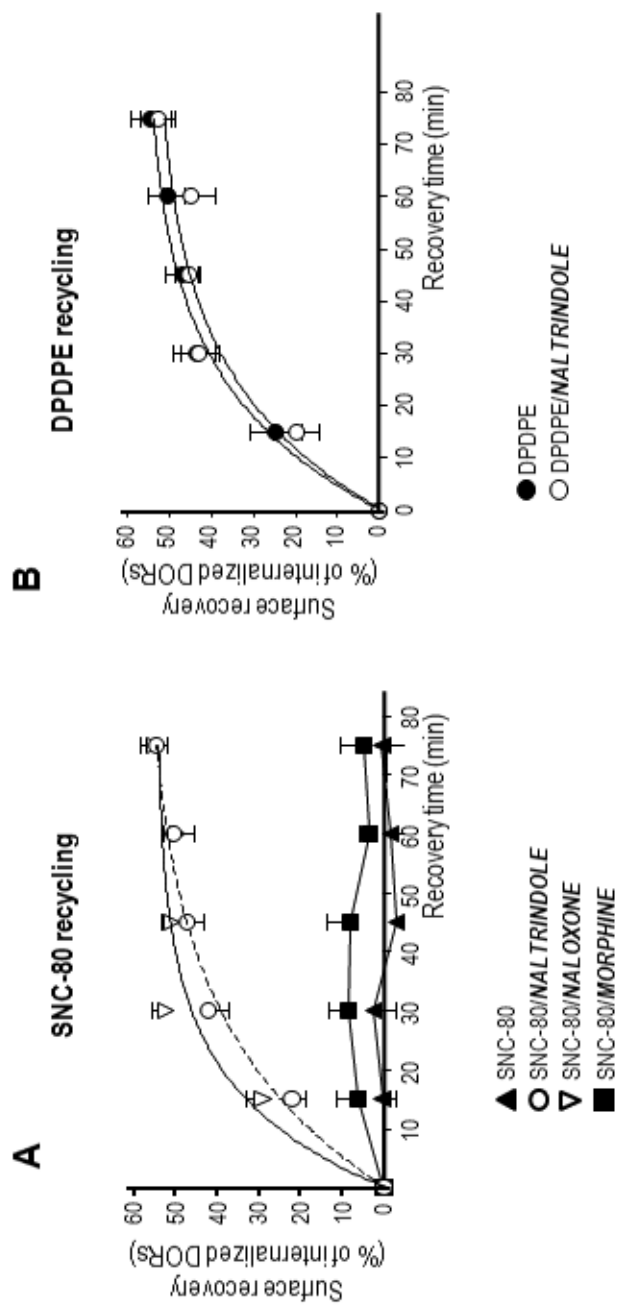


Figure 10



## 4. Discussion

Durant des décennies, la recherche en pharmacologie s'est basée sur l'hypothèse que les RCPG existent sous deux états, l'un actif et l'autre inactif. Cette théorie était limitée par les techniques d'observation de l'activité de la drogue qui consistait à observer la contraction ou la relaxation d'un tissu tel l'intestin d'un cobaye ou un vaisseau sanguin. L'expérimentateur était donc limité par un seul point d'observation, la contraction du tissu, mais aussi par son incapacité à contrôler la quantité de récepteurs du tissu biologique. Il nous était impossible d'étudier toute la complexité de la signalisation des RCPG, nous ne pouvions que nous contenter de scruter l'effet global de toute la signalisation des récepteurs visés. Lorsque notre perspective changea des tissus aux cellules et que nous avons pu observer les changements intracellulaires produits par les RCPG, une révolution se produisit dans les modèles théoriques. Nous sommes passés d'un modèle linéaire de l'efficacité des ligands à un modèle pluridimensionnelle [489] où l'efficacité dépend de la voie de signalisation observée.

Ce changement de perspective fut possible grâce au progrès effectué en biologie moléculaire. En particulier les techniques de recombinaison de l'ADN ont permis l'expression de protéines humaines dans l'intérieur de système cellulaire hétérologue. Cette avancée technologique a permis au pharmacologue de contrôler en partie le contenu des cellules et de leur membrane. Une multitude d'outils ont ainsi pu être créés dans le but d'évaluer l'efficacité des RCPG sous différent angle, voir différentes voies de signalisation et de régulation

Il ne fallut pas longtemps après le développement de ses outils pour que les chercheurs commencent à trouver des failles dans la théorie des récepteurs à deux états. De nouvelles théories ont donc été développées afin d'expliquer ces comportements « biaisés ». C'est dans ce milieu foisonnant de nouveaux outils et nouvelles théories que cette étude fut réalisée. En utilisant le DOR et ses ligands comme modèles, tout d'abord, nous démontrons que les ligands à double efficacité stabilisent le DOR sous une conformation active différente que les agonistes classiques. En deuxième temps, nous démontrons physiquement que les agonistes partiels (Morphine et TIPP) stabilisent des

conformations différentes entre eux, donc que le concept de conformations actives distinctes n'est pas le fait de seulement quelques ligands « biaisés ». Et finalement, nous démontrons que les agonistes complets (DPDPE et SNC-80) peuvent aussi stabiliser des conformations différentes entre elles menant à une régulation différentielle du tri postendocytique du DOR et contribuant aux différences dans la désensibilisation de la signalisation et dans la tolérance à l'analgésie.

## **4.1 Les agonistes a double efficacité du DOR stabilisent des conformations actives différentes que ses agonistes**

### **4.1.1 L'inversion de l'ordre d'efficacité des ligands**

Comme mentionnée précédemment, la façon de démontrer la présence de différentes conformations actives d'un récepteur est de comparer l'efficacité de différents ligands au travers d'au moins deux voies de signalisation ou de régulation [483]. Une inversion de l'efficacité des ligands indiquant qu'ils stabilisent des conformations différentes. Il est toutefois important que cette inversion d'efficacité ne soit pas en fonction d'un contexte cellulaire tel une différence dans la quantité de récepteurs exprimés à la surface de la cellule. C'est dans cette optique que nous avons évalué l'efficacité de différents ligands du DOR à activer deux voies de signalisation dans une lignée cellulaire hétérologue exprimant de façon stable le récepteur. Ce type d'expérience avait déjà permis de démontrer que les agonistes inverses de la voie de l'AMPC du  $\beta_2$ AR stabilisaient en fait une conformation active dans la voie des MAPK ERK1/2. De plus, contrairement aux agonistes de ce récepteur, cette activation était indépendante de l'activation des protéines  $G_s$  et  $G_i$ , mais dépendante de la présence de la  $\beta$ arr [351].

Nous avons donc testé l'efficacité des ligands du DOR dans deux voies de signalisation, la production d'AMPC et l'activation des MAPK ERK1/2. Tel qu'observé sur le  $\beta_2$ AR, les agonistes inverses du DOR pour la production d'AMPC (article 1; figure 1a) se comportaient comme des agonistes pour l'activation de la MAPK ERK1/2 (article 1; figure 1b). Le TICP, qui est le ligand le moins efficace dans la voie de l'AMPC, devient un agoniste

partiel plus efficace que la morphine lorsque la voie des MAPK est observée. Cette observation indique donc que le TICP stabilise une conformation active qui est différente que celle activée par la morphine.

#### **4.1.2 L'effet agoniste du TICP sur les MAPK ERK1/2 dépend de la fonctionnalité de la sous-unité $G\alpha_i$ , mais pas de son activation**

Sachant que l'activation des MAPK ERK1/2 peut s'effectuer selon différente cascade de signalisation, allant de la transactivation d'un récepteur tyrosine kinase jusqu'à une activation indépendante des protéines G, mais dépendante de la  $\beta$ arr, nous avons tenté de caractériser l'activation de cette voie de signalisation par les différentes classes de ligands observés. En premier lieu, nous avons déterminé si l'activation des MAPK ERK1/2 par le TICP est indépendante de l'activité de la protéine  $G_i$  en traitant nos cellules avec la PTX, toxine qui provoque une ribosylation de l'ADP et empêchant la protéine G de s'activer. Cette ribosylation empêche l'ADP de se dissocier de la sous-unité  $\alpha_i$  de la protéine G, bloquant ainsi l'activation de cette dernière par le récepteur. Contrairement aux ligands à double efficacité du  $\beta_2$ AR qui active les MAPK ERK1/2 selon une cascade indépendante des protéines  $G_s$  et  $G_i$ , l'activation de cette voie de signalisation par le TICP est dépendante de l'activation de la protéine G (article 1; figure 1c). Comment expliquer que l'activité d'un ligand dans une voie de signalisation soit dépendante de l'activation de la protéine  $G\alpha_i$  sans pour autant inhiber la production de l'AMPc? Répondre à cette question reste pour le moins difficile. Lors de l'écriture de cet article, nous avons suggéré que le TICP favoriserait l'activation d'un sous-type de protéines  $G\alpha_i$  qui serait moins efficace pour l'inhibition de l'AMPc que les autres protéines  $G\alpha_i$ . Cette hypothèse était plausible à l'époque, car il avait été démontré auparavant que le DOR peut interagir avec différentes protéines  $G\alpha_i$  [487;488]. De plus, il avait été démontré qu'une incubation de 30 minutes avec l'agoniste inverse de la voie AMPc, ICI174864, produit une augmentation de la quantité de sous-unités  $G\alpha_{i3}$  récupérées après l'immunoprécipitation du DOR [490] et cette augmentation serait spécifique à cette sous-unité.

C'était toutefois avant la découverte que le DOR et d'autres RCPG forment un complexe de signalisation avec la protéine G et ses effecteurs à la membrane plasmique [65;66;185]. Il serait invraisemblable que la conformation du DOR stabilisée par le TICP produise un échange de la protéine  $G\alpha_i$  vers une autre protéine  $G\alpha_i$ , possédant une faible activité cyclase, en moins de 2 minutes (temps requis pour atteindre le  $B_{max}$  du TICP pour l'activation des MAPK ERK1/2) (article 1; figure 2A), à moins que ces protéines  $G\alpha_i$  soient déjà en complexe avec une sous population de complexe DOR/protéine G. Dans un tel cas, l'effet du TICP sur l'activation des MAPK ERK1/2 ne serait que l'effet d'une fraction des récepteurs couplés à ces protéines  $G\alpha_i$  spécifiques, les autres étant inactivés par l'action du ligand.

Sans pour autant exclure cette hypothèse, le 2<sup>e</sup> article propose une autre piste de réponse à cette question. Nous avons observé que l'inactivation de la protéine  $G\alpha_i$  par la PTX inhibe le changement de conformation du complexe DOR/protéine  $G\alpha_{i1}$  induit par la majorité des ligands (article 2; figure 4B). Ainsi, la ribosylation de la protéine  $G\alpha_{i1}$  par la PTX empêcherait le récepteur de changer sa conformation vers une active même si le ligand utilisé est incapable d'activer la sous-unité  $\alpha_{i1}$ . L'inactivation de la protéine  $G_i$  par la PTX semblerait figer le DOR sous une conformation inactive, l'empêchant ainsi d'activer d'autres cascades de signalisation que celle dépendante de l'activation de la sous-unité  $G\alpha_i$ . L'activité du TICP dans la voie des MAPK ERK1/2 dépendrait donc d'une sous-unité  $G\alpha_i$  fonctionnelle, mais pas de son activation. Il est possible que l'activité du TICP soit produite par les sous-unités  $G\beta\gamma$  et que la PTX empêche ce dimère de s'éloigner de la sous-unité  $G\alpha_i$ .

#### **4.1.3 Le TICP, contrairement au DPDPE, stabilise une conformation qui n'est pas désensibilisée**

Une des différences majeures entre la signalisation des MAPK ERK1/2 produite par le TICP de celle produite par les agonistes complets DPDPE et SNC-80 est sa durée (article 1; figure 2). L'activation du DOR par le TICP entraîne une forte activation de la voie des MAPK ERK1/2, presque comparable à son activation par le DPDPE et supérieure aux agonistes

partiels (morphine et TIPP) (article 1; figure 1B). Cependant, alors que l'activation de la cascade des MAPK ERK1/2 par le DPDPE diminue au niveau des agonistes partiels en 10 minutes pour disparaître complètement au bout de 30 minutes, son activation par le TICP se prolonge sans diminution pour au moins 2 heures (article 1; figure 2).

Le TICP stabiliserait donc une conformation active du DOR dans la voie des MAPK ERK1/2, dépendante des protéines G, et qui n'est pas soumise à une désensibilisation rapide. La désensibilisation des DOR étant causée par la phosphorylation du récepteur et son internalisation [479;491;492], nous avons donc tenté de prolonger l'activation des MAPK ERK1/2 en inhibant l'internalisation par un gradient osmotique de sucrose et utilisant un récepteur clivé de sa queue C-terminale, lieu de la majorité des sites de phosphorylations du DOR. L'activation de la voie de signalisation fût légèrement prolongée par le sucrose et par l'absence des sites de phosphorylation sérine/thréonine de la queue C-terminale. Leur effet semble d'ailleurs être additif. Toutefois, la voie de signalisation se désensibilise toujours au point de représenter moins de 20% de son activation maximale (article 1; figure 4).

Cette désensibilisation peut-elle s'expliquer par la présence d'autres sites de phosphorylation sur le récepteur? Plusieurs études ont démontré l'implication de la phosphorylation de tyrosine dans la désensibilisation de la signalisation des récepteurs opiacés [296;479;493;494]. Nous avons donc vérifié l'état d'activation des résidus tyrosine des DOR après une exposition de 30 minutes avec le DPDPE ou le TICP. Les résultats ont démontré que seule la conformation stabilisée par le DPDPE est phosphorylée au niveau de ses tyrosines (article 1; figure 5A). De plus, nous avons déterminé que cette phosphorylation est dépendante de l'activité de la tyrosine kinase Src (article 1; figure 5B) et que l'inhibition de cette phosphorylation par une faible concentration de PP2 (20  $\mu$ M), un inhibiteur de Src, permet une prolongation de la signalisation des MAPK ERK1/2 produite par DPDPE (article 1; figure 7C) tandis que la même concentration de PP2 en présence de TICP inhibe cette voie de signalisation (article 1; figure 7A).

#### **4.1.4 Le double rôle de Src dans l'activation et la désensibilisation de la voie des MAPK ERK1/2**

Le DPDPE, contrairement au TICP, stabiliserait donc une conformation du DOR qui serait désensibilisée par la kinase Src. Pourtant, les deux ligands produisent une activation semblable de cette tyrosine kinase (article 1; figure 5C). Il faut comprendre que la kinase Src est aussi impliquée dans beaucoup de mécanismes d'activation de la signalisation des MAPK ERK1/2. D'ailleurs, l'activité kinase de Src est essentielle pour l'activation des MAPK ERK1/2 par le TICP ; une inhibition de la kinase par 20  $\mu$ M de PP2 diminue du tiers la phosphorylation des MAPK (article 1; figure 6A). L'implication de Src dans l'activation de cette voie de signalisation semble toutefois plus complexe. Alors que l'inhibition de Src par 20  $\mu$ M ou 40  $\mu$ M de PP2 augmente l'activation des MAPK ERK1/2 causée par DPDPE, une inhibition de Src par 80  $\mu$ M de PP2 inhibe considérablement l'activation de cette voie par le DPDPE (article 1; figure 6B). Afin de confirmer que cette inhibition de la signalisation des MAPK ERK1/2 par le PP2 n'est pas causée par une inhibition non spécifique d'autres tyrosines kinases impliquées dans la cascade de signalisation, nous avons transfecté dans les cellules différentes quantité d'un double mutant négatif de Src (Src(K296R/Y528)). Ce mutant a la capacité de se lier sur les mêmes sites que la protéine endogène, mais son site catalytique est inactivé. Nous avons pu ainsi confirmer que l'inhibition partielle de Src augmente la durée et l'efficacité de la signalisation de la cascade des MAPK dépendante de DPDPE, mais qu'une forte inhibition de cette kinase empêche l'activation de la voie de signalisation (article 1; figure 6C).

Ainsi les conformations du DOR stabilisées par le TICP et le DPDPE activeraient la voie des MAPK ERK1/2 par l'intermédiaire de la tyrosine kinase Src. Toutefois, seule la conformation stabilisée par DPDPE est reconnue et désensibilisée par cette tyrosine kinase. La phosphorylation du DOR par Src semble plus sensible à l'inhibition de cette kinase que l'activation de la voie de signalisation des MAPK ERK1/2, produisant ainsi une courbe biphasique de cette voie de signalisation lors d'une inhibition croissante de la kinase. Il n'est pas impossible que le DPDPE produise l'activation des MAPK ERK1/2 selon différents mécanismes. L'agoniste isoproterenol du  $\beta_1$ AR active les MAPK ERK1/2 selon deux mécanismes, un dépendant et l'autre indépendant de la protéine G [369]. Toutefois,

ces deux mécanismes sont fortement dépendants de l'activité de la tyrosine Src pour le  $\beta_1$ AR, seulement 10  $\mu$ M de PP2 inhibe complètement l'activation des MAPK ERK1/2 [369]. De plus, l'activation des MAPK ERK1/2 par la liaison du DPDPE sur le DOR est complètement dépendante de l'activité de la protéine  $G\alpha_i$  (article 1; figure 1) contrairement au  $\beta_1$ AR, car l'inactivation de la protéine  $G_i$  par la PTX inhibe complètement l'augmentation de l'activité des MAPK ERK1/2.

Un groupe de chercheurs précédent avait montré l'implication de la phosphorylation d'une Tyr dans le domaine NPXXY à la jonction du 7<sup>e</sup> passage transmembranaire et de la queue C-terminale pour la désensibilisation du DOR. En inhibant la phosphorylation de cette dernière par mutagenèse ou par inhibition pharmacologique (50  $\mu$ M de PP1 durant 1 heure), ils avaient réussi à bloquer l'activation de la voie des MAPK ERK1/2 [495]. Il faut noter ici qu'ils ont utilisé une seule dose d'inhibiteur de Src, ils ont donc possiblement complètement inhibé la phosphorylation du récepteur, mais aussi l'activation de la voie des MAPK ERK1/2. Ils ont également démontré que la phosphorylation du récepteur traité avec l'agoniste DTLET produit une diminution de la liaison de surface du [3H]DSLET et ils en conclure que la phosphorylation Tyr est responsable de l'internalisation du récepteur. Cette méthode n'est pas la meilleure pour quantifier l'internalisation du récepteur, car l'incubation prolongée avec un ligand peut modifier la capacité d'un autre ligand à lier le récepteur [496]. Nous avons d'ailleurs par la suite démontré que le blocage de la phosphorylation des résidus Tyr du récepteur ne modifie pas l'internalisation de ce dernier, mais protège contre sa désensibilisation en augmentant le recyclage du DOR à la membrane plasmique [302].

Des études précédentes sur des DOR purifiés avaient permis de déterminer que les ligands stabilisaient des conformations distinctes dans leur interaction avec les différentes protéines  $G\alpha_i$  et dans leur capacité à les activer [487;488]. Toutefois, aucune démonstration n'avait encore été faite sur des systèmes cellulaires entiers et vivants. Cette étude a donc permis de confirmer le fait que le DOR peut être stabilisé sous différentes conformations actives dépendamment des ligands qui le lient et que ces différentes conformations possèdent des propriétés de signalisation et de régulation distincte. Nous avons pu identifier au moins deux conformations actives du DOR, celle

stabilisée par les agonistes comme le DPDPE et celle stabilisée par les ligands à double efficacité comme le TICP. L'application thérapeutique de ce type de molécule resterait toutefois à démontrer. L'inversion de l'ordre d'efficacité entre le TICP et la morphine, pour la voie des cyclases et la voie des MAPK ERK1/2, indique que ces ligands stabilisent des conformations différentes, mais la variabilité des essais de signalisation nous empêche d'observer différentes conformations entre les agonistes partiels et les agonistes complets. Afin de déterminer si le concept des conformations multiples peut être étendu aux agonistes partiels du DOR ou s'il demeure l'apanage des ligands à double efficacité, il nous fallait utiliser une méthode plus directe.

## **4.2 Les ligands du DOR stabilisent différentes conformations actives du complexe DOR/protéine G**

### **4.2.1 Le DOR forme un complexe préformé à la membrane avec les protéines G**

La théorie pharmacologique en vigueur à l'époque suggérait que les protéines G s'associaient au récepteur lors de l'activation de ce dernier pour ensuite se dissocier rapidement. Ce modèle de collision était toutefois contesté par plusieurs études au profit d'un modèle où la protéine G formerait un complexe stable de signalisation avec le récepteur [64;65;497-500]. L'idée de cette étude était d'étudier *in vivo* (à l'intérieur d'un modèle cellulaire) l'interaction entre le DOR et ses protéines G suite à l'activation du récepteur par différents ligands. Nous avons donc pris avantage de la technique BRET qui permet d'évaluer la distance entre deux protéines en interaction et nous l'avons appliqué pour évaluer l'effet des différents ligands du DOR sur son interaction avec la protéine  $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ . Cette technique avait déjà démontré son utilité pour évaluer les changements de conformation ligands dépendant du complexe  $\alpha_{2A}AR$ /protéine G [65]. Elle possède toutefois quelques inconvénients. Le premier inconvénient est la grosseur de la protéine GFP et de la l'enzyme luciférase. Le poids moléculaire de ces deux protéines est d'environ 35 kD, ce qui est légèrement inférieur au DOR (50-55 kD), semblable à la  $G\alpha_{i1}$  (environ 35



kD) et nettement supérieurs à la protéine G $\gamma$  (7 kD). Ces protéines occupent un espace important dans le cytoplasme et elles pourraient empêcher, par encombrement stérique, l'interaction entre les différents partenaires du complexe. Ce problème n'est toutefois pas très important, car le risque est d'obtenir des résultats faux négatifs. L'inconvénient majeur de cette technique est la surexpression des protéines d'intérêt. Étant donné que la technique nécessite la surexpression de protéine recombinante (protéine d'intérêt + GFP ou luciférase), il est possible que les interactions observées soient produites par collision aléatoire des protéines marquées. Une simple titration BRET, où l'expression de l'accepteur est augmentée graduellement et celle du donneur est maintenue stable, permet normalement de déterminer la spécificité de l'interaction. Dans le cas de complexe formé à partir de multiples protéines (plus que les deux protéines d'intérêt), la surexpression peut aussi entraîner des problèmes de stoechiométrie avec les partenaires du complexe. Il devient alors difficile de trouver les conditions idéales d'observation de l'interaction. Quoi qu'il en soit, cette technique reste la seule (avec les autres techniques de résonance par transfert énergétique (RET)) qui permet d'évaluer des interactions entre protéines à l'intérieur de cellules vivantes.

La première étape était d'évaluer si le récepteur forme un complexe stable avec les protéines G. Nous avons tout d'abord évalué l'interaction basale entre un DOR marqué par une GFP2 en C-terminale et différentes sous-unités G $\alpha_{i1}$  marquées avec une luciférase à différents endroits dans la protéine (entre l'acide aminé Gly60 et Tyr61 ou entre l'acide aminé Leu91 et Lys92 ou entre l'acide aminé Glu122 et Leu123). Nous avons aussi évalué l'interaction basale entre la sous-unité G $\gamma_2$  marquée en N-terminal avec une GFP10 et les différentes sous-unités G $\alpha_{i1}$ Luc ainsi qu'avec un DOR marqué en C-terminal avec une luciférase.

Les expériences de BRET ont démontré que le récepteur et ses protéines G forment un complexe sans l'ajout de ligand (article 2; figure 2). Afin de confirmer que cette interaction basale n'est pas un artefact produit par la surexpression des protéines G, nous avons effectué une coimmunopurification du DOR en présence ou en absence d'une surexpression de protéines G. Les résultats obtenus en coimmunopurification confirment l'interaction spontanée du DOR avec ses protéines G (article 2; figure 2A-C). De plus, cette

interaction ne peut être expliquée par une activation de base du DOR, car l'inactivation de la protéine  $G\alpha_i$  par la PTX n'entraîne pas de changement de la liaison basal du complexe (article 2; figure 4B encadrés). Il nous restait donc à évaluer les changements produits par les différents ligands à l'intérieur du complexe.

La présence des protéines GFP et RLuc sur chacun des partenaires BRET peut aussi produire des artefacts. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des expériences de titration BRET en remplaçant le DOR-GFP2 par le passage transmembranaire d'un récepteur CD8 couplé à une GFP2. Ces expériences consistent à augmenter graduellement l'expression de l'accepteur (protéine marquée avec la GFP) tout en gardant l'expression du donneur (protéine marquée avec une RLuc). Elles permettent de déterminer les conditions de transfection optimales pour l'interaction BRET et elles permettent d'évaluer la spécificité de l'interaction; une droite représente une interaction non spécifique alors qu'une courbe représente une interaction spécifique et saturable. Le faible ratio BRET et l'absence de courbe saturable entre les partenaires BRET CD8/ $G\alpha_i$  ou  $G\beta\gamma$ , comparativement aux partenaires BRET DOR/ $G\alpha_i$  ou  $G\beta\gamma$ , indiquent que ces protéines interagissent à des conditions basales à l'intérieur de la cellule (article 2; figure 2). Il faut noter ici que le ratio BRET ne permet pas de différencier les événements qui se produisent à la membrane de ceux qui se produisent à l'intérieur de la cellule. Ainsi, un ratio BRET de base n'indique pas si le récepteur est fonctionnel à la membrane. Une façon de le déterminer est d'observer les changements suite à l'activation du récepteur par un ligand. Nous avons donc stimulé le DOR avec un agoniste, le SNC-80, et observé une augmentation du ratio BRET indiquant que le récepteur est bien à la surface des cellules et fonctionnel. L'augmentation du ratio BRET peut-être interprétée de deux façons : soit une augmentation du nombre de complexes DOR/ $G\alpha\beta\gamma$  formés ou soit un changement de conformation de ce complexe.

#### **4.2.2 Les ligands modifient la conformation du complexe DOR/protéine G**

Dans le but d'évaluer si la liaison du ligand au récepteur produit une libération des protéines G ou plutôt une réorganisation du complexe, nous avons évalué les

changements ligands dépendant de l'interaction de trois sous-unités  $G\alpha_{i1}$ , distinctes dans le positionnement de la RLuc à l'intérieur de la protéine, avec leur partenaire BRET DOR-GFP2 ou  $G\gamma_2$ -GFP10. Les différents positionnements de la RLuc sur la protéine  $G\alpha_{i1}$  permettent d'avoir une vision 3D des changements de l'interaction entre les protéines d'intérêt. Le principe est le suivant : une diminution ou une augmentation du BRET pour les trois protéines  $G\alpha_{i1}$  favoriserait les théories de la dissociation ou du recrutement des protéines G suite à l'activation du récepteur tandis qu'une diminution du BRET pour certaines  $G\alpha_{i1}$  et une augmentation pour les autres favoriseraient une réorganisation spatiale du complexe [65].

Nous avons donc évalué les changements de BRET produit par le DPDPE et le TICP à l'intérieur du complexe DOR/protéines G. Les études fonctionnelles nous avaient permis de déterminer que ces deux ligands stabilisent des conformations actives différentes. Les résultats ont démontré que le DPDPE induit un éloignement de la position RLuc122 de la queue C-terminale du récepteur, mais un rapprochement de la position RLuc91. Aucun changement significatif ne fut observé pour la position RLuc 60 vis-à-vis le récepteur (article 2; figure 3A). Ces résultats entre la protéine  $G\alpha_{i1}$  et le DOR démontrent que le DPDPE produit un réarrangement du complexe plutôt qu'une dissociation. Les changements observés entre les sous-unités  $G\alpha_{i1}$  et  $G\gamma_2$  correspondent aussi à une réorganisation d'un complexe préformé, les positions RLuc122 et RLuc91 s'éloignent de la sous-unité  $G\gamma$  tandis que la position RLuc60 se rapproche (article 2; figure 3C).

Le TICP produit également des changements de conformation du complexe DOR/protéine G et ces changements diffèrent de ceux produits par le DPDPE. Alors que le DPDPE induit un rapprochement de la position RLuc91 vers le récepteur et un éloignement de la sous-unité  $G\gamma_2$ , le TICP ne produit aucun changement de cette position vers le récepteur et la rapproche de la sous-unité  $G\gamma_2$ . Bien que les deux ligands semblent avoir des effets opposés pour la majorité des interactions évaluées, ils produisent un changement semblable de la position RLuc122 de  $G\alpha_{i1}$  vers la queue C-terminale du récepteur (article 2; figure 3). Ces résultats confirment le fait établi dans l'article précédent, à savoir que le DPDPE stabilise une conformation du complexe DOR/protéine G différente du TICP. De plus, ils confirment que l'utilisation de la technique BRET et des différents

positionnements de la RLuc sur la protéine  $G\alpha_{i1}$  permettent d'évaluer ces conformations stabilisées par les ligands.

### 4.2.3 Les ligands du DOR stabilisent des conformations différentes

Dans le but de déterminer si les différentes conformations stabilisées par le DPDPE et le TICP sont une exception ou une règle applicable sur la majorité des ligands du DOR, nous avons étendu l'étude précédente à une plus grande quantité de ligands. Six ligands furent choisis (le SNC-80, le DPDPE, la morphine, le TICP, le TIPP et le naltrindole) et leur efficacité à modifier l'interaction du DOR avec les différentes  $G\alpha_{i1}$ -RLuc ou  $G\gamma_2$ , ou encore entre les sous-unités mêmes, fut évaluée. La stratégie employée pour déterminer la présence de différentes conformations actives des récepteurs consistait à trouver des inversions dans l'ordre d'efficacité des ligands à modifier les interactions BRET. Les premières interactions évaluées furent entre le récepteur et les protéines G. Malheureusement, aucune inversion significative de l'ordre d'efficacité des ligands (article 2; figure 5A-B) ne fut observée. Toutefois, il est important de noter que le TICP stabilise une conformation du complexe DOR/protéine G qui est différente des autres ligands. Une activation du récepteur par ce ligand produit un éloignement de  $G\alpha_{i1}$ -RLuc122 de la queue C-terminale du DOR qui est comparable au SNC-80, au DPDPE et à la morphine, mais le TICP est le seul qui produit un éloignement de  $G\alpha_{i1}$ -RLuc60.

Les secondes interactions évaluées furent celles entre les sous-unités de l'hétérotrimère  $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$  (article 2; figure 5C). Cette fois-ci nous observons quelques inversions de l'ordre d'efficacité des ligands. Entre autres le TIPP qui permute son ordre d'efficacité avec la morphine entre les interactions  $G\alpha_{i1}$ -RLuc91/ $G\gamma_2$ -GFP et  $G\alpha_{i1}$ -RLuc60/ $G\gamma_2$ -GFP ou avec le TICP entre les interactions  $G\alpha_{i1}$ -RLuc122/ $G\gamma_2$ -GFP et  $G\alpha_{i1}$ -RLuc60/ $G\gamma_2$ -GFP. Le naltrindole semble aussi stabiliser une conformation particulière de l'hétérotrimère. Il est celui qui produit le plus fort rapprochement de  $G\alpha_{i1}$ -RLuc122 vers  $G\gamma_2$ -GFP mais il arrive en 4<sup>e</sup> position (après le SNC-80, le DPDPE et la morphine) pour  $G\alpha_{i1}$ -RLuc60 vers  $G\gamma_2$ -GFP. Ces résultats démontrent que la morphine et le TIPP (agonistes partiels pour les voies AMPc et ERK1/2), le TICP (agoniste inverse dans la voie de l'AMPc et agoniste inverse dans la voie

ERK) et le naltrindole (antagoniste dans la voie ERK et agoniste partiel dans la voie AMPc, mais considéré comme antagoniste dans la littérature) stabilisent des conformations du complexe récepteur protéine G qui sont distinctes.

#### **4.2.4 Le mouvement entre les protéines G, élément prédictible de l'activation des voies de signalisation**

Maintenant que nous avons déterminé que les ligands du DOR stabilisent plusieurs conformations actives du récepteur avec une technique évaluant l'interaction entre les partenaires principaux de la signalisation du DOR, il était intéressant de vérifier si les changements produits par les ligands peuvent être prédictible de l'activation de ces voies de signalisation. Nous avons donc tenté de corréler les voies de signalisation de l'AMPc et des MAPK ERK1/2 activées par les différents ligands avec les changements conformationnels produits à l'intérieur de  $G\alpha\beta\gamma$  par ces mêmes ligands.

Pour la voie de l'AMPc, l'interaction entre la  $G\alpha_{i1}$ -RLuc60 et la  $G\gamma_2$ -GFP semble prédire avec précision son inhibition (article 2; tableau III et figure 6) avec un  $r^2$  significatif de 0,954. L'interaction entre la  $G\alpha_{i1}$ -RLuc91 semble aussi prédire l'activation de l'AMPc ( $r^2$  significatif de 0,798) mais cette prédiction fait défaut pour l'agoniste partiel TIPP qui produit un changement de conformation à l'opposé des autres agonistes partiels telle la morphine pour cette interaction. Cette différence du TIPP n'est pas observée pour l'interaction entre la  $G\alpha_{i1}$ -RLuc60 et la  $G\gamma_2$ -GFP. Cette dernière semble donc pouvoir prédire l'activation de la voie de l'AMPc et pourrait être utilisée comme biosenseur de l'activation de la voie  $G\alpha_i$  de l'AMPc.

Trouver une interaction prédictible de l'activation de la voie des MAPK ERK1/2 semble toutefois moins évident. Aucune position de la RLuc sur la  $G\alpha_i$  ne semble donner une bonne prédiction de l'activation de cette voie. Il faut toutefois considérer que, tel qu'expliqué dans l'introduction, la voie des MAPK ERK1/2 peut être activée selon une multitude de mécanismes dépendants et indépendants de la protéine G. Réussir à prédire l'activation des MAPK ERK1/2 avec une seule interaction était donc très peu probable.

## **4.3 Implication des différentes conformations dépendante du ligand dans la régulation de la signalisation du DOR**

### **4.3.1 Une stimulation prolongée avec les agonistes complets DPDPE et SNC-80 stabilise des conformations qui sont régulées différemment**

Dans la section précédente, nous avons étudié les changements de conformation du complexe DOR/G $\alpha\beta\gamma$  à la suite d'une exposition aiguë aux différents ligands. Cette stimulation aiguë n'est pas appropriée pour évaluer les mécanismes de régulation des RCPG. Pour étudier ces mécanismes, le récepteur a besoin d'une stimulation prolongée dans le temps afin de produire sa désensibilisation et son internalisation. Il était connu que les récepteurs qui favorisent la voie de dégradation après leur internalisation se désensibilisent plus que les récepteurs qui favorisent la voie du recyclage vers la membrane. Mais serait-il possible que ce soit le ligand qui dirige le récepteur vers l'une ou l'autre de ces voies de régulations? Un article important publié dans le journal *Science* évaluait le destin postendocytose du DOR après une stimulation avec le SNC-80. Les auteurs classaient ce dernier dans la classe B, c'est-à-dire les récepteurs qui favorisent la voie de la dégradation à cause de son interaction avec la protéine GASP [473]. Pourtant, d'autres études avaient démontré que le DOR, activé par d'autres ligands tel le DPDPE, pouvait revenir à la membrane et donc recycler [302;472;479;501]. De plus, une autre étude avait déterminé que le DOR n'était pas désensibilisé de la même façon lorsqu'il était stimulé par le DPDPE ou le SNC-80 [502]. La littérature suggérait donc que ces deux ligands produisent une régulation différentielle du DOR. Nous les avons ainsi retenus comme candidat possible à une sélectivité fonctionnelle au niveau de la régulation du récepteur.

En premier lieu, nous voulions évaluer la capacité des deux ligands à internaliser le DOR. En utilisant un récepteur marqué au bout de son N-terminal par un peptide FLAG et transfecté dans des cellules HEK293 ou dans des cultures primaires de neurones provenant du cortex d'un rat nouveau-né. Il faut noter que le DOR est exprimé

naturellement dans les cultures primaires de neurones (pas dans les cellules HEK293) et qu'il peut avoir une compétition entre le récepteur transfecté l'endogène pour les mécanismes de régulation. Toutefois, étant donné qu'il n'existe pas de bon anticorps reconnaissant le DOR, l'ajout d'un récepteur marqué par un peptide FLAG était nécessaire pour en voir l'internalisation. Nous avons donc déterminé que les deux ligands produisent une internalisation semblable du DOR (article 3; figure 1). Cette absence de différence fut observée dans deux contextes cellulaires et trois techniques différentes, confirmant ainsi que les deux ligands possèdent la même efficacité pour activer les voies d'internalisation du DOR.

En deuxième lieu, nous voulions évaluer la capacité des deux ligands à produire le recyclage du DOR après son internalisation. Nous avons donc traité de façon prolongée (de 30 minutes à 1 heure) les cellules HEK293 et les cultures primaires de neurones exprimant le Flag-DOR avec l'un ou l'autre des ligands. Par la suite nous avons retiré le ligand et laissé récupérer les cellules afin d'observer le retour des Flag-DOR à la membrane. Nous avons pu observer qu'un traitement avec le DPDPE permet le recyclage du récepteur alors qu'un traitement avec le SNC-80 maintient le DOR à l'intérieur de la cellule (article 3; figure 2 et 3A). Ces résultats, obtenus dans 2 contextes cellulaires différents, confirment la différence entre les deux ligands observée dans la littérature.

Afin de confirmer que ces résultats ne sont pas un artefact dû à un mauvais lavage du ligand SNC-80, nous avons effectué des expériences de déplacement et de liaison totale d'un ligand radiomarqué, le naltrindole[<sup>3</sup>H], après une stimulation d'une heure avec le DPDPE ou le SNC-80. Normalement, si le SNC-80 est encore présent sur le récepteur, nous devrions observer un changement dans le Kd (article 3; figure 3B) de la courbe de déplacement ou dans le Bmax (article 3; figure 6A) de la courbe de liaison total. Aucun changement ne fut observé, indiquant que le SNC-80 a bien été lavé du milieu.

Une internalisation plus faible du DOR par DPDPE aurait pu aussi expliquer les différences observées au niveau du recyclage du récepteur, c'est-à-dire qu'une activation plus faible de la voie de régulation du DOR par le DPDPE, comparativement au SNC-80, aurait pu expliquer pourquoi le DOR peut recycler avec un ligand, mais pas avec l'autre. Toutefois, cette hypothèse est à rejeter, car les deux ligands ont une efficacité semblable pour

internaliser le DOR. Comment alors réconcilier ces différences dans la capacité du DOR à recycler? Il a été démontré que la capacité de la protéine GASP à interagir avec différents RCPG est sensible au changement de conformation de leurs queues C-terminales [503]. Ces données suggèrent que les conformations du DOR stabilisées par le DPDPE ou le SNC-80 pourraient interagir différemment avec leurs protéines de régulation. Il devenait alors très intéressant d'explorer ces conformations distinctes d'un point de vue moléculaire.

#### **4.3.2 Les conformations stabilisées par DPDPE et SNC-80 diffèrent dans leur interaction avec les protéines G et la $\beta$ arr**

Si les différences dans le tri postendocytose du DOR, lorsque celui-ci est stimulé avec le DPDPE ou le SNC-80, ne semblaient pas causées par une différence dans l'efficacité de ces ligands à internaliser le récepteur (article 3; figure 1), ces ligands devraient donc stabiliser des conformations distinctes du récepteur. Nous avons donc utilisé la même approche que dans le 2<sup>e</sup> article pour déterminer les différents changements de conformation du DOR, c'est-à-dire l'interaction BRET entre les récepteurs et la protéine G, afin de comparer les conformations stabilisées par une stimulation prolongée (1h) par ses deux ligands. Alors que les deux ligands semblent éloigner de la même façon la protéine  $G\alpha_{i1}$ -Luc de la queue C-terminal du DOR (article 3; figure 5A), une différence importante fut observée pour l'interaction entre la  $G\gamma_2$ -GFP et le DOR. Alors qu'une incubation avec le DPDPE produit un éloignement de  $G\gamma_2$  de la queue C-terminale du récepteur, le SNC-80 produit un rapprochement (article 3; figure 5C). Ces résultats démontrent que les deux ligands stabilisent des conformations différentes du DOR. Ils suggèrent aussi que la conformation du récepteur stabilisée par une heure de traitement avec le SNC-80 reste en contact avec la  $G\gamma_2$  durant son internalisation et sa régulation. Cette observation est très intéressante, car elle entre en contradiction avec les théories suggérant que les protéines G se dissocient du récepteur lors de son activation et sa désensibilisation [63], du moins lorsque celui-ci est stimulé par le SNC-80. Il faut toutefois y mettre un bémol, car il est impossible de savoir si la  $G\gamma_2$  qui interagit avec le récepteur après 1h d'incubation avec le



SNC-80 est la même que celle qui interagissait avec le récepteur au moment de son activation.

La présence de conformations distinctes n'explique toutefois pas à elle seule le mécanisme responsable des différences observées lors des expériences de recyclage (article 1; figure 2 et 3B). Une des pistes possibles consistait à évaluer l'interaction de la  $\beta$ arr avec les conformations du DOR stabilisées par ces deux ligands. Il est connu que les récepteurs de classe A (qui recycle à la membrane) interagissent de façon transitoire avec la  $\beta$ arr tandis que les récepteurs de classe B (qui sont dirigé principalement vers les voies de dégradation) interagissent fortement avec la  $\beta$ arr [328-330]. Les principales raisons de la différence entre ses deux classes avaient été identifiées comme étant la phosphorylation des résidus Ser/Thr de la queue C-terminale [328-330]. Toutefois, ces expériences avaient été faites sur différent RCPG, et avec seulement un ligand par RCPG. Étant donné que le DOR peut-être stabilisé dans des conformations distinct dépendant du ligand, il était intéressant de vérifier si ces différentes conformations pouvaient être un déterminant de ces différentes classes; autrement dit si un même récepteur peut lier transitoirement ou fortement la  $\beta$ arr, dépendamment du ligand qui le lie.

Nous avons débuté par évaluer le recrutement de la  $\beta$ arr2 vers le DOR lors de sa stimulation par le DPDPE ou le SNC-80 (1  $\mu$ M) par la technique BRET en utilisant le DOR marqué en C-terminale par une YFP et la  $\beta$ arr2 marquée en N-terminale avec une luciférase. Les résultats démontrent que le SNC-80 produit une augmentation deux fois plus importante de l'interaction (augmentation du ratio BRET) entre le DOR et la  $\beta$ arr2 que le DPDPE (article 3; figure 7A et B). Ceci suggère soit que le SNC-80 est deux fois plus efficaces que le DPDPE pour recruter la  $\beta$ arr2 au DOR ou que le complexe  $\beta$ arr2/DOR formé après stimulation avec le SNC-80 est différent de celui formé après une stimulation avec le DPDPE. La  $\beta$ arr2 étant une molécule essentielle à l'internalisation du DOR, nous devrions nous attendre à ce que le SNC-80 internalise plus rapidement ou plus efficacement le DOR que le DPDPE. Pourtant, les deux ligands internalisent le DOR d'une façon semblable (article 3; figure1). Sans être une certitude, il est probable que la conformation stabilisée par le SNC-80 recrute la  $\beta$ arr2 plus près du bout de la queue C-terminale du DOR que le DPDPE.

Dans un même ordre d'idée et considérant qu'une stimulation à long terme (1h) du DOR par le SNC-80 produit un rapprochement de  $G\gamma_2$  vers la queue C-terminale du récepteur alors que le DPDPE produit un éloignement, nous avons vérifié si la  $\beta$ arr2-RLuc pouvait être recrutée à proximité de la  $G\gamma_2$ -YFP lors de la stimulation du DOR avec un ou l'autre de ces deux ligands. La technique BRET fut encore utilisée et nous avons pu observer que la conformation stabilisée par le SNC-80 recrute la  $\beta$ arr à proximité de  $G\gamma_2$ -YFP mais pas DPDPE, confirmant que les deux conformations recrutent différemment la  $\beta$ arr2.

Par la suite nous avons testé la stabilité de ces interactions BRET après avoir retiré le ligand du milieu avec 2 lavages consécutifs. Alors que le complexe DOR/ $\beta$ arr2/ $G\gamma_2$  stabilisé par le SNC-80 est maintenu pendant plus d'une heure après le retrait du ligand (article 3; figure 8B-D-F), le complexe DOR/ $\beta$ arr stabilisé par le DPDPE se dissocie en moins de 15 minutes (article 3; figure 8A-C). Ces résultats furent confirmés par la co-immunoprécipitation du DOR après stimulation d'une heure avec les l'un ou l'autre des deux ligands (article 3; figure 9). Les résultats suggèrent donc que le DOR est régulé comme un récepteur de classe B lorsqu'il est stabilisé par le SNC-80, et comme un récepteur de classe A lorsqu'il est stabilisé par le DPDPE.

Mais est-ce que ces différences sont contrôlées par la conformation du récepteur ou bien elles sont induites par un autre mécanisme suivant le changement de conformation, par exemple une différence dans la phosphorylation du récepteur? Pour le vérifier, nous avons donc émis l'hypothèse suivante : si la stabilité du complexe DOR/ $\beta$ arr/ $G\gamma_2$  produit par une stimulation par le SNC-80 dépendant uniquement de la conformation du récepteur, un changement forcé de cette conformation devrait interférer avec cette stabilité et permettre la dissociation du complexe. Pour la vérifier, nous avons premièrement déterminé si le naltrindole, un antagoniste du DOR, pouvait modifier la conformation stabilisée par les deux agonistes. Alors que le naltrindole (1  $\mu$ M; 2 min) ne produit aucun effet significatif sur la conformation stabilisée par 1h d'incubation avec le DPDPE, il produit un changement significatif dans la conformation stabilisée par le SNC-80 (article 3; figure 5B-D). Une diminution du ratio BRET produit par le naltrindole fut observée au niveau de l'interaction DOR/ $G\gamma_2$ . Cette diminution semble correspondre à l'inverse de l'augmentation observée lors d'une stimulation d'une heure avec le SNC-80,

comme si le complexe DOR/G $\gamma_2$  retournait à sa conformation de base après l'ajout de l'antagoniste. Il serait toutefois hasardeux d'affirmer que la conformation stabilisée par le naltrindole soit la conformation basale, car ce dernier a montré une petite activité au niveau de l'AMPc (article 2; figure 1A). Quoi qu'il en soit, le naltrindole reconnaît la conformation stabilisée par le SNC-80 et il la modifie.

Deuxièmement, nous avons ajouté l'antagoniste lors de la période de récupération en absence du SNC-80 ou du DPDPE afin de vérifier l'effet du changement de conformation sur la stabilité du complexe DOR/ $\beta$ arr2/G $\gamma_2$ . Alors que le naltrindole n'a aucun effet sur la stabilité de ce dernier après stimulation avec le DPDPE, il modifie considérablement la stabilité du complexe stabilisé par le SNC-80 à un point tel que les interactions DOR/ $\beta$ arr2, G $\gamma_2$ / $\beta$ arr2 et DOR/G $\gamma_2$  retournent à leur état initial (article 3 ; figure 8). Sans exclure une phosphorylation différentielle des conformations stabilisées par ces deux ligands, il est clair que la stabilité du complexe est hautement dépendante de la conformation du récepteur.

Finalement, étant donné que le retrait du DPDPE du milieu permet au DOR de revenir à la membrane plasmique, mais pas le retrait du SNC-80, nous avons voulu vérifier si cette différence dans le tri postendocytose est causée par la stabilité du complexe DOR/ $\beta$ arr/G $\gamma_2$ . Nous avons donc ajouté du naltrindole lors de la période de recyclage du récepteur dans le but de déstabiliser le complexe stabilisé par le SNC-80 et nous avons ainsi observé le recyclage du DOR (article 3 ; figure 10A). Ces résultats confirment que les différences dans le tri postendocytose du DOR observé après une stimulation prolongée avec les deux ligands sont une conséquence de la stabilisation de différents complexes par les ligands SNC-80 et DPDPE. Ils représentent un exemple de sélectivité fonctionnelle au niveau de la régulation d'un RCPG.

### **4.3.3 La conformation du DOR stabilisée par le SNC-80 produit une plus forte désensibilisation de la voie de l'AMPC et de la tolérance aiguë à l'analgésie que la conformation stabilisée par le DPDPE**

Des études précédentes avaient montré l'importance dans la capacité d'un ligand à produire l'internalisation du DOR dans la désensibilisation de ses voies de signalisation et dans le développement de la tolérance à l'analgésie [429;430]. Le ligand AR-M100390, qui ne produit pas l'internalisation et la désensibilisation du DOR, ne produisait aucune tolérance aiguë à l'analgésie alors que le SNC-80 perdait sa réponse à l'analgésie après une deuxième injection en moins de 12h. Les auteurs associèrent la perte de l'analgésie produite par le SNC-80 à la perte du récepteur à la surface, car la réponse de ce ligand fut restaurée après le retour du DOR à la surface, 24h plus tard. L'absence d'internalisation protégerait ainsi contre la tolérance aiguë à l'analgésie [429]. Toutefois, les souris développaient la tolérance à l'analgésie après des injections répétées de l'AR-M100390 sur 5 jours. La tolérance alors observée ne fut pas reliée à une désensibilisation du récepteur, mais plutôt à la désensibilisation de la voie des canaux calciques, responsable de l'analgésie [430]. Autrement dit, l'absence de désensibilisation d'un récepteur stimulé durant plusieurs jours mène à la désensibilisation de son effecteur. Mais qu'en est-il du DPDPE qui est capable d'internaliser le DOR avec la même efficacité que le SNC-80, mais qui permet au récepteur de retourner à la surface de la cellule en moins d'une heure? Produirait-il autant de désensibilisation et de tolérance?

Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord évalué la capacité de ces deux ligands à désensibiliser la voie de l'AMPC après une exposition d'une heure en présence et en absence d'un inhibiteur d'une voie de recyclage, la monensin. Cette dernière avait démontré sa capacité à inhiber 60 % du recyclage du DOR après son internalisation avec DPDPE [302]. De plus, il avait été démontré que la monensin augmentait la désensibilisation de la voie AMPC induite par un autre agoniste du DOR qui permet au récepteur de recycler, l'éthorphine [479]. Les résultats démontrent que la conformation qui ne recycle pas (stabilisé par le SNC-80) désensibilise plus fortement la voie de l'AMPC que la conformation qui recycle (stabilisé par le DPDPE) (article 3; figure 4A). Il est peu

probable que la différence observée dans la désensibilisation soit reliée à l'efficacité des deux ligands, car ils possèdent une efficacité semblable pour inhiber la production de l'AMPc par la forskolin (inhibition maximale ( $E_{max}$ ) SNC-80 :  $-70 \pm 2$  ; inhibition maximale ( $E_{max}$ ) DPDPE:  $-69 \pm 3$  ;  $EC_{50}$  SNC-80 :  $5 \pm 1$  nM ;  $EC_{50}$  DPDPE :  $8 \pm 1$  nM;  $p > 0.05$  ; two-way ANOVA;  $n=6$ ). De plus, seule la désensibilisation produite par le DPDPE est augmentée par la présence de l'inhibiteur du recyclage (article 3; figure 4A). Ainsi, le recyclage du récepteur contribuerait à diminuer la désensibilisation produite par le DPDPE.

Toutefois, lorsqu'on regarde la resensibilisation de la voie de signalisation après 30 minutes de retrait de l'agoniste, nous observons que le recyclage ne semble pas être impliqué dans la resensibilisation du DOR (article 3 ; figure 4B). Ces derniers résultats pourraient être interprétés par le fait que le DOR n'a pas besoin d'être recyclé pour être resensibilisé. Mais ils ne permettent pas d'exclure totalement le recyclage, car la monensin ne bloque pas totalement le recyclage du DOR [302]. Les récepteurs qui retournent à la membrane pourraient être assez nombreux pour produire la signalisation. De plus, un article récent a démontré que la resensibilisation du MOR peut s'effectuer à la membrane sans que l'internalisation du récepteur ne soit nécessaire [324]. Il est donc possible que les 40 à 60% de récepteurs qui restent à la surface soient resensibilisés selon un mécanisme semblable au MOR. Quoi qu'il en soit, le recyclage contribue à une diminution de la désensibilisation produite par le DPDPE contrairement à celle produite par le SNC-80.

Finalement, la dernière étape de cette thèse consistait à tester l'analgésie produite par ces deux ligands dans un modèle de douleur neuropathique chez la souris afin d'évaluer le développement de la tolérance produit par ces deux ligands. Le modèle de douleur neuropathique fut choisi, car plusieurs articles proposent que le DOR soit impliqué dans la modulation de ce type de douleur [504-507]. Nous avons donc vérifié si deux doses équianalgésiques (intrathécale) successives de DPDPE ou de SNC-80 (1h d'intervalle entre les doses) produisent une perte de leur efficacité à produire l'analgésie. Les résultats démontrent que les deux ligands produisent la même analgésie après la première injection, mais seulement le DPDPE maintient son effet analgésique après la deuxième injection. La conformation stabilisée par le SNC-80 produit donc une tolérance aiguë à

l'analgésie qui est corrélée avec une absence de recyclage à la membrane et une interaction stable avec la  $\beta$ arr2 et la  $G\gamma_2$  tandis que la conformation stabilisée par le DPDPE ne produit pas de tolérance aiguë à l'analgésie et n'interagit avec la  $\beta$ arr2 que de façon transitoire. Le fait que la conformation stabilisée par le SNC-80 interagit de façon stable avec la  $\beta$ arr2 et produit de la tolérance à l'analgésie concorde avec de nouvelles études très récentes sur le MOR. Ces études ont été réalisées sur des souris dont le gène de la  $\beta$ arr2 fut retiré et elles démontrent clairement que la  $\beta$ arr2 est impliquée dans le développement de la tolérance à l'analgésie des agonistes du MOR [508-510].

## 5. Conclusion

En conclusion, l'ère où la pharmacologie se basait sur le postulat que les RCPG existent sous seulement deux états, l'un actif et l'autre inactif est révolue. Les résultats rapportés dans cette thèse démontrent hors de tout doute que les ligands du DOR stabilisent des conformations actives distinctes. Ces conformations peuvent interagir avec différentes voies de signalisation et de régulation et peuvent mener à des comportements très différents. Les ligands DPDPE et SNC-80 en sont des exemples probants, alors que les deux ligands possèdent une efficacité semblable pour inhiber la production de l'AMPC, seulement le SNC-80 permet une interaction stable entre le DOR, la  $G\gamma_2$  et la  $\beta$ arr2 produisant la séquestration du récepteur à l'intérieur de la cellule et le développement de la tolérance aiguë à l'analgésie. Malheureusement, le DPDPE est un peptide qui ne traverse pas la barrière hématoencéphalique, il ne peut donc pas aller stimuler les DOR dans le système nerveux central. On peut toutefois supposer qu'un ligand qui stabilise une conformation qui internalise le récepteur, qui n'interagit que transitoirement avec la  $\beta$ arr2 et qui passe la barrière hématoencéphalique serait un excellent candidat dans le traitement des douleurs chroniques.

Le concept de sélectivité fonctionnelle n'est pas unique au DOR et il peut être utilisé pour plusieurs autres récepteurs [356]. Les conséquences du changement de perspective envers les différentes conformations des RCPG activés par leur ligand sont multiples. Il serait théoriquement possible de sélectionner les voies de signalisation et de régulation

produisant les effets thérapeutiques désirés tout en évitant les voies produisant les effets indésirables. Cependant, pour y arriver il faudra augmenter nos connaissances sur les voies responsables des effets thérapeutiques et des effets indésirables. Certains outils développés durant cette thèse pourront aider dans la recherche de ligands sélectifs pour les RCPG. L'utilisation des techniques BRET en est un bon exemple, car elle permet d'observer les interactions entre les RCPG et les protéines de signalisation ou de régulations à l'intérieur de cellules vivantes, contexte très différent des techniques *in vivo* [511]. L'application du concept de sélectivité fonctionnelle des ligands des RCPG dans la recherche de nouveaux médicaments ne fait que commencer et plusieurs étapes restent à franchir pour en arriver à la commercialisation de nouveaux ligands, mais il est maintenant clair que nous devons en tenir compte dans leur développement.

## 6. Liste de référence

1. MC Lagerstrom and HB Schioth (2008): Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat.Rev.Drug Discov.* 7:339.
2. HB Schioth and R Fredriksson (2005): The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen.Comp Endocrinol.* 142:94.
3. K Palczewski, T Kumasaka, T Hori, CA Behnke, H Motoshima, BA Fox, T Le, I, DC Teller, T Okada, RE Stenkamp, M Yamamoto, and M Miyano (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739.
4. T Okada, M Sugihara, AN Bondar, M Elstner, P Entel, and V Buss (2004): The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J.Mol.Biol.* 342:571.
5. SG Rasmussen, HJ Choi, DM Rosenbaum, TS Kobilka, FS Thian, PC Edwards, M Burghammer, VR Ratnala, R Sanishvili, RF Fischetti, GF Schertler, WI Weis, and BK Kobilka (2007): Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450:383.
6. V Cherezov, DM Rosenbaum, MA Hanson, SG Rasmussen, FS Thian, TS Kobilka, HJ Choi, P Kuhn, WI Weis, BK Kobilka, and RC Stevens (2007): High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318:1258.
7. MA Hanson, V Cherezov, MT Griffith, CB Roth, VP Jaakola, EY Chien, J Velasquez, P Kuhn, and RC Stevens (2008): A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure.* 16:897.
8. T Warne, MJ Serrano-Vega, JG Baker, R Moukhametzianov, PC Edwards, R Henderson, AG Leslie, CG Tate, and GF Schertler (2008): Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454:486.
9. VP Jaakola, MT Griffith, MA Hanson, V Cherezov, EY Chien, JR Lane, AP Ijzerman, and RC Stevens (2008): The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322:1211.
10. B Wu, EY Chien, CD Mol, G Fenalti, W Liu, V Katritch, R Abagyan, A Brooun, P Wells, FC Bi, DJ Hamel, P Kuhn, TM Handel, V Cherezov, and RC Stevens (2010): Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330:1066.
11. EY Chien, W Liu, Q Zhao, V Katritch, GW Han, MA Hanson, L Shi, AH Newman, JA Javitch, V Cherezov, and RC Stevens (2010): Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* 330:1091.



12. H Wu, D Wacker, M Mileni, V Katritch, GW Han, E Vardy, W Liu, AA Thompson, XP Huang, FI Carroll, SW Mascarella, RB Westkaemper, PD Mosier, BL Roth, V Cherezov, and RC Stevens (2012): Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*
13. A Manglik, AC Kruse, TS Kobilka, FS Thian, JM Mathiesen, RK Sunahara, L Pardo, WI Weis, BK Kobilka, and S Granier (2012): Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*
14. SG Rasmussen, HJ Choi, JJ Fung, E Pardon, P Casarosa, PS Chae, BT DeVree, DM Rosenbaum, FS Thian, TS Kobilka, A Schnapp, I Konetzki, RK Sunahara, SH Gellman, A Pautsch, J Steyaert, WI Weis, and BK Kobilka (2011): Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469:175.
15. DM Rosenbaum, C Zhang, JA Lyons, R Holl, D Aragao, DH Arlow, SG Rasmussen, HJ Choi, BT DeVree, RK Sunahara, PS Chae, SH Gellman, RO Dror, DE Shaw, WI Weis, M Caffrey, P Gmeiner, and BK Kobilka (2011): Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* 469:236.
16. T Warne, R Moukhametzianov, JG Baker, R Nehme, PC Edwards, AG Leslie, GF Schertler, and CG Tate (2011): The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor. *Nature* 469:241.
17. F Xu, H Wu, V Katritch, GW Han, KA Jacobson, ZG Gao, V Cherezov, and RC Stevens (2011): Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science* 332:322.
18. JH Park, P Scheerer, KP Hofmann, HW Choe, and OP Ernst (2008): Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454:183.
19. P Scheerer, JH Park, PW Hildebrand, YJ Kim, N Krauss, HW Choe, KP Hofmann, and OP Ernst (2008): Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455:497.
20. KL Pierce, RT Premont, and RJ Lefkowitz (2002): Seven-transmembrane receptors. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3:639.
21. J Bockaert, L Fagni, A Dumuis, and P Marin (2004): GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol.Ther.* 103:203.
22. J Wess (1997): G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 11:346.
23. T Schoneberg, G Schultz, and T Gudermann (1999): Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol.Cell Endocrinol.* 151:181.
24. PG Strange (1999): G-protein coupled receptors: conformations and states. *Biochem.Pharmacol.* 58:1081.

25. F Huttenrauch, A Nitzki, FT Lin, S Honing, and M Oppermann (2002): Beta-arrestin binding to CC chemokine receptor 5 requires multiple C-terminal receptor phosphorylation sites and involves a conserved Asp-Arg-Tyr sequence motif. *J.Biol.Chem.* 277:30769.
26. TA Bennett, DC Maestas, and ER Prossnitz (2000): Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence. *J.Biol.Chem.* 275:24590.
27. S Mhaouty-Kodja, LS Barak, A Scheer, L Abuin, D Diviani, MG Caron, and S Cotecchia (1999): Constitutively active alpha-1b adrenergic receptor mutants display different phosphorylation and internalization features. *Mol.Pharmacol.* 55:339.
28. J Bockaert and JP Pin (1999): Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18:1723.
29. TK Attwood and JB Findlay (1994): Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 7:195.
30. LF Kolakowski, Jr. (1994): GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors.Channels* 2:1.
31. R Fredriksson, MC Lagerstrom, LG Lundin, and HB Schioth (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol.Pharmacol.* 63:1256.
32. AJ Harmar (2001): Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* 2:REVIEWS3013.
33. SM Foord, S Jupe, and J Holbrook (2002): Bioinformatics and type II G-protein-coupled receptors. *Biochem.Soc.Trans.* 30:473.
34. JX Gray, M Haino, MJ Roth, JE Maguire, PN Jensen, A Yarme, MA Stetler-Stevenson, U Siebenlist, and K Kelly (1996): CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J.Immunol.* 157:5438.
35. JC Leemans, AA te Velde, S Florquin, RJ Bennink, BK de, RA van Lier, T van der Poll, and J Hamann (2004): The epidermal growth factor-seven transmembrane (EGF-TM7) receptor CD97 is required for neutrophil migration and host defense. *J.Immunol.* 172:1125.
36. TK Bjarnadottir, R Fredriksson, and HB Schioth (2007): The adhesion GPCRs: a unique family of G protein-coupled receptors with important roles in both central and peripheral tissues. *Cell Mol.Life Sci.* 64:2104.
37. X Kang, X Xiao, M Harata, Y Bai, Y Nakazaki, Y Soda, R Kurita, T Tanaka, F Komine, K Izawa, R Kunisaki, M Setoyama, H Nishimori, A Natsume, M Sunamura, L Lozonshi, I

- Saitoh, T Tokino, S Asano, Y Nakamura, and K Tani (2006): Antiangiogenic activity of BAI1 in vivo: implications for gene therapy of human glioblastomas. *Cancer Gene Ther.* 13:385.
38. HJ Kee, KY Ahn, KC Choi, SJ Won, T Heo, S Jung, JK Kim, CS Bae, and KK Kim (2004): Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3) in normal brain and implications for BAI3 in ischemia-induced brain angiogenesis and malignant glioma. *FEBS Lett.* 569:307.
  39. CJ Formstone and PF Little (2001): The flamingo-related mouse Celsr family (Celsr1-3) genes exhibit distinct patterns of expression during embryonic development. *Mech.Dev.* 109:91.
  40. S Sugita, K Ichtchenko, M Khvotchev, and TC Sudhof (1998): alpha-Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. G-protein coupling not required for triggering exocytosis. *J.Biol.Chem.* 273:32715.
  41. H Matsushita, VG Lelianova, and YA Ushkaryov (1999): The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS Lett.* 443:348.
  42. TC Sudhof (2001): alpha-Latrotoxin and its receptors: neurexins and CIRL/latrophilins. *Annu.Rev.Neurosci.* 24:933.
  43. TK Bjarnadottir, K Geirardsdottir, M Ingemansson, MA Mirza, R Fredriksson, and HB Schioth (2007): Identification of novel splice variants of Adhesion G protein-coupled receptors. *Gene* 387:38.
  44. Y Wang, JP Macke, BS Abella, K Andreasson, P Worley, DJ Gilbert, NG Copeland, NA Jenkins, and J Nathans (1996): A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. *J.Biol.Chem.* 271:4468.
  45. M Murone, A Rosenthal, and FJ de Sauvage (1999): Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Curr.Biol.* 9:76.
  46. CM Chen, W Strapps, A Tomlinson, and G Struhl (2004): Evidence that the cysteine-rich domain of Drosophila Frizzled family receptors is dispensable for transducing Wingless. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:15961.
  47. Y Nakano, S Nystedt, AA Shivdasani, H Strutt, C Thomas, and PW Ingham (2004): Functional domains and sub-cellular distribution of the Hedgehog transducing protein Smoothened in Drosophila. *Mech.Dev.* 121:507.

48. Y Chen and G Struhl (1998): In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development* 125:4943.
49. E Adler, MA Hoon, KL Mueller, J Chandrashekar, NJ Ryba, and CS Zuker (2000): A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693.
50. H Matsunami, JP Montmayeur, and LB Buck (2000): A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404:601.
51. AN Pronin, H Tang, J Connor, and W Keung (2004): Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem.Senses* 29:583.
52. T Ishihara, S Nakamura, Y Kaziro, T Takahashi, K Takahashi, and S Nagata (1991): Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *EMBO J.* 10:1635.
53. M Rodbell, HM Krans, SL Pohl, and L Birnbaumer (1971): The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125I-glucagon. *J.Biol.Chem.* 246:1872.
54. M Rodbell, L Birnbaumer, SL Pohl, and HM Krans (1971): The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J.Biol.Chem.* 246:1877.
55. EM Ross and AG Gilman (1977): Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity. *J.Biol.Chem.* 252:6966.
56. EM Ross and AG Gilman (1977): Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylyl cyclase activity: interactions of solubilized components with receptor-replete membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74:3715.
57. EM Ross, AC Howlett, KM Ferguson, and AG Gilman (1978): Reconstitution of hormone-sensitive adenylyl cyclase activity with resolved components of the enzyme. *J.Biol.Chem.* 253:6401.
58. JK Northup, PC Sternweis, MD Smigel, LS Schleifer, EM Ross, and AG Gilman (1980): Purification of the regulatory component of adenylyl cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77:6516.
59. Y Sun, D McGarrigle, and XY Huang (2007): When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol.Biosyst.* 3:849.
60. X Deupi and B Kobilka (2007): Activation of G protein-coupled receptors. *Adv.Protein Chem.* 74:137.
61. JM Janz and DL Farrens (2004): Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. *J.Biol.Chem.* 279:29767.

62. WM Oldham and HE Hamm (2008): Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9:60.
63. A Musnier, B Blanchot, E Reiter, and P Crepieux (2010): GPCR signalling to the translation machinery. *Cell Signal.* 22:707.
64. M Bunemann, M Frank, and MJ Lohse (2003): Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:16077.
65. C Gales, JJ Van Durm, S Schaak, S Pontier, Y Percherancier, M Audet, H Paris, and M Bouvier (2006): Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 13:778.
66. N Audet, C Gales, E rcher-Lahlou, M Vallieres, PW Schiller, M Bouvier, and G Pineyro (2008): 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.* 283:15078.
67. DJ Dupre, M Robitaille, RV Rebois, and TE Hebert (2009): The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 49:31.
68. GB Downes and N Gautam (1999): The G protein subunit gene families. *Genomics* 62:544.
69. AV Smrcka (2008): G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol.Life Sci.* 65:2191.
70. TM Cabrera-Vera, J Vanhauwe, TO Thomas, M Medkova, A Preininger, MR Mazzoni, and HE Hamm (2003): Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr.Rev.* 24:765.
71. DG Lambright, J Sondek, A Bohm, NP Skiba, HE Hamm, and PB Sigler (1996): The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379:311.
72. DG Lambright, JP Noel, HE Hamm, and PB Sigler (1994): Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 369:621.
73. EJ Neer (1995): Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249.
74. E Reuveny, PA Slesinger, J Inglese, JM Morales, JA Iniguez-Lluhi, RJ Lefkowitz, HR Bourne, YN Jan, and LY Jan (1994): Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* 370:143.
75. S Herlitze, DE Garcia, K Mackie, B Hille, T Scheuer, and WA Catterall (1996): Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258.

76. WJ Tang and AG Gilman (1991): Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 254:1500.
77. PC Sternweis (1994): The active role of beta gamma in signal transduction. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6:198.
78. L Stephens, A Smrcka, FT Cooke, TR Jackson, PC Sternweis, and PT Hawkins (1994): A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* 77:83.
79. J Inglese, WJ Koch, K Touhara, and RJ Lefkowitz (1995): G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem.Sci.* 20:151.
80. CJ Schmidt, TC Thomas, MA Levine, and EJ Neer (1992): Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J.Biol.Chem.* 267:13807.
81. A Garritsen and WF Simonds (1994): Multiple domains of G protein beta confer subunit specificity in beta gamma interaction. *J.Biol.Chem.* 269:24418.
82. CR McCudden, MD Hains, RJ Kimple, DP Siderovski, and FS Willard (2005): G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol.Life Sci.* 62:551.
83. Y Daaka, LM Luttrell, and RJ Lefkowitz (1997): Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390:88.
84. C Vasquez and DL Lewis (2003): The beta2-adrenergic receptor specifically sequesters Gs but signals through both Gs and Gi/o in rat sympathetic neurons. *Neuroscience* 118:603.
85. P Schnabel, R Schreck, DL Schiller, M Camps, and P Gierschik (1992): Stimulation of phospholipase C by a mutationally activated G protein alpha 16 subunit. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 188:1018.
86. DE Logothetis, Y Kurachi, J Galper, EJ Neer, and DE Clapham (1987): The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325:321.
87. JL Boyer, GL Waldo, and TK Harden (1992): Beta gamma-subunit activation of G-protein-regulated phospholipase C. *J.Biol.Chem.* 267:25451.
88. M Camps, A Carozzi, P Schnabel, A Scheer, PJ Parker, and P Gierschik (1992): Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* 360:684.
89. J BERTHET, TW RALL, and EW SUTHERLAND (1957): The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J.Biol.Chem.* 224:463.

90. EW SUTHERLAND and TW RALL (1958): Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J.Biol.Chem.* 232:1077.
91. R Kopperud, C Krakstad, F Selheim, and SO Doskeland (2003): cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett.* 546:121.
92. J Buck, ML Sinclair, L Schapal, MJ Cann, and LR Levin (1999): Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:79.
93. M Kamenetsky, S Middelhaufe, EM Bank, LR Levin, J Buck, and C Steegborn (2006): Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J.Mol.Biol.* 362:623.
94. WJ Tang and JH Hurley (1998): Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol.Pharmacol.* 54:231.
95. JJ Tesmer, RK Sunahara, AG Gilman, and SR Sprang (1997): Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G $\alpha$ .GTP $\gamma$ S. *Science* 278:1907.
96. BM Hacker, JE Tomlinson, GA Wayman, R Sultana, G Chan, E Villacres, C Disteche, and DR Storm (1998): Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics* 50:97.
97. LR Forte, DB Bylund, and WL Zahler (1983): Forskolin does not activate sperm adenylate cyclase. *Mol.Pharmacol.* 24:42.
98. WF Simonds (1999): G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol.Sci.* 20:66.
99. S Salim, S Sinnarajah, JH Kehrl, and CW Dessauer (2003): Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J.Biol.Chem.* 278:15842.
100. K Tasken and EM Aandahl (2004): Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 84:137.
101. FD Smith, LK Langeberg, and JD Scott (2006): The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem.Sci.* 31:316.
102. GS Baillie and MD Houslay (2005): Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17:129.
103. R Kopperud, AE Christensen, E Kjarland, K Viste, H Kleivdal, and SO Doskeland (2002): Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. *J.Biol.Chem.* 277:13443.

104. RJ de, FJ Zwartkruis, MH Verheijen, RH Cool, SM Nijman, A Wittinghofer, and JL Bos (1998): Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396:474.
105. M Gloerich and JL Bos (2010): Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 50:355.
106. B Ponsioen, M Gloerich, L Ritsma, H Rehmann, JL Bos, and K Jalink (2009): Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Mol.Cell Biol.* 29:2521.
107. Y Li, S Asuri, JF Rebhun, AF Castro, NC Parnavitana, and LA Quilliam (2006): The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* 281:2506.
108. C Liu, M Takahashi, Y Li, S Song, TJ Dillon, U Shinde, and PJ Stork (2008): Ras is required for the cyclic AMP-dependent activation of Rap1 via Epac2. *Mol.Cell Biol.* 28:7109.
109. T Nakamura and GH Gold (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325:442.
110. TA Quill, D Ren, DE Clapham, and DL Garbers (2001): A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:12527.
111. WN Zagotta and SA Siegelbaum (1996): Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu.Rev.Neurosci.* 19:235.
112. ML Ruiz and JW Karpen (1997): Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states. *Nature* 389:389.
113. DM Wheeler, A Katz, RT Rice, and RG Hansford (1994): Volatile anesthetic effects on sarcoplasmic reticulum Ca content and sarcolemmal Ca flux in isolated rat cardiac cell suspensions. *Anesthesiology* 80:372.
114. K Dunlap, JI Luebke, and TJ Turner (1995): Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 18:89.
115. RB Sutton, JA Ernst, and AT Brunger (1999): Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. *J.Cell Biol.* 147:589.
116. RE Dolmetsch, U Pajvani, K Fife, JM Spotts, and ME Greenberg (2001): Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294:333.
117. H Khosravani and GW Zamponi (2006): Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev.* 86:941.



118. ME Mangoni, A Traboulsie, AL Leoni, B Couette, L Marger, QK Le, E Kupfer, A Cohen-Solal, J Vilar, HS Shin, D Escande, F Charpentier, J Nargeot, and P Lory (2006): Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ.Res.* 98:1422.
119. RA Ophoff, GM Terwindt, MN Vergouwe, ER van, PJ Oefner, SM Hoffman, JE Lamerdin, HW Mohrenweiser, DE Bulman, M Ferrari, J Haan, D Lindhout, GJ van Ommen, MH Hofker, MD Ferrari, and RR Frants (1996): Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543.
120. RA Ophoff, GM Terwindt, RR Frants, and MD Ferrari (1998): P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel defects in migraine, ataxia and epilepsy. *Trends Pharmacol.Sci.* 19:121.
121. I Splawski, KW Timothy, LM Sharpe, N Decher, P Kumar, R Bloise, C Napolitano, PJ Schwartz, RM Joseph, K Condouris, H Tager-Flusberg, SG Priori, MC Sanguinetti, and MT Keating (2004): Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119:19.
122. C Altier and GW Zamponi (2008): Signaling complexes of voltage-gated calcium channels and G protein-coupled receptors. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* 28:71.
123. CJ Doering and GW Zamponi (2005): Molecular pharmacology of non-L-type calcium channels. *Curr.Pharm.Des* 11:1887.
124. WA Catterall (2000): Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 16:521.
125. ML Schiff, DP Siderovski, JD Jordan, G Brothers, B Snow, VL De, DF Ortiz, and M Diverse-Pierluissi (2000): Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. *Nature* 408:723.
126. MA Davare, V Avdonin, DD Hall, EM Peden, A Burette, RJ Weinberg, MC Horne, T Hoshi, and JW Hell (2001): A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.2. *Science* 293:98.
127. HW Tedford and GW Zamponi (2006): Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol.Rev.* 58:837.
128. MT Smith, PJ Cabot, FB Ross, AD Robertson, and RJ Lewis (2002): The novel N-type calcium channel blocker, AM336, produces potent dose-dependent antinociception after intrathecal dosing in rats and inhibits substance P release in rat spinal cord slices. *Pain* 96:119.
129. C Krarup (2003): An update on electrophysiological studies in neuropathy. *Curr.Opin.Neurol.* 16:603.

130. SR Ikeda (1996): Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255.
131. DE Garcia, B Li, RE Garcia-Ferreiro, EO Hernandez-Ochoa, K Yan, N Gautam, WA Catterall, K Mackie, and B Hille (1998): G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels. *J.Neurosci.* 18:9163.
132. T Blackmer, EC Larsen, C Bartleson, JA Kowalchyk, EJ Yoon, AM Preininger, S Alford, HE Hamm, and TF Martin (2005): G protein betagamma directly regulates SNARE protein fusion machinery for secretory granule exocytosis. *Nat.Neurosci.* 8:421.
133. D Bichet, V Cornet, S Geib, E Carlier, S Volsen, T Hoshi, Y Mori, and WM De (2000): The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25:177.
134. WM De, H Liu, D Walker, VE Scott, CA Gurnett, and KP Campbell (1997): Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385:446.
135. S Herlitze, GH Hockerman, T Scheuer, and WA Catterall (1997): Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:1512.
136. GW Zamponi, E Bourinet, D Nelson, J Nargeot, and TP Snutch (1997): Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 385:442.
137. Z Chen, HS Nield, H Sun, A Barbier, and TB Patel (1995): Expression of type V adenylyl cyclase is required for epidermal growth factor-mediated stimulation of cAMP accumulation. *J.Biol.Chem.* 270:27525.
138. T Blackmer, EC Larsen, M Takahashi, TF Martin, S Alford, and HE Hamm (2001): G protein betagamma subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytotic fusion downstream of Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 292:293.
139. AC Dolphin (2003): G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol.Rev.* 55:607.
140. SE Jarvis and GW Zamponi (2001): Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels. *J.Neurosci.* 21:2939.
141. JD Spafford and GW Zamponi (2003): Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Curr.Opin.Neurobiol.* 13:308.

142. EM Silinsky (2004): Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J.Physiol* 558:389.
143. E Tomblor, NJ Cabanilla, P Carman, N Permaul, JJ Hall, RW Richman, J Lee, J Rodriguez, DP Felsenfeld, RF Hennigan, and MA Diverse-Pierluissi (2006): G protein-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *J.Biol.Chem.* 281:1827.
144. AM Beedle, JE McRory, O Poirot, CJ Doering, C Altier, C Barrere, J Hamid, J Nargeot, E Bourinet, and GW Zamponi (2004): Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nat.Neurosci.* 7:118.
145. C Altier, H Khosravani, RM Evans, S Hameed, JB Peloquin, BA Vartian, L Chen, AM Beedle, SS Ferguson, A Mezghrani, SJ Dubel, E Bourinet, JE McRory, and GW Zamponi (2006): ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nat.Neurosci.* 9:31.
146. JE Schroeder and EW McCleskey (1993): Inhibition of Ca<sup>2+</sup> currents by a mu-opioid in a defined subset of rat sensory neurons. *J.Neurosci.* 13:867.
147. A Taddese, SY Nah, and EW McCleskey (1995): Selective opioid inhibition of small nociceptive neurons. *Science* 270:1366.
148. K Wickman, C Karschin, A Karschin, MR Picciotto, and DE Clapham (2000): Brain localization and behavioral impact of the G-protein-gated K<sup>+</sup> channel subunit GIRK4. *J.Neurosci.* 20:5608.
149. F Lesage, E Guillemare, M Fink, F Duprat, C Heurteaux, M Fosset, G Romey, J Barhanin, and M Lazdunski (1995): Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *J.Biol.Chem.* 270:28660.
150. S Isomoto, C Kondo, N Takahashi, S Matsumoto, M Yamada, T Takumi, Y Horio, and Y Kurachi (1996): A novel ubiquitously distributed isoform of GIRK2 (GIRK2B) enhances GIRK1 expression of the G-protein-gated K<sup>+</sup> current in *Xenopus* oocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 218:286.
151. A Inanobe, Y Yoshimoto, Y Horio, KI Morishige, H Hibino, S Matsumoto, Y Tokunaga, T Maeda, Y Hata, Y Takai, and Y Kurachi (1999): Characterization of G-protein-gated K<sup>+</sup> channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J.Neurosci.* 19:1006.
152. F Lesage, F Duprat, M Fink, E Guillemare, T Coppola, M Lazdunski, and JP Hugnot (1994): Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K<sup>+</sup> channels in the brain. *FEBS Lett.* 353:37.
153. CS Nelson, JL Marino, and CN Allen (1997): Cloning and characterization of Kir3.1 (GIRK1) C-terminal alternative splice variants. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 46:185.

154. C Luscher and PA Slesinger (2010): Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat.Rev.Neurosci.* 11:301.
155. M Yamada, A Inanobe, and Y Kurachi (1998): G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol.Rev.* 50:723.
156. YJ Liao, YN Jan, and LY Jan (1996): Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J.Neurosci.* 16:7137.
157. TM Jelacic, ME Kennedy, K Wickman, and DE Clapham (2000): Functional and biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J.Biol.Chem.* 275:36211.
158. SJ Tucker, M Pessia, and JP Adelman (1996): Muscarine-gated K<sup>+</sup> channel: subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am.J.Physiol* 271:H379.
159. PA Slesinger, N Patil, YJ Liao, YN Jan, LY Jan, and DR Cox (1996): Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 16:321.
160. P Kofuji, N Davidson, and HA Lester (1995): Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:6542.
161. G Krapivinsky, EA Gordon, K Wickman, B Velimirovic, L Krapivinsky, and DE Clapham (1995): The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K<sup>(+)</sup>-channel proteins. *Nature* 374:135.
162. TM Jelacic, SM Sims, and DE Clapham (1999): Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels containing GIRK3. *J.Membr.Biol.* 169:123.
163. G Labouebe, M Lomazzi, HG Cruz, C Creton, R Lujan, M Li, Y Yanagawa, K Obata, M Watanabe, K Wickman, SB Boyer, PA Slesinger, and C Luscher (2007): RGS2 modulates coupling between GABAB receptors and GIRK channels in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Nat.Neurosci.* 10:1559.
164. C Luscher, LY Jan, M Stoffel, RC Malenka, and RA Nicoll (1997): G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19:687.
165. L Koyrakh, R Lujan, J Colon, C Karschin, Y Kurachi, A Karschin, and K Wickman (2005): Molecular and cellular diversity of neuronal G-protein-gated potassium channels. *J.Neurosci.* 25:11468.

166. M Torrecilla, CL Marker, SC Cintora, M Stoffel, JT Williams, and K Wickman (2002): G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons. *J.Neurosci.* 22:4328.
167. HG Cruz, F Berton, M Sollini, C Blanchet, M Pravetoni, K Wickman, and C Luscher (2008): Absence and rescue of morphine withdrawal in GIRK/Kir3 knock-out mice. *J.Neurosci.* 28:4069.
168. CL Marker, R Lujan, J Colon, and K Wickman (2006): Distinct populations of spinal cord lamina II interneurons expressing G-protein-gated potassium channels. *J.Neurosci.* 26:12251.
169. PA Slesinger, M Stoffel, YN Jan, and LY Jan (1997): Defective gamma-aminobutyric acid type B receptor-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in cerebellar granule cells isolated from weaver and Girk2 null mutant mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:12210.
170. M Pravetoni and K Wickman (2008): Behavioral characterization of mice lacking GIRK/Kir3 channel subunits. *Genes Brain Behav.* 7:523.
171. AD Morgan, ME Carroll, AK Loth, M Stoffel, and K Wickman (2003): Decreased cocaine self-administration in Kir3 potassium channel subunit knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 28:932.
172. LB Kozell, NA Walter, LC Milner, K Wickman, and KJ Buck (2009): Mapping a barbiturate withdrawal locus to a 0.44 Mb interval and analysis of a novel null mutant identify a role for Kcnj9 (GIRK3) in withdrawal from pentobarbital, zolpidem, and ethanol. *J.Neurosci.* 29:11662.
173. D Ma, N Zerangue, K Raab-Graham, SR Fried, YN Jan, and LY Jan (2002): Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* 33:715.
174. ML Lunn, R Nassirpour, C Arrabit, J Tan, I McLeod, CM Arias, PE Sawchenko, JR Yates, III, and PA Slesinger (2007): A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. *Nat.Neurosci.* 10:1249.
175. RB Nehring, E Wischmeyer, F Doring, RW Veh, M Sheng, and A Karschin (2000): Neuronal inwardly rectifying K(+) channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family. *J.Neurosci.* 20:156.
176. M Nishida and R MacKinnon (2002): Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 111:957.

177. S Pegan, C Arrabit, W Zhou, W Kwiatkowski, A Collins, PA Slesinger, and S Choe (2005): Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat.Neurosci.* 8:279.
178. A Inanobe, T Matsuura, A Nakagawa, and Y Kurachi (2007): Structural diversity in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Channels (Austin.)* 1:39.
179. HK Chang, LJ Marton, KK Liang, and RC Shieh (2009): K<sup>+</sup> binding in the G-loop and water cavity facilitates Ba<sup>2+</sup> movement in the Kir2.1 channel. *Biochim.Biophys.Acta* 1788:500.
180. D Ma, XD Tang, TB Rogers, and PA Welling (2007): An andersen-Tawil syndrome mutation in Kir2.1 (V302M) alters the G-loop cytoplasmic K<sup>+</sup> conduction pathway. *J.Biol.Chem.* 282:5781.
181. X Tao, JL Avalos, J Chen, and R MacKinnon (2009): Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 326:1668.
182. Y Xu, HG Shin, S Szep, and Z Lu (2009): Physical determinants of strong voltage sensitivity of K<sup>(+)</sup> channel block. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 16:1252.
183. S Pegan, C Arrabit, PA Slesinger, and S Choe (2006): Andersen's syndrome mutation effects on the structure and assembly of the cytoplasmic domains of Kir2.1. *Biochemistry* 45:8599.
184. M Nishida, M Cadene, BT Chait, and R MacKinnon (2007): Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J.* 26:4005.
185. N Lavine, N Ethier, JN Oak, L Pei, F Liu, P Trieu, RV Rebois, M Bouvier, TE Hebert, and HH Van Tol (2002): G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J.Biol.Chem.* 277:46010.
186. A Kuo, JM Gulbis, JF Antcliff, T Rahman, ED Lowe, J Zimmer, J Cuthbertson, FM Ashcroft, T Ezaki, and DA Doyle (2003): Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300:1922.
187. A Inanobe, KI Morishige, N Takahashi, H Ito, M Yamada, T Takumi, H Nishina, K Takahashi, Y Kanaho, T Katada, and . (1995): G beta gamma directly binds to the carboxyl terminus of the G protein-gated muscarinic K<sup>+</sup> channel, GIRK1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 212:1022.
188. CL Huang, PA Slesinger, PJ Casey, YN Jan, and LY Jan (1995): Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation. *Neuron* 15:1133.

189. PA Slesinger, E Reuveny, YN Jan, and LY Jan (1995): Identification of structural elements involved in G protein gating of the GIRK1 potassium channel. *Neuron* 15:1145.
190. MT Kunkel and EG Peralta (1995): Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell* 83:443.
191. CL Huang, YN Jan, and LY Jan (1997): Binding of the G protein betagamma subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett.* 405:291.
192. C He, H Zhang, T Mirshahi, and DE Logothetis (1999): Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *J.Biol.Chem.* 274:12517.
193. T Ivanina, I Rishal, D Varon, C Mullner, B Frohnwieser-Steinecke, W Schreibmayer, CW Dessauer, and N Dascal (2003): Mapping the Gbetagamma-binding sites in GIRK1 and GIRK2 subunits of the G protein-activated K<sup>+</sup> channel. *J.Biol.Chem.* 278:29174.
194. M Finley, C Arrabit, C Fowler, KF Suen, and PA Slesinger (2004): betaL-betaM loop in the C-terminal domain of G protein-activated inwardly rectifying K(+) channels is important for G(betagamma) subunit activation. *J.Physiol* 555:643.
195. M Rubinstein, S Peleg, S Berlin, D Brass, T Keren-Raifman, CW Dessauer, T Ivanina, and N Dascal (2009): Divergent regulation of GIRK1 and GIRK2 subunits of the neuronal G protein gated K<sup>+</sup> channel by GalphaiGDP and Gbetagamma. *J.Physiol* 587:3473.
196. T Kawano, P Zhao, CV Floreani, Y Nakajima, T Kozasa, and S Nakajima (2007): Interaction of Galphaq and Kir3, G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels. *Mol.Pharmacol.* 71:1179.
197. SM Clancy, CE Fowler, M Finley, KF Suen, C Arrabit, F Berton, T Kosaza, PJ Casey, and PA Slesinger (2005): Pertussis-toxin-sensitive Galpha subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol.Cell Neurosci.* 28:375.
198. S Peleg, D Varon, T Ivanina, CW Dessauer, and N Dascal (2002): G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron* 33:87.
199. W Schreibmayer, CW Dessauer, D Vorobiov, AG Gilman, HA Lester, N Davidson, and N Dascal (1996): Inhibition of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel by G-protein alpha-subunits. *Nature* 380:624.

200. T Ivanina, D Varon, S Peleg, I Rishal, Y Porozov, CW Dessauer, T Keren-Raifman, and N Dascal (2004): Galphai1 and Galphai3 differentially interact with, and regulate, the G protein-activated K<sup>+</sup> channel. *J.Biol.Chem.* 279:17260.
201. A Bacci, JR Huguenard, and DA Prince (2004): Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature* 431:312.
202. MG Lacey, NB Mercuri, and RA North (1987): Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J.Physiol* 392:397.
203. NR Newberry and RA Nicoll (1985): Comparison of the action of baclofen with gamma-aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J.Physiol* 360:161.
204. MJ Beckstead and JT Williams (2007): Long-term depression of a dopamine IPSC. *J.Neurosci.* 27:2074.
205. P Dutar, HM Vu, and DJ Perkel (1999): Pharmacological characterization of an unusual mGluR-evoked neuronal hyperpolarization mediated by activation of GIRK channels. *Neuropharmacology* 38:467.
206. QQ Sun, JR Huguenard, and DA Prince (2002): Somatostatin inhibits thalamic network oscillations in vitro: actions on the GABAergic neurons of the reticular nucleus. *J.Neurosci.* 22:5374.
207. H Kuhn (1978): Light-regulated binding of rhodopsin kinase and other proteins to cattle photoreceptor membranes. *Biochemistry* 17:4389.
208. E Reiter and RJ Lefkowitz (2006): GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol.Metab* 17:159.
209. RJ Lefkowitz and EJ Whalen (2004): beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 16:162.
210. RJ Lefkowitz and SK Shenoy (2005): Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512.
211. K Xiao, DB McClatchy, AK Shukla, Y Zhao, M Chen, SK Shenoy, JR Yates, III, and RJ Lefkowitz (2007): Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104:12011.
212. L Ma and G Pei (2007): Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J.Cell Sci.* 120:213.
213. EJ Weinman, RA Hall, PA Friedman, LY Liu-Chen, and S Shenolikar (2006): The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annu.Rev.Physiol* 68:491.



214. RA Hall, RT Premont, CW Chow, JT Blitzer, JA Pitcher, A Claing, RH Stoffel, LS Barak, S Shenolikar, EJ Weinman, S Grinstein, and RJ Lefkowitz (1998): The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature* 392:626.
215. RA Hall, LS Ostedgaard, RT Premont, JT Blitzer, N Rahman, MJ Welsh, and RJ Lefkowitz (1998): A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:8496.
216. P Huang, D Steplock, EJ Weinman, RA Hall, Z Ding, J Li, Y Wang, and LY Liu-Chen (2004): kappa Opioid receptor interacts with Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup>-exchanger regulatory factor-1/Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) to stimulate Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange independent of G(i)/G(o) proteins. *J.Biol.Chem.* 279:25002.
217. W Cao, LM Luttrell, AV Medvedev, KL Pierce, KW Daniel, TM Dixon, RJ Lefkowitz, and S Collins (2000): Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J.Biol.Chem.* 275:38131.
218. J Liu, Z Liao, J Camden, KD Griffin, RC Garrad, LI Santiago-Perez, FA Gonzalez, CI Seye, GA Weisman, and L Erb (2004): Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J.Biol.Chem.* 279:8212.
219. TS Lewis, PS Shapiro, and NG Ahn (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv.Cancer Res.* 74:49.
220. Z Chen, TB Gibson, F Robinson, L Silvestro, G Pearson, B Xu, A Wright, C Vanderbilt, and MH Cobb (2001): MAP kinases. *Chem.Rev.* 101:2449.
221. GL Johnson and R Lapadat (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911.
222. S Yoon and R Seger (2006): The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21.
223. ZG Goldsmith and DN Dhanasekaran (2007): G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26:3122.
224. J Lyons, CA Landis, G Harsh, L Vallar, K Grunewald, H Feichtinger, QY Duh, OH Clark, E Kawasaki, HR Bourne, and . (1990): Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science* 249:655.

225. G L'Allemain, J Pouyssegur, and MJ Weber (1991): p42/mitogen-activated protein kinase as a converging target for different growth factor signaling pathways: use of pertussis toxin as a discrimination factor. *Cell Regul.* 2:675.
226. J Pouyssegur and K Seuwen (1992): Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. *Annu.Rev.Physiol* 54:195.
227. GL Johnson and N Dhanasekaran (1989): The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocr.Rev.* 10:317.
228. WJ Tang and AG Gilman (1992): Adenylyl cyclases. *Cell* 70:869.
229. V Radhika and N Dhanasekaran (2001): Transforming G proteins. *Oncogene* 20:1607.
230. AM Pace, M Faure, and HR Bourne (1995): Gi2-mediated activation of the MAP kinase cascade. *Mol.Biol.Cell* 6:1685.
231. N Mochizuki, Y Ohba, E Kiyokawa, T Kurata, T Murakami, T Ozaki, A Kitabatake, K Nagashima, and M Matsuda (1999): Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature* 400:891.
232. V Pizon, P Chardin, I Lerosey, B Olofsson, and A Tavitian (1988): Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene* 3:201.
233. H Kitayama, Y Sugimoto, T Matsuzaki, Y Ikawa, and M Noda (1989): A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77.
234. SJ Cook, B Rubinfeld, I Albert, and F McCormick (1993): RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *EMBO J.* 12:3475.
235. JL Bos (1998): All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.* 17:6776.
236. JM Schmitt and PJ Stork (2001): Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Mol.Cell Biol.* 21:3671.
237. P Crespo, N Xu, WF Simonds, and JS Gutkind (1994): Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369:418.
238. WJ Koch, BE Hawes, J Inglese, LM Luttrell, and RJ Lefkowitz (1994): Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J.Biol.Chem.* 269:6193.

239. M Faure, TA Voyno-Yasenetskaya, and HR Bourne (1994): cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J.Biol.Chem.* 269:7851.
240. A Katz, D Wu, and MI Simon (1992): Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360:686.
241. PA Thomason, SR James, PJ Casey, and CP Downes (1994): A G-protein beta gamma-subunit-responsive phosphoinositide 3-kinase activity in human platelet cytosol. *J.Biol.Chem.* 269:16525.
242. S Lev, H Moreno, R Martinez, P Canoll, E Peles, JM Musacchio, GD Plowman, B Rudy, and J Schlessinger (1995): Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376:737.
243. I Dikic, G Tokiwa, S Lev, SA Courtneidge, and J Schlessinger (1996): A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383:547.
244. LM Luttrell, BE Hawes, BT van, DK Luttrell, TJ Lansing, and RJ Lefkowitz (1996): Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* 271:19443.
245. GJ Della Rocca, BT van, Y Daaka, DK Luttrell, LM Luttrell, and RJ Lefkowitz (1997): Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J.Biol.Chem.* 272:19125.
246. O Kranenburg, I Verlaan, PL Hordijk, and WH Moolenaar (1997): Gi-mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway involves a 100 kDa tyrosine-phosphorylated Grb2 SH3 binding protein, but not Src nor Shc. *EMBO J.* 16:3097.
247. O Kranenburg, I Verlaan, and WH Moolenaar (1999): Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J.Biol.Chem.* 274:35301.
248. O Kranenburg, I Verlaan, and WH Moolenaar (1999): Gi-mediated tyrosine phosphorylation of Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2)-bound dynamin-II by lysophosphatidic acid. *Biochem.J.* 339 ( Pt 1):11.
249. L Wunderlich, A Farago, and L Buday (1999): Characterization of interactions of Nck with Sos and dynamin. *Cell Signal.* 11:25.
250. JE Hinshaw and SL Schmid (1995): Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374:190.
251. GJ Praefcke and HT McMahon (2004): The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5:133.

252. S Roy, B Wyse, and JF Hancock (2002): H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis. *Mol.Cell Biol.* 22:5128.
253. H Daub, FU Weiss, C Wallasch, and A Ullrich (1996): Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379:557.
254. H Daub, C Wallasch, A Lankenau, A Herrlich, and A Ullrich (1997): Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 16:7032.
255. E Zwick, H Daub, N Aoki, Y Yamaguchi-Aoki, I Tinhofer, K Maly, and A Ullrich (1997): Critical role of calcium- dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J.Biol.Chem.* 272:24767.
256. S Eguchi, K Numaguchi, H Iwasaki, T Matsumoto, T Yamakawa, H Utsunomiya, ED Motley, H Kawakatsu, KM Owada, Y Hirata, F Marumo, and T Inagami (1998): Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 273:8890.
257. S Murasawa, Y Mori, Y Nozawa, N Gotoh, M Shibuya, H Masaki, K Maruyama, Y Tsutsumi, Y Moriguchi, Y Shibazaki, Y Tanaka, T Iwasaka, M Inada, and H Matsubara (1998): Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *Circ.Res.* 82:1338.
258. SP Soltoff (1998): Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y<sub>2</sub> receptor. Phorbol ester or [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation can substitute for receptor activation. *J.Biol.Chem.* 273:23110.
259. H Iwasaki, S Eguchi, H Ueno, F Marumo, and Y Hirata (1999): Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 140:4659.
260. A Gschwind, E Zwick, N Prenzel, M Leserer, and A Ullrich (2001): Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 20:1594.
261. S Higashiyama and D Nanba (2005): ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim.Biophys.Acta* 1751:110.
262. H Ohtsu, PJ Dempsey, and S Eguchi (2006): ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 291:C1.

263. B Schafer, B Marg, A Gschwind, and A Ullrich (2004): Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J.Biol.Chem.* 279:47929.
264. CM Waters, MC Connell, S Pyne, and NJ Pyne (2005): c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell Signal.* 17:263.
265. JS Biscardi, MC Maa, DA Tice, ME Cox, TH Leu, and SJ Parsons (1999): c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J.Biol.Chem.* 274:8335.
266. S Maudsley, KL Pierce, AM Zamah, WE Miller, S Ahn, Y Daaka, RJ Lefkowitz, and LM Luttrell (2000): The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J.Biol.Chem.* 275:9572.
267. KL Pierce, S Maudsley, Y Daaka, LM Luttrell, and RJ Lefkowitz (2000): Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:1489.
268. D Gesty-Palmer, M Chen, E Reiter, S Ahn, CD Nelson, S Wang, AE Eckhardt, CL Cowan, RF Spurney, LM Luttrell, and RJ Lefkowitz (2006): Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J.Biol.Chem.* 281:10856.
269. S Ahn, SK Shenoy, H Wei, and RJ Lefkowitz (2004): Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J.Biol.Chem.* 279:35518.
270. XR Ren, E Reiter, S Ahn, J Kim, W Chen, and RJ Lefkowitz (2005): Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:1448.
271. SK Shenoy, MT Drake, CD Nelson, DA Houtz, K Xiao, S Madabushi, E Reiter, RT Premont, O Lichtarge, and RJ Lefkowitz (2006): beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* 281:1261.
272. SK Milano, YM Kim, FP Stefano, JL Benovic, and C Brenner (2006): Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J.Biol.Chem.* 281:9812.

273. CH Chen, MM Paing, and J Trejo (2004): Termination of protease-activated receptor-1 signaling by beta-arrestins is independent of receptor phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 279:10020.
274. LM Luttrell, SS Ferguson, Y Daaka, WE Miller, S Maudsley, GJ Della Rocca, F Lin, H Kawakatsu, K Owada, DK Luttrell, MG Caron, and RJ Lefkowitz (1999): Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283:655.
275. LM Luttrell, FL Roudabush, EW Choy, WE Miller, ME Field, KL Pierce, and RJ Lefkowitz (2001): Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:2449.
276. KA DeFea, J Zalevsky, MS Thoma, O Dery, RD Mullins, and NW Bunnnett (2000): beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J.Cell Biol.* 148:1267.
277. A Tohgo, KL Pierce, EW Choy, RJ Lefkowitz, and LM Luttrell (2002): beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J.Biol.Chem.* 277:9429.
278. AG Gilman (1987): G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu.Rev.Biochem.* 56:615.
279. HR Bourne (1989): G-protein subunits. Who carries what message? *Nature* 337:504.
280. DL Sodickson and BP Bean (1996): GABAB receptor-activated inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons. *J.Neurosci.* 16:6374.
281. A Benians, JL Leaney, and A Tinker (2003): Agonist unbinding from receptor dictates the nature of deactivation kinetics of G protein-gated K<sup>+</sup> channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6239.
282. RV Rebois and TE Hebert (2003): Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors.Channels* 9:169.
283. M Lachance, N Ethier, G Wolbring, PP Schnetkamp, and TE Hebert (1999): Stable association of G proteins with beta 2AR is independent of the state of receptor activation. *Cell Signal.* 11:523.
284. M Nobles, A Benians, and A Tinker (2005): Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:18706.

285. RV Rebois, M Robitaille, C Gales, DJ Dupre, A Baragli, P Trieu, N Ethier, M Bouvier, and TE Hebert (2006): Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J.Cell Sci.* 119:2807.
286. DJ Dupre, M Robitaille, N Ethier, LR Villeneuve, AM Mamarbachi, and TE Hebert (2006): Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J.Biol.Chem.* 281:34561.
287. M Robitaille, N Ramakrishnan, A Baragli, and TE Hebert (2009): Intracellular trafficking and assembly of specific Kir3 channel/G protein complexes. *Cell Signal.* 21:488.
288. EA Johnson, S Oldfield, E Braksator, A Gonzalez-Cuello, D Couch, KJ Hall, SJ Mundell, CP Bailey, E Kelly, and G Henderson (2006): Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells. *Mol.Pharmacol.* 70:676.
289. OA Lawler, SM Miggin, and BT Kinsella (2001): Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J.Biol.Chem.* 276:33596.
290. AM Zamah, M Delahunty, LM Luttrell, and RJ Lefkowitz (2002): Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J.Biol.Chem.* 277:31249.
291. J Kim, S Ahn, XR Ren, EJ Whalen, E Reiter, H Wei, and RJ Lefkowitz (2005): Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:1442.
292. SS Ferguson (2007): Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol.Sci.* 28:173.
293. F Dicker, U Quitterer, R Winstel, K Honold, and MJ Lohse (1999): Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:5476.
294. J Perroy, L Adam, R Qanbar, S Chenier, and M Bouvier (2003): Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J.* 22:3816.
295. SM Appleyard, JP McLaughlin, and C Chavkin (2000): Tyrosine phosphorylation of the kappa -opioid receptor regulates agonist efficacy. *J.Biol.Chem.* 275:38281.
296. JP McLaughlin and C Chavkin (2001): Tyrosine phosphorylation of the mu-opioid receptor regulates agonist intrinsic efficacy. *Mol.Pharmacol.* 59:1360.

297. CC Clayton, MR Bruchas, ML Lee, and C Chavkin (2010): Phosphorylation of the mu-opioid receptor at tyrosine 166 (Tyr3.51) in the DRY motif reduces agonist efficacy. *Mol.Pharmacol.* 77:339.
298. L Zhang, H Zhao, Y Qiu, HH Loh, and PY Law (2009): Src phosphorylation of micro-receptor is responsible for the receptor switching from an inhibitory to a stimulatory signal. *J.Biol.Chem.* 284:1990.
299. G Pineyro and E Archer-Lahlou (2007): Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cell Signal.* 19:8.
300. Y Pak, BF O'Dowd, JB Wang, and SR George (1999): Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.* 274:27610.
301. HK Kramer, ML Andria, DH Esposito, and EJ Simon (2000): Tyrosine phosphorylation of the delta-opioid receptor. Evidence for its role in mitogen-activated protein kinase activation and receptor internalization\*. *Biochem.Pharmacol.* 60:781.
302. E Archer-Lahlou, N Audet, MG Amraei, K Huard, M Paquin-Gobeil, and G Pineyro (2008): Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *J.Cell Mol.Med.*
303. H Kuhn, SW Hall, and U Wilden (1984): Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* 176:473.
304. C Pfister, M Chabre, J Plouet, VV Tuyen, KY De, JP Faure, and H Kuhn (1985): Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science* 228:891.
305. HG Dohlman, M Bouvier, JL Benovic, MG Caron, and RJ Lefkowitz (1987): The multiple membrane spanning topography of the beta 2-adrenergic receptor. Localization of the sites of binding, glycosylation, and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. *J.Biol.Chem.* 262:14282.
306. VV Gurevich and EV Gurevich (2006): The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol.Ther.* 110:465.
307. VV Gurevich and JL Benovic (1993): Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J.Biol.Chem.* 268:11628.
308. VV Gurevich, SB Dion, JJ Onorato, J Ptasienski, CM Kim, R Sterne-Marr, MM Hosey, and JL Benovic (1995): Arrestin interactions with G protein-coupled receptors.



- Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. *J.Biol.Chem.* 270:720.
309. A Mendez, ME Burns, A Roca, J Lem, LW Wu, MI Simon, DA Baylor, and J Chen (2000): Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites. *Neuron* 28:153.
310. SA Vishnivetskiy, CL Paz, C Schubert, JA Hirsch, PB Sigler, and VV Gurevich (1999): How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J.Biol.Chem.* 274:11451.
311. CV Carman and JL Benovic (1998): G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr.Opin.Neurobiol.* 8:335.
312. Y Namkung and DR Sibley (2004): Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J.Biol.Chem.* 279:49533.
313. AC Hanyaloglu, M Vrecl, KM Kroeger, LE Miles, H Qian, WG Thomas, and KA Eidne (2001): Casein kinase II sites in the intracellular C-terminal domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor and chimeric gonadotropin-releasing hormone receptors contribute to beta-arrestin-dependent internalization. *J.Biol.Chem.* 276:18066.
314. AJ Butcher, R Prihandoko, KC Kong, P McWilliams, JM Edwards, A Bottrill, S Mistry, and AB Tobin (2011): Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *J.Biol.Chem.* 286:11506.
315. SB Liggett (2011): Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. *Sci.Signal.* 4:e36.
316. KN Nobles, K Xiao, S Ahn, AK Shukla, CM Lam, S Rajagopal, RT Strachan, TY Huang, EA Bressler, MR Hara, SK Shenoy, SP Gygi, and RJ Lefkowitz (2011): Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci.Signal.* 4:ra51.
317. A Sitaramayya and PA Liebman (1983): Phosphorylation of rhodopsin and quenching of cyclic GMP phosphodiesterase activation by ATP at weak bleaches. *J.Biol.Chem.* 258:12106.
318. M Bouvier, WP Hausdorff, BA De, BF O'Dowd, BK Kobilka, MG Caron, and RJ Lefkowitz (1988): Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370.
319. H Kishi, H Krishnamurthy, C Galet, RS Bhaskaran, and M Ascoli (2002): Identification of a short linear sequence present in the C-terminal tail of the rat

- follicotropin receptor that modulates arrestin-3 binding in a phosphorylation-independent fashion. *J.Biol.Chem.* 277:21939.
320. OJ Kim, BR Gardner, DB Williams, PS Marinec, DM Cabrera, JD Peters, CC Mak, KM Kim, and DR Sibley (2004): The role of phosphorylation in D1 dopamine receptor desensitization: evidence for a novel mechanism of arrestin association. *J.Biol.Chem.* 279:7999.
321. WL Hubbell, C Altenbach, CM Hubbell, and HG Khorana (2003): Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv.Protein Chem.* 63:243.
322. JG Krupnick, VV Gurevich, and JL Benovic (1997): Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J.Biol.Chem.* 272:18125.
323. SS Ferguson (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol.Rev.* 53:1.
324. VC Dang, B Chieng, Y Azriel, and MJ Christie (2011): Cellular morphine tolerance produced by betaarrestin-2-dependent impairment of mu-opioid receptor resensitization. *J.Neurosci.* 31:7122.
325. OB Goodman, Jr., JG Krupnick, F Santini, VV Gurevich, RB Penn, AW Gagnon, JH Keen, and JL Benovic (1996): Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383:447.
326. SA Laporte, RH Oakley, J Zhang, JA Holt, SS Ferguson, MG Caron, and LS Barak (1999): The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:3712.
327. I Gaidarov, JG Krupnick, JR Falck, JL Benovic, and JH Keen (1999): Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* 18:871.
328. RH Oakley, SA Laporte, JA Holt, MG Caron, and LS Barak (2000): Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J.Biol.Chem.* 275:17201.
329. J Zhang, SS Ferguson, PY Law, LS Barak, and MG Caron (1999): Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* 19:301.
330. RH Moore, EE Millman, V Godines, NA Hanania, TM Tran, H Peng, BF Dickey, BJ Knoll, and RB Clark (2007): Salmeterol stimulation dissociates beta2-adrenergic receptor phosphorylation and internalization. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 36:254.

331. RH Oakley, SA Laporte, JA Holt, LS Barak, and MG Caron (2001): Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J.Biol.Chem.* 276:19452.
332. TT Cao, HW Deacon, D Reczek, A Bretscher, and ZM von (1999): A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401:286.
333. AC Hanyaloglu and ZM von (2008): Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 48:537.
334. AH Maehle, CR Prull, and RF Halliwell (2002): The emergence of the drug receptor theory. *Nat.Rev.Drug Discov.* 1:637.
335. JN Langley (1905): On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J.Physiol* 33:374.
336. T Kenakin (2004): Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol.Sci.* 25:186.
337. AJ Clark (1926): The antagonism of acetyl choline by atropine. *J.Physiol* 61:547.
338. AJ Clark (1926): The reaction between acetyl choline and muscle cells. *J.Physiol* 61:530.
339. JH Gaddum (1926): The action of adrenalin and ergotamine on the uterus of the rabbit. *J.Physiol* 61:141.
340. HP Rang (2006): The receptor concept: pharmacology's big idea. *Br.J.Pharmacol.* 147 Suppl 1:S9.
341. EJ ARIENS (1954): Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. I. Problems and theory. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 99:32.
342. RP STEPHENSON (1956): A modification of receptor theory. *Br.J.Pharmacol.Chemother.* 11:379.
343. CJ DEL and B KATZ (1957): Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 146:369.
344. P Leff (1995): The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol.Sci.* 16:89.
345. T Costa and A Herz (1989): Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7321.

346. P Samama, S Cotecchia, T Costa, and RJ Lefkowitz (1993): A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J.Biol.Chem.* 268:4625.
347. A DeLean and RJ Lefkowitz (1980): Dihydroergocryptine binding and alpha-adrenoreceptors in smooth muscle. *Nature* 283:109.
348. LE Limbird and RJ Lefkowitz (1978): Agonist-induced increase in apparent beta-adrenergic receptor size. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75:228.
349. EM Ross, ME Maguire, TW Sturgill, RL Biltonen, and AG Gilman (1977): Relationship between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase. *J.Biol.Chem.* 252:5761.
350. GP Brown and GW Pasternak (1998): 3H-naloxone benzoylhydrazone binding in MOR-1-transfected Chinese hamster ovary cells: evidence for G-protein-dependent antagonist binding. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 286:376.
351. F Monczor, N Fernandez, BL Legnazzi, ME Riveiro, A Baldi, C Shayo, and C Davio (2003): Tiotidine, a histamine H2 receptor inverse agonist that binds with high affinity to an inactive G-protein-coupled form of the receptor. Experimental support for the cubic ternary complex model. *Mol.Pharmacol.* 64:512.
352. CJ Stefan, MC Overton, and KJ Blumer (1998): Mechanisms governing the activation and trafficking of yeast G protein-coupled receptors. *Mol.Biol.Cell* 9:885.
353. C Vasquez and DL Lewis (1999): The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. *J.Neurosci.* 19:9271.
354. M Bouaboula, S Perrachon, L Milligan, X Canat, M Rinaldi-Carmona, M Portier, F Barth, B Calandra, F Pecceu, J Lupker, JP Maffrand, FG Le, and P Casellas (1997): A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J.Biol.Chem.* 272:22330.
355. HO Onaran and T Costa (1997): Agonist efficacy and allosteric models of receptor action. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 812:98.
356. T Kenakin and LJ Miller (2010): Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol.Rev.* 62:265.
357. U Gether, S Lin, and BK Kobilka (1995): Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *J.Biol.Chem.* 270:28268.

358. P Ghanouni, Z Gryczynski, JJ Steenhuis, TW Lee, DL Farrens, JR Lakowicz, and BK Kobilka (2001): Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* 276:24433.
359. BK Kobilka and U Gether (2002): Use of fluorescence spectroscopy to study conformational changes in the beta 2-adrenoceptor. *Methods Enzymol.* 343:170.
360. VJ Hruby and G Tollin (2007): Plasmon-waveguide resonance (PWR) spectroscopy for directly viewing rates of GPCR/G-protein interactions and quantifying affinities. *Curr.Opin.Pharmacol.* 7:507.
361. T Georgieva, S Devanathan, D Stropova, CK Park, Z Salamon, G Tollin, VJ Hruby, WR Roeske, HI Yamamura, and E Varga (2008): Unique agonist-bound cannabinoid CB1 receptor conformations indicate agonist specificity in signaling. *Eur.J.Pharmacol.* 581:19.
362. JP Vilardaga, M Bunemann, C Krasel, M Castro, and MJ Lohse (2003): Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat.Biotechnol.* 21:807.
363. JP Vilardaga, R Steinmeyer, GS Harms, and MJ Lohse (2005): Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat.Chem.Biol.* 1:25.
364. G Swaminath, Y Xiang, TW Lee, J Steenhuis, C Parnot, and BK Kobilka (2004): Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J.Biol.Chem.* 279:686.
365. G Swaminath, X Deupi, TW Lee, W Zhu, FS Thian, TS Kobilka, and B Kobilka (2005): Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. *J.Biol.Chem.* 280:22165.
366. S Granier, S Kim, AM Shafer, VR Ratnala, JJ Fung, RN Zare, and B Kobilka (2007): Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies. *J.Biol.Chem.* 282:13895.
367. MJ Lohse, P Hein, C Hoffmann, VO Nikolaev, JP Vilardaga, and M Bunemann (2008): Kinetics of G-protein-coupled receptor signals in intact cells. *Br.J.Pharmacol.* 153 Suppl 1:S125.
368. A Zurn, U Zabel, JP Vilardaga, H Schindelin, MJ Lohse, and C Hoffmann (2009): Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes. *Mol.Pharmacol.* 75:534.

369. S Galandrin, G Oligny-Longpre, H Bonin, K Ogawa, C Gales, and M Bouvier (2008): Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor. *Mol.Pharmacol.* 74:162.
370. JL Baneres, D Mesnier, A Martin, L Joubert, A Dumuis, and J Bockaert (2005): Molecular characterization of a purified 5-HT4 receptor: a structural basis for drug efficacy. *J.Biol.Chem.* 280:20253.
371. T Okada and K Palczewski (2001): Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 11:420.
372. AS Tutor, P Penela, and F Mayor, Jr. (2007): Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies are potent stimulators of the ERK1/2 pathway in cardiac cells. *Cardiovasc.Res.* 76:51.
373. LP Pellissier, J Sallander, M Campillo, F Gaven, E Queffeulou, M Pillot, A Dumuis, S Claeysen, J Bockaert, and L Pardo (2009): Conformational toggle switches implicated in basal constitutive and agonist-induced activated states of 5-hydroxytryptamine-4 receptors. *Mol.Pharmacol.* 75:982.
374. JD Urban, WP Clarke, ZM von, DE Nichols, B Kobilka, H Weinstein, JA Javitch, BL Roth, A Christopoulos, PM Sexton, KJ Miller, M Spedding, and RB Mailman (2007): Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 320:1.
375. D Gurwitz and R Haring (2003): Ligand-selective signaling and high-content screening for GPCR drugs. *Drug Discov.Today* 8:1108.
376. E Hermans (2003): Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol.Ther.* 99:25.
377. BL Roth and DM Chuang (1987): Multiple mechanisms of serotonergic signal transduction. *Life Sci.* 41:1051.
378. SC Roerig, HH Loh, and PY Law (1992): Identification of three separate guanine nucleotide-binding proteins that interact with the delta-opioid receptor in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Mol.Pharmacol.* 41:822.
379. A Fisher, E Heldman, D Gurwitz, R Haring, D Barak, H Meshulam, D Marciano, R Brandeis, Z Pittel, M Segal, and . (1993): Selective signaling via unique M1 muscarinic agonists. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 695:300.
380. D Gurwitz, R Haring, E Heldman, CM Fraser, D Manor, and A Fisher (1994): Discrete activation of transduction pathways associated with acetylcholine m1 receptor by several muscarinic ligands. *Eur.J.Pharmacol.* 267:21.

381. JS Ward, L Merritt, DO Calligaro, FP Bymaster, HE Shannon, BD Sawyer, CH Mitch, JB Deeter, SC Peters, MJ Sheardown, and . (1995): Functionally selective M1 muscarinic agonists. 3. Side chains and azacycles contributing to functional muscarinic selectivity among pyrazinylazacycles. *J.Med.Chem.* 38:3469.
382. CP Lawler, C Prioleau, MM Lewis, C Mak, D Jiang, JA Schetz, AM Gonzalez, DR Sibley, and RB Mailman (1999): Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes. *Neuropsychopharmacology* 20:612.
383. T Kenakin (1995): Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol.Sci.* 16:232.
384. T Kenakin (2007): Functional Selectivity through Protean and Biased Agonism: Who Steers the Ship? *Mol.Pharmacol.* 72:1393.
385. D Spengler, C Waeber, C Pantaloni, F Holsboer, J Bockaert, PH Seeburg, and L Journot (1993): Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170.
386. BF Roettger, D Ghanekar, R Rao, C Toledo, J Yingling, D Pinon, and LJ Miller (1997): Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol.Pharmacol.* 51:357.
387. JA Gray and BL Roth (2001): Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT(2A) receptors by agonists and antagonists. *Brain Res.Bull.* 56:441.
388. S Galandrin, G Oligny-Longpre, and M Bouvier (2007): The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol.Sci.* 28:423.
389. D Richard, J-L Senon, M Valleur (2009): Dictionnaire des drogues et dépendance. Larousse,
390. CB Pert and SH Snyder (1973): Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011.
391. J Hughes, TW Smith, HW Kosterlitz, LA Fothergill, BA Morgan, and HR Morris (1975): Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577.
392. PY Law, YH Wong, and HH Loh (2000): Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40:389.
393. JT Williams, MJ Christie, and O Manzoni (2001): Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev.* 81:299.
394. CJ Evans, DE Keith, Jr., H Morrison, K Magendzo, and RH Edwards (1992): Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952.

395. BL Kieffer, K Befort, C Gaveriaux-Ruff, and CG Hirth (1992): The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:12048.
396. Y Chen, A Mestek, J Liu, JA Hurley, and L Yu (1993): Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol.Pharmacol.* 44:8.
397. K Yasuda, K Raynor, H Kong, CD Breder, J Takeda, T Reisine, and GI Bell (1993): Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:6736.
398. F Meng, GX Xie, RC Thompson, A Mansour, A Goldstein, SJ Watson, and H Akil (1993): Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:9954.
399. S Li, J Zhu, C Chen, YW Chen, JK Deriel, B Ashby, and LY Liu-Chen (1993): Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor. *Biochem.J.* 295 ( Pt 3):629.
400. H Toyoda, Y Fukuda, Y Koyama, D Nishimura, H Hoshino, N Katada, K Kato, and T Hayakawa (1996): Case report: multiple systemic lymph node metastases from a small hepatocellular carcinoma. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 11:959.
401. PS Johnson, JB Wang, WF Wang, and GR Uhl (1994): Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidyl inositol turnover. *Neuroreport* 5:507.
402. RJ Spencer, W Jin, SA Thayer, S Chakrabarti, PY Law, and HH Loh (1997): Mobilization of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in transfected neuro2a cells by activation of multiple opioid receptor subtypes. *Biochem.Pharmacol.* 54:809.
403. M Tallent, MA Dichter, GI Bell, and T Reisine (1994): The cloned kappa opioid receptor couples to an N-type calcium current in undifferentiated PC-12 cells. *Neuroscience* 63:1033.
404. ET Piros, PL Prather, HH Loh, PY Law, CJ Evans, and TG Hales (1995): Ca<sup>2+</sup> channel and adenylyl cyclase modulation by cloned mu-opioid receptors in GH3 cells. *Mol.Pharmacol.* 47:1041.
405. TS McDowell (2003): Fentanyl decreases Ca<sup>2+</sup> currents in a population of capsaicin-responsive sensory neurons. *Anesthesiology* 98:223.
406. ZZ Wu, SR Chen, and HL Pan (2008): Distinct inhibition of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels by delta-opioid agonists in dorsal root ganglion neurons devoid of functional T-type Ca<sup>2+</sup> currents. *Neuroscience* 153:1256.



407. T Fukuizumi, T Ohkubo, and K Kitamura (2003): Spinally delivered N-, P/Q- and L-type Ca<sup>2+</sup>-channel blockers potentiate morphine analgesia in mice. *Life Sci.* 73:2873.
408. DJ Henry, DK Grandy, HA Lester, N Davidson, and C Chavkin (1995): Kappa-opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by *Xenopus oocytes*. *Mol.Pharmacol.* 47:551.
409. H Zheng, HH Loh, and PY Law (2008): 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.* 73:178.
410. H McQuay (1999): Opioids in pain management. *Lancet* 353:2229.
411. BL Kieffer and C Gaveriaux-Ruff (2002): Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog.Neurobiol.* 66:285.
412. SS Negus, K Schrode, and GW Stevenson (2008): Micro/kappa opioid interactions in rhesus monkeys: implications for analgesia and abuse liability. *Exp.Clin.Psychopharmacol.* 16:386.
413. SL Walsh, EC Strain, ME Abreu, and GE Bigelow (2001): Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 157:151.
414. JP McLaughlin, LC Myers, PE Zarek, MG Caron, RJ Lefkowitz, TA Czyzyk, JE Pintar, and C Chavkin (2004): Prolonged kappa opioid receptor phosphorylation mediated by G-protein receptor kinase underlies sustained analgesic tolerance. *J.Biol.Chem.* 279:1810.
415. MR Bruchas, BB Land, M Aita, M Xu, SK Barot, S Li, and C Chavkin (2007): Stress-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation mediates kappa-opioid-dependent dysphoria. *J.Neurosci.* 27:11614.
416. CN May, MR Dashwood, CJ Whitehead, and CJ Mathias (1989): Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution. *Br.J.Pharmacol.* 98:903.
417. F Porreca, HI Mosberg, R Hurst, VJ Hruby, and TF Burks (1984): 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.* 230:341.
418. A Cowan, XZ Zhu, HI Mosberg, JR Omnaas, and F Porreca (1988): Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 246:950.

419. JA Desmeules, V Kayser, and G Guilbaud (1993): Selective opioid receptor agonists modulate mechanical allodynia in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 53:277.
420. PE Stewart and DL Hammond (1994): Activation of spinal delta-1 or delta-2 opioid receptors reduces carrageenan-induced hyperalgesia in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 268:701.
421. GL Fraser, GA Gaudreau, PB Clarke, DP Menard, and MN Perkins (2000): Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br.J.Pharmacol.* 129:1668.
422. MR Brandt, MS Furness, NK Mello, KC Rice, and SS Negus (2001): Antinociceptive effects of delta-opioid agonists in Rhesus monkeys: effects on chemically induced thermal hypersensitivity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 296:939.
423. J Mika, R Przewlocki, and B Przewlocka (2001): The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur.J.Pharmacol.* 415:31.
424. CM Cahill, A Morinville, C Hoffert, D O'Donnell, and A Beaudet (2003): Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* 101:199.
425. P Petrillo, O Angelici, S Bingham, G Ficalora, M Garnier, PF Zaratina, G Petrone, O Pozzi, M Sbacchi, TO Stean, N Upton, GM Dondio, and MA Scheideler (2003): Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS\*,8aalpha,8abeta,12bbeta)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]isoquinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 307:1079.
426. EL Gallantine and TF Meert (2005): A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 97:39.
427. DC Broom, JF Nitsche, JE Pintar, KC Rice, JH Woods, and JR Traynor (2002): Comparison of receptor mechanisms and efficacy requirements for delta-agonist-induced convulsive activity and antinociception in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 303:723.
428. H Beaudry, A Proteau-Gagne, S Li, Y Dory, C Chavkin, and L Gendron (2009): Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience* 161:381.
429. AA Pradhan, JA Becker, G Scherrer, P Tryoen-Toth, D Filliol, A Matifas, D Massotte, C Gaveriaux-Ruff, and BL Kieffer (2009): In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS.One.* 4:e5425.

430. AA Pradhan, W Walwyn, C Nozaki, D Filliol, E Erbs, A Matifas, C Evans, and BL Kieffer (2010): Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. *J.Neurosci.* 30:16459.
431. JM Van Ree, MA Gerrits, and LJ Vanderschuren (1999): Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol.Rev.* 51:341.
432. K Raynor, H Kong, Y Chen, K Yasuda, L Yu, GI Bell, and T Reisine (1994): Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol.Pharmacol.* 45:330.
433. L Hackler, JE Zadina, LJ Ge, and AJ Kastin (1997): Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* 18:1635.
434. JE Zadina, L Hackler, LJ Ge, and AJ Kastin (1997): A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386:499.
435. J Fichna, A Janecka, J Costentin, and JC Do Rego (2007): The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacol.Rev.* 59:88.
436. C Stein, M Pfluger, A Yassouridis, J Hoelzl, K Lehrberger, C Welte, and AH Hassan (1996): No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J.Clin.Invest* 98:793.
437. P Holzer (2004): Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetic therapy in humans. *Neurosci.Lett.* 361:192.
438. S Roy and HH Loh (1996): Effects of opioids on the immune system. *Neurochem.Res.* 21:1375.
439. F Mennicken, J Zhang, C Hoffert, S Ahmad, A Beaudet, and D O'Donnell (2003): Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J.Comp Neurol.* 465:349.
440. PG Fine, RK Portenoy (2004): A clinical guide to opioid analgesia. McGraw-Hill compagny, Minneapolis,
441. CM Cahill, A Morinville, MC Lee, JP Vincent, B Collier, and A Beaudet (2001): Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J.Neurosci.* 21:7598.
442. L Gendron, AL Lucido, F Mennicken, D O'Donnell, JP Vincent, T Stroh, and A Beaudet (2006): Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J.Neurosci.* 26:953.

443. A Morinville, CM Cahill, MJ Esdaile, H Aibak, B Collier, BL Kieffer, and A Beaudet (2003): Regulation of delta-opioid receptor trafficking via mu-opioid receptor stimulation: evidence from mu-opioid receptor knock-out mice. *J.Neurosci.* 23:4888.
444. AM Patwardhan, KA Berg, AN Akopain, NA Jeske, N Gamper, WP Clarke, and KM Hargreaves (2005): Bradykinin-induced functional competence and trafficking of the delta-opioid receptor in trigeminal nociceptors. *J.Neurosci.* 25:8825.
445. W Walwyn, NT Maidment, M Sanders, CJ Evans, BL Kieffer, and TG Hales (2005): Induction of delta opioid receptor function by up-regulation of membrane receptors in mouse primary afferent neurons. *Mol.Pharmacol.* 68:1688.
446. X Zhang, L Bao, U Arvidsson, R Elde, and T Hokfelt (1998): Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience* 82:1225.
447. L Bao, SX Jin, C Zhang, LH Wang, ZZ Xu, FX Zhang, LC Wang, FS Ning, HJ Cai, JS Guan, HS Xiao, ZQ Xu, C He, T Hokfelt, Z Zhou, and X Zhang (2003): Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron* 37:121.
448. JS Guan, ZZ Xu, H Gao, SQ He, GQ Ma, T Sun, LH Wang, ZN Zhang, I Lena, I Kitchen, R Elde, A Zimmer, C He, G Pei, L Bao, and X Zhang (2005): Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell* 122:619.
449. G Scherrer, N Imamachi, YQ Cao, C Contet, F Mennicken, D O'Donnell, BL Kieffer, and AI Basbaum (2009): Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148.
450. HB Wang, JS Guan, L Bao, and X Zhang (2008): Distinct subcellular distribution of delta-opioid receptor fused with various tags in PC12 cells. *Neurochem.Res.* 33:2028.
451. D Dubois and L Gendron (2010): Delta opioid receptor-mediated analgesia is not altered in preprotachykinin A knockout mice. *Eur.J.Neurosci.* 32:1921.
452. RR Gainetdinov, RT Premont, LM Bohn, RJ Lefkowitz, and MG Caron (2004): Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu.Rev.Neurosci.* 27:107.
453. L Martini and JL Whistler (2007): The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr.Opin.Neurobiol.* 17:556.

454. M Connor, PB Osborne, and MJ Christie (2004): Mu-opioid receptor desensitization: is morphine different? *Br.J.Pharmacol.* 143:685.
455. AK Finn and JL Whistler (2001): Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* 32:829.
456. DA Eisinger, H Ammer, and R Schulz (2002): Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization. *J.Neurosci.* 22:10192.
457. DE Keith, SR Murray, PA Zaki, PC Chu, DV Lissin, L Kang, CJ Evans, and ZM von (1996): Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J.Biol.Chem.* 271:19021.
458. B Aguila, L Coulbault, M Boulouard, F Leveille, A Davis, G Toth, A Borsodi, G Balboni, S Salvadori, P Jauzac, and S Allouche (2007): 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.* 152:1312.
459. JL Whistler, HH Chuang, P Chu, LY Jan, and ZM von (1999): Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* 23:737.
460. SL Borgland, M Connor, PB Osborne, JB Furness, and MJ Christie (2003): Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid desensitization, and endocytosis of mu-opioid receptors. *J.Biol.Chem.* 278:18776.
461. VC Dang and JT Williams (2005): Morphine-Induced mu-opioid receptor desensitization. *Mol.Pharmacol.* 68:1127.
462. J McPherson, G Rivero, M Baptist, J Llorente, S Al-Sabah, C Krasel, WL Dewey, CP Bailey, EM Rosethorne, SJ Charlton, G Henderson, and E Kelly (2010): mu-opioid receptors: correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization. *Mol.Pharmacol.* 78:756.
463. E Navratilova, MC Eaton, D Stropova, EV Varga, TW Vanderah, WR Roeske, and HI Yamamura (2005): Morphine promotes phosphorylation of the human delta-opioid receptor at serine 363. *Eur.J.Pharmacol.* 519:212.
464. H Haberstock-Debic, KA Kim, YJ Yu, and ZM von (2005): Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J.Neurosci.* 25:7847.
465. S Arttamangkul, M Torrecilla, K Kobayashi, H Okano, and JT Williams (2006): Separation of mu-opioid receptor desensitization and internalization: endogenous receptors in primary neuronal cultures. *J.Neurosci.* 26:4118.

466. S Arttamangkul, N Quillinan, MJ Low, ZM von, J Pintar, and JT Williams (2008): Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices. *Mol.Pharmacol.* 74:972.
467. WM Walwyn, W Wei, CW Xie, K Chiu, BL Kieffer, CJ Evans, and NT Maidment (2006): Mu opioid receptor-effector coupling and trafficking in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience* 142:493.
468. JG Minnis, S Patierno, SE Kohlmeier, NC Brecha, M Tonini, and C Sternini (2003): Ligand-induced mu opioid receptor endocytosis and recycling in enteric neurons. *Neuroscience* 119:33.
469. S Patierno, L Anselmi, I Jaramillo, D Scott, R Garcia, and C Sternini (2011): Morphine induces mu opioid receptor endocytosis in guinea pig enteric neurons following prolonged receptor activation. *Gastroenterology* 140:618.
470. LM Bohn, RJ Lefkowitz, RR Gainetdinov, K Peppel, MG Caron, and FT Lin (1999): Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286:2495.
471. LM Bohn, LA Dykstra, RJ Lefkowitz, MG Caron, and LS Barak (2004): Relative opioid efficacy is determined by the complements of the G protein-coupled receptor desensitization machinery. *Mol.Pharmacol.* 66:106.
472. N Trapaidze, I Gomes, M Bansinath, and LA Devi (2000): Recycling and resensitization of delta opioid receptors. *DNA Cell Biol.* 19:195.
473. JL Whistler, J Enquist, A Marley, J Fong, F Gladher, P Tsuruda, SR Murray, and ZM von (2002): Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 297:615.
474. JN Hislop, AG Henry, A Marchese, and ZM von (2009): Ubiquitination regulates proteolytic processing of G protein-coupled receptors after their sorting to lysosomes. *J.Biol.Chem.* 284:19361.
475. T Koch, A Widera, K Bartzsch, S Schulz, LO Brandenburg, N Wundrack, A Beyer, G Grecksch, and V Holtt (2005): Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol.Pharmacol.* 67:280.
476. I Lecoq, N Marie, P Jauzac, and S Allouche (2004): Different regulation of human delta-opioid receptors by SNC-80 [(+)-4-[(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide] and endogenous enkephalins. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 310:666.
477. A Hasbi, T Nguyen, T Fan, R Cheng, A Rashid, M Alijaniam, MM Rasenick, BF O'Dowd, and SR George (2007): Trafficking of preassembled opioid mu-delta heterooligomer-Gz signaling complexes to the plasma membrane: coregulation by agonists. *Biochemistry* 46:12997.

478. FA Bradbury, JC Zelnik, and JR Traynor (2009): G protein independent phosphorylation and internalization of the delta-opioid receptor. *J.Neurochem.* 109:1526.
479. N Marie, I Lecoq, P Jauzac, and S Allouche (2003): Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. *J.Biol.Chem.* 278:22795.
480. T Palanche, B Ilien, S Zoffmann, MP Reck, B Bucher, SJ Edelstein, and JL Galzi (2001): The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J.Biol.Chem.* 276:34853.
481. T Kenakin (2001): Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J.* 15:598.
482. T Kenakin and O Onaran (2002): The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference? *Trends Pharmacol.Sci.* 23:275.
483. T Kenakin (2003): Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol.Sci.* 24:346.
484. M Azzi, PG Charest, S Angers, G Rousseau, T Kohout, M Bouvier, and G Pineyro (2003): Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:11406.
485. JA Gray, A Bhatnagar, VV Gurevich, and BL Roth (2003): The interaction of a constitutively active arrestin with the arrestin-insensitive 5-HT(2A) receptor induces agonist-independent internalization. *Mol.Pharmacol.* 63:961.
486. LJ Sim and SR Childers (1997): Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [35S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in guinea pig brain. *J.Comp Neurol.* 386:562.
487. ID Alves, Z Salamon, E Varga, HI Yamamura, G Tollin, and VJ Hruby (2003): Direct observation of G-protein binding to the human delta-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J.Biol.Chem.* 278:48890.
488. ID Alves, KA Ciano, V Boguslavski, E Varga, Z Salamon, HI Yamamura, VJ Hruby, and G Tollin (2004): Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. *J.Biol.Chem.* 279:44673.
489. S Galandrin and M Bouvier (2006): Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol.Pharmacol.* 70:1575.

490. G Pineyro, M Azzi, A DeLean, PW Schiller, and M Bouvier (2005): 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.* 67:336.
491. C Wang, D Zhou, Z Cheng, Q Wei, J Chen, G Li, G Pei, and Z Chi (1998): The C-truncated delta-opioid receptor underwent agonist-dependent activation and desensitization. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 249:321.
492. OM Kouhen, G Wang, J Solberg, LJ Erickson, PY Law, and HH Loh (2000): Hierarchical phosphorylation of delta-opioid receptor regulates agonist-induced receptor desensitization and internalization. *J.Biol.Chem.* 275:36659.
493. SM Appleyard, JP McLaughlin, and C Chavkin (2000): Tyrosine phosphorylation of the kappa -opioid receptor regulates agonist efficacy. *J.Biol.Chem.* 275:38281.
494. M Shapira, O Keren, M Gafni, and Y Sarne (2001): Divers pathways mediate delta-opioid receptor down regulation within the same cell. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 96:142.
495. HK Kramer, ML Andria, DH Esposito, and EJ Simon (2000): Tyrosine phosphorylation of the delta-opioid receptor. Evidence for its role in mitogen-activated protein kinase activation and receptor internalization\*. *Biochem.Pharmacol.* 60:781.
496. G Pineyro, M Azzi, A DeLean, PW Schiller, and M Bouvier (2005): 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.* 67:336.
497. S Klein, H Reuveni, and A Levitzki (2000): Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:3219.
498. RV Rebois, DR Warner, and NS Basi (1997): Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins? *Cell Signal.* 9:141.
499. M Frank, L Thumer, MJ Lohse, and M Bunemann (2005): G Protein activation without subunit dissociation depends on a G{alpha}{i}-specific region. *J.Biol.Chem.* 280:24584.
500. C Gales, RV Rebois, M Hogue, P Trieu, A Breit, TE Hebert, and M Bouvier (2005): Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat.Methods* 2:177.
501. X Zhang, F Wang, X Chen, Y Chen, and L Ma (2008): Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. *J.Neurochem.*



502. EV Varga (2003): The molecular mechanisms of cellular tolerance to delta-opioid agonists. A minireview. *Acta Biol.Hung.* 54:203.
503. D Thompson, M Pusch, and JL Whistler (2007): Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors. *J.Biol.Chem.* 282:29178.
504. X Nadal, JE Banos, BL Kieffer, and R Maldonado (2006): Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur.J.Neurosci.* 23:830.
505. G Scherrer, P Tryoen-Toth, D Filliol, A Matifas, D Laustriat, YQ Cao, AI Basbaum, A Dierich, JL Vonesh, C Gaveriaux-Ruff, and BL Kieffer (2006): Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:9691.
506. CM Cahill, SV Holdridge, and A Morinville (2007): Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol.Sci.* 28:23.
507. C Gaveriaux-Ruff, C Nozaki, X Nadal, XC Hever, R Weibel, A Matifas, D Reiss, D Filliol, MA Nassar, JN Wood, R Maldonado, and BL Kieffer (2011): Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* 152:1238.
508. VC Dang, B Chieng, Y Azriel, and MJ Christie (2011): Cellular morphine tolerance produced by betaarrestin-2-dependent impairment of mu-opioid receptor resensitization. *J.Neurosci.* 31:7122.
509. CE Groer, CL Schmid, AM Jaeger, and LM Bohn (2011): Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J.Biol.Chem.* 286:31731.
510. N Quillinan, EK Lau, M Virk, ZM von, and JT Williams (2011): Recovery from mu-opioid receptor desensitization after chronic treatment with morphine and methadone. *J.Neurosci.* 31:4434.
511. A De (2011): The new era of bioluminescence resonance energy transfer technology. *Curr.Pharm.Biotechnol.* 12:558.