

Université de Montréal

**Étude du trafic du récepteur delta-opiacé suite à
sa stimulation par différents agonistes**

par

Charfi Iness

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc

en pharmacologie

option neurosciences

Juin, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude du trafic du récepteur delta-opiacé suite à sa stimulation par différents
agonistes

Présenté par :
Charfi Iness

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Rousseau, président-rapporteur
Graciela Pineyro, directeur de recherche
Graziella Di Cristo, membre du jury

Résumé

Les opiacés figurent parmi les analgésiques les plus puissants pour le traitement des douleurs sévères. Les agonistes du DOR (récepteur delta opiacé) induisent moins d'effets secondaires que ceux du μ , ce qui les rend une cible d'intérêt pour le traitement des douleurs chroniques. Cependant, ils induisent la tolérance à l'analgésie. Des hypothèses récentes proposent que le potentiel des drogues à induire la tolérance soit la conséquence de la stabilisation de différentes conformations du récepteur induites par la liaison avec différents ligands, chacune ayant différentes propriétés de trafic. Dans ce contexte, nous avons déterminé si différents ligands du DOR différaient dans leur capacité à induire la signalisation et le trafic du récepteur. Nos résultats indiquent que DPDPE et SNC-80 sont les drogues les plus efficaces à inhiber la production d'AMPC, suivis par UFP-512, morphine et TIPP. DPDPE et SNC-80 induisent à eux seuls l'internalisation du DOR dans les cellules HEK-293 de façon dépendante de la β -arrestine mais pas de la GRK2 ni PKC. Ces deux drogues induisent également l'internalisation du DOR dans les neurones corticaux et c'est seulement le DPDPE qui permet au DOR de regagner la membrane des cellules HEK-293 et des neurones après récupération. Cette capacité de recyclage était suggérée comme un mécanisme protégeant contre la survenue de la tolérance. Ces observations indiquent que le DOR peut subir différentes régulations en fonction du ligand lui étant associé. Cette propriété de sélectivité fonctionnelle des ligands pourrait être utile pour le développement de nouveaux opiacés ayant une activité analgésique plus durable.

Mots-clés : récepteur delta opiacé, signalisation, internalisation, recyclage, analgésie, tolérance, sélectivité fonctionnelle.

Abstract

Opiates are among the most powerful painkillers to treat severe pain. Delta opioid receptor (DOR) agonists induce fewer side effects than mu opioid receptor agonists, which makes them a target of interest for the treatment of chronic pain. However, they induce tolerance to analgesia. Recent hypotheses suggest that drug tolerance is the result of stabilization of ligand-specific conformations of the receptor, with distinct traffic properties such as internalization and/or recycling. In this context, we determined whether different DOR ligands differed with respect to their ability to induce signaling and receptor trafficking. Our results indicate that DPDPE and SNC-80 are the most effective drugs to inhibit the production of cAMP, followed by UFP-512, morphine and TIPP. Only DPDPE and SNC-80 manage to induce DOR internalization in HEK-293 cells. This effect is dependent on β -arrestin but not on GRK2 or PKC. Of these two internalizing agonists, only DPDPE allows the DOR to recycle back to the membrane of HEK-293 cells after recovery. DPDPE and SNC-80 also trigger similar DOR internalization in cortical neurons, and as observed in HEK293 cells only DPDPE allowed the receptor to recycle back to the membrane. This recycling capacity was suggested as a mechanism to protect against the onset of tolerance. These observations indicate that the DOR can undergo different regulations depending on the ligand bound to it. This property of functional selectivity of DOR ligands could be useful for the development of new opiates with longer lasting analgesic properties.

Keywords : delta opioid receptor, signaling, internalization, recycling, analgesia, tolerance, functional selectivity.

Table des matières

Introduction.....	19
1. Récepteurs opioïdes et analgésiques opiacés.....	19
1.1. Circuits de la douleur.....	19
1.2. Système opioïde.....	22
1.2.1. Historique.....	22
1.2.2. Composantes moléculaires du système opioïde.....	23
1.2.2.1. Les peptides.....	23
1.2.2.2. Les récepteurs.....	24
2. Voies de signalisation des récepteurs opiacés.....	32
2.1. Protéines de signalisation, seconds messagers et effecteurs.....	32
2.2. Protéines de régulation.....	35
2.2.1. Les kinases.....	36
2.2.1.1. Les GRK.....	36
2.2.1.2. Les PKC.....	39
2.2.1.3. Les CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II).....	41
2.2.1.4. Les MAPK.....	42
2.2.1.5. Les PKA.....	43
2.2.1.6. Les PKG.....	43
2.2.2. Les β -arrestines.....	43
3. Analgésiques opiacés.....	49
4. Tolérance analgésique et mécanismes sous-jacents.....	51
4.1. Définition de la tolérance.....	51
4.2. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la tolérance.....	52
4.2.1. Mécanismes moléculaires liés au récepteur.....	52
4.2.1.1. Lien entre désensibilisation et tolérance.....	52
4.2.1.2. Conséquences fonctionnelles de la désensibilisation : découplage récepteur-effecteur.....	56
4.2.2. Mécanismes cellulaires de la tolérance.....	57

4.2.2.1. Activation de la voie de l'adénylate cyclase.....	58
4.2.2.2. CREB et autres facteurs de transcription.....	58
4.2.2.3. Expression conjointe du MOR et du DOR.....	59
4.2.3. Plasticité synaptique.....	60
4.2.3.1. Description.....	60
4.2.3.2. Régulation à la hausse du récepteur NMDA.....	61
5. Internalisation et trafic post-endocytaire du DOR.....	62
6. Rôle de la GRK2, PKC et β arr2 dans la régulation du DOR.....	64
7. La sélectivité fonctionnelle : un nouveau concept pharmacologique....	66
8. Hypothèse de travail.....	70
9. But du projet.....	70
Matériel et méthodes.....	71
1. Réactifs.....	71
2. Plasmides.....	71
3. Culture cellulaire et transfection.....	72
4. Essai d'accumulation d'AMPC.....	73
5. Évaluation du trafic du DOR dans les cellules HEK-293.....	74
6. Évaluation du trafic du DOR dans les neurones.....	75
7. Analyse statistique.....	77
8. Ligands du DOR utilisés dans cette étude.....	77
Exposé et analyse des résultats.....	79
1. Efficacité de signalisation des différents ligands dans la voie d'accumulation d'AMPC.....	79
2. Internalisation du DOR dans les cellules HEK-293.....	81
2.1. Cinétique et magnitude d'internalisation.....	81

2.2. Mécanismes d'internalisation du DOR dans les cellules HEK-293.....	82
2.2.1. Rôle des kinases GRK2 et PKC.....	82
2.2.2. Rôle de la β -arrestine.....	85
3. Recyclage du DOR dans les cellules HEK-293.....	86
4. Internalisation et recyclage du DOR dans les neurones corticaux.....	87
Discussion.....	95
Conclusion.....	101
Annexe I.....	102
Annexe II.....	104
Références.....	118

Liste des tableaux

Tableau I. Distribution des récepteurs opioïdes au niveau du système nerveux chez le rat et l'humain.....	27
Tableau II. Propriétés moléculaires des arrestines.....	46
Tableau III. Les analgésiques opioïdes utilisés dans les douleurs sévères.....	51

Liste des figures

Figure 1. Perception et contrôle de la douleur.....	21
Figure 2. Peptides précurseurs des opioïdes endogènes.....	24
Figure 3. Illustration des homologies de domaines entre les membres de la famille des récepteurs opioïdes mu, delta, kappa et ORL.....	31
Figure 4. Rôle physiologique des récepteurs et peptides opioïdes in vivo.....	32
Figure 5. Actions des récepteurs opioïdes sur les canaux calciques et potassiques.....	35
Figure 6. Représentation schématique des différentes protéines de la famille GRK (GRK1-GRK7).....	38
Figure 7. Structure des isoformes de la PKC.....	40
Figure 8. Diagramme en ruban de la β -arrestine et ses mécanismes de liaison au récepteur.....	45
Figure 9 : Organisation structurale des arrestines.....	47
Figure 10. Trafic intracellulaire des récepteurs à sept domaines transmembranaires et β -arrestines.....	49
Figure 11. Évolution du concept d'efficacité en pharmacologie.....	68
Figure 12. Signalisation des ligands du DOR dans la voie de l'adénylate cyclase : courbes doses-réponses.....	80
Figure 13. L'effet maximal d'inhibition de la production d'AMPc diffère selon le ligand.....	81
Figure 14. Les agonistes du DOR induisent différents degrés d'internalisation	

dans les cellules HEK-293.....	82
Figure 15. La GRK2 n'est pas essentielle pour l'internalisation du DOR produite par le SNC-80 et le DPDPE dans les cellules HEK-293.....	84
Figure 16. La PKC n'est pas essentielle à la séquestration du DOR produite par le SNC-80 et le DPDPE dans les cellules HEK-293.....	85
Figure 17. La β arr est impliquée dans l'internalisation du DOR par le SNC-80 et le DPDPE de façon similaire.....	86
Figure 18. Différents profils de recyclage du DOR suite à l'exposition au DPDPE et SNC-80.....	87
Figure 19. Le DPDPE et SNC-80 induisent l'internalisation du DOR dans les neurones.....	88
Figure 20. Quantification du marquage intracellulaire induit par l'exposition au DPDPE et SNC-80 (10 μ M) pendant 60min.....	89
Figure 21. Le marquage intracellulaire après récupération diminue suite à l'exposition au DPDPE mais pas suite à l'exposition au SNC-80.....	91
Figure 22. Quantification du marquage intracellulaire de l'internalisation et suite à la récupération.....	92
Figure 23. Les neurones marqués à la surface après récupération sont plus nombreux suite au traitement au DPDPE qu'au SNC-80.....	93
Figure 24. Le taux de récupération suite au traitement au DPDPE est plus grand que celui correspondant au SNC-80.....	94

Figure 25. La GRK2 intervient dans l'internalisation du récepteur 5-HT _{4a} induite par la sérotonine (5-HT), dans les cellules HEK-293.....	102
Figure 26. La PKC est indispensable pour l'internalisation du récepteur 5-HT _{4b} dans les cellules HEK-293.....	102
Figure 27. Étude du déplacement du [³ H] naltrindole après récupération par DPDPE et SNC-80.....	103

Liste des abréviations

AC : Adénylyl cyclase

ACTH : Adrénocorticotrophine

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AMPA : Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

AP2 : Complexes adaptateurs de type 2

ASIC : Canaux activés par le proton

ATP : Adénosine triphosphate

ATV : Aire tegmentaire ventrale

β arr : β arrestine

β 2AR : Récepteur adrénergique de type β

BRET : Transfert d'énergie par résonance de bioluminescence

BSA : Albumine sérique bovine

C : Carboxyl

Ca^{2+} : Ion calcique

CaMKII : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

CB1 : Récepteur cannabinoïde de type 1

CDME : Corne dorsale de la moelle épinière

CHO : Cellules ovariennes de hamster chinois

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

5-HT_{4a} et 5-HT_{4b} : Récepteur à la sérotonine de type 4a et 4b

COS-7 : Cellules rénales de singe vert africain

CREB : Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPC

CRF : Corticolibérine

DADLE : [D-Ala², D-Leu⁵]-Enképhaline

DAG : Diacylglycérol

DAMGO: [D-Ala(2),N-Me-Phe(4),Gly(5)-ol]-enképhaline

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMN : Double mutant négatif

DO : Densité optique
DOR ou DOP : Récepteur opioïde δ
DPDPE : [D-pénicillamine², D-pénicillamine⁵]-enképhaline
DTM : Domaine transmembranaire
D1, D2 : Récepteur de la dopamine de type 1, 2
EDTA : Acide tétra-acétique éthylène diamine
ELISA : dosage immuno-enzymatique sur support solide
Emax : Effet maximal
ERK : Kinases régulées par des signaux extra-cellulaires
FRA : Antigènes reliés à Fos
G : Protéine à activité GTPase
GABA : Acide- γ -amino-butérique
GASP : Protéines de triage associées aux GPCR
GDP : Guanosine diphosphate
GFP : Protéine fluorescente verte
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques
GRK : Kinase des GPCR
GTP : Guanosine triphosphate
GTPase : Enzyme hydrolysant le GTP
GTP γ S : Guanosine 5'-(gamma-thio) triphosphate
HEK-293 : Cellules embryonnaires de rein humain 293
HIO : Hyperalgésie induite par les opiacés
I.A.S.P : association internationale pour l'étude de la douleur
IBMX : Isobutylmethylxantine
ICV : Intra-cérébro-ventriculaire
IM : Intramusculaire
IP3 : Inositol-1,4,5-triphosphate
IUPHAR : Union internationale de pharmacologie fondamentale et clinique
JNK : Kinase au domaine N-terminal semblable à c-Jun
K⁺ : Ion potassique
KO : Invalidation génique

KOR ou KOP : Récepteur opioïde κ
LC : Locus cœruleus
LTP : Potentialisation à long terme
MAPK : Protéine kinase activée par des mitogènes
Mg²⁺ Ion magnésium
 μ M : Micromolaire
MOR ou MOP : récepteur opioïde μ
MSH : Hormone stimulant les mélanocytes
N : Amino
Na⁺ : Ion sodique
nm : Nanomètre
nM : Nanomolaire
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NOP : Récepteur à orphanine FQ / nociceptine
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORL1 : Homologue aux récepteurs opioïdes de type 1
PA : Potentiel d'action
PAG : Substance grise péri-acqueducale
PBS : Tampon phosphate salin
PEI : Polyéthylénimine
PFA : Paraformaldéhyde
PGi : Noyau réticulaire paragigantocellulaire
PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC : Protéine kinase dépendante du Ca²⁺
PKG : Protéine kinase dépendante du GMPc
PLA₂, PLC, PLD : Phospholipase de type A₂, C, ou D
PO : voie orale
POMC : Pro-opiomélanocortine
PTX : Toxine pertussique
RGS : Régulateur de la signalisation des protéines G
RO : Récepteur opioïde
SP : Substance P

SNC : Système nerveux central

SNC-80 : (+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxy-benzyl]-N,N-diethyl-benzamide

SNS : Spécifique des neurones sensoriels

TICP : H-Tyr-Tic[CH₂N]Cha-Phe-OH

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

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

V2R : Récepteur de la vasopressine de type 2

VR1 : récepteur canal de la capsaïcine

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce modeste travail ainsi qu'à la réussite de cette formidable formation.

Je tiens à remercier sincèrement et en premier lieu Madame Graciela Piñeyro, qui, en tant que Directrice de mémoire, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Louis-Eric Trudeau (professeur à l'Université de Montréal), son étudiant Dominic Thibault et madame Laura Stone (professeure à l'université McGill) pour leur générosité et leur grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

J'exprime ma gratitude et ma haute considération à la fondation du CHU Sainte-Justine et la fondation des étoiles pour la bourse d'études qui me fut attribuée. Soyez assurées que votre contribution financière m'était d'une grande aide.

J'aimerais aussi témoigner toute ma reconnaissance à tout le personnel du centre de recherche du CHU Sainte-Justine qui a très gentiment collaboré de près ou de loin dans la réalisation de cette tâche.

Je n'oublie pas mes parents et mon mari pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers M. Guy Rousseau et Mme Graziella Di Cristo qui ont eu la gentillesse de lire, corriger et critiquer ce travail.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous les membres de notre laboratoire, tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Introduction

1. Récepteurs opioïdes et analgésiques opiacés :

1.1. Circuits de la douleur :

L'I.A.S.P (International Association for Study of Pain) propose de définir la douleur comme « Une expérience subjective sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en terme d'un tel dommage ». Cette définition est également retenue par l'O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé) (28). Habituellement, elle correspond à un signal d'alarme de l'organisme pour signifier une remise en cause de son intégrité physique (146).

Il existe 3 grands mécanismes de genèse de la douleur : la douleur de nociception ou douleur nociceptive résultant de lésions des tissus périphériques, qui provoquent un influx douloureux transmis par le système nerveux intact, la douleur neurogène due à des lésions du système nerveux, que ce soit au niveau périphérique (à la suite d'une amputation, de la section d'un nerf, d'un zona, d'une neuropathie diabétique ou alcoolique...) ou central (après un traumatisme médullaire, un infarctus cérébral...) et la finalement la douleur psychogène : elle existe en l'absence de lésion et ces manifestations douloureuses sont liées à la somatisation des problèmes psychologiques, psychiques ou sociaux de l'individu. On va surtout s'intéresser au premier type de douleur : la douleur de nociception. En effet, la nociception est le processus par lequel les stimuli thermiques, mécaniques ou chimiques sont détectés par une sous-population de fibres nerveuses périphériques, appelés nocicepteurs (141). Les corps cellulaires des nocicepteurs sont localisés dans les ganglions de la racine dorsale pour le corps et le ganglion de Gasser pour le visage, et ont tous deux une branche axonale périphérique et centrale qui innerve les organes cibles et la moelle épinière, respectivement. Les nocicepteurs sont excités uniquement lorsque l'intensité du stimulus atteint une valeur seuil, ce qui suggère qu'ils possèdent des propriétés biophysiques et moléculaires qui leur permettent de détecter et de réagir sélectivement à des stimuli potentiellement nocifs. Il y a deux grandes classes de nocicepteurs : les fibres A δ et les fibres C. Les fibres A δ sont myélinisées, de diamètre moyen et interviennent dans la première douleur, c'est-à-dire la douleur aiguë, rapide et localisée. Ces afférences myélinisées diffèrent des fibres A β de plus grand diamètre, de conduction rapide et qui répondent à une stimulation mécanique inoffensive (toucher léger par exemple). La

deuxième classe de nocicepteurs comprend les fibres C non myélinisées, de petit diamètre et qui véhiculent la douleur secondaire, lente et moins bien localisée (19).

Ces fibres primaires afférentes se projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière, qui est organisée en couches distinctes anatomiquement et électrophysiologiquement (364). Par exemple, les fibres A δ se projettent au lamina I ainsi que dans la corne dorsale profonde (lamina V). Les afférences A β se projettent dans les lamelles profondes (III, IV et V). En revanche, les nocicepteurs C iront plus superficiellement aux lamina I et II (19). Les neurones des lamina I et V constituent la principale efférence de la corne dorsale vers le cerveau (141). Ces neurones sont à l'origine de multiples voies ascendantes, y compris les voies spinothalamiques et spinoreticulothalamiques, qui portent des messages nociceptifs au thalamus et au tronc cérébral, respectivement. La voie spinothalamique est particulièrement pertinente pour l'aspect sensori-discriminatif de l'expérience de la douleur (où est le stimulus et quelle est son intensité), alors que la voie spinoreticulothalamique est plus pertinente dans les douleurs mal localisées. À partir du tronc cérébral et du thalamus, l'information atteint les structures corticales. Il n'y a aucune région spécifique du cerveau contrôlant la douleur (5). En effet, la douleur résulte de l'activation de différentes structures, dont certaines sont plus associées avec les propriétés sensori-discriminatives (telles que le cortex somato-sensoriel) et d'autres avec les aspects émotionnels (comme le gyrus cingulaire antérieur et le cortex insulaire).

La perception douloureuse ne découle pas seulement de l'activation des voies nociceptives ascendantes mais d'un véritable dialogue de celles-ci avec les différentes voies descendantes de contrôle de cette douleur par l'intermédiaire des interneurons présents dans la corne dorsale (265). Le cortex, le thalamus et le tronc cérébral incluant la substance grise péri-aqueducale, le noyau du raphé et le locus coeruleus (LC) y sont impliqués. La sérotonine et la noradrénaline jouent un rôle prépondérant dans ces contrôles (280). Les endomorphines et d'autres peptides sont aussi impliqués dans ces mécanismes (7) (figure 1).

Ces différentes voies nociceptives, citées ci-dessus, transmettent l'information du stimulus nociceptif grâce à des mécanismes électro-biochimiques faisant intervenir de nombreuses molécules et acides aminés. Ces éléments comprennent les stimuli chimiques, les neurotransmetteurs des afférences sensibles primaires, les récepteurs et leurs ligands correspondants, les protéines intracellulaires et finalement les canaux ioniques (figure 1).

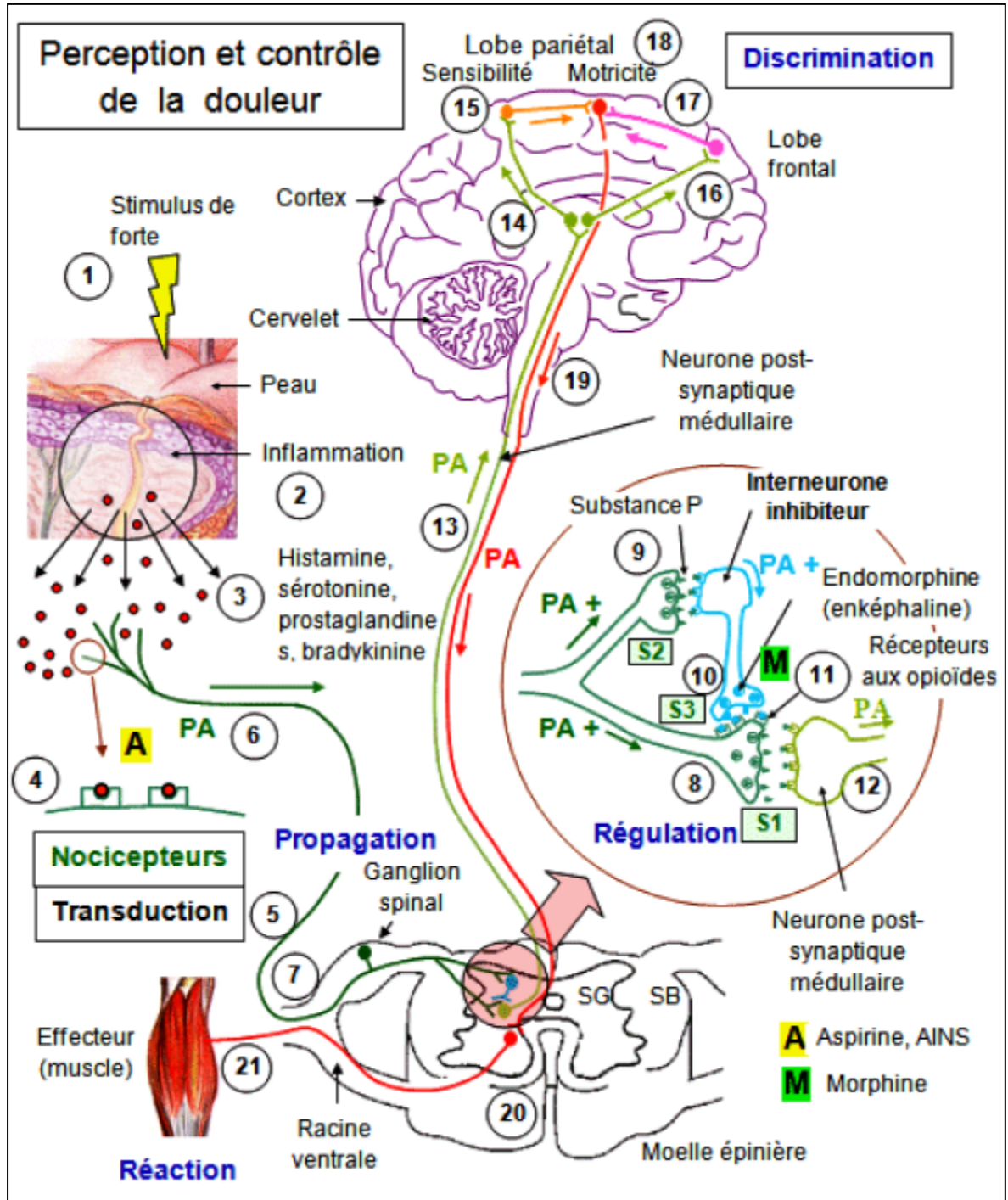


Figure 1. Perception et contrôle de la douleur

Quelle que soit la nature du stimulus nocicepteur (mécanique, thermique, chimique ...), il doit être de forte intensité, c'est-à-dire supraliminaire ou supérieur au seuil de déclenchement de la réponse (1) et capable de nuire à l'intégrité de l'organisme. Dans l'organe concerné (peau, viscère, articulation, muscle), le stimulus nocicepteur provoque l'apparition d'une zone lésée. La taille et la réactivité de cette zone dépend directement de l'intensité du stimulus et va définir l'intensité et la durée de la réponse. Une réaction inflammatoire (2) se développe : les cellules abîmées libèrent des substances algésiogènes : histamine, sérotonine, prostaglandines, bradykinine (3), entre autres. Ces substances sécrétées se fixent (4) sur des nocicepteurs qui élaborent (5) un PA (potentiel d'action). Cet influx nerveux se propage le long du neurone sensitif (6). La transduction est un

phénomène qui se produit au niveau d'un site de transduction, localisé sur l'extrémité d'une dendrite d'un neurone sensitif. Le corps cellulaire du neurone sensitif (6) est dans le ganglion spinal (7) c'est-à-dire dans le renflement présent sur la racine postérieure sensitive du nerf rachidien qui aboutit à la moelle épinière. L'arborisation terminale arrive dans la substance grise de la CDME (corne dorsale de la moelle épinière); ce contact est représenté agrandi dans le cercle en haut et à droite du schéma. Dans l'arborisation terminale, les potentiels d'action provoquent la libération d'un neurotransmetteur de la douleur dans la fente synaptique : la substance P (8) et (9), mais aussi d'autres substances comme le glutamate (acide aminé). La morphine agirait en bloquant l'exocytose de cette substance. Le neurone nociceptif postsynaptique médullaire possède sur sa membrane des récepteurs spécifiques au glutamate et à la substance P. Le neurone unipolaire (la fibre C) se divise en deux et présente donc 2 synapses : (8) et (9) à gauche dans l'agrandissement. L'une (S1) vient au contact d'un neurone postsynaptique médullaire (8), c'est-à-dire d'un neurone qui parcourt la moelle épinière. L'autre synapse (S2) communique avec un interneurone (9) inhibiteur (-) dont les terminaisons axoniques sécrètent un autre neurotransmetteur (10) : c'est une morphine endogène ou endomorphine. Dans ce groupe de molécules, on trouve les endorphines, les dynorphines et les enképhalines. Elles se fixent sur des récepteurs particuliers, appelés récepteurs opioïdes (11). Ces molécules imitent l'action de la morphine, car leur structure est partiellement semblable. L'enképhaline sécrétée par l'arborisation terminale de l'interneurone inhibiteur, se fixe sur des récepteurs opioïdes du neurone bipolaire S3. Le résultat est que S1 ne peut plus libérer la substance P et le glutamate : le message de douleur est arrêté (ou modulé). Une enképhalinase, enzyme naturellement présente dans la fente synaptique, détruit rapidement l'enképhaline. Une fibre nerveuse atteint la zone de la sensibilité générale (15). La première étape de la discrimination concerne la localisation et l'identification (nature, intensité) du stimulus douloureux. Une deuxième fibre arrive au niveau du cortex frontal (16) où se fait la 2^{ème} étape de la discrimination motivo-affective (17). C'est ce qui fait que des individus vont réagir différemment à une même douleur, car le cortex frontal prend en compte les facteurs émotionnels : peur, anxiété, etc. Les PA venant de ces deux zones corticales se rejoignent (18) au niveau de la zone (aire) motrice. Il en résulte un PA moteur (19) qui quitte le cerveau par une fibre motrice descendante, en rouge sur le schéma. La fibre motrice efférente (c'est-à-dire qui part des centres nerveux vers les organes périphériques) parcourt la moelle épinière et sort au niveau concerné par une racine ventrale (donc motrice et sans ganglion spinal) d'un nerf rachidien (20). Elle est reliée à un organe effecteur (muscle, glande, par ex.) (21). Les réactions peuvent être très variées : mouvement réflexe, fuite, sueur, décharge d'adrénaline. Contrôle de la douleur au niveau périphérique : c'est au niveau des lésions (2) que se fait l'action de certains médicaments comme l'aspirine (acide acétylsalicylique), le paracétamol, les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdiens). Ces molécules limitent ou empêchent la sécrétion des prostaglandines (3). Il en résulte une diminution ou une suppression des PA (6) et donc de la douleur. Au niveau central, la morphine et les molécules assimilées présentent une similitude de forme avec l'enképhaline. Elles vont donc se fixer sur les récepteurs opioïdes (11) et empêcher la libération de substance P au niveau S1 (<http://georges.dolisi.free.fr/Ladouleur/Douleur.htm>) (130).

1.2. Système opioïde :

1.2.1. Historique :

La découverte du système opioïde découle de l'utilisation et l'abus de l'opium dans l'histoire ancienne. L'opium, extrait de graines de pavot (*Papaver somniferum*), possède de puissantes propriétés analgésiques et produit l'euphorie. Cette substance a été utilisée pour des fins médicales et récréatives pendant plusieurs millénaires. La morphine est l'ingrédient le plus actif de l'opium. Le composé a été isolé en 1805 et devient rapidement le traitement clinique de choix pour soulager la douleur sévère. L'héroïne a été synthétisée chimiquement par diacétylation de la morphine dans les années 1800 et a été commercialisée comme la première drogue opiacée non addictive pour traiter la toux et l'asthme. Les fortes propriétés addictives de l'héroïne ont été rapidement reconnues, et l'héroïne et l'opium ont été interdits en 1910. Aujourd'hui la morphine reste le meilleur antidouleur dans la médecine

contemporaine, en dépit d'un large éventail d'effets indésirables (dépression respiratoire, constipation, tolérance et dépendance). L'héroïne est une drogue illicite d'abus, et la dépendance à l'héroïne représente un enjeu majeur de santé publique. En raison de leurs puissantes propriétés analgésiques et addictives, les opiacés ont fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques afin de comprendre leur mode d'action dans le cerveau et d'optimiser leur utilisation. En 1973, trois équipes indépendantes ont montré que les opiacés se lient à des récepteurs membranaires dans le cerveau, et ces récepteurs ont été nommés μ , δ et κ quelques années plus tard (153). En 1975, deux pentapeptides, Met-et Leu-enképhaline ont été isolés comme les premiers ligands endogènes de ces récepteurs (153). De nombreux peptides ont suivi, formant la famille des peptides opioïdes. Trois gènes distincts codant pour les peptides ont été isolés dans les années 1970 et début 1980, trois autres gènes codant pour les récepteurs ont été clonés. Dans le milieu des années 1990, l'ensemble du système opioïde endogène a été caractérisé au niveau moléculaire (153).

1.2.2. Composantes moléculaires du système opioïde :

1.2.2.1. Les peptides :

Le système opioïde endogène est constitué de trois gènes précurseurs de peptides opioïdes qui sont ensuite clivés en peptides plus courts (154). Tous les peptides opioïdes partagent une séquence N-terminale (Tyr-Gly-Gly-Phe), qui interagit avec les récepteurs opioïdes. Le gène codant pour la préproenképhaline produit plusieurs copies du pentapeptide Met-enképhaline et une copie de la Leu-enképhaline. Ce gène encode également des copies plus longues de Met-enképhaline. Notamment, le peptide opioïde bam22, active les récepteurs opioïdes via sa séquence N-terminale tout en activant une autre famille de récepteurs sensoriels connus sous le nom de sensory neuron-specific (SNS) receptors via sa partie C-terminale. Le gène de la préprodynorphine code également pour plusieurs peptides opioïdes, y compris la dynorphine A, dynorphine B, et la néo-endorphine. Les peptides dérivés de la préprodynorphine contiennent tous la séquence N-terminale de la Leu-enképhaline et des résidus d'acides aminés basiques dans leur extrémité C-terminale. Enfin, le gène de la préproopiomélanocortine code pour un seul peptide opioïde : la β -endorphine, parmi d'autres peptides présentant une activité biologique non opioïde. La β -endorphine est le plus long peptide opioïde (31 acides aminés) et démontre des propriétés analgésiques très puissantes et de longue durée (153, 154) (figure 2).

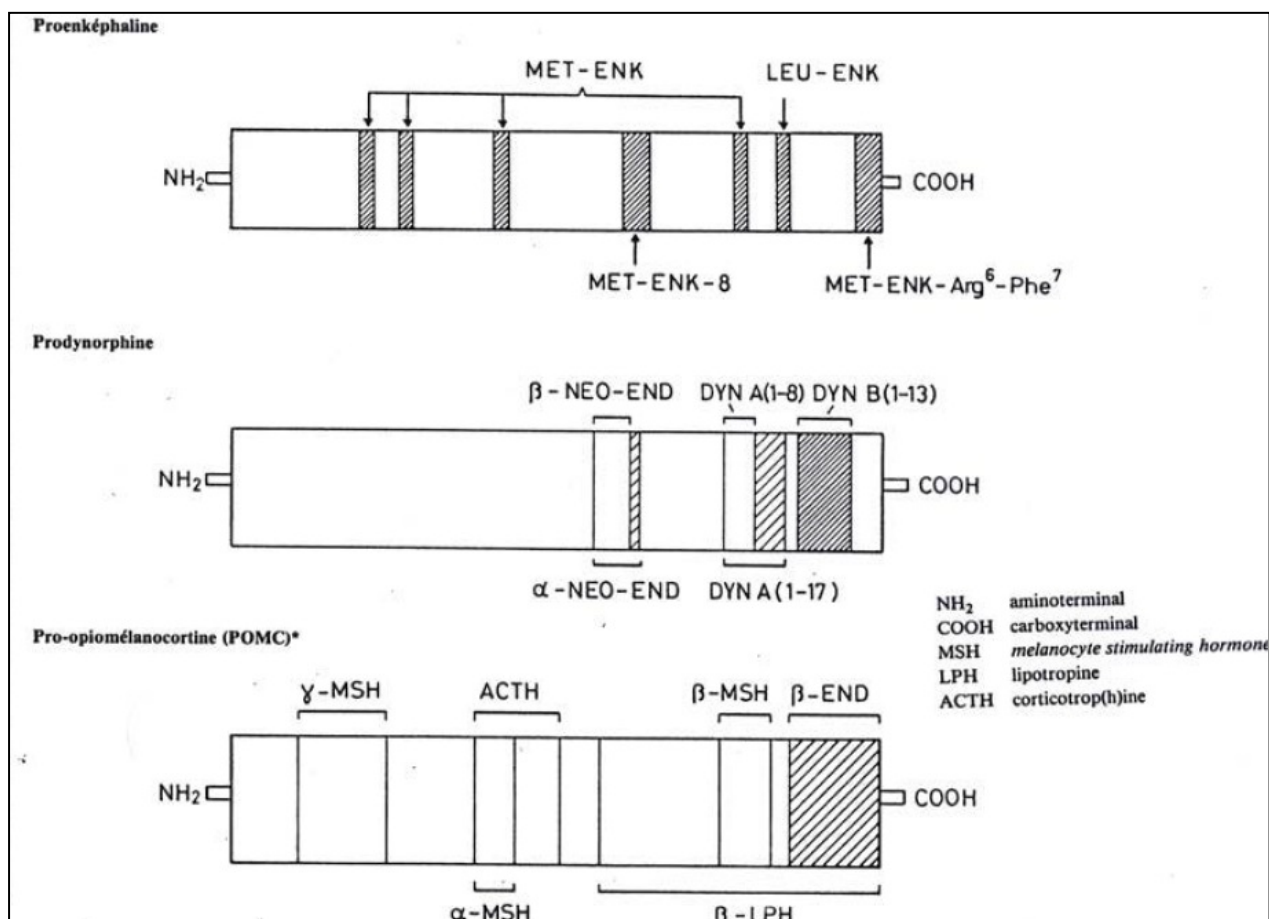


Figure 2. Peptides précurseurs des opioïdes endogènes

Les ligands endogènes des récepteurs opioïdiques sont des peptides qui dérivent de peptides précurseurs plus gros par clivage enzymatique. La proenkephaline et la prodorphine sont spécifiques des opiacés alors que la pro-opiomélanocortine (POMC) est aussi le précurseur de la MSH (Melanocyte Stimulating Hormone), de la lipotropine (LPH) et de la corticotrophine (ACTH). En cas d'insuffisance surrénalienne périphérique et donc de levée du rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol, l'augmentation de la production d'ACTH a pour origine une majoration de la production de POMC conduisant simultanément à l'activation de la synthèse de la β-endorphine ainsi que des trois formes de la MSH (Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Clinique DCEM3 2005/2006 « Les analgésiques centraux » - L. Monassier - Mise à jour : janvier 2005) (131).

1.2.2.2. Les récepteurs

Les récepteurs opioïdes sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Cette famille comprend plusieurs centaines de membres au sein du génome des mammifères. Les récepteurs opioïdes μ , δ et κ constituent une sous-famille des GPCR, avec un quatrième membre correspondant au récepteur orphanine FQ / nociceptine. Ce dernier et ses ligands endogènes présentent une forte homologie de structure avec les récepteurs et peptides opioïdes. Toutefois, le récepteur ne lie pas les opiacés et le peptide orphanine FQ / nociceptine ne démontre aucune affinité envers les récepteurs μ , δ ou κ . Les quatre gènes

codant pour les récepteurs opioïdes présentent une organisation génomique semblable, avec des jonctions intron-exon conservées. Ces gènes ont été caractérisés à travers les vertébrés, mais n'ont pas pu être identifiés plus tôt dans l'évolution. Les quatre gènes sont appelés à Oprm1 (μ), Oprd1 (δ), Oprk1 (κ), et Oprl1 (orphanine FQ / nociceptine). Ces récepteurs sont classiquement appelés MOR (récepteur opioïde μ), DOR (récepteur opioïde δ), KOR (récepteur opioïde κ), et ORL-1 (opioïd receptor like-1), respectivement, à travers la littérature. Une nouvelle nomenclature des MOP (μ), DOP (δ), KOP (κ) et NOP (orphanine FQ / nociceptine) a été récemment proposée par l'union internationale de pharmacologie fondamentale et clinique (IUPHAR) pour unifier les abréviations des récepteurs. L'enképhaline et la β -endorphine ont une plus forte affinité pour les MOR et DOR, et la dynorphine a une plus forte affinité pour les KOR (153). Beaucoup de polymorphismes nucléotidiques ont été identifiés dans les séquences codantes et régulatrices des gènes humains des récepteurs opioïdes, et de grandes études génétiques sont en cours pour associer ces phénotypes avec des maladies neurologiques ou psychiatriques.

Ces récepteurs sont largement distribués dans tout le système nerveux (système limbique, voies nociceptives, axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien) et régulent plusieurs fonctions physiologiques, y compris la douleur, le stress, la récompense, la motivation, l'humeur (203) et autres fonctions autonomiques comme la respiration, la thermorégulation, la motilité gastrointestinale. Ils modulent aussi la réponse immunitaire (151).

Les récepteurs opioïdes constituent les principales cibles pour les médicaments opioïdes. En raison de leur fort potentiel thérapeutique pour le traitement des douleurs sévères, ces composés ont été étudiés pendant plusieurs décennies et des milliers de nouveaux dérivés synthétiques ont été développés. Ces efforts ont visé à augmenter la sélectivité des agonistes ou antagonistes envers les récepteurs opioïdes μ , δ ou κ , avec l'espoir que l'on pouvait distinguer les événements biologiques médiés par chaque type de récepteur et de déterminer si l'effet thérapeutique et les effets indésirables des opioïdes pourraient être dissociés (153). Ces études ont montré que chaque récepteur avait une distribution spécifique dans le système nerveux central (17), dont certaines régions exprimant les trois types de récepteurs (striatum et la corne dorsale de la moelle épinière), mais pas nécessairement dans les mêmes neurones, et d'autres régions présentant préférentiellement un seul type de récepteur (noyaux thalamiques pour le récepteur μ ou le claustrum pour le récepteur κ). Des études par hybridation in situ au niveau du SNC du rat ont démontré que l'ARNm du MOR était essentiellement localisé dans le bulbe olfactif, le noyau caudé-

putamen, le noyau accumbens, les noyaux thalamiques, l'hippocampe, l'amygdale, l'aire préoptique, le noyau du raphé, le LC, le noyau du tractus solitaire, la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale (198). En revanche, les ARNm du KOR ont été exprimés dans l'hippocampe, y compris le gyrus dentelé, l'hypothalamus et certains noyaux thalamiques et également dans le cortex, le noyau caudé putamen, le tubercule olfactif, le claustrum, l'amygdale, la substance noire, l'aire tegmentaire ventral, le noyau accumbens, la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale. L'ARNm du DOR a été principalement retrouvé dans le cortex cérébral, le tubercule et bulbe olfactif, l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus, le noyau caudé putamen, les noyaux pontiques et réticulaires, le noyau accumbens, la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale (94). Chez l'humain, une étude d'histochimie du cerveau en postmortem par hybridation in situ au 33P démontre une distribution de l'ARNm du MOR et du KOR dans le striatum, le thalamus, l'hypothalamus, le cortex cérébral, le cervelet et certaines zones du tronc cérébral et de la moelle épinière. Le DOR était surtout retrouvé au niveau du cortex cérébral avec une localisation modérée au niveau de l'hippocampe et du noyau pontique et une faible apparition dans le striatum, le thalamus et l'hypothalamus (232) (tableau I).

Tableau I. Distribution des récepteurs opioïdes au niveau du système nerveux chez le rat et l'humain

	MOR	DOR	KOR
Rat	bulbe olfactif, noyau caudé-putamen, noyau accumbens, noyaux thalamiques, hippocampe, amygdale, aire préoptique, noyau du raphé, LC, noyau du tractus solitaire, moelle épinière, ganglions de la racine dorsale	cortex cérébral, tubercule et bulbe olfactif, hippocampe, amygdale, hypothalamus, noyau caudé putamen, noyaux pontiques et réticulaires, noyau accumbens, moelle épinière, ganglions de la racine dorsale	hippocampe, y compris le gyrus dentelé, hypothalamus, certains noyaux thalamiques, cortex, noyau caudé putamen, tubercule olfactif, claustrum, amygdale, substance noire, aire tegmentaire ventral, noyau accumbens, moelle épinière, ganglions de la racine dorsale
Humain	striatum, thalamus, hypothalamus, cortex cérébral, cervelet, certaines zones du tronc cérébral et de la moelle épinière.	cortex cérébral, hippocampe, noyau pontique, striatum, thalamus, hypothalamus	striatum, thalamus, hypothalamus, cortex cérébral, cervelet, certaines zones du tronc cérébral et de la moelle épinière.

Une autre équipe, a démontré au niveau du cerveau du cochon de Guinée par autoradiographie et en utilisant la liaison au GTP γ S une fois le récepteur stimulé par l'agoniste spécifique, une distribution des RO semblable à celle retrouvée dans le SNC des rats (273). Cette étude a démontré que la distribution des récepteurs opioïdes est compatible avec leurs fonctions connues. La présence des récepteurs opioïdes dans le noyau accumbens et le cortex est compatible avec les effets de récompense des opioïdes (17, 304). La localisation de tous les récepteurs opioïdes dans l'hypothalamus reflète les actions neuroendocrines, dont la thermorégulation, l'homéostasie des fluides et la synthèse d'hormones (175, 112). Leurs niveaux élevés dans le mésencéphale, la protubérance et le bulbe rachidien sont compatibles avec les effets connus des opiacés sur la nociception (120, 186, 86) et la fonction cardiovasculaire et respiratoire (71, 20, 116, 235). Au niveau de l'hippocampe, les RO contrôlent les processus de cognition comme l'apprentissage et la

mémoire. Cependant, chaque récepteur est aussi impliqué dans une fonction distincte et à un degré différent (282). Globalement, il semble que les agonistes du récepteur μ présentent la meilleure activité antinociceptive, mais aussi le plus grand potentiel d'abus, que les agonistes des récepteurs δ pourraient présenter un potentiel moins addictif, tout en ayant une activité analgésique moindre, et enfin, que l'utilisation des agonistes du récepteur κ pour le traitement de la douleur devrait être limité à la périphérie en raison des fortes propriétés dysphoriques de ces composés (perturbations de l'humeur caractérisées par un sentiment déplaisant et dérangeant de tristesse, d'anxiété, de tension et d'irritabilité) (151).

Les récepteurs δ sont moins directement impliqués dans le contrôle hédonique (lié au plaisir). Très distincts des récepteurs μ et κ , les récepteurs δ régulent les réponses émotionnelles et montrent une activité anxiolytique et antidépressive. Cette fonction spécifique des récepteurs δ est maintenant confirmée tant par l'inactivation du gène codant pour le DOR et des études pharmacologiques utilisant le SNC-80, le seul composé que l'on peut administrer par voie systémique avec une spécificité accrue envers le DOR. L'inactivation du gène codant pour le MOR, quant à elle, produit l'effet contraire, en diminuant le taux de stress psychologique et de réactivité émotionnelle, confirmant l'effet anxiogène induit par le MOR et ses ligands (159). Les souris déficientes en MOR, DOR et KOR démontrent toutes une sensibilité accrue à la douleur. Cela indique que les trois récepteurs activés par les peptides opioïdes endogènes inhibent les réponses nociceptives. Visiblement, les phénotypes des souris mutantes diffèrent selon les modèles de douleur. Dans les modèles de douleur physiologique ou aiguë, les récepteurs μ modulent la nociception mécanique, chimique et thermique contrôlée au niveau supra spinal, tandis que les KOR modulent la nociception thermique à médiation spinale et la douleur viscérale. Encore une fois, les DOR diffèrent des MOR et des KOR dans le sens qu'ils n'interviennent pas dans la douleur aiguë. En revanche, il existe des preuves du rôle des DOR dans la réduction de l'hyperalgésie dans des situations de douleur inflammatoire et neuropathique. Ces données, combinées à de nombreuses études pharmacologiques, démontrent clairement un rôle spécifique de chaque récepteur dans la régulation de la douleur (153).

Les récepteurs opioïdes ont été aussi retrouvés en périphérie : sur les terminaisons périphériques des nerfs sensoriels de la synovie chez l'homme (215, 283), sur les fibres nerveuses dermiques et épidermiques, la pulpe dentaire et au niveau des fibres afférentes primaires ou ils modulent la douleur en périphérie (281). Aussi, les peptides opioïdes ont été trouvés dans les cellules humaines sous-cutanées et synoviales, les mastocytes, les

granulocytes, les lymphocytes et les macrophages. Les peptides dominants étaient la β -endorphine et la met-enképhaline, mais la dynorphine et les endomorphines ont également été détectées (121, 181, 215, 252, 283, 287). La présence du système opioïde au sein des cellules immunitaires démontre son rôle important dans la régulation de la douleur périphérique inflammatoire (276, 282). Dans ce contexte, on a démontré que l'inflammation favorise la synthèse et le transport axonal des récepteurs opioïdes au niveau des ganglions de la corne dorsale donc une efficacité accrue des agonistes opioïdes au niveau des terminaisons nerveuses périphériques (140). Plusieurs médiateurs de l'inflammation modulent la libération des opioïdes à partir des leucocytes, y compris les cytokines, les catécholamines, le CRF (corticotrophin releasing factor) et les chémokines (258, 253).

Les MOR, DOR et KOR ont été retrouvés au niveau du système nerveux entérique. Les MOR, retrouvés au niveau du plexus sous-muqueux et myentériques, sont les principaux responsables de la constipation provoquée par les opioïdes. En effet, l'activation des MOR inhibe la transmission synaptique au niveau du système nerveux entérique induisant une diminution de la motilité intestinale (126, 69, 125). Aussi, cette activation résulte en une diminution de la sécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau de la lumière intestinale et une augmentation de l'absorption de fluides par la paroi intestinale favorisant la constipation (127). L'équipe de Bigliardi et al. (24) ont montré que, chez les humains, les MOR sont exprimés dans les terminaisons nerveuses périphériques du derme et l'épiderme. Les kératinocytes environnants ces terminaisons, ainsi que les terminaisons nerveuses elles-mêmes produisent la β -endorphine, qui, à son tour, affecte directement l'expression des MOR sur les kératinocytes. La présence du système opioïde à ce niveau pourrait expliquer, en partie, la genèse du prurit induit par les opioïdes (247).

Une étude réalisée en 1985 a démontré l'existence de récepteurs opioïdes au niveau du cœur de rat (166). Il est clair que, sous certaines conditions telles que le stress, l'âge et les maladies cardiaques, les peptides opioïdes endogènes sont libérés par les myocytes pour activer les récepteurs opioïdes du myocarde et donc protéger le cœur (263). Les effets cardioprotecteurs des agonistes des RO ont été constamment démontrés dans différents modèles d'ischémie/reperfusion in vivo ainsi que in vitro (263).

Les MOR, DOR et KOR montrent une homologie de 60% dans la séquence d'acides aminés. Une forte homologie survient dans les sept domaines transmembranaires, qui contiennent la poche liant les opioïdes et au niveau des boucles intracellulaires et d'une

partie de la queue C-terminale adjacente au septième domaine transmembranaire. Les domaines extracellulaires, dont trois boucles extracellulaires et le domaine N-terminal, déterminent la sélectivité μ , δ et κ . Ces domaines varient fortement entre les récepteurs et probablement agissent comme une porte filtrant les agonistes ou antagonistes μ , δ et κ qui pénètrent après la poche de liaison. Des composés synthétiques ont été développés avec une forte sélectivité μ , δ , et κ , alors que les peptides endogènes montrent une préférence limitée des récepteurs (77, 152, 209, 316, 325) (figure 3 et 4). La troisième boucle intracellulaire a été impliquée dans la liaison aux protéines G, et la forte homologie en cette partie du récepteur suggère que les différents récepteurs opioïdes interagissent avec des complexes similaires de protéines G, bien que de petites différences aient été citées (58) (voir paragraphe suivant et figure 5). Les MOR, DOR et KOR couplent négativement l'adénylate cyclase, inhibent les canaux calciques voltage-dépendants, augmentent la conductance des canaux potassiques à rectification entrante, et stimulent la phospholipase C (PLC) (257). Les différences les plus marquées entre les récepteurs se trouvent dans les deuxième et troisième boucles extracellulaires ainsi que dans les domaines N et C-terminaux (figure 3). Basé sur des études antérieures des GPCR, il est probable que les résidus hydrophiles dans la septième hélice forment le noyau de la poche de liaison du ligand et que les différences dans les boucles extracellulaires sont celles qui déterminent la spécificité des ligands des trois récepteurs (325).

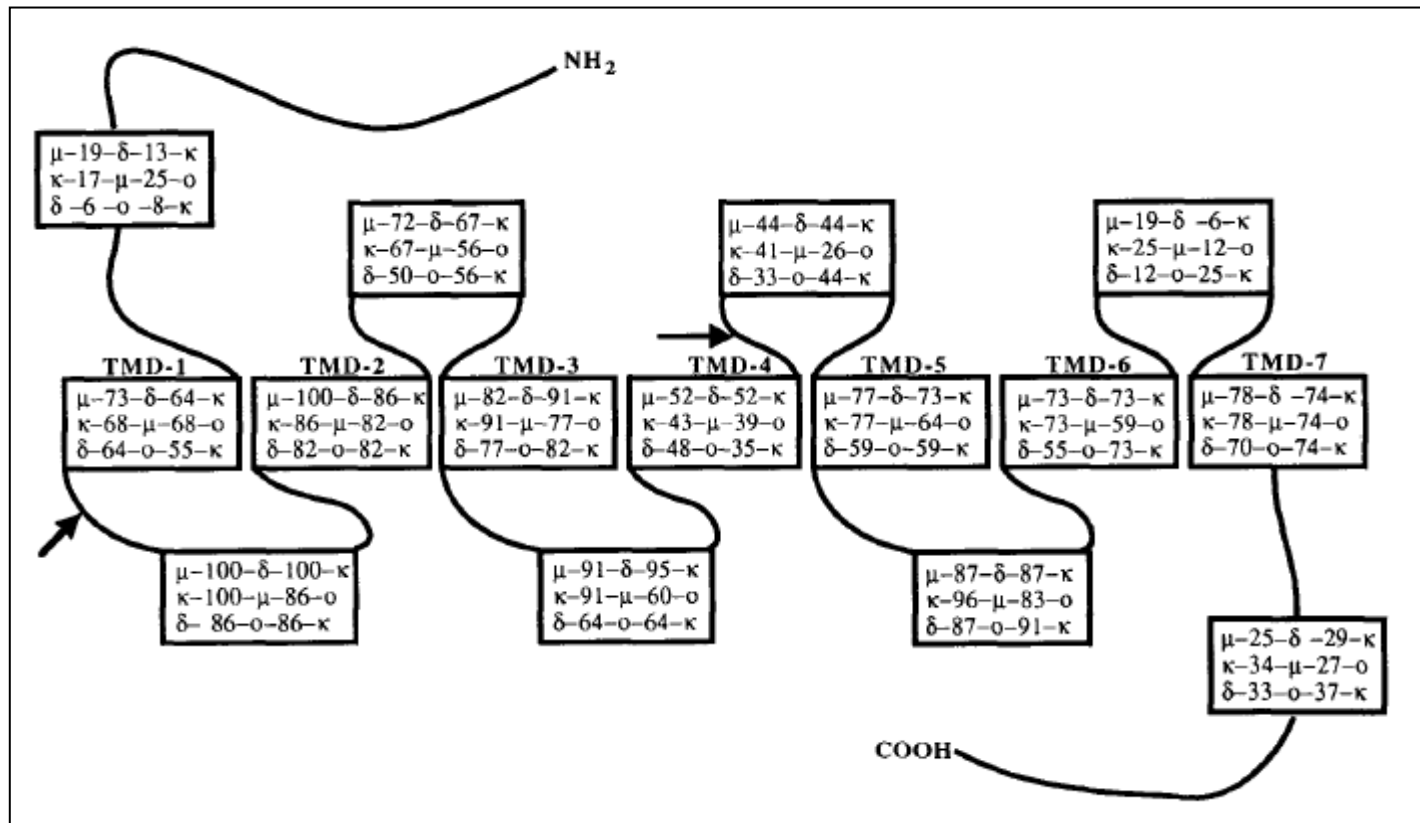


Figure 3. Illustration des homologies de domaines entre les membres de la famille des récepteurs opioïdes mu, delta, kappa et ORL.

Les nombres représentent le pourcentage d'homologie entre les séquences d'acides aminés et sont calculés à partir d'alignements en utilisant le logiciel MacVector, Kodak, New Haven, CT. Les flèches indiquent les frontières communes d'intron-exon dans la région codante pour les quatre membres de la famille des récepteurs opioïdes, TMD : domaine transmembranaire (Zaki et al, 1996) (325).

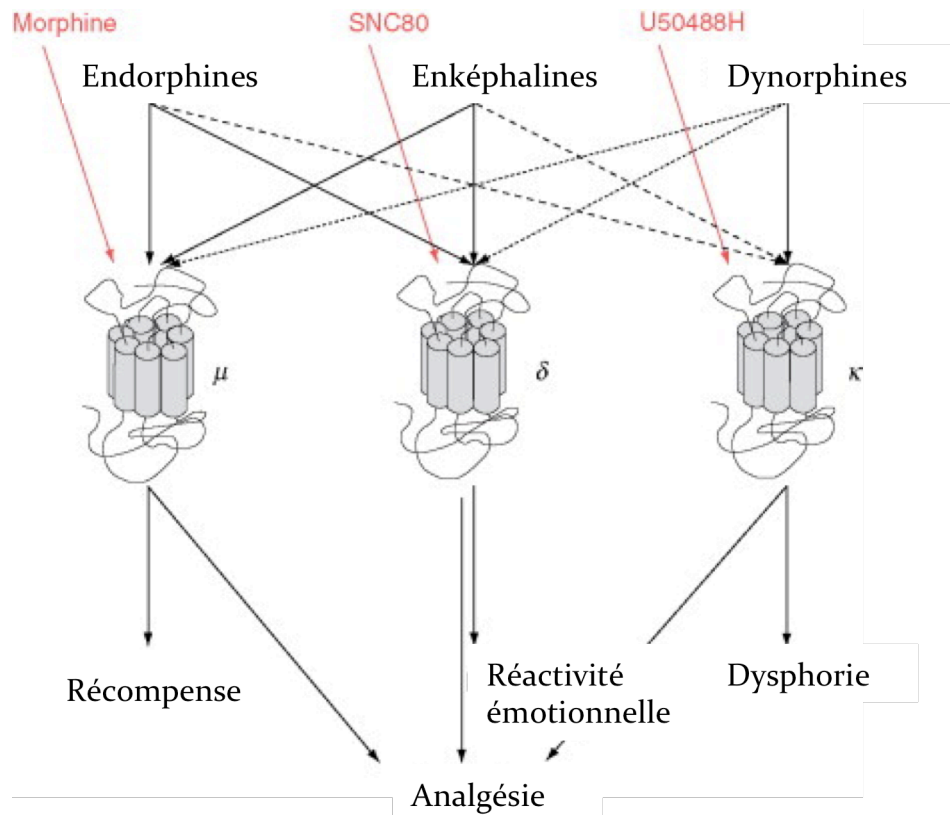


Figure 4. Rôle physiologique des récepteurs et peptides opioïdes in vivo.

Les peptides opioïdes démontrent une certaine sélectivité, bien que faible, envers les récepteurs μ , δ et κ . Un agoniste très sélectif exogène (morphine) ou synthétique (SNC-80 et U50488H) est indiqué pour chaque récepteur. La combinaison des études pharmacologiques avec des approches génétiques de knock-out (KO) (inactivation génique ciblée chez la souris) ont montré que chaque récepteur contrôle des réponses neuronales spécifiques. Les récepteurs μ et κ produisent l'euphorie ou la dysphorie, respectivement, tandis que les récepteurs δ contrôlent l'anxiété et la dépression (réactivité émotionnelle). L'activation de ces trois récepteurs inhibe la douleur (analgésie), mais chaque récepteur contrôle une modalité de douleur distincte (adapté de Kieffer et al, 2009) (153).

2. Voies de signalisation des récepteurs opiacés :

2.1. Protéines de signalisation, seconds messagers et effecteurs :

Les RO appartiennent à la superfamille des GPCR à 7 domaines transmembranaires (DTM) : 7 hélices hydrophobes connectées par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Le domaine N-terminal orienté du côté extracellulaire est opposé au domaine C-terminal intra cytoplasmique (25). Comme tous les GPCR, les récepteurs opioïdes transmettent des signaux extracellulaires au sein de la cellule en activant les protéines G hétérotrimériques, chacune composée de trois sous-unités, soit un des 23 isomères de la sous-unité α , un des 7 isomères de la sous-unité β et un des 12 isomères de la sous-unité γ (207). Les sous-unités β et γ forment un dimère qui ne se dissocie pas dans les conditions physiologiques, mais il demeure controversé si l'activation de la sous-unité α

crée ou non une dissociation avec le dimère $\beta\gamma$ (207). La sous-unité α est composée d'une hydrolase guanosine triphosphate (GTPase) qui convertit la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP) par hydrolyse, déclenchant son activation et le contrôle de la durée du signal en aval. C'est l'étape de la dissociation du GDP, permettant la liaison d'un nouveau GTP non-hydrolysé, qui constitue l'étape limitant de ce système de signalisation. La liaison de l'agoniste modifie la structure hélicoïdale du récepteur, et un réarrangement dans les DTM 3, 6 et 7 a été proposé pour induire la transition entre les conformations inactives et actives du récepteur. Ce mouvement hélicoïdal modifie la structure intracellulaire du récepteur, d'où l'interaction récepteur-protéines G. Les boucles intracellulaires constituent une grande partie de l'interface récepteur-protéines G. Une pléthore d'études sur les GPCR à 7 DTM ont établi le rôle essentiel de la deuxième et troisième boucles intracellulaires plus, au moins dans certains récepteurs, la portion proximale de la partie C-terminale dans le couplage à la protéine G (95). Pour le DOR, une étude de mutagenèse incluant 30 mutations a proposé une activation du récepteur par le ligand comme suit : l'agoniste opioïde se lie à la partie hydrophobe de la boucle extracellulaire 3 et éventuellement dans la région N-terminale, déstabilisant ainsi les interactions de DTM6 et DTM7 près du côté extracellulaire du récepteur. Le ligand pénètre ensuite dans la poche de liaison et perturbe les interactions hydrophobes et hydrophiles au sein des hélices 3, 6 et 7. Il en résulte des mouvements de ces hélices et la propagation ultérieure de ces mouvements dans le récepteur. Ce mouvement aboutit finalement à une rupture des liaisons cytoplasmique ioniques et éventuellement l'exposition des domaines intracellulaires des récepteurs aux protéines G et d'autres protéines effectrices (70). Ces domaines intracellulaires sont presque identiques pour les récepteurs μ , δ et κ , confirmant le fait que les trois récepteurs interagissent majoritairement avec les protéines G inhibitrices de type G_o/G_i : G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_{o1} , G_{o2} , sensibles à la toxine pertussique, bien que le couplage aux protéines G_s ou G_z , insensibles à la toxine pertussique, a également été rapporté (60, 90, 119). Les MOR n'activent pas G_q , G_{11} , G_{12} , G_{13} et G_{14} et il existe un couplage différentiel des différents RO pour la plupart des protéines G. Les MOR, DOR et KOR semblent préférentiellement activer G_o et G_{i2} bien qu'il y ait des preuves que les MOR montrent une préférence pour G_{i3} (90). Les DOR couplent à G_{16} plus efficacement que le font les MOR et les KOR. Il existe certaines preuves que les RO, en particulier les MOR et ORL1, peuvent aussi coupler à des effecteurs cellulaires de manière indépendante de la protéine G (58). En effet, il a été démontré que dans des cultures de

cellules chromaffines de la médullosurrénale bovine, la modulation de l'activité du canal potassique par le MOR n'a pas été bloquée par un traitement à la PTX (toxine pertussique qui inhibe la protéine G α i), ni par l'inclusion de nucléotides inhibiteurs ou activateurs des protéines G hétérotrimériques dans l'électrode d'enregistrement. La même observation a été émise quant au récepteur ORL1 (58).

Dans certains neurones, les MOR s'associent au G α s, un stimulant de l'adénylate cyclase et de l'AMPc et un sous-type de protéine G qui est particulièrement intéressant, étant donné que son activation est associée à une analgésie inexistante ou même à la douleur (97).

Les sous-unités α et $\beta\gamma$ de la protéine G modulent l'activité des effecteurs intracellulaires. Plusieurs événements de signalisation ont été identifiés dans des cellules transfectées et les tissus natifs. En effet, les opioïdes inhibent l'adénylate cyclase via la sous-unité α de la protéine G diminuant la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) affectant à la fois les événements cytoplasmiques et l'activité transcriptionnelle de la cellule (187, 322). Aussi, les opioïdes inhibent les canaux Ca $^{2+}$ voltage-dépendants ou activent les canaux potassiques à rectification entrante (301), par l'intermédiaire des sous unités $\beta\gamma$, ce qui diminue la libération des neurotransmetteurs et l'excitabilité neuronale (322) (figure 5). De plus, l'interaction de la sous-unité $\beta\gamma$ avec la phospholipase C et A2 induit la production ultérieure de phosphatidyl inositol 3 (IP3) et diacylglycérol (DAG), qui stimulent la libération du calcium intracellulaire et activent la PKC. Cette action des opioïdes est soit significativement améliorée ou complètement dépendante de la co-activation des récepteurs qui sont directement couplés à la phospholipase (322). Globalement, les opioïdes inhibent les neurones en diminuant soit les décharges neuronales ou la libération des neurotransmetteurs, en fonction de la localisation des récepteurs post ou pré-synaptique. Les récepteurs opioïdes sont exprimés sur les neurones excitateurs et inhibiteurs, et peuvent donc exercer une inhibition ou désinhibition dans les circuits neuronaux, lesquelles se manifestent par l'analgésie.

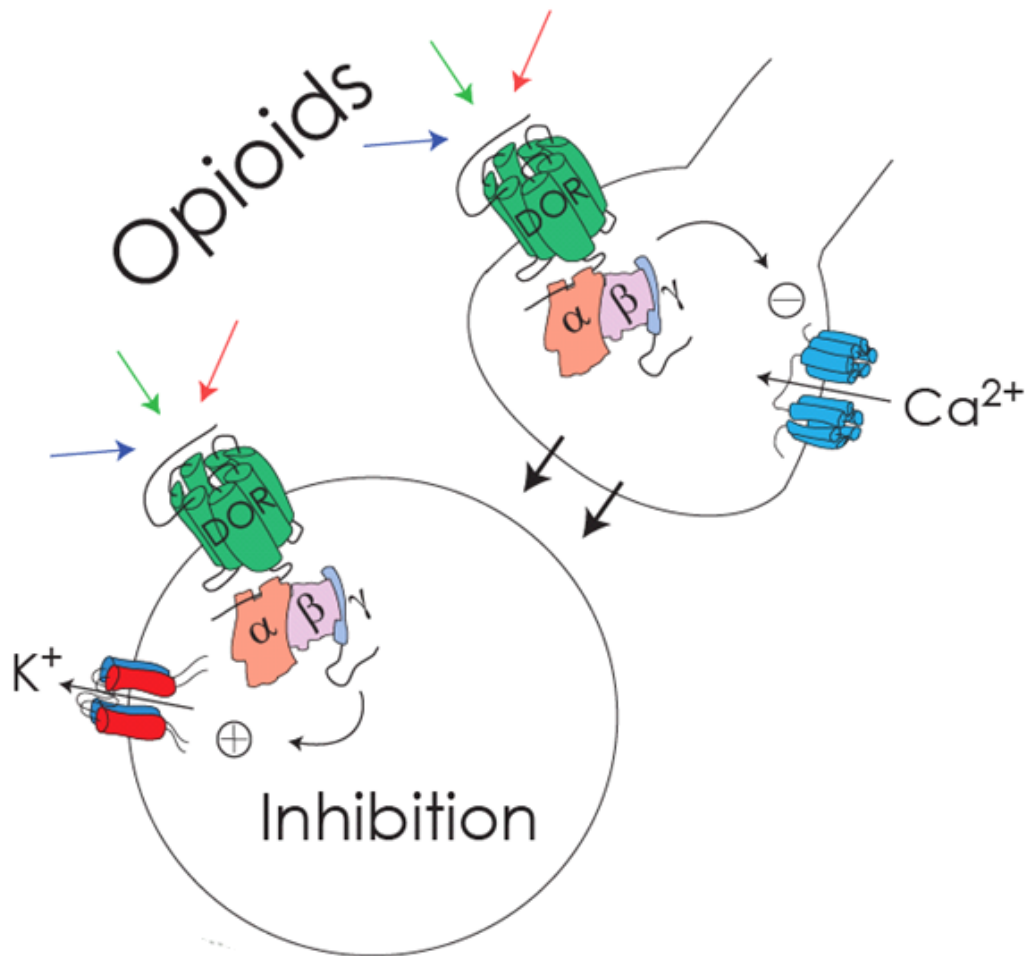


Figure 5. Actions des récepteurs opioïdes sur les canaux calciques et potassiques.

L'activation des récepteurs opiacés entraîne la fermeture des canaux calciques réduisant la libération de neurotransmetteurs par les nocicepteurs et active les canaux potassiques causant une réduction de l'excitabilité des neurones post-synaptiques (adapté de Audet et al , 2010) (10).

2.2. Protéines de régulation :

L'activation d'un RO par un agoniste induit non seulement le déclenchement de voies de signalisation mais aussi une régulation de l'activité du récepteur. Cette régulation dite « négative » permet un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. Pour être effective, cette régulation nécessite un découplage physique entre le récepteur et la protéine $G\alpha$. Ce phénomène, défavorisant le couplage du récepteur à ses partenaires et induisant une atténuation de la transmission du signal en provenance de ce dernier, est connu sous le nom de désensibilisation. Plusieurs protéines sont impliquées dans ce phénomène de régulation. Elles vont ainsi tout à la fois, stimuler l'initiation de certaines voies de signalisation et constituer des pierres angulaires des mécanismes de rétrocontrôles assurant l'atténuation et

la terminaison du signal initié par un récepteur donné. Ce mécanisme de désensibilisation spécifique d'un récepteur donné, activé par son ligand est dit homologue. Il peut également s'étendre à d'autres récepteurs et avoir des conséquences plus larges sur l'ensemble de la signalisation cellulaire, dites hétérologues, par l'intermédiaire de protéines kinases comme PKA ou PKC aux multiples cibles potentielles (183). En d'autres termes, on doit distinguer la désensibilisation homologue, induite par la liaison de l'agoniste au récepteur, de la désensibilisation hétérologue qui est elle indépendante d'un ligand spécifique mais provoquée par l'activation d'un autre récepteur sur la même cellule. Ce phénomène est lié au fait que les kinases dépendantes des seconds messagers vont phosphoryler non seulement les récepteurs activés par les agonistes mais aussi les récepteurs n'ayant pas été stimulés préalablement par un ligand. Les mécanismes de désensibilisation des RO incluent le découplage fonctionnel des protéines G, l'internalisation du récepteur et sa régulation négative (183). Parmi les acteurs de désensibilisation des RO, on retrouve entre autres, les protéines kinases activées par des seconds messagers tels que l'AMPc (PKA), le GMPc (PKG), le calcium et le DAG (PKC) et le Ca^{2+} /calmoduline (CaMKII) ainsi que les kinases plus spécifiques des GPCR : les GRK et les kinases activées par les mitogènes : MAPK (183, 317). En effet, plusieurs études ont démontré un parallélisme entre la phosphorylation des RO et la désensibilisation induite par l'agoniste (183). Ces kinases phosphorylent les RO sur des résidus sérine/thréonine, localisés dans leur extrémité C-terminale (117) et dans les domaines intracellulaires (84).

2.2.1. Les kinases

2.2.1.1. Les GRK

Les GRK sont une famille de kinases qui phosphorylent spécifiquement le récepteur activé par l'agoniste (237). La famille des GRK est composée de sept membres qui partagent une homologie de séquence significative. Chaque membre contient un domaine central catalytique, un domaine N-terminal pensé pour être important dans la reconnaissance du substrat et qui contient un domaine homologue au domaine RGS (régulateur de la signalisation des protéines G), et un domaine C-terminal qui contribue à l'envoi de la kinase vers la membrane plasmique. Elles diffèrent essentiellement par leur extrémité C-terminale, alternativement modifiée par des groupements lipidiques (acylation ou farnésylation) ou présentant un domaine de liaison au complexe $\text{G}\beta\gamma$ (286). La famille des GRK peut être regroupée en trois sous familles en fonction de leur homologie de séquence: 1) GRK1 (rhodopsine kinase) et GRK7 (un nouveau candidat à cône opsine kinase) 2)

GRK2 (kinase du récepteur β -adrénergique 1 : β -ARK1) et GRK3 (β -ARK2) et 3) GRK4, GRK5 et GRK6 (figure 6) (84). Toutes ces kinases partagent un même domaine RGS N-terminal ainsi qu'un domaine catalytique central. Elles se distinguent néanmoins par leur domaine C-terminal qui va définir leurs propriétés d'association aux membranes. La GRK1 et GRK7 vont être farnésylées au niveau d'un motif CAAX. La GRK2 et GRK3 vont quant à elles présenter un domaine d'homologie à la pleckstrine. La GRK5 présente une séquence riche en résidus basiques lui conférant une affinité pour les phospholipides. Finalement les GRK 4 et 6 vont être palmitylées au niveau de résidus cystéines (84). Dans les cellules non stimulées, les GRK 1, 2 et 3 sont localisées dans le cytosol et leur translocation à la membrane a lieu suite à l'activation du récepteur par l'agoniste. Les GRK 4, 5 et 6 présentent toutes une localisation membranaire. La palmitoylation des GRK 4 et 6 semble essentielle pour leur localisation membranaire. L'association de la GRK5 à la membrane plasmique pourrait être expliquée par une interaction électrostatique entre 46 résidus acides aminés basiques contenus dans la partie C-terminale de la kinase et les phospholipides membranaires (169, 240).

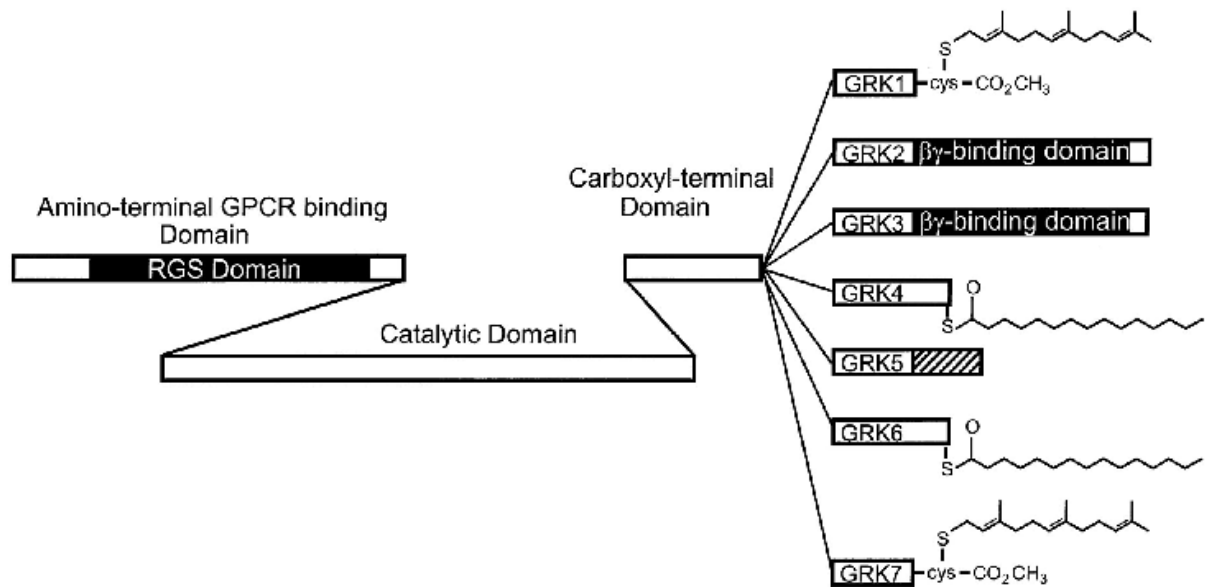


Figure 6. Représentation schématique des différentes protéines de la famille GRK (GRK1-GRK7)

Le domaine N-terminal des GRK1-GRK7 contient une région RGS conservée. Toutes ces GRK partagent le même domaine catalytique mais diffèrent au niveau de la région C-terminale. La GRK1 et GRK7 vont être farnésylées au niveau d'un motif CAAX. La GRK2 et GRK3 présentent un domaine d'homologie à la pleckstrine. La GRK5 présente une séquence riche en résidus basiques lui conférant une affinité pour les phospholipides et les GRK 4 et 6 sont palmitylées au niveau de résidus cystéines (figure adaptée de Stoffel et al., 1994) (286).

L'équipe de Chakrabarti et celle de Hurlle ont démontré que le traitement opioïde conduit à la régulation à la hausse de diverses GRK et de la β arr 2 in vivo (43, 132). Les études cellulaires ont montré que la phosphorylation du récepteur par la GRK et sa liaison ultérieure à la β arr sont des étapes essentielles dans la désensibilisation de nombreux GPCR. La phosphorylation par la GRK augmente l'affinité des GPCR à la β arr qui est requise dans la formation de puits recouverts de clathrine et des vésicules au cours de l'internalisation du récepteur. L'équipe de Christie et al. a démontré que l'inhibition de l'action de la GRK2 bloque la désensibilisation du MOR suite à un traitement chronique à la morphine (63). Aussi, une étude récente réalisée en 2011 a montré que la désensibilisation et la tolérance cellulaire ont été diminuées en utilisant un inhibiteur de la GRK2 : le NaPP1 dans les neurones du LC (voir détails dans la section lien entre désensibilisation et tolérance) (246). Par ailleurs, la phosphorylation prolongée du KOR médiée par la GRK3 est responsable d'une tolérance analgésique soutenue chez les souris.

En effet, cette étude a démontré que le knock-out de la GRK3 induit une tolérance analgésique significativement moindre que chez les souris natives (208).

2.2.1.2. Les PKC

C'est une famille de sérine/thréonine kinases avec 11 isoformes (226). Elles sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la signalisation, la modulation de l'expression génétique, la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la mort cellulaire (299). En se basant sur la structure primaire et la nature des cofacteurs, ces kinases peuvent être divisées en trois groupes. Le groupe des PKC conventionnelles (PKCc) comprend les PKC α , β I, β II, et γ , qui sont activés par le calcium et le diacylglycérol. En revanche, les PKCn (nouvelles PKC), y compris les isoformes δ , ϵ , η , θ et μ ne semblent pas avoir besoin du calcium pour leur activation. Les deux isoformes moins caractérisées, ζ et λ appartiennent à la classe des PKC atypiques (PKCa) et sont activées par la phosphatidylsérine, un composant de la bicouche de phospholipides (317). La structure des PKC est constituée d'un domaine de régulation et d'un domaine catalytique attachés entre eux par une région charnière. La région catalytique est hautement conservée entre les différentes isoformes. La différence entre les isoformes réside au niveau de la région régulatrice (figure 7) (299).

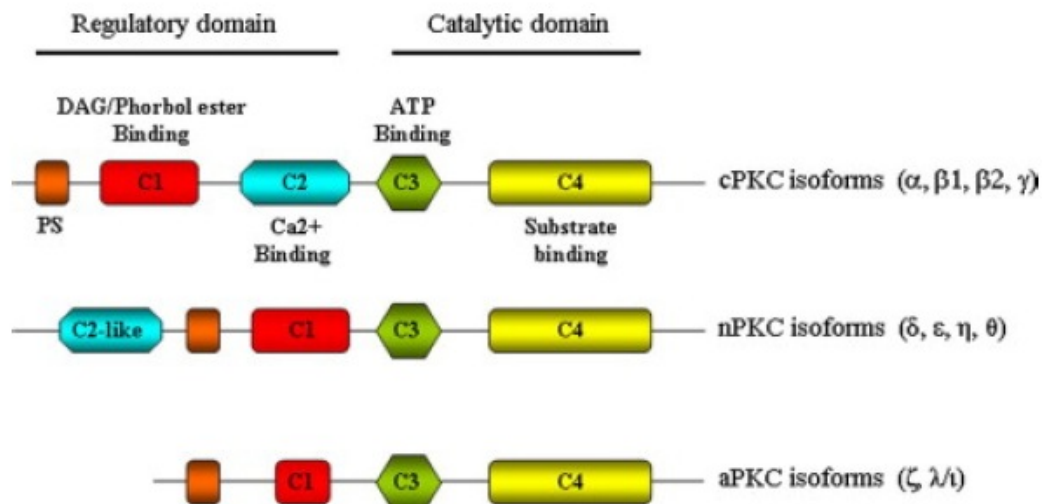


Figure 7. Structure des isoformes de la PKC

Les isoformes de la PKC sont divisés en 3 groupes qui contiennent des régions conservées (C1-C4). Les cPKC ou PKC conventionnelles sont activées par le calcium qui lie la région C2 et par le diacylglycérol (DAG) et les phorbol esters liant la région C1. Les nPKC ou nouvelles PKC ne possèdent pas le site de liaison au calcium dans leur région C2 et sont seulement activées par le DAG et les phorbol esters via leur liaison à la région C1. Les aPKC ou PKC atypiques manquent complètement la région C2 et possèdent un domaine C1 modifié liant les céramides et les phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphates. Toutes les PKC possèdent une séquence de pseudosubstrat autoinhibiteur (PS) attaché au domaine catalytique et bloquant l'accès du substrat dans l'état basal de la kinase, jusqu'à ce que les activateurs induisent des changements conformationnels et favorisent l'accès du substrat. Les régions C3 et C4 sont des séquences hautement conservées qui lient l'ATP et les substrats des protéines, respectivement (Turban et al, 2011) (299).

La phosphorylation des RO, protéines G et AC (adénylate cyclase) par la PKC est impliquée dans la désensibilisation, internalisation et régulation négative des RO ainsi que dans la super sensibilisation de l'activité de l'AC (voir détails plus loin, paragraphe 3.2.2.1) (183). D'autres études ont, en revanche, pu montrer que la PKC serait plutôt impliquée dans la désensibilisation hétérologue du MOR (199). La désensibilisation hétérologue ou désensibilisation croisée se caractérise par une désensibilisation de plusieurs GPCR après l'activation prolongée d'un seul (199). L'activation de la PKC résulte de la translocation de la kinase du cytosol vers la membrane plasmique, qui a été utilisée comme un indicateur de l'activation de la PKC (226). La liaison de la PKC à la membrane, telle que révélée par autoradiographie, est augmentée chez les animaux tolérants aux opioïdes (206). Aussi, un traitement chronique à la morphine augmente l'activité enzymatique de la PKC (220). De plus, divers inhibiteurs de la PKC ont été utilisés dans différents modèles animaux et le résultat était toujours une diminution de la tolérance analgésique aux opiacés : DAMGO ([D-Ala(2),N-Me-Phe(4),Gly(5)-ol]-enképhaline), morphine et étorphine (317). Les

isoformes α , β et γ ont été les plus impliquées dans la perte de l'efficacité analgésique (317).

En résumé, un certain nombre d'études de plusieurs laboratoires différents ont identifié de manière indépendante le rôle crucial de la PKC dans la tolérance aux opiacés. Il est encore énigmatique comment l'activation de la PKC induit une tolérance aux opiacés car on devait s'attendre à une désensibilisation de la kinase après son activation prolongée (317). Un mécanisme plausible serait l'interaction de la PKC avec les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Les récepteurs NMDA, membres de la famille des canaux ioniques ligand-dépendants, répondent au glutamate, un acide aminé excitateur. La phosphorylation des récepteurs NMDA est un moyen essentiel pour réguler la fonction des canaux ioniques, qui sont perméables au calcium. Il a été démontré que la phosphorylation des récepteurs NMDA par la PKC active ces récepteurs (149,192). Par conséquent, la PKC activée suite à un traitement opioïde chronique peut potentiellement augmenter l'activité des récepteurs NMDA. Ces récepteurs activés sont perméables au calcium qui, à son tour, peut activer davantage la PKC. En conséquence, une boucle de contrôle positif entre la PKC et les récepteurs NMDA peut exister lors de la genèse de la tolérance aux opiacés, même si un tel mécanisme n'a pas encore été testé. Dans ce contexte, les antagonistes des récepteurs NMDA ont été démontrés très efficaces pour atténuer la tolérance aux opiacés (297, 298).

2.2.1.3. La CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)

Ces kinases, régulées par le complexe Ca^{2+} /Calmoduline, et dont les isoformes α et β sont largement exprimées dans le SNC, sont multifonctionnelles. En effet, outre leur rôle dans la mémoire et l'apprentissage, ces kinases sont impliquées dans la désensibilisation des RO (78) et le développement de la tolérance (195). En effet, l'équipe de Koch et al. a démontré que la désensibilisation des MOR dépend de la phosphorylation médiée par la CaMKII dans les cellules HEK-293 (158). Cet effet est nettement atténué par mutagenèse dirigée des sites de phosphorylation par la CaMKII sur la troisième boucle intracellulaire des MOR (158). Des données récentes démontrent que le traitement morphinique aigu et chronique module l'expression et l'activité de la CaMKII dans les cellules NG108-15 (189). Les inhibiteurs de l'activité de la CaMKII (KN62, KN93) atténuent fortement le développement de la tolérance et la dépendance physique en réponse à un traitement de morphine chronique. Les mécanismes de régulation de l'activité de la CaMKII suite à une exposition

aux opioïdes demeurent inconnus. Cependant, des mécanismes spéculatifs ont été émis (183). En effet, vu que la CaMKII phosphoryle le CREB (protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc) et médie l'activation de la MAPK et que le rôle du CREB et de la MAPK dans les mécanismes de tolérance aux opiacés sont bien décrits, plusieurs lignes d'évidence soutiennent le rôle de la phosphorylation médiée par la CaMKII dans le développement de la tolérance aux opiacés (134, 170, 224). Les mécanismes par lesquels les récepteurs opioïdes modulent l'activité de la CaMKII restent flous. L'activation de récepteurs MOR par la morphine provoque l'hydrolyse du phosphatidyl inositol, la formation de l'inositol, et la libération subséquente du calcium des réserves intracellulaires. Un autre mécanisme pourrait impliquer les courants calciques médiés par les récepteurs NMDA et l'activation en aval de la CaMKII, bien qu'il n'y ait pas de preuve directe pour soutenir ces mécanismes dans les cellules tolérantes aux opioïdes (183). La sur-activation de la voie de l'AMPc après un traitement opioïde chronique est un autre mécanisme possible pour la phosphorylation médiée par la CaMKII et la modulation de son activité. Malgré leur plausibilité, ces mécanismes restent spéculatifs et d'autres études sont nécessaires pour établir les mécanismes de régulation de l'activité de la CaMKII suite à l'exposition aux opiacés (183).

2.2.1.4. Les MAPK

Plusieurs études ont démontré le couplage fonctionnel des RO aux MAPK (36, 87, 180). Les MAPK sont une famille de sérine/thréonine kinases qui répondent à des stimuli extracellulaires (mitogènes, stress osmotique, choc thermique et cytokines pro-inflammatoires) et régulent diverses activités cellulaires, telles que l'expression des gènes, la mitose, la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la survie cellulaires (231). Elles jouent un rôle crucial dans la transduction du signal en aval des tyrosine-kinases et des protéines Ras et Raf. Les MAPK régulent les protéines du cytosquelette, la PLA2 et des facteurs de transcription comme le Fos B, C-Myc, Elk-1 et ATF-2. Cette famille de kinases inclue les ERKs 1-8 (extracellular signal-regulated kinases), les JNKs (c-Jun N-terminal kinases), les p38 et les p57 (231).

La stimulation des MOR induit l'activation et la translocation nucléaire significative des MAPK dans les cellules HEK-293 (262). Les MAPK semblent également être impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation des MOR et des DOR (134, 262). Un inhibiteur de MAPK1 (PD98059) a non seulement empêché l'activation de la MAPK, mais aussi inhibé la désensibilisation homologue des MOR en empêchant leur phosphorylation (262).

Aussi, l'internalisation du DOR induite par le ligand a été requise afin d'activer les MAPK dans cellules mammifères transfectées (134).

2.2.1.5. Les PKA

La protéine kinase dépendante de l'AMPc ou PKA est une holoenzyme tétramérique formée de l'association de deux domaines régulateurs constitutivement dimériques et de deux domaines catalytiques. La liaison de l'AMPc aux sous unités régulatrices initie la dissociation du complexe et l'activation de l'enzyme. La PKA, modulée par plusieurs drogues opioïdes, module à son tour de nombreux effecteurs (223). Outre les récepteurs, la PKA phosphoryle de nombreux canaux ioniques et protéines cellulaires. Alors que l'activation des RO conduit à une inhibition de l'adénylate cyclase, il est peu probable que la PKA joue un rôle dans les mécanismes de régulation à court-terme puisque cette enzyme est activée par l'AMPc. L'augmentation de l'activité de cette sérine/thréonine kinase, suite à la super activation de la voie d'AMPc lors d'un traitement chronique à la morphine, a été impliquée dans la neuroadaptation cellulaire induite par un traitement prolongé aux opioïdes (314), bien que les études avec des inhibiteurs de la PKA ont démontré des résultats contradictoires quand au rôle de la PKA dans la tolérance (317). La PKA n'est pas impliquée dans la désensibilisation des récepteurs opioïdes (42).

2.2.1.6. Les PKG

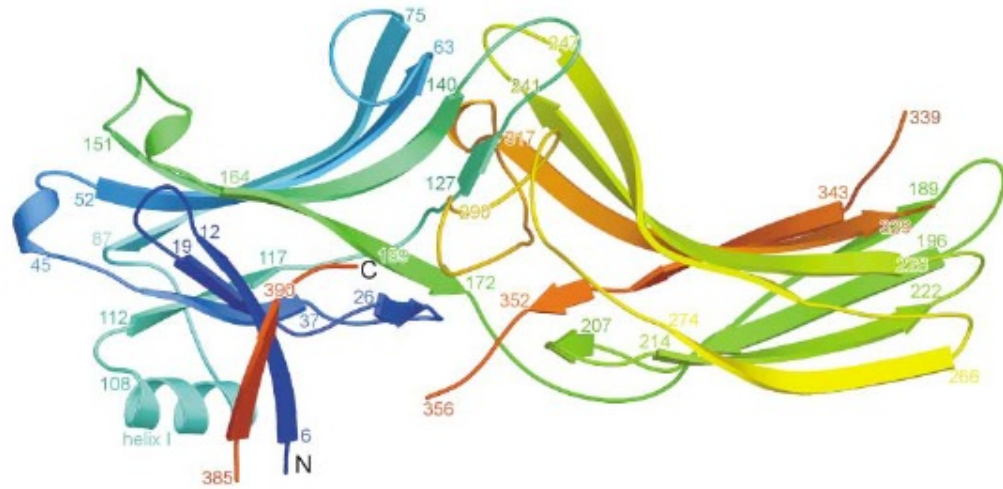
La PKG est largement exprimée dans le SNC et autres tissus. Deux gènes codant pour la PKG I et la PKG II ont été identifiés chez les mammifères. Cette kinase a été impliquée dans la phosphorylation et la désensibilisation de nombreux GPCR (256). Activée par le GMPc, cette kinase a été aussi citée parmi les kinases ayant un rôle dans le développement de la tolérance analgésique aux opiacés (317). Bien que la GMPc est un second messenger important dans le SNC, on connaît peu son action dans la tolérance aux opiacés. Dans une étude publiée, l'inhibiteur de PKG (KT-5823) empêche la tolérance à la morphine s'il est donné par voie intrathécale, mais pas intracérébroventriculaire (23). Des preuves plus indirectes viennent des études examinant la voie d'activation majeure de la PKG par l'oxyde nitrique (NO), l'activation de la guanylyl cyclase sensible au NO et l'augmentation du taux de GMPc intracellulaire (317).

2.2.2. Les β -arrestines

Une série d'expériences de reconstitution in vitro impliquant des complexes β 2AR (récepteur β 2 adrénergique) et l'activité de l'AC conduit à la conclusion que la désensibilisation des GPCR implique minimalement deux étapes, la phosphorylation GRK

dépendante des résidus sérine/thréonine des récepteurs stimulés suivie d'une interaction de haute affinité entre le récepteur et les β -arrestines (β arr) 1 et 2 (21). Les β arr constituent une famille de protéines solubles capables d'empêcher complètement l'interaction récepteur/protéine G en agissant comme cofacteurs des GRK (désensibilisation homologue). Elles interfèrent stériquement au niveau de l'interface récepteur/protéine $G\alpha$ à l'issue de leur recrutement par le récepteur activé. La β arr exhibe néanmoins une faible affinité pour le récepteur activé et c'est la phosphorylation de ce dernier par les GRK qui favorise le passage de la β arr dans un état de haute affinité pour le récepteur. L'interaction initiale entre la β arr et le récepteur activé mettrait en jeu des résidus polaires pointant au niveau des surfaces concaves de chacun des domaines en feuillet beta de la protéine (figure 8A). En détruisant ce réseau de résidus polaires, les résidus phosphorylés du récepteur favoriseraient une conformation de la β arr exhibant une affinité supérieure vis à vis du récepteur (313) (figure 8B).

A



B

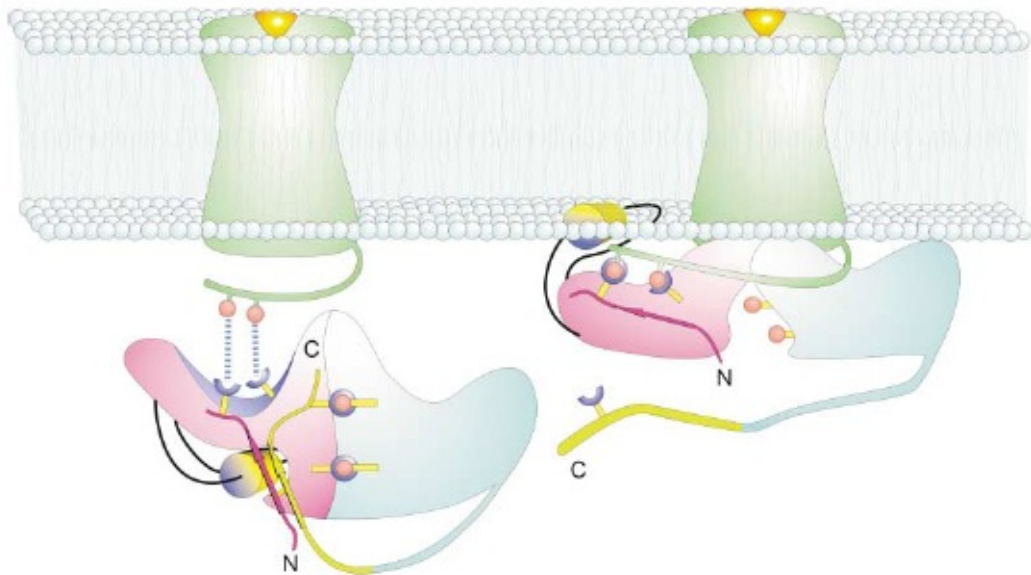


Figure 8. Diagramme en ruban de la β -arrestine et ses mécanismes de liaison au récepteur.

A) Diagramme en ruban de la β arr. Les brins sont colorés du bleu vers l'orange en fonction de leur distance de l'extrémité N-terminale. Les domaines N et C-terminaux sont indiqués par N et C respectivement. B) Mécanismes proposés de liaison du récepteur à la β arr. Les domaines N et C terminaux sont en rose et en bleu, respectivement. Le noyau polaire est localisé à l'interface entre les domaines N et C terminaux et est représenté par des interactions entre charges (points rouges et bleus). La queue C-terminale est en jaune-vert alors que la queue N-terminale est en magenta. Les charges positives et négatives sont représentées en bleu et rouge, les portions hydrophobes sont en jaune. Le récepteur activé est en vert (Han et al, 2001) (111).

A ce jour, six membres de la famille des β arr ont été identifiés et divisés en quatre sous-groupes en fonction de l'homologie de séquence et de la distribution tissulaire : (1) l'arrestine visuelle (ou antigène S) des cellules en bâtonnet découverte de par sa liaison à la rhodopsine (168). (2) la β -arrestine 1 (aussi appelée arrestine 2) et la β -arrestine 2 (ou arrestine 3) nommées ainsi pour leur rôle dans la désensibilisation du récepteur β 2AR (9, 188). Ces deux protéines sont exprimées de manière ubiquitaire avec cependant une concentration accrue dans les tissus lymphatiques. (3) l'arrestine C (ou arrestine 4 et arrestine X) des cellules en cône (59, 217). (4) l'arrestine D et l'arrestine E (séquences encore partielles) ne sont pas caractérisées mais montrent une distribution tissulaire diffuse (59, 85). De plus, des variants d'épissage sont connus pour les arrestines 1, 2 et 3 (tableau II).

Tableau II: Propriétés moléculaires des arrestines.

Nomenclature des arrestines	Autres noms	Distribution tissulaire	Localisation chromosomique	Régulation	Spécificité
Arrestine	Antigène S	cellules en bâtonnets	2q37	3 variants d'épissage : 404, 396, 370	$\rho >> \beta_2AR \sim M_2 \text{ mACHR}$
Arrestine-2	β arrestine ou β arrestine-1	ubiquitaire	11q13	2 variants d'épissage : 418, 410, liaison à la clathrine	$\beta_2AR \sim M_2 \text{ mACHR} > \rho$
Arrestine-3	β arrestine-2	ubiquitaire	17q13	2 variants d'épissage : 420, 409, liaison à la clathrine	$\beta_2AR \sim M_2 \text{ mACHR} > \rho$
Arrestine-4	arrestine-C ou arrestine X	cellules en cônes	X cen-q21	388	inconnue

ρ , rhodopsine ; β 2AR, récepteur β 2-adrénérique ; M2 mACHR, récepteur muscarinique de type M2 (adapté d'après Krupnick et al , 1998 et Penn et al, 1998) (167, 234).

La découverte et le clonage des β arr 1 et 2 a suivi immédiatement la caractérisation de l'arrestine visuelle. Ces trois protéines ont été identifiées comme médiateurs cruciaux de la désensibilisation de leurs GPCR apparentés. Les GRK 1 et 7 phosphorylent le opsines visuelles, alors que les GRK 2, 3, 4, 5 et 6 régulent les divers membres des GPCR ainsi que

d'autres récepteurs de surface cellulaire (178).

La famille des arrestines présente une organisation structurale comme le montre la figure 9. Dans le cas des β arr 1 et 2, d'autres domaines fonctionnels s'ajoutent y compris ceux responsables de la liaison à la protéine adaptatrice AP2 et ceux reconnaissant les kinases comme la tyrosine kinase Src et les MAPK (178).

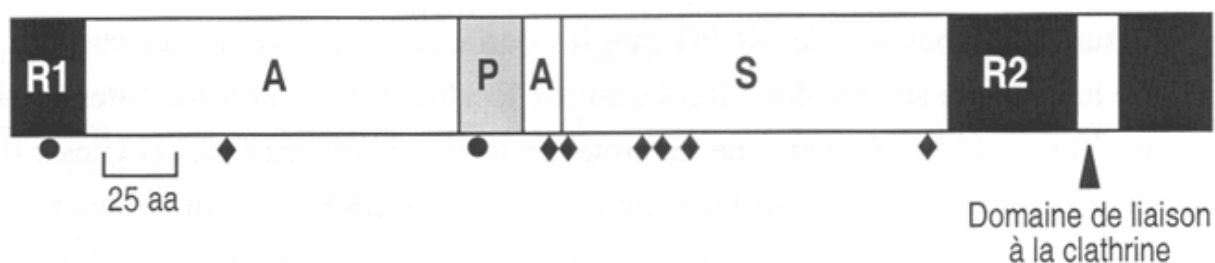


Figure 9 : Organisation structurale des arrestines.

Ces protéines peuvent être divisées en plusieurs domaines fonctionnels : A, domaine de reconnaissance de l'état activé du récepteur ; P, domaine de reconnaissance du degré de phosphorylation du récepteur ; R1, R2, régions régulatrices N- et C-terminales ; S, site secondaire d'interaction avec le récepteur ; (losange), site potentiel de phosphorylation par la PKC ; (cercle), site potentiel de phosphorylation par la kinase GMPc dépendante et par la PKC. Les β arr 1 et 2 présentent une région C-terminale additionnelle de 15 acides aminés responsable de la liaison à la clathrine (Ferguson et al, 1998) (85).

L'interaction entre la β arr et le récepteur dévoilerait également des interfaces de liaison pour plusieurs partenaires comme la clathrine. En effet, les β arr participent également à l'endocytose du récepteur dans des vésicules tapissées de clathrine. Ce processus requiert également la présence de la dynamine (protéine nécessaire à la formation des vésicules) et de la protéine adaptatrice AP2 qui permet l'assemblage de nouvelles vésicules recouvertes de clathrine (199). En effet, l'activité GTPase de la dynamine facilite la formation de l'étranglement des puits tapissés de clathrine et est essentielle dans la scission des vésicules de la surface membranaire (173). Le récepteur une fois internalisé peut suivre deux voies : soit il est dirigé vers des endosomes de recyclage, soit il est orienté vers le compartiment lysosomal (figure 10) (199). Le pH acide des endosomes de recyclage peut favoriser la dissociation entre le ligand et le récepteur (77). Le récepteur libre peut alors être déphosphorylé par des phosphatases et recyclé à la membrane plasmique : on parle de resensibilisation (227). En revanche, d'autres récepteurs sont dirigés vers les lysosomes où ils sont dégradés par des protéases. Ce mécanisme favorise vraisemblablement l'arrêt de la transmission du signal cellulaire. Le rôle de l'ubiquitination de certains récepteurs dans leur orientation vers le compartiment lysosomal a récemment été démontré (152). Deux modèles

distincts du trafic de la β arr à l'intérieur de la cellule ont été proposés, conduisant à la classification des GPCR en deux classes. Les récepteurs de classe A (comme le β 2AR, le récepteur α 1-adrénérique, le MOR, le récepteur à l'endothéline ETA, le récepteur de la dopamine D1A,...) démontrent une liaison préférentielle à la β arr 2 par rapport à la β arr 1 et aucune interaction avec l'arrestine visuelle. La stimulation de ces récepteurs conduit à la translocation rapide de la β arr-GFP à la membrane plasmique. La liaison de la β arr à ces récepteurs semble transitoire, puisqu'elle se dissocie du récepteur peu après le transfert de ce dernier dans les vésicules de clathrine. De ce fait, la β arr et le récepteur ne colocalisent pas dans les endosomes. Les récepteurs de classe B (y compris le récepteur à la neurotensine 1, le récepteur à la neurokinine 1, le récepteur à la vasopressine de type 2 V2R, le récepteur à l'angiotensine II de type 1A) peuvent se lier à l'arrestine visuelle et présentent une affinité égale pour β arr 1 et 2 (26). Le complexe récepteur- β arr est plus stable. Ainsi, le récepteur activé et la β arr circulent ensemble et semblent être colocalisés dans les endosomes pendant des périodes prolongées. De plus, les récepteurs de classe A resensibilisent et recyclent plus rapidement que ceux de la classe B. Les informations contenues dans la partie C-terminale du récepteur est suffisante pour déterminer sa classification. Par exemple, un remplacement de la queue C-terminale de β 2AR (classe A) avec celle des V2R (classe B) ou vice-versa transforme les chimères résultant dans l'autre classe (114). Oakley et al. (313) ont rapporté la présence d'un ensemble de triplet de résidus sérine dans les queues cytoplasmiques des récepteurs de classe B qui est responsable de la colocalisation des β arr et du récepteur dans les endosomes.

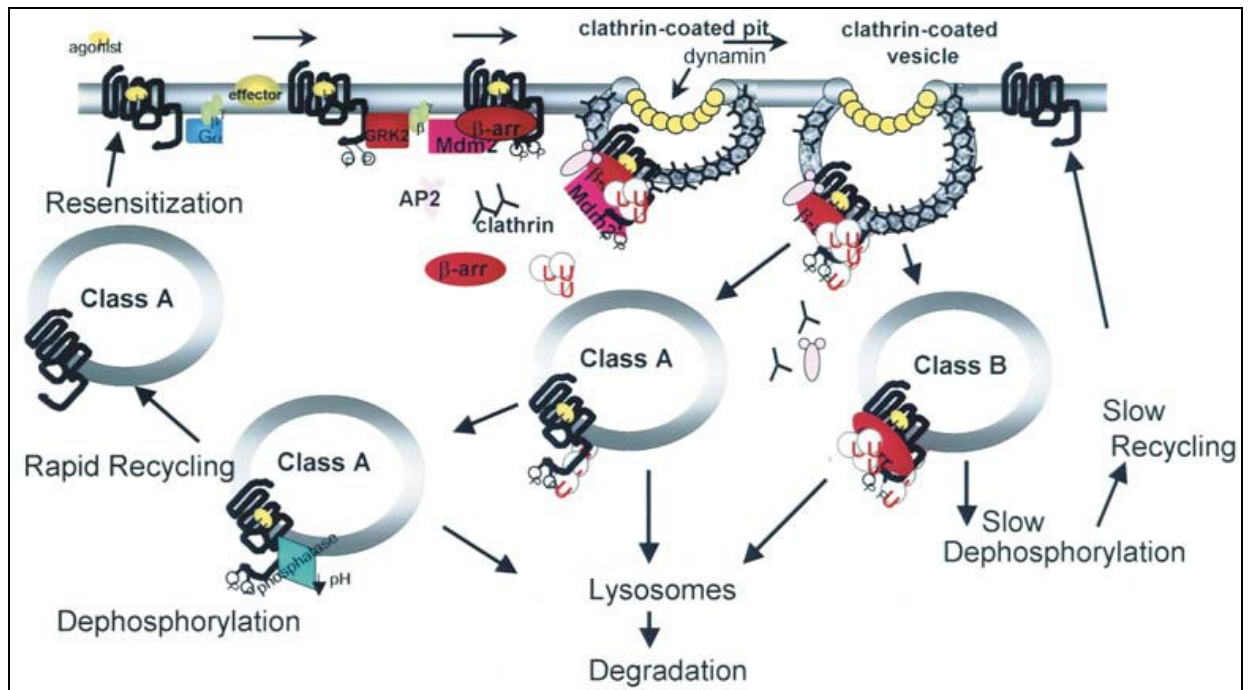


Figure 10. Trafic intracellulaire des récepteurs à sept domaines transmembranaires et β -arrestines.

La phosphorylation dépendante de l'agoniste des récepteurs à sept DTM induit le recrutement de la β arr après quoi les deux sont ubiquitinés. Ce complexe est envoyé vers les puits recouverts de clathrine. Dans le cas des récepteurs de classe A, la β arr perd son ubiquitination, induisant sa dissociation du récepteur. Le récepteur ubiquitiné se dirige vers les endosomes tardifs et les lysosomes pour y être dégradé. Dans le cas des récepteurs de classe B, la β arr reste ubiquitiné et colocalise avec le récepteur dans les endosomes. U : ubiquitine. Le récepteur activé va induire le recrutement d'une GRK et sa phosphorylation subséquente. La β arr est alors recrutée au récepteur et favorise son internalisation au niveau des puits recouverts de clathrine (CCP). On distingue alors deux types de comportements différents du récepteur : les récepteurs de classe B vont être retenus à l'intérieur de la cellule et dégradés ou lentement recyclés vers la surface. Les récepteurs de classe A vont, quant à eux, rapidement recycler vers la surface cellulaire à l'issue de leur endocytose. Contrairement aux récepteurs du groupe A, les GPCR du groupe B vont interagir stablement avec la β arr et co-internaliser avec cette dernière. Dans ce cas, la β arr va favoriser la phosphorylation des ERK1/2 mais inhiber leur translocation vers le noyau. Dans le cas d'une interaction transitoire avec le récepteur (groupe A), la β arr reste associée à la membrane plasmique en système hétérologue aussi longtemps que le ligand n'est pas dissocié de son récepteur (Shenoy et al, 2003) (269).

3. Analgésiques opiacés

Les RO constituent la cible principale des substances opioïdes endogènes et exogènes. Les analgésiques opiacés figurent parmi les drogues les plus puissantes pour le traitement des douleurs modérées à sévères (douleurs cancéreuses, postopératoires, chroniques,...). Au niveau cellulaire, les opioïdes inhibent les canaux calciques voltage dépendants en diminuant l'entrée des ions calcium résultant en une diminution de la libération des neurotransmetteurs présynaptiques (par exemple, la libération de substance P des afférences primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière). Ils activent également les canaux potassiques à rectification entrante entraînant l'hyperpolarisation des neurones post-

synaptiques et une diminution de la transmission synaptique. Par ailleurs, les opiacés inhibent la transmission GABAergique dans un circuit local (par exemple dans le tronc cérébral, où le GABA agit en inhibant un neurone inhibiteur de la douleur). Cette action de désinhibition des opioïdes a le net effet d'exciter les circuits descendants inhibiteurs de la douleur (137). Les analgésiques opiacés utilisés en clinique sont surtout des agonistes du MOR, à leur tête la morphine et ses dérivés. Ces analgésiques incluent les agonistes complets des MOR, les agonistes partiels et les agonistes-antagonistes (tableau III). L'activation des MOR est accompagnée de l'apparition de nombreux effets indésirables centraux et périphériques. Ces effets sont liés à de nombreux facteurs comme l'âge, la pathologie, les dysfonctions organiques, l'administration simultanée d'autres drogues, l'exposition aux opioïdes et la voie d'administration (137). Les effets indésirables les plus fréquents sont la dépendance physique et psychique, la sédation, les nausées et les vomissements, la constipation, la tolérance et la dépression respiratoire. Mais il y a d'autres effets indésirables, y compris la confusion, les hallucinations, les cauchemars, la rétention urinaire, les myoclonies multifocales, l'étourdissement, la dysphorie, et l'hyperalgésie qui ont été rapportés par les patients recevant ces drogues (34). Les agonistes du DOR ont un pouvoir analgésique plus faible que ceux du MOR (93) et peuvent causer des convulsions, une fois utilisés à forte dose (255). Cependant, ils démontrent une action analgésique intéressante surtout dans la douleur chronique (92) et provoquent moins d'effets secondaires que les agonistes du MOR. En effet, ils induisent moins de dépression respiratoire, de constipation et de dépendance physique (306). De plus, plusieurs études ont démontré leur efficacité putative dans le traitement des troubles psychologiques comme la dépression (33, 255, 311) et l'anxiété (305,311) et de plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (110) et d'Alzheimer (204, 291). Dans ce contexte, les agonistes du DOR démontrent un potentiel unique dans la neurogenèse et la neuroprotection que l'on ne retrouve pas avec les autres RO (219). Le DOR constitue alors une cible attrayante pour le traitement de nombreuses pathologies, surtout avec un profil d'effets indésirables limité. C'est pour ces raisons que nous nous sommes intéressés à l'étude du récepteur delta-opiacé.

Tableau III. Les analgésiques opioïdes utilisés dans les douleurs sévères

Name	Equianalgesic im dose ^a	Im/Po potency	Starting oral dose range (mg)	Comments	Precautions
Morphinelike agonists					
Morphine	10	6	30–60†	Standard of comparison for opioid analgesics; sustained-release preparations (MS Contin, Oramorph SR and Kadian)	Lower doses for aged patients; impaired ventilation; bronchial asthma; increased intracranial pressure; liver failure
Hydromorphone (Dilaudid)	1.5	5	4–8	Slightly shorter acting; HP im dosage form for tolerant patients	Like morphine
Methadone (Dolophine)	10	2	10–20	Good oral potency; long plasma half-life	Like morphine; may accumulate with repetitive dosing, causing excessive sedation
Levorphanol (Levo-Dromoran)	2	2	2–4	Like methadone	Like methadone
Oxymorphone (Numorphan)	1	See comments	See comments	Not available orally; available as a rectal suppository	Like im morphine
Oxycodone	20	—	15–30	Immediate-release (Roxicodone and Oxy IR) and sustained-release (Oxycontin) forms; also lower doses in combination with nonopioids for less severe pain	Like morphine
Meperidine (Demerol)	75	4	Not recommended	Slightly shorter acting; used orally for less severe pain	Normeperidine (toxic metabolite) accumulates with repetitive dosing causing CNS excitation; not for patients with impaired renal function or receiving monoamine oxidase inhibitors‡
Codeine	130	1.5	See comments	Used orally for less severe pain	Like morphine
Fentanyl	0.1	—	—	Transdermal fentanyl (Duragesic); also oral transmucosal fentanyl citrate for breakthrough pain	Transdermal creates skin reservoir of drug; 12-hour delay in onset and offset; fever increases absorption
Mixed agonist–antagonists					
Pentazocine (Talwin)	60	3	See comments	Used orally for less severe pain; mixed agonist–antagonist	May cause psychotomimetic effects; may precipitate withdrawal in opioid dependent patients; not for myocardial infarction
Nalbuphine (Nubain)	10	See comments	See comments	Not available orally; like im pentazocine but not “scheduled”	Incidence of psychotomimetic effects lower than with pentazocine
Butorphanol (Stadol)	2	See comments	See comments	Not available orally like im nalbuphine	Like nalbuphine
Partial agonists					
Buprenorphine (Buprenex)	0.4	See comments	See comments	Not available orally; sublingual preparation not yet in U.S.; does not produce	May precipitate withdrawal in opioid-dependent patients; not readily reversed by naloxone;

Pour ces doses intramusculaires (im) équianalgésiques, le temps du pic de l’analgésie chez les patients non tolérants est d’une demi-heure à une heure et la durée d’action est de 4 à 6 heures. L’effet analgésique au pic est retardé et la durée est prolongée suite à une administration orale (po). Oramorph SR et Roxicodone sont synthétisés par les laboratoires Roxane, Kadian par Faulding USA, Oxycontin par Purdue Pharma LP, Dilaudid par Knoll Pharmaceuticals, Dolophine par Eli Lilly, Nomorphan par Endo Laboratories, Demerol et Talwin par Sanofi Winthrop Pharmaceuticals, Duragesic par Janssen Pharmaceuticals, Nubain par Du Pont Merck Pharmaceuticals, Stadol par Bristol-Myers Squibb et Buprenex par Reckitt & Colman. *Ces doses sont les doses im recommandées au début du traitement, à partir de laquelle la dose optimale pour chaque patient est déterminée par titration et la dose maximale limitée par les effets adverses. Pour une dose intraveineuse en bolus, on utilise la moitié de la dose im (Inturrisi et al, 2002) (137).

4. Tolérance analgésique et mécanismes sous-jacents

4.1. Définition de la tolérance

La tolérance que l’on peut définir simplement comme la diminution des effets d’une substance chimique ou xénobiotique lors d’administrations répétées est néanmoins un phénomène complexe, aussi bien au niveau de ses composantes que dans les mécanismes qui en sont à l’origine. En effet, lors d’un traitement prolongé par des opiacés, la tolérance analgésique peut être due à une évolution de la pathologie, à une modification du

métabolisme (tolérance pharmacocinétique) ou encore à une modification du signal opioïdergique (tolérance pharmacodynamique). De plus, pour une même molécule, la tolérance diffère selon les effets observés. Alors que la tolérance aux effets respiratoires de la morphine est faible, comparée à la tolérance aux effets analgésiques, l'augmentation des doses (pour avoir le même effet thérapeutique) peut conduire à une dépression respiratoire fatale (199). La tolérance est généralement quantifiée par le déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse qui peut être associée à une diminution de la réponse maximale chez les animaux entiers ou des changements semblables au niveau des courbes concentration-réponse dans les systèmes isolés. Il faudrait alors augmenter les doses pour qu'il y ait plus de récepteurs activés afin d'avoir le même effet thérapeutique que celui obtenu au début du traitement.

4.2. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la tolérance

La tolérance analgésique est médiée par de multiples mécanismes d'adaptation allant des mécanismes moléculaires du couplage MOR-effecteur dans les neurones et du système de second messenger dans les cellules sensibles aux opioïdes, les cellules non-neurales (y compris les cellules gliales) et le réseau de neurones interagissent avec les neurones opioïdergiques, au comportement acquis chez les animaux, en passant par la neuroplasticité (54).

4.2.1. Mécanismes moléculaires liés au récepteur

4.2.1.1. Lien entre désensibilisation et tolérance

Nous allons nous intéresser dans ce qui va suivre à uniquement l'aspect pharmacodynamique de la tolérance et un des phénomènes les mieux décrits comme mécanisme moléculaire de la tolérance analgésique fut la désensibilisation du récepteur. La désensibilisation du récepteur opiacé est un état durant lequel une liaison opiacée relativement prolongée réduit la fonction et entrave la capacité du récepteur à émettre des signaux par sa (ses) voie(s) intracellulaire(s). La désensibilisation du MOR, qui stimule le développement d'une tolérance aux opiacés, a lieu lors de changements d'état du récepteur, de ses protéines de signalisation associées, et des protéines effectrices.

Les premiers travaux concernant la désensibilisation des récepteurs opioïdes datent des années 1980 par l'équipe de Loh sur la lignée murine NG108-15, un hybridome exprimant le MOR et un des rares modèles cellulaires disponibles à cette époque. Ces auteurs ont pu montrer qu'un traitement prolongé par différents agonistes induisait une désensibilisation de ces récepteurs, observée sur l'inhibition de l'adénylate cyclase (173). À la suite de ces

travaux, de nombreuses études ont pu montrer qu'une stimulation prolongée des MOR et KOR provoquait une désensibilisation de ces récepteurs, observée sur l'adénylate cyclase mais également sur d'autres effecteurs comme les canaux ioniques (199). Cependant, ce n'est qu'après 1992 et le clonage du premier récepteur opioïde (77, 152) que de nombreuses équipes ont étudié les mécanismes de la désensibilisation dans des systèmes cellulaires exprimant un des trois types de récepteur opioïdes. On peut citer les lignées de cellules embryonnaires de rein humain (HEK-293), de cellules rénales de singe vert africain (COS-7) ou de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO). Ces systèmes d'expression hétérologue présentent l'avantage de ne pouvoir exprimer qu'un type de récepteur et ce en quantité importante, facilitant ainsi les études biochimiques et cellulaires. Cependant, il faut toujours garder à l'esprit que dans ce cas, nous sommes alors loin des conditions physiologiques. Même s'il semble clair qu'un parallèle existe entre désensibilisation et tolérance, puisque les définitions de ces deux termes recouvrent des réalités similaires (on trouve les éléments de « traitement prolongé » et « diminution de réponse »), quels sont les arguments en faveur d'une implication de la désensibilisation dans le développement de la tolérance ? Un traitement chronique avec la morphine chez le rat induit une désensibilisation des DOR et MOR observée sur l'adénylate cyclase, dans la substance grise périaqueducule, le thalamus et le LC (227, 114). Aussi, l'utilisation de souris knock-out pour le gène codant la β arr 2 a permis de montrer que cette protéine qui est connue comme impliquée dans la désensibilisation des GPCR jouait un rôle dans la tolérance à la morphine (26). En effet, chez ces souris knock-out, la désensibilisation du MOR suite à un traitement chronique à la morphine, mesurée par la liaison MOR-GTP γ S, a été abolie. Ces mêmes souris traitées chroniquement à la morphine maintiennent aussi le même degré de réponse analgésique, mesuré par la latence des animaux à produire une réponse sur la plaque chauffante. Whistler et al. suggèrent que la propriété des agonistes à induire l'endocytose (une étape du processus de désensibilisation) est corrélée avec leur capacité à promouvoir la tolérance (318). Ils suggèrent que bien que la morphine, un opioïde hautement addictif, puisse activer les MOR, elle induit une faible internalisation, contrairement au DAMGO, étorphine et méthadone. D'autres observations ont rapporté que la méthadone et l'étorphine induisent moins de tolérance que la morphine quand elles sont administrées chroniquement et à des doses produisant la même efficacité (74, 210, 251). Si la méthadone et l'étorphine, produisant une faible tolérance, induisent l'internalisation du récepteur et la morphine, produisant la tolérance, ne provoque pas l'internalisation du

MOR, il semble que l'internalisation du récepteur joue un rôle déterminant dans la tolérance aux drogues. L'équipe de Whistler suggère que le cycle de la désensibilisation des MOR et leur resensibilisation ultérieure peut être conçu pour mimer l'action des peptides opioïdes endogènes (ne produisant pas de tolérance) qui sont généralement libérés de manière phasique ou pulsatile (318). Cette resensibilisation implique l'internalisation du récepteur, suivie de son recyclage à la membrane pour entamer une nouvelle signalisation cellulaire. Donc si la désensibilisation du récepteur (surtout celle médiée par la β arr2) est suivie par sa resensibilisation, ceci constitue une étape protégeant contre la survenue de la tolérance (8). Cependant, d'autres études ont démontré que le MOR peut resensibiliser sans implication du cycle internalisation-recyclage membranaire. Dans ce contexte, l'équipe de Dang et al. a démontré que la resensibilisation du MOR ne requiert pas le trafic médié par la β arr2 chez des animaux traités de façon chronique à la morphine, en utilisant des souris KO (knock-out) de β arr2 (63). Aussi, une revue publiée en 2011 indique que les propriétés pharmacocinétiques de la morphine et de la méthadone sont différentes et que l'équivalence des concentrations intra-cérébro-ventriculaires (ICV) n'a pas été établie ce qui rend les résultats de Whistler (indiqués ci-haut) difficiles à interpréter. De plus, l'équipe de Soignier et al. a démontré que la morphine et les endorphines 1 et 2 présentaient un niveau de tolérance comparable quand elles étaient administrées par voie ICV, suggérant que la tolérance des agonistes, quel que soit leur amplitude d'internalisation, devrait être la même quand ces agonistes partagent la même efficacité intrinsèque (cas de la morphine et des endorphines) (278). En outre, chez les humains, la tolérance développée chez ceux ayant un dispositif transdermique de fentanyl (haute efficacité, endocytose modérée) était plus importante que chez ceux recevant la buprénorphine (faible efficacité, pas d'internalisation) (275). Donc, il reste incertain si les agonistes avec une forte internalisation produiraient moins de tolérance analgésique que les agonistes induisant moins d'internalisation. L'équipe d'Arttamangkul a démontré que le blocage de l'internalisation par la concanavaline A n'affecte pas la désensibilisation du MOR dans les neurones du LC de souris, que cette désensibilisation a été la même que chez les souris KO de β arr2 et que la resensibilisation du récepteur n'a pas été modifiée suite au blocage de l'endocytose (8) mais accélérée chez les souris KO de β arr2 (246). On peut conclure de cette étude que la désensibilisation ne requiert pas la β arr et est distincte de l'internalisation. Aussi, Dang et al. ont démontré que le blocage de l'endocytose dépendant de la dynamine n'a aucun effet sur le taux et l'ampleur de la désensibilisation du MOR dans le même système biologique

(65). Bien que l'endocytose puisse produire une désensibilisation en déplaçant le MOR de la membrane cellulaire, il est clair d'après ces études que le découplage MOR-effecteur ne le requiert pas. La désensibilisation est aussi plus rapide que l'internalisation (de point de vue cinétique) et il est certain que l'efficacité de désensibilisation et celle de l'endocytose ne sont pas corrélées (64).

La désensibilisation induite par la Met-enképhaline, DAMGO, morphine et méthadone (246) est plus prononcée dans le LC (66, 67), ainsi qu'au niveau des neurones de la substance grise péri-aqueducule (PAG) (135), après une exposition chronique à la morphine. La désensibilisation contribuerait à la tolérance par la réduction fonctionnelle des MOR à la surface cellulaire suite à une administration prolongée des drogues (voir détails au début du paragraphe). Il y a beaucoup d'adaptations causées par l'administration chronique de la morphine qui pourraient être responsables de cette observation, mais l'endocytose ne semble pas jouer un rôle, du moins selon certaines études. L'équipe de Quillinan et al a démontré une réduction de l'endocytose après un traitement chronique à la morphine, responsable d'une désensibilisation accrue (246). Autres mécanismes d'adaptation comprennent ceux qui sont directement impliqués dans la phosphorylation des MOR par des kinases telles que ERK1/2, GRK (mais GRK2 est diminué (79)), β arr (mais β arr2 est diminuée dans la PAG (80)) ou autres telles que les protéines RGS : protéines régulatrices des signaux des protéines G (99), la phospholipase D2 (157) ou la spinophiline (45). En plus d'une désensibilisation accrue, le traitement chronique à la morphine conduit à une réduction de la resensibilisation du MOR dans les neurones du LC de la souris (66). Dang et al. et Quillinan et al. ont récemment confirmé cette observation et ont établi que cette réduction de la resensibilisation est reliée à une adaptation dans le processus de régulation du MOR médiée par la cascade GRK2- β arr2-dynamine (63, 246). Il a été proposé que, suite à un traitement chronique à la morphine, la régulation des MOR par la β arr2 soit renforcée (probablement suite à une phosphorylation accrue du MOR par la GRK2), ce qui ralentit la resensibilisation du récepteur et aboutit à une accumulation des MOR désensibilisés (63). La constatation que l'herkinorine (analogue de l'opiacé salvinorine) engage efficacement les protéines G de signalisation mais ne provoque pas de phosphorylation du récepteur ni de translocation de la β arr2, même lorsque la GRK2 est surexprimée (103) confirme la possibilité de trouver des analgésiques opiacés qui ne produiraient pas de diminution de la resensibilisation du MOR médiée par la β arr2 donc qui induiraient moins de tolérance. Cet opiacé est actuellement dans les phases précoces de

développement. L'équipe de Virk en 2009 a rapporté la découverte intrigante que la métrénképhaline produit une signalisation efficace en présence de faible concentration de buprénorphine, mais ne produit plus de désensibilisation rapide (312). Ceci suggère que les opioïdes, ou drogues apparentées, peuvent stabiliser le MOR dans des conformations qui sont en mesure de signaler aux protéines G, sans pour autant le désensibiliser, limitant ainsi la tolérance (64). Aussi, on a démontré que la morphine combinée à un opiacé qui stimule l'endocytose aura pour résultat l'internalisation du MOR, sa resensibilisation et son recyclage. Cette découverte a donné naissance à la proposition que des « cocktails » d'opiacés, comme par exemple de la méthadone à faible dose associée à de la morphine dans un traitement, atténueraient le développement d'une tolérance (118). En outre, la méthadone a des effets inhibiteurs sur les récepteurs NMDA, ce qui peut également prémunir contre le développement d'une tolérance aux opiacés (297). Un autre domaine possible de développement de médicament pourrait avoir lieu dans le champ de l'identification des adjuvants aux opiacés qui empêchent la tolérance aux opiacés en agissant sur la phosphorylation des récepteurs (par l'inhibition de la PKC ou autre kinase) et la liaison à la β arr.

4.2.1.2. Conséquences fonctionnelles de la désensibilisation : découplage récepteur-effecteur

Il existe des preuves très solides qui supportent que l'altération du couplage MOR-effecteur contribue à la tolérance in vivo (64). La tolérance aux opiacés a été largement quantifiée dans des tissus isolés, des neurones et des préparations membranaires d'animaux tolérants à la morphine, ainsi que dans des modèles de culture cellulaire. La mesure fonctionnelle de la diminution du couplage MOR-effecteur dans les tissus et cellules isolées après un traitement morphinique chronique montre systématiquement une perte dans le nombre de récepteurs fonctionnels, sans changement dans la liaison au MOR (157). Les agonistes fortement internalisant le MOR, telle que l'étorphine, sont une exception, car ils induisent une régulation négative des récepteurs (279), probablement parce qu'une faible proportion des MOR internalisés est dégradée pendant chaque cycle de l'internalisation (319).

Les modèles opérationnels (ou analyse Fuchgott) utilisés pour quantifier la perte du couplage fonctionnel MOR-effecteur dans des systèmes isolés après un traitement chronique à la morphine ont calculé une perte minimale d'environ 80% des MOR

fonctionnels pour observer un déplacement de la courbe dose-réponse (voir définition de la tolérance) (55, 74, 15). Les essais étudiant l'interaction directe de la protéine G $\beta\gamma$ avec les canaux ioniques au niveau des neurones opioïdiques d'animaux traités chroniquement avec de la morphine *in vivo* ont déclaré un couplage MOR-effecteur affaibli (à l'exception de 135), notamment au niveau de la PAG de rats et souris (14), du LC du rat et de la souris (15, 55, 58, 63, 67, 246) et des ganglions neuronaux du trijumeau chez la souris (143). Des résultats similaires ont également été signalés au niveau de l'inhibition de la transmission synaptique GABAergique dans les terminaisons nerveuses dans la PAG (88, 107). Aussi, l'étude de la liaison MOR-GTP γ S dans le tronc cérébral en parallèle avec la densité des MOR (26) a démontré un couplage MOR-effecteur réduit, suite à une administration chronique de morphine, mais pas dans d'autres régions (155, 274). Pris ensemble, ces résultats sont cohérents avec les rapports précédents dans des cultures cellulaires montrant que l'exposition chronique à la morphine inhibe le couplage MOR-effecteur (par technique de liaison au GTP γ S) sans affecter sensiblement la densité des MOR à la membrane (242, 243).

La désensibilisation du récepteur, le rôle des différentes kinases et β arr, l'endocytose, l'interaction avec différentes protéines cytoplasmiques et le trafic post-endocytique (recyclage, dégradation), comme déjà expliqués, contribuent également aux mécanismes moléculaires de la tolérance analgésique liés au récepteur.

4.2.2. Mécanismes cellulaires de la tolérance

Le traitement chronique aux opiacés donne des adaptations de certains neurones spécifiques du cerveau, provoquant un phénomène complexe psychologique et physique connu sous le nom de toxicomanie. Les comportements complexes, comme la tolérance et la dépendance physique et psychique, qui caractérisent l'état toxicomane, semblent résulter de neuroadaptations au niveau du complexe récepteur/effecteur. Après l'utilisation chronique des opioïdes, il ya une régulation à la hausse de la voie de l'AMPC, une augmentation du CREB et une augmentation du facteur de transcription cFosB. Ceux-ci seront discutés plus en détail ci-dessous. Il ya de nombreuses régions du cerveau qui ont été impliquées dans les neuroadaptations qui se produisent pendant la tolérance et la dépendance aux opiacés. Le LC a été le plus largement étudié et il a été proposé de jouer un rôle causal principal dans l'expression de nombreux signes de sevrage (222, 266). Cependant, d'autres études ont fourni des preuves pour suggérer que des régions indépendantes du LC, comme le PAG, le bulbe rostral ventrolatéral, y compris le noyau

réticulaire paragigantocellulaire (PGi), et la corne dorsale de la moelle épinière, jouent un rôle plus important dans le syndrome de sevrage (56). Des lésions au niveau du PGi, la principale source des afférences excitatrices du LC, atténuent profondément l'initiation du sevrage médiée par le LC (248). Le PAG présente de nombreuses projections réciproques à un certain nombre de régions du cerveau, y compris l'amygdale, le noyau accumbens (113, 194), le PGi et plusieurs régions hypothalamiques (254). Ces domaines peuvent également subir des adaptations quand ils sont traités chroniquement par des opiacés.

4.2.2.1. Activation de la voie de l'adénylate cyclase

Donnés en aiguë, les opioïdes sont connus pour inhiber l'activité adénylcyclase. Cependant, après un traitement chronique à la morphine dans des cultures de lignées cellulaires non-neuronales, il y a une régulation à la hausse de la cascade de l'adénylcyclase malgré la présence continue de l'agoniste (12, 13). Après retrait de la morphine, l'activité de l'adénylate cyclase augmente davantage et serait potentiellement une composante importante du sevrage (268). La régulation positive de l'AMPC implique une augmentation des concentrations de l'adénylate cyclase et, éventuellement, d'autres composantes de la transduction de cette voie de signalisation (4). En outre, la régulation positive de la voie d'AMPC s'oppose à l'inhibition aiguë de cette voie par les opiacés et, par conséquent, représenterait une des causes de la tolérance physiologique. La cascade AMPC est connue pour avoir des effets puissants sur la libération de neurotransmetteurs dans les synapses à la fois excitatrices et inhibitrices du système nerveux central (27, 53). La suppression des opioïdes, après un traitement chronique, résulte en une augmentation de la transmission synaptique GABAergique dépendante de l'AMPC dans plusieurs sites, y compris l'aire tegmentaire ventrale (ATV) (53, 272), le PAG (136) et le noyau accumbens (53). Dans le PAG et l'ATV, les opioïdes administrés en aiguë inhibent la transmission synaptique GABAergique présynaptique par un mécanisme indépendant de la PKA (27, 310). Toutefois, après un traitement opioïde chronique, il y a une augmentation du couplage récepteur opioïde/AMPC au niveau de la transmission synaptique médiée par le GABA.

4.2.2.2. CREB et autres facteurs de transcription

Les mécanismes par lesquels l'exposition chronique aux opiacés provoque la régulation positive de la voie de l'AMPC sont encore mal compris. Il a été démontré que l'administration chronique d'opiacés régule à la hausse de manière sélective les deux isoformes de l'adénylate cyclase (types I et VIII) dans les neurones du LC (170, 205).

La régulation positive de l'adénylate cyclase de type VIII semble être médiée par la protéine CREB, l'un des principaux facteurs de transcription dépendant de l'AMPc dans le cerveau (40, 170). L'infusion d'oligonucléotides antisens du CREB dans le LC réduit l'augmentation induite par la morphine de l'adénylyl cyclase type VIII. Cependant, elle n'a aucun effet sur le type I (170). En outre, cette infusion atténue seulement certains comportements de sevrage 16-30 min après administration du naltrexone (170). Par conséquent, il peut y avoir d'autres facteurs en dehors du CREB qui assurent la médiation de la régulation à la hausse de l'adénylyl cyclase ou bien le processus médié par le CREB n'est pas responsable de tout le syndrome de sevrage. Les mécanismes de neuroadaptation peuvent être aussi reliés à l'activité d'autres facteurs de transcription. Les familles Fos et Jun ont été impliquées dans le développement de la dépendance. Leur induction est rapide, mais transitoire, après administration aiguë des opioïdes. Aussi, les protéines Fos-like, appelées FRA chroniques (Fos-related antigens), s'accumulent après un traitement répété aux opiacés (228). Les FRA chroniques sont un variant d'épissage du gène fosB et sont des candidats potentiels pour la plasticité induite par les médicaments (48, 182, 225).

4.2.2.3. Expression conjointe du MOR et du DOR

Bien que nous ayons principalement porté notre attention sur les MOR jusqu'à présent, il est important de comprendre que des interactions entre les différents sous-types de récepteurs opiacés surviennent, sont complexes, et se modifient à cause d'une expression des récepteurs modifiée pendant la mise en place d'une tolérance aux opiacés et aussi durant la douleur inflammatoire chronique. Par exemple, l'activation des MOR par la morphine augmente l'expression des DOR sur les surfaces cellulaires de plusieurs neurones du cerveau et de la moelle épinière (327), augmentant ainsi la probabilité d'une interaction entre les sous-types. Le DOR homomérique active un sous-ensemble similaire de protéines G que le MOR homomérique (3). Toutefois, l'hétérodimérisation μ/δ des RO modifie les propriétés de liaison de l'agoniste et de l'antagoniste du complexe du récepteur opiacé et de son sous-type associé de protéine G (activation préférentielle de la $G_{\alpha z}$) (81). On pense que cela est dû à un échafaudage complexe de protéines sur les récepteurs opiacés homodimériques et hétérodimériques, lequel intègre ses protéines G associées, ses protéines de phosphorylation et d'autres protéines effectrices et même peut-être les récepteurs NMDA (211). L'association des DOR aux MOR semble augmenter la possibilité de développer une tolérance à la morphine (327), mais on ne sait pas pourquoi. En effet, le

développement de la tolérance a été atténué, chez les souris KO du DOR et aussi par les molécules agoniste du MOR et antagoniste du DOR désignées pour interagir préférentiellement avec les hétérodimères (68). Aussi, on ne connaît pas non plus l'effet de l'activation de la protéine G α . C'est pourquoi les interactions entre les différents sous-types de récepteurs opiacés, et en particulier entre les MOR et les DOR, doivent faire l'objet de recherches plus approfondies afin d'atténuer le développement de la tolérance.

D'autres approches récentes prometteuses pour limiter la tolérance ont été largement revus et incluent le ciblage sélectif d'hétéromultimères, ou les opiacés qui activent des cascades de signalisation intracellulaire différentes, impliquant éventuellement l'activation différentielle des sous-types de la protéine G α (236), et en particulier l'activation différentielle de la protéine G par rapport à l'endocytose (22, 54, 157, 202).

4.2.3. Plasticité synaptique

4.2.3.1. Description

Les drogues toxicomanogènes, y compris les opiacés, influencent profondément la plasticité synaptique qui souligne l'apprentissage et la mémoire dans les systèmes neuronaux impliqués dans le développement de la toxicomanie (récemment passé en revue par Hyman et al, 2006 et Kauer et Malenka, 2007) (133, 147). Des études récentes ont mis l'accent sur les processus qui jouent un rôle clé dans la consolidation de la mémoire, la potentialisation à long terme (LTP) (renforcement durable de l'efficacité de la transmission synaptique qui fait suite à certains types de stimulation), et la dépression à long terme (phénomène inverse de la LTP qui conduit à la mise sous silence de la synapse). Dans la plupart des cas, ces processus impliquent des changements dans la synthèse, l'insertion, la suppression, la stabilisation et la consolidation des sous-unités des récepteurs du glutamate (généralement AMPA) au niveau des synapses (72, 196). Après un traitement chronique à la morphine, la LTP a été fortement inhibée au niveau des synapses excitatrices des neurones CA1 de l'hippocampe (les MOR agissent directement sur les interneurons GABAergiques dans cette région (322)), un effet qui pourrait être renversé par la morphine en traitement aiguë (241). Cela semble être dû à l'activation de la voie de l'AMPC pendant le sevrage, car ça pourrait être bloqué par les inhibiteurs de PKA (54).

4.2.3.2. Régulation à la hausse du récepteur NMDA

De nombreuses études ont démontré l'existence d'une réponse paradoxale aux opiacés connue sous le nom d'hyperalgésie induite par les opiacés (HIO) (41, 52, 105). Lors de l'HIO, les récepteurs μ se couplent aux protéines Gs et forment alors un complexe exciteur avec augmentation de l'AMPc (160, 161) et libération de neurotransmetteurs exciteurs. Cela active la PKC intracellulaire (51) qui induit alors la phosphorylation des récepteurs NMDA (49, 50) provoquant un influx de Ca^{2+} et par là, toutes les cascades de sensibilisation centrale. De nombreux systèmes exciteurs contribuant à une analgésie réduite ou à une douleur plus forte sont secondairement activés ou modulés par l'activation des MOR. On a proposé d'inhiber les systèmes exciteurs coactivés avec des adjuvants au traitement opiacé afin de réduire ou d'atténuer la tolérance aux opiacés. Parmi les systèmes exciteurs qui sont régulés à la hausse avec une activité des MOR, il y a : les récepteurs d'orphanine (300), la cyclo-oxygénase (129), le peptide lié au gène de la calcitonine (294) et la substance P (294). L'attention des chercheurs s'est surtout portée sur l'amélioration de la fonction des récepteurs NMDA pendant le traitement aux opiacés. Bien que les récepteurs NMDA soient omniprésents dans le système nerveux central, ils jouent un rôle particulièrement important dans la signalisation de la douleur via une neurotransmission glutamatergique dans les lames superficielles de la moelle épinière dorsale. Dans les neurones de la corne dorsale, les récepteurs NMDA et les MOR sont tous deux présents et participent à la transmission et à la modulation des signaux de douleur au cerveau. Bien que les processus cellulaires contribuant à la tolérance aux opiacés et provoquant une distinction entre la forme aiguë et chronique par ce mécanisme ne soient pas clairs, il existe des preuves provenant d'études animales que l'inhibition des récepteurs NMDA pendant une exposition aux opiacés réduit la tolérance chronique à ces drogues (297). Récemment, les recherches portant sur l'effet hyperalgésique des opiacés se sont davantage concentrées sur la régulation à la hausse de la fonction des récepteurs NMDA activée par les récepteurs opiacés en tant que mécanisme possible. Il est cliniquement difficile de faire une distinction entre l'HIO et la tolérance aux opiacés. C'est pourquoi il est possible qu'une fonction des récepteurs NMDA accrue puisse contribuer aux deux processus ainsi qu'à d'autres troubles pathologiques comme la douleur chronique et la douleur neuropathique. Ces pistes de preuves concernant les systèmes exciteurs régulés à la hausse par l'activation des récepteurs opiacés fournissent une justification pour l'utilisation clinique de traitements adjuvants lors d'une thérapie à base d'opiacés, comme par exemple avec des agents anti-

inflammatoires non stéroïdiens et des antagonistes NMDA (bien que ces derniers puissent causer des troubles de mémoire et d'apprentissage). Des médicaments en développement pourraient fournir de nouveaux adjuvants au traitement par opiacés qui visent d'autres systèmes excitateurs stimulés.

5. Internalisation et trafic post-endocytaire du DOR

Nous avons porté notre attention principalement sur les MOR jusqu'à présent. Cependant, le DOR constitue une cible prometteuse pour le traitement des douleurs chroniques, ainsi que de nombreux désordres psychologiques. C'est pourquoi il devient intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires de la tolérance aux ligands du DOR. Vu que la compréhension de ces mécanismes repose sur l'étude du trafic du récepteur, il sera alors indispensable d'étudier les aspects de ce trafic et les mécanismes moléculaires sous-jacents. Plusieurs études ont suggéré que les agonistes des DOR sont capables de stimuler différents trafics du récepteur. Par exemple, la pré-incubation des cellules HEK-293 exprimant de façon stable le DOR avec les peptides DPDPE ([D-pénicillamine², D-pénicillamine⁵]-enképhaline), la [D-Ser², D-Leu⁵]enképhaline-Thr, la [D-Ala², D-Leu⁵]enképhaline, la deltorphine II ou les alcaloïdes comme le BW373U86 et l'étorphine aboutit à l'internalisation du récepteur, mais pas avec les alcaloïdes lévorphanol, morphine et oxymorhindoïde (30, 32). Les études de liaison avec les radioligands ont démontré que le traitement chronique à la morphine induit une régulation négative du DOR dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain (324), mais pas dans les cellules NG108-15 (174). Cette régulation négative du DOR suite au traitement chronique à la morphine, vient à l'encontre des résultats trouvés au niveau du SNC, où on a démontré une augmentation de l'expression du DOR à la surface cellulaire suite à un traitement chronique à la morphine (voir paragraphe 3.2.2.3). Dans les cellules de neuroblastome humain SK-N-BE, le DPDPE et la deltorphine I induisent l'internalisation et la dégradation lysosomale du DOR, alors que l'étorphine stimule l'internalisation et le recyclage du récepteur à la surface cellulaire (201, 115). Toutefois, l'activation de la voie de dégradation du DOR n'est pas spécifique aux peptides car les peptides endogènes, comme la [Leu⁵] enképhaline et [Met⁵] enképhaline, induisent le recyclage du DOR après son internalisation, mais l'opioïde synthétique SNC-80, dirige le récepteur vers la voie de dégradation (176). Évidemment, l'internalisation du DOR et son recyclage semblent être spécifiques de l'agoniste et du système biologique dans lequel il est exprimé (319). En effet, au niveau des neurones de

l'hippocampe et du striatum, le SNC-80 provoque une forte internalisation du DOR, alors que son dérivé proche, le AR-M100390 ne réussit pas à induire son endocytose (238). Cette même étude a démontré que le récepteur, une fois stimulé par le SNC-80, se dirige vers les lysosomes pour y être dégradé. Aussi, le DOR est internalisé en réponse à une exposition prolongée à la dermenképhaline au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière de rat (91).

L'internalisation du DOR implique les vésicules de clathrine dans la plupart des cellules mammifères (308). D'autres données indiquent toutefois que, selon l'environnement cellulaire, des voies alternatives d'internalisation (35) peuvent également être impliquées dans l'internalisation du DOR. La mono-ubiquitination a été impliquée dans l'internalisation de certains GPCR (122). L'ubiquitination du DOR lui-même n'est cependant probablement pas essentielle pour son internalisation dépendante de l'agoniste, puisque la mutation exhaustive des résidus lysine cytoplasmiques n'a pas inhibé l'endocytose du DOR dans les cellules HEK-293 (288). Le domaine C-terminal du DOR a été démontré ayant un rôle crucial dans l'internalisation du récepteur. La troncature des 15 ou 37 derniers résidus du DOR a complètement bloqué l'internalisation médiée par le DPDPE dans les cellules CHO (296). On a constaté cependant que l'étorphine et le DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-Enképhaline) ont été capables d'internaliser le DOR tronqué dans les cellules HEK-293 (218). Par ailleurs, bien que le DOR tronqué internalise dans les cellules HEK-293, le DOR portant des sites de phosphorylation mutés au niveau C-terminal ne le fait pas (320). Pour expliquer ces résultats, Whistler et al. ont suggéré que la queue C-terminale du DOR peut servir comme «frein» dépendant de la phosphorylation, qui empêche l'interaction entre le DOR et la β arr en l'absence d'agoniste. L'internalisation du récepteur a un rôle important dans la resensibilisation du signal. Ainsi, il a été démontré que la prévention de l'internalisation du DOR par une solution de sucrose hypertonique ou la concanavaleine A prolonge l'état désensibilisé du DOR dans les cellules SK-N-BE (115). Cependant, l'endocytose est aussi une étape essentielle pour le ciblage du DOR vers les voies de dégradation (308). Plusieurs études réalisées dans des systèmes d'expression hétérologues ont montré que les DOR internalisés sont rapidement dirigés vers les lysosomes pour une dégradation ultérieure (123, 319) ou recyclés vers la membrane (100, 295, 328), via un mécanisme dépendant de Rab11 (6). Le tri des DOR vers ces destinations impliquerait aussi la β arr2 (328). Bien que la capacité du DOR à recycler ait été fréquemment rapportée, ces

récepteurs sont souvent engagés dans la voie de dégradation via leur interaction avec les protéines GASP (G protein coupled receptor associated sorting proteins) (123, 319). Le DOR a été souvent rapporté comme appartenant à la classe B (voir explication à la section 2.2.2) (319, 329).

Une fois internalisé, le DOR subit une régulation négative rapide et importante dans des lignées de cellules recombinantes (193), de cellules de neuroblastome (1) et dans les tissus du cerveau intact (290). L'implication des vésicules de clathrine est bien établie dans la régulation négative de nombreux GPCR (167). Dans cette voie, l'environnement acide des endosomes précoces favorise la dissociation du complexe agoniste-récepteur. Le récepteur libre est ensuite dégradé dans les lysosomes. La régulation négative du DOR implique principalement sa dégradation lysosomale dans les cellules du neuroblastome (156, 267). Il est généralement admis que le domaine C-terminal du DOR a un rôle fondamental dans la régulation négative du récepteur (1, 62). Ainsi, l'échange de la queue C-terminale entre les récepteurs μ et δ conduit à des changements réciproques dans la cinétique de la régulation négative du récepteur (1). La troncature des 37 derniers acides aminés de la partie C-terminale du DOR empêche la régulation négative médiée par le DADLE dans les cellules CHO (62). De façon intéressante, le transfert de motifs de recyclage putatifs d'autres GPCR, tels que le MOR (289) ou le récepteur β 2-adrénérique (89) sur le DOR a montré que les constructions chimériques résultantes se dirigeaient vers la voie de recyclage.

Dans le DOR de souris, la Thr353 a été identifiée comme le résidu crucial de la régulation négative médiée par le DADLE (62). Le résidu homologue est une Ala dans le DOR humain. Cette observation souligne l'importance d'étudier la régulation du récepteur humain.

Wang et al. (315) ont identifié un motif de ciblage lysosomal supplémentaire (Leu245, Leu246) dans la troisième boucle intracellulaire du DOR de rongeurs, ce qui indique que, en plus de l'extrémité C-terminale, d'autres domaines du récepteur peuvent également prendre part au trafic du DOR. Le rôle des protéasomes dans la dégradation du DOR a également été reporté (46, 307).

6. Rôle de la GRK2, PKC et β arr2 dans la régulation du DOR

Pour étudier les mécanismes moléculaires sur lesquels repose le trafic du DOR, on s'est principalement intéressé aux rôles de la GRK2, la PKC et la β arr2 dans la régulation du

DOR, vu leurs rôles cruciaux dans le développement de la tolérance analgésique aux opiacés.

Le rôle de la GRK2 dans la modulation de la signalisation et du trafic du DOR a fait l'objet de diverses études controversées. En effet, l'équipe de Willets et al. a démontré que dans des cellules de neuroblastomes de souris NG108-15, qui exprime de façon endogène le DOR, la désensibilisation du récepteur ne semble pas dépendre de la GRK2 (321). Aussi, la désensibilisation du DOR stimulé par le DPDPE et la deltorphine I, dans des cellules de neuroblastomes SK-N-BE, n'a pas été affectée par la transfection d'une forme mutante de la GRK2 (200). D'autres études ont démontré tout à fait le contraire, en démontrant le rôle crucial de la phosphorylation médiée par la GRK2 dans la désensibilisation du DOR, dans différents systèmes biologiques (200, 214, 233). Cette phosphorylation a un rôle important dans l'induction de l'internalisation du DOR, dans différentes lignées cellulaires et avec différents agonistes (115, 296, 326, 330). Cependant, l'équipe de Zhang et al. a démontré que le DOR peut internaliser dans les cellules HEK-293 de façon indépendante de la GRK2 (329).

L'activation du DOR par l'agoniste conduit à son internalisation suite au recrutement de la GRK2 vers la protéine $G\beta\gamma$, qui phosphoryle le récepteur à plusieurs sites, y compris la Sérine 363 (Ser363), permettant le recrutement de la β arr et sa localisation dans des puits recouverts de clathrine (32). L'inhibition de la protéine G par la PTX ne prévient pas l'internalisation du DOR stimulé par le DPDPE dans les cellules de neuroblastomes de souris (44). En revanche, dans les cellules HEK-293 exprimant de façon stable le DOR, le prétraitement à la PTX inhibe de 60% la capacité de l'agoniste [D-Thr2]-Leu-enképhaline-Thr6 à induire l'internalisation du récepteur (163). L'équipe de Traynor et al. a démontré qu'au niveau des cellules HEK-293, le DOR peut être phosphorylé et internaliser de façon dépendante de la protéine G. Cependant une voie alternative indépendante de la protéine G et de la GRK2 existe (32). En effet, cette équipe a démontré que l'internalisation du DOR par le DPDPE a été ralentie en présence de PTX, mais le taux d'internalisation a été le même au bout de 6h. T³⁵⁸, T³⁶¹ et S³⁶³ de la partie C-terminale du DOR sont les 3 trois sérine / thréonine responsables de la phosphorylation du récepteur induite par le DPDPE (179, 328, 329). L'internalisation médiée par la GRK2 conduit le DOR vers le recyclage, tandis que les récepteurs mutés au niveau de ces 3 résidus (cités ci-dessus) donc internalisés indépendamment de la phosphorylation sont destinés à la dégradation et ne peuvent pas recycler à la surface cellulaire (328).

Outre la désensibilisation médiée par la GRK2 (désensibilisation homologue dépendante de l'agoniste), l'activation hétérologue de la PKC, au niveau des cellules HEK-293, stimule la phosphorylation du DOR au niveau de la S³⁴⁴, induisant son internalisation de façon dépendante de la β arr et la clathrine (323). Cette activation hétérologue est indépendante de l'agoniste. Elle a lieu suite à l'activation d'autres GPCR ou une augmentation du niveau de Ca²⁺ intracellulaire (323). Aussi, l'activation de la PKC augmente le taux et la magnitude de la régulation négative (diminution des sites de liaison) du DOR induite par l'agoniste dans les cellules NG108-15 (104).

La phosphorylation du DOR induit le recrutement de la β arr2 à sa proximité. La β arr2 est exprimée de façon ubiquitaire et constitue un régulateur majeur de la plupart des GPCR. Bien que la phosphorylation du récepteur induite par l'agoniste a été démontrée pour être d'une grande importance pour la liaison de la β arr (83, 96), la capacité des récepteurs opioïdes de recruter la β arr sans être phosphorylés a été illustrée pour les MOR et DOR où les sites de phosphorylation induite par l'agoniste ont été enlevés ou mutés (244, 329). Le rôle de la β arr2 dans l'internalisation du DOR a été proposé (245, 329). En effet, la déplétion en cette protéine régulatrice bloque l'internalisation du DOR stimulé par le DPDPE dans les cellules HEK-293 et sa surexpression l'augmente (329). Ceci a été aussi démontré dans les cellules de fibroblastes embryonnaires de souris (245). L'équipe de Zhang a démontré que l'internalisation dépendante de la phosphorylation par la GRK2, qui est médiée par β arr1 et β arr2 conduit au recyclage du DOR alors que l'internalisation GRK2 indépendante, médiée par β arr2 uniquement, mène à la dégradation du récepteur. Ainsi, le trafic post-endocytaire du DOR peut être régulé par la phosphorylation catalysée par la GRK2 ainsi que les différentes isoformes de la β arr (328). Tout récemment, notre laboratoire a démontré que les différentes modalités de recrutement de la β arr vers le DOR supporte les différences de recyclage entre les agonistes. En effet, le recrutement de la β arr2 à proximité de la sous-unité γ 2 de la protéine G empêche le DOR de recycler à la membrane (annexe II).

7. La sélectivité fonctionnelle : un nouveau concept pharmacologique

Dans le but de prédire si un médicament aura la capacité de se lier à un récepteur (affinité) et de l'activer (efficacité), la pharmacologie classique se fonde sur des principes de type

quantitatif. Ces principes reposent sur l'hypothèse selon laquelle un récepteur oscille entre une conformation active et une conformation inactive, l'état actif étant à la source de toutes les réponses pharmacologiques associées au récepteur (figure 11A) (10). Dans ce modèle, l'efficacité d'un ligand est définie par sa capacité à stabiliser diverses quantités d'une seule conformation active du récepteur : l'agoniste complet stabilise une grande quantité de la forme active, l'agoniste partiel une quantité moindre, l'agoniste inverse stabilise principalement la conformation inactive, quant à l'antagoniste, il occupe le récepteur sans modifier la distribution entre les deux états de celui-ci (302). Ce modèle pharmacologique classique a cependant été remis en question au cours de ces dernières années. Les progrès technologiques ont en effet permis de démontrer que l'ordre d'efficacité ou de puissance de différents ligands peut s'inverser lorsque ces propriétés sont évaluées sur plusieurs voies de signalisation (11). Ces observations ne peuvent pas s'expliquer par l'existence d'un état actif unique. Elles impliqueraient plutôt qu'un même récepteur puisse être stabilisé sous différentes conformations actives dont chacune possède des propriétés de signalisation spécifiques (302, 150). Avec ce nouveau concept est née l'idée que la mise au point de ligands sélectifs qui stabiliseraient spécifiquement certaines conformations de récepteurs pourrait permettre de cibler des voies de signalisation et donc d'obtenir les réponses pharmacologiques qui y sont associées (figure 11B) (150). La capacité d'un ligand à stabiliser un récepteur dans une conformation reliée à des propriétés de signalisation ou de régulation spécifiques (11) est appelée sélectivité fonctionnelle (302) ou agonisme biaisé (150). La sélectivité du ligand pourrait être fondée sur l'interaction d'un opiacé en particulier avec le complexe des récepteurs et sa capacité à stabiliser ou au contraire déstabiliser la structure dans laquelle les cascades enzymatiques sont activées. Par la suite, les protéines activées régissent l'effet analgésique ou le développement d'une tolérance. C'est pourquoi différents opiacés auront différents effets sur les processus intracellulaires qui modifieront leur efficacité analgésique et leur profil d'effets secondaires. Ce nouveau paradigme est actuellement l'objet d'une attention considérable puisqu'il constitue théoriquement un moyen de dissocier les effets désirables d'un médicament de ses effets indésirables, à condition bien sûr, de connaître les signaux correspondant à chaque type de réponse (10).

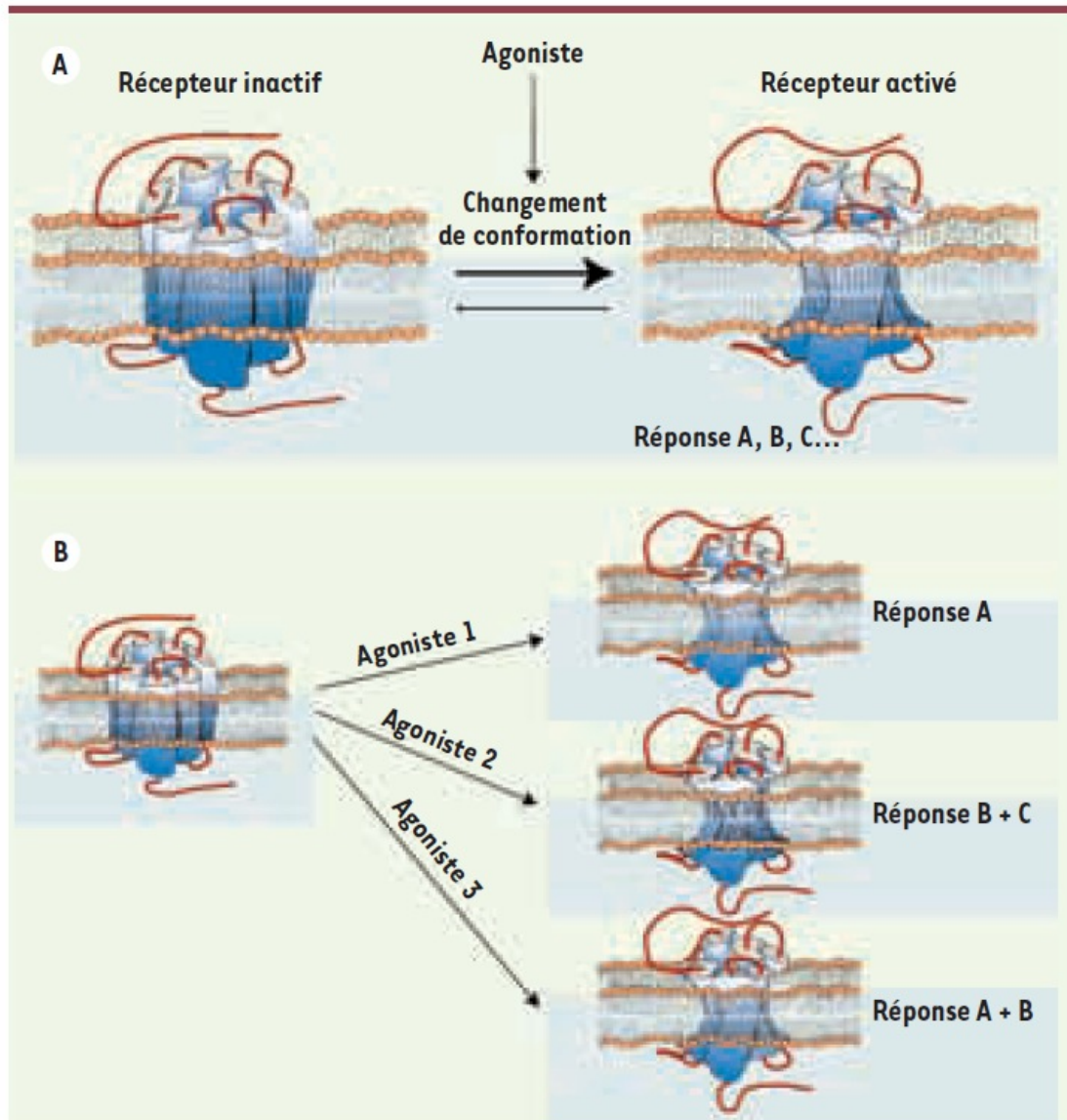


Figure 11. Évolution du concept d'efficacité en pharmacologie

A. Modèle à deux états : une conformation active unique est à la source de toutes les réponses associées à un récepteur donné. B. États actifs multiples : différentes conformations actives présentent des profils de signalisation distincts (Audet et al, 2010) (10).

La capacité des ligands opiacés à stabiliser différentes conformations du DOR a été démontrée en étudiant l'affinité aux différentes sous-unités de la protéine G (10). Aussi, les études de mutagenèse ont démontré que différents agonistes du DOR interagissent avec différents acides aminés de la 3^{ème} boucle extracellulaire (308). Des différences spécifiques de l'agoniste ont été observées dans la désensibilisation du DOR (2, 184, 249). Dans ce contexte, on a constaté que tandis que le traitement avec des agonistes peptidiques ou l'étorphine résulte en une importante phosphorylation du DOR dans les cellules HEK-293

transfectées, le traitement avec la morphine ne l'induit pas (218, 326). De plus, bien que la troncature de la partie C-terminale du DOR abolisse la phosphorylation médiée par les agonistes peptidiques (230, 330), le SNC-80 est encore capable de phosphoryler le DOR tronqué humain. Par conséquent, on peut émettre l'hypothèse qu'il y a plus de sites de phosphorylation du récepteur par les protéines kinases dans la conformation stabilisée par le SNC-80 que dans celle stabilisée par le DPDPE (308). Aussi, les interactions du DOR avec la β arr ont été démontrées spécifiques de l'agoniste (308). En effet, bien que la morphine et l'étorphine activent le DOR au niveau des cellules HEK-293, seule l'étorphine réussit à induire la translocation de la β arr vers la membrane cellulaire (318). L'internalisation du DOR a également été démontrée dépendante de l'agoniste. Ainsi, l'équipe de Marie et al. (201) a montré que dans les cellules SK-N-BE, la cinétique et le profil d'internalisation du DOR humain est dépendante de la structure chimique (peptide ou alcaloïde) de l'agoniste. En outre, la morphine, en accord avec son incapacité de phosphoryler le DOR et de recruter la β arr, est également incapable de promouvoir l'internalisation dans les cellules HEK-293 (148) et CHO (164). Contrairement au MOR, la surexpression de GRK2 ne favorise pas l'internalisation du DOR induite par la morphine dans les cellules HEK-293 (326). Aussi, l'agoniste AR-M1000390 induit une désensibilisation rapide du DOR humain sans causer une internalisation mesurable dans les cellules SK-N-BE (201). Ceci n'a pas été le cas au niveau du cerveau où le AR-M1000390 ne réussissait pas à désensibiliser la réponse analgésique médiée par le DOR (231).

La régulation négative du DOR dépend également de l'agoniste en question. En utilisant la microscopie à fluorescence, l'équipe de Marie et al. (201) a démontré que, bien que le traitement moins de 4h avec des agonistes de nature peptidique cible le DOR humain dans les lysosomes, l'étorphine dirige préférentiellement le récepteur dans les endosomes de recyclage. Aussi, la troncature de la partie C-terminale du DOR humain au niveau de la Gly³³⁸ (229) abolit complètement la régulation négative médiée par le DPDPE mais pas celle par SNC-80. De même, la mutation du site de phosphorylation primaire putatif, la Ser³⁶³ en alanine atténue seulement la régulation négative du DOR induite par le DPDPE (pas celle induite par le SNC-80) dans les cellules CHO (cellules ovariennes de Hamster chinois) (221). Ces données suggèrent que la phosphorylation du DOR et sa régulation négative médiée par le SNC-80 impliquent d'autres domaines du récepteur, en plus de la partie C-terminale.

En conclusion, les différences entre les agonistes apparaissent à chaque étape de la

désensibilisation homologue du DOR et même les agonistes qui présentent des efficacités similaires dans l'activation de la protéine G diffèrent souvent dans leur capacité à phosphoryler, désensibiliser, internaliser et dégrader le DOR (308).

Outre le trafic, la sélectivité fonctionnelle peut également permettre l'activation de voies de signalisation par des mécanismes différents. Le DPDPE et le TICP (H-Tyr-Tic[CH₂N]Chaphe-OH), par exemple, amorcent tous deux l'activation de la cascade ERK, mais le DPDPE se comporte comme un agoniste dans la voie cyclase, tandis que le TICP est agoniste inverse sur cette voie (11). Ces observations indiquent que même si le DOR occupé par l'un ou l'autre des ligands est capable d'activer la voie de signalisation des ERK, les conformations sont nécessairement distinctes puisqu'elles produisent des effets opposés sur la voie de l'AMPc (10).

8. Hypothèse de travail

Les différents ligands du DOR induisent des propriétés de trafic distinctes du récepteur soit au niveau de l'internalisation et ses mécanismes sous-jacents ou au niveau du recyclage à la surface cellulaire. Ceci confirme que le DOR adopte différentes conformations, en fonction de l'agoniste qui lui est associé, définissant la propriété de sélectivité fonctionnelle des ligands.

9. But du projet

Le but de cette étude est de mieux caractériser les propriétés de signalisation et les mécanismes de régulation des DOR, puisqu'ils semblent être des cibles putatives pour le traitement de la douleur chronique, ainsi que de plusieurs désordres psychologiques. Cependant, le traitement chronique aux agonistes du DOR produit la tolérance. Donc, puisque la compréhension de la tolérance aux opiacés touche aux mécanismes moléculaires sur lesquels est fondé le trafic des DOR, nous avons été intéressés à étudier ces aspects, et en particulier étudier le rôle de la sélectivité fonctionnelle dans la régulation du DOR afin d'évaluer l'importance de l'étude de cette propriété pharmacologique pour éviter le développement de la tolérance analgésique.

Matériel et méthodes

1. Réactifs

Les réactifs reliés à la culture cellulaire tels le milieu de base DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), le sérum de veau fœtal, le sérum de veau, la glutamine, la pénicilline, la streptomycine, la trypsine, la G418 (geneticine) et le HBSS proviennent de Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Le bleu de trypan et les lamelles proviennent de VWR. L' [³H] adénine est fournie par PerkinElmer Life Sciences. Le chlorure de sodium (NaCl) provient d'ACP Chemicals (Montréal, QC, Canada). La polyéthylénilimine (PEI) provient de Polysciences, Inc. (Warrington, PA, États-Unis). La lipofectamine et l'anticorps Alexa 488 sont fournis par Invitrogen. L'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) et le sérum d'albumine bovine (BSA) sont fournis par EMD chemicals (Gibbstown, NJ, États-Unis). L'anticorps conjugué à une peroxidase (HRP) anti-souris a été fourni par Amersham Biosciences. Le supplément B27 et le Neurobasal A proviennent de Gibco. Le Neurocell était fourni par Multicell. Le PurecolTM provient de INAMED Biomaterials. La papaïne a été fournie par Worthington Biochemical corporation. La morphine, le DPDPE, les sels utilisés pour le tampon PBS (phosphate buffered saline), la forskoline, l'isobutylmethylxantine (IBMX), l'anticorps anti-FLAG M1, le substrat o-phenylenediamine dihydrochlorure (SIGMA FASTTM OPD), la chélérythrine, la polylysine, la Cystéine-HCl monohydrate, l'acide borique, le borate de sodium, le sérum de chèvre, l'imidazole, la paraformaldéhyde (PFA), le chlorure de magnésium et de calcium, le triton, l'inhibiteur de trypsine, l'acide trichloracétique, l'ATP, l'AMPc et tous les produits de la solution de dissociation proviennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, États-Unis). Le ligand TIPP provient généreusement du laboratoire du Dr P. Schiller, et l'UFP-512, du laboratoire de Dr G. Balboni. Le SNC-80 provient de Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, États-Unis). Les plaques de 96 puits proviennent de Perkin-Elmer. Les plats de pétris sont fournis par Sarstedt et les lames étaient de chez Fisherbrand.

2. Plamides

Le FLAG-DOR (264, 265) est le résultat du gène murin DOR étiqueté à l'extrémité N-terminale avec l'épitope FLAG à l'intérieur du vecteur pcDNA3, provenant aimablement du laboratoire du Dr. M. von. Zastrow (Université de Californie, San Francisco). Le dominant négatif de GRK2 (GRK2-K220-R) a été généreusement fourni par le laboratoire du Dr. F. Mayor (département de biologie moléculaire et centre de biologie moléculaire

Severo Ochoa, Espagne). Le dominant négatif de β arr (β arr (319-418)) provient aimablement du laboratoire du Dr. M. Bouvier (Département de biochimie, Université de Montréal). La GRK2-K220R est inactive en raison de la mutation du résidu lysine (K) en position 220 en une arginine (R) qui interfère avec son activité kinase. La β arr (319-418) est équivalente au fragment de l'extrémité C-terminale de la β arr 1 et fonctionne comme dominant négatif parce qu'elle compétitionne avec la β arr fonctionnelle endogène.

3. Culture cellulaire et transfection

Lignées cellulaires immortalisées

Les cellules embryonnaires humaines rénales HEK-293 ont été transfectées, en utilisant la lipofectamine, avec 4 μ g de FLAG-DOR (par pétri de 100mm), pour exprimer ce récepteur de façon stable. Les lignées cellulaires ont été sélectionnées à l'aide de 500 μ g/ml de G418. Ces cellules, nommées WT6, ont été utilisées pour étudier la cinétique d'internalisation des différents ligands et réaliser les expériences d'accumulation d'AMPC. Quant aux transfections transitoires, effectuées à l'aide de PEI (31), les cellules HEK-293 ont été co-exprimées avec le FLAG-DOR (3 μ g pour le contrôle et 1.8 μ g en présence du mutant négatif de GRK2) et soit le vecteur vide pcDNA3 (8 μ g pour le contrôle et 1.2 μ g en présence du mutant négatif de GRK2), soit le double mutant négatif de GRK2 (GRK2-K220R) (8 μ g), pour étudier l'effet de GRK2 dans l'internalisation. Afin d'évaluer le rôle de la β arr, les cellules ont été co-exprimées avec le FLAG-DOR et soit le vecteur pcDNA3 soit la β arr (319-418) (mêmes quantités que le cas précédant). Les lignées cellulaires ont été cultivées en monocouche dans des pétris contenant du milieu DMEM enrichi de 10% (v/v) de sérum de bovin fœtal, 1000 unités/ml de pénicilline, 1mg/ml streptomycine, 5mM de L-glutamine et 10 μ g/ml de plasmocine dans une atmosphère humide de 95% air et 5% CO₂ à 37°C.

La veille de la transfection, on transfère les cellules HEK-293 dans une plaque à 24 puits, déjà traitée avec de la poly-lysine, à une concentration de 150.000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules sont incubées 3-4h avec un mélange contenant du DMEM, les plasmides requis, 150 mM de NaCl et 3 μ g de PEI (pH entre 6.5 et 7.5) pour chaque μ g de plasmide présent, ces trois derniers sont préalablement incubés ensemble 15 min avant d'être ajoutés aux cellules. La transfection est arrêtée en ajoutant du milieu de base supplémenté de sérum de veau fœtal à 10%. 48 heures post-transfection, on étudiera la cinétique d'internalisation par méthode ELISA.

Cultures primaires de neurones

Elles sont préparées à partir du cortex préfrontal de rats en post natal (au plus tard 2 jours après naissance) en utilisant une procédure adaptée d'une méthode décrite précédemment (82). Brièvement, les rats sont cryo-anesthésiés, leurs cerveaux rapidement enlevés et transférés dans une solution de dissociation glacée (Na_2SO_4 90mM; K_2SO_4 30mM; MgCl_2 5,8 mM; CaCl_2 0.25mM; Hepes 10 mM, glucose 20 mM, pH 7,4). Le cortex préfrontal est disséqué et digéré dans une solution de papaïne (20 unités par ml, 40 min à 37°C). Par la suite, le produit est passé successivement dans deux pipettes Pasteur de diamètres décroissants pour sa dissociation mécanique. La suspension obtenue est centrifugée, les cellules en suspension sont diluées à une densité de 2,5 millions/ml avant leur étalement sur des lamelles de verre préalablement traitées avec du collagène/poly-L-lysine (chacun à 0,1 mg/ml). Les cellules sont cultivées dans un milieu basal (Neurobasal) supplémenté avec du B27 (4%), 1000 unités/ml de pénicilline-streptomycine, Glutamax (2%) et sérum de veau fœtal (10%). 24 heures après, les lamelles sont transférées dans une plaque de 6 puits contenant 2 ml de Neurobasal par puits et on transfecte les cellules avec du FLAG-DOR (8µg d'ADN/puits) en suivant le protocole de transfection au phosphate de calcium adapté (270). Brièvement, un précipité de phosphate de calcium/ADN s'est formé dans une solution saline tamponnée d'HEPES (pH 7,03) et a été ajouté goutte à goutte milieu Neurobasal. Après 30 min de transfection, les neurones sont lavés dans une solution saline équilibrée de Hank et retournés à leur milieu de culture d'origine.

4. Essai d'accumulation d'AMPC

Les cellules WT6 sont incubées, pendant au moins 16h, dans du milieu DMEM contenant de la [^3H]-adénine (1µCi/ml; 1Ci=37GBq). La membrane cellulaire est perméable à l'adénine tritiée, qui peut donc pénétrer à l'intérieur de la cellule et s'incorporer dans l'ATP produit par la cellule. L'ATP produit à son tour de l'AMPC marqué. Le lendemain, le milieu radioactif est enlevé et est remplacé par du DMEM à 37°C. Les cellules sont ensuite décollées mécaniquement et lavées 4 fois au PBS à 4°C. Les cellules sont par la suite incubées pendant 20 min à 37°C dans une solution contenant 300µl de PBS/0.1µM forskoline (activateur de l'adénylate cyclase)/2.5µM IBMX (inhibiteur de phosphodiésterases) où on a dilué toutes les drogues de 10^{-12} à 10^{-5}M . La réaction est

arrêtée sur glace à l'aide d'une solution contenant 5% d'acide trichloracétique, 5mM ATP et 5mM AMPc non marquées. Après une centrifugation de 30min à 4°C à 1200G, l' $[^3\text{H}]$ -ATP est séparé de l' $[^3\text{H}]$ -AMPc par chromatographie séquentielle sur colonne de résine Dowex et d'oxyde d'aluminium (Alumine). Les quantités d'AMPc et d'ATP tritiés éluées sont mesurées par un compteur à scintillation liquide et chaque expérience est faite en triplet. Les résultats sont exprimés selon le ratio : ($[^3\text{H}]$ -AMPc/($[^3\text{H}]$ -ATP+ $[^3\text{H}]$ -AMPc)). Les effets des drogues sont exprimés en % de changement par rapport à la production d'AMPc en absence de ligand (niveau basal).

5. Évaluation du trafic du DOR dans les cellules HEK-293

Internalisation

La quantification des récepteurs à la surface membranaire et la mesure de l'internalisation du récepteur est effectuée par technique ELISA, adaptée à partir des méthodes déjà publiées (6, 172, 292). Les cellules sontensemencées à une densité de 300.000 cellules/puits pour les transfections stables et une densité de 150.000 cellules/puits pour les transfections transitoires dans une plaque de 24 puits couverts de poly-lysine. L'étude de l'internalisation se fait au moins 48h après mise en plat des cellules stables, et 48h après transfection pour les cellules transfectées de façon transitoire. Le jour de l'expérience, le milieu complet (avec sérum) sera changé par du DMEM, 15min avant l'ajout des drogues. Lorsque l'effet de la PKC sur la cinétique d'internalisation est étudié, la chélérythrine est diluée dans du DMEM à une concentration de 6 μM et introduite 15min avant le début de l'expérience. Les différentes drogues sont diluées dans du DMEM à une concentration de 10 μM et ajoutées aux cellules, aux temps indiqués sur les figures. L'internalisation est arrêtée par l'élimination des drogues et le lavage avec du PBS à 4°C (3 fois). Les cellules sont ensuite fixées à la PFA (3%) pendant 15min à température pièce (RT). Après lavage de la PFA, les sites non spécifiques sont bloqués par une solution de PBS/BSA (1%)/CaCl₂ (1mM), MgCl₂ (1mM) durant 30min à RT. Les cellules sont par la suite incubées avec l'anticorps primaire anti-FLAG M1 (1:1000 dans du PBS/BSA (1%)), durant 1 heure, toujours à RT. Après lavage de l'anticorps primaire (3 fois au PBS), on ajoute l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à une peroxydase (HRP) (1:5000 dans du PBS/BSA (1%)), pendant 30min. Les cellules sont encore lavées au PBS et 200 μl de substrat HRP o-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA FASTTM OPD) sont ajoutés dans tous les puits, pendant 8 à 12

minutes. La réaction est arrêtée avec une solution de HCl 3N. La densité optique est évaluée à 492 nm dans un lecteur de microplaques (Victor3 ; Perkin Elmer) de 96 puits dans lesquels 200µl du mélange formé sont transférés. La lecture de la densité optique (DO) correspond au signal généré par les récepteurs demeurés à la surface cellulaire. La quantité des récepteurs internalisés à la suite de l'exposition aux drogues est calculée en soustrayant la DO obtenue en présence de l'agoniste de celle obtenue en son absence. Les résultats sont exprimés en pourcentage des récepteurs initialement présents à la surface cellulaire selon le ratio : $((DO^{basal} - DO^{stimulé})/DO^{basal}) * 100$ où DO^{basal} et $DO^{stimulé}$ sont les DO des récepteurs en absence et en présence des drogues, respectivement et aux différents temps. Ils correspondent aux résultats de l'internalisation en pourcentage des récepteurs en surface avant traitement. Les résultats des différents traitements pour modifier l'internalisation sont normalisés selon l'internalisation induite par la drogue correspondant à la condition basale, et présentant le pourcentage d'internalisation maximale observée dans le cas contrôle.

Recyclage

Le recyclage des récepteurs internalisés à la membrane cellulaire est estimé en utilisant une variante de l'essai décrit ci-dessus. Une heure avant l'internalisation, la synthèse protéique est bloquée avec 10µM de cycloheximide qui reste présente durant la période de l'essai. A la fin de la période d'internalisation, l'agoniste est éliminé en lavant avec du DMEM à 37°C (3*1min). Les cellules sont ensuite placées dans l'incubateur, pour permettre leur récupération dans un milieu sans agoniste (DMEM/HEPES/cycloheximide) pour des temps d'incubation croissants. L'expérience est arrêtée en ajoutant du PBS froid, et on procède aux étapes de quantification des récepteurs à la surface, comme décrites dans le paragraphe précédant. Le taux des récepteurs internalisés qui recyclent à la surface membranaire est exprimé comme pourcentage des récepteurs internalisés suite à l'exposition à l'agoniste.

6. Evaluation du trafic du DOR dans les neurones

Le trafic du DOR dans les neurones est évalué par immunofluorescence et microscopie confocale. Les expériences d'immunohistochimie sont réalisées 2 jours après transfection du récepteur. Tout d'abord, les neurones sont incubés avec un anticorps primaire de souris anti-FLAG M1 (1:100), dépendant du calcium, 30 min avant l'ajout soit du véhicule soit des drogues (10µM). Après 60min de traitement, les neurones sont lavés avec du PBS-

EDTA (2*5min) puis 1 seule fois avec du PBS à 37°C. Ces lavages permettent l'élimination des drogues, ainsi que les anticorps liés aux récepteurs de surface, garantissant ainsi que seuls les DOR internalisés, qui sont protégés des lavages, conservent le marquage avec l'anticorps primaire (309). Pour les neurones d'internalisation contrôle, les cellules sont immédiatement fixées à l'aide de la PFA (3%) puis perméabilisées avec du PBS/Triton (0.1%) (20min à RT). Les neurones sont alors exposés à l'anticorps secondaire (Alexa-488 anti-souris, 1:1000), pendant 60min, puis lavés 3 fois au PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Les images sont acquises en utilisant un microscope confocal à balayage laser FluoView 1000 (Olympus). L'intensité moyenne du marquage cytoplasmique est quantifiée en utilisant le logiciel ImageJ selon une méthode décrite précédemment (259). Brièvement, l'intensité nucléaire intégrée est soustraite de l'intensité intégrée dans le périmètre du corps cellulaire des neurones. La valeur obtenue est divisée par l'aire comprise entre le périmètre extérieur de la cellule et le périmètre nucléaire pour donner l'intensité cellulaire moyenne. La fluorescence nucléaire est considérée comme de l'arrière-plan et son intensité moyenne est soustraite du quotient décrit ci-dessus. Pour mesurer l'intensité du marquage de surface, on délimite la membrane manuellement et on calcule l'intensité de fluorescence toujours en utilisant le logiciel ImageJ. Cette valeur sera divisée par l'intensité du marquage cytoplasmique suite au traitement (avant récupération). Pour les neurones montrant le marquage intracellulaire après recyclage, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire, exposées aux drogues ou au véhicule pendant 60min et lavées comme décrit ci-haut. Elles sont renvoyées à l'incubateur pour une récupération de 60min dans du Neurobasal. Après cette période, les cellules sont lavées au PBS/EDTA (2*5min) puis au PBS (1*5min) puis fixées et traitées comme ci-dessus afin d'évaluer la fluorescence intracellulaire après récupération. Pour l'évaluation du marquage de surface des neurones qui ont récupéré de l'exposition à l'agoniste, les cellules sont lavées au PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et exposées à l'anticorps secondaire sans perméabilisation. Le recyclage est déterminé à partir de 2 mesures complémentaires : a) évaluation de la fluorescence intracellulaire qui reste présente après récupération de l'exposition à l'agoniste, b) comptage du nombre de cellules qui présentent du marquage de surface suite à leur incubation en absence de l'agoniste. Au total, 4 expériences indépendantes ont été réalisées dans lesquelles 8-28 neurones par condition ont été étudiés.

7. Analyse statistique

Les analyses statistiques et l'ajustement des courbes sont effectués à l'aide de la version 5 du logiciel Graph Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA). Les tests utilisés sont l'ANOVA (un et deux facteurs) (mesures non répétées), suivis par les comparaisons post hoc de Bonferroni (dans le cas de l'ANOVA à deux facteurs) et le test t non apparié.

8. Ligands du DOR utilisés dans cette étude

De point de vue structural, les ligands peuvent être divisés en deux groupes, les ligands peptidiques : DPDPE ([D-pénicillamine², D-pénicillamine⁵]enképhaline), UFP-512 (H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid) et TIPP (H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH) et les ligands non peptidiques : SNC-80 ((+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxy-benzyl]-N,N-diethyl-benzamide) et morphine. Les ligands non peptidiques sont moins métabolisés et passent plus facilement la barrière hématoencéphalique ainsi que les membranes cellulaires (39). Le DPDPE a été synthétisé à partir de l'enképhaline, un pentapeptide endogène, en ajoutant des ponts de disulfure entre les deux pénicillamines afin de rendre la conformation plus rigide pour se lier spécifiquement au DOR (75). L'UFP-512 a été synthétisé à partir d'un pharmacophore antagoniste, le Dmt-Tic, en modifiant l'extrémité C-terminale dans le but de créer un agoniste (16). Le térapeptide TIPP est un antagoniste potentiel du DOR caractérisé par une extrémité carboxylique libre lui conférant une haute sélectivité envers le DOR (261). Le SNC-80 a été synthétisé à partir de l'énantiomère du 1-allyl-trans-2,5-dimethylpiperazine (38). En ce qui concerne la morphine, des méthodes de synthèse chimique existent mais la production à partir du pavot reste la plus rentable. Industriellement la morphine peut être obtenue de deux façons :

- à partir de pavot Oeillette : on utilise la capsule égrenée et l'extrémité de la tige du pavot oeillette (*papaver somniferum nigrum*) récolté "vert" pendant l'été. Les parties de la plante sont séchées, puis la morphine est extraite en milieu hydroalcoolique avec d'autres opiacés. Elle sera séparée par une précipitation sélective avant d'être purifiée.
- à partir de l'opium : l'opium est issu de pavots (*papaver somniferum*), cultivés en Inde, par évaporation du latex qui s'écoule d'incisions faites sur la capsule. La morphine (et d'autres alcaloïdes) est obtenue par extraction aqueuse acide depuis

l'opium qui en contient à peu près 10 %. Elle est ensuite obtenue seule par une précipitation sélective.

Exposé et analyse des résultats

1. Efficacité de signalisation des différents ligands dans la voie d'accumulation d'AMPC

Il a été important d'évaluer en premier lieu l'ordre d'efficacité de nos différentes drogues dans la voie de l'adénylate cyclase afin de voir comment il va corrélérer ultérieurement avec l'ordre d'efficacité d'internalisation. Une éventuelle inversion dans l'ordre d'efficacité dans les deux réponses sera un indice confirmant la propriété de sélectivité fonctionnelle, comme déjà détaillé dans l'introduction (paragraphe sélectivité fonctionnelle). La capacité des différents ligands : DPDPE, SNC-80, morphine, TIPP et UFP-512 de moduler la production d'AMPC a été évaluée dans les cellules HEK-293, exprimant de façon stable le DOR. On remarque que tous les ligands inhibent la production d'AMPC de façon dose dépendante (figure 12). Ils se comportent donc comme agonistes dans cette voie de signalisation vu que le DOR est couplé à $G_{\alpha i}$, inhibant l'activité de l'adénylate cyclase. En comparant les effets maximaux (E_{max}) d'inhibition d'AMPC correspondant à chaque drogue (figure 13), on peut classer les ligands par ordre d'efficacité décroissant: SNC-80 = DPDPE \geq UFP-512 = morphine > TIPP (E_{max} respectifs en % : 70.8, 68.9, 56.6, 46 et 17). Donc à des concentrations maximales de 10 μ M, le SNC-80 et le DPDPE sont les agonistes les plus efficaces, suivis par l'UFP-512, la morphine et le TIPP. Ces trois derniers se comportent donc comme agonistes partiels. Concernant la puissance, les $-\log EC_{50}$ étaient de 9.7, 9.4, 8.3, 8 et 5.8 pour TIPP, UFP-512, SNC-80, DPDPE et morphine, respectivement. On peut alors classer nos ligands par ordre de puissance décroissant : TIPP \geq UFP-512 > SNC-80 = DPDPE > morphine. En effet, plus le $-\log EC_{50}$ est grand, plus la concentration requise pour avoir 50% de l'effet maximal est faible, donc plus la drogue est puissante (exemple : si $-\log EC_{50} = 9.7$, la concentration requise est de l'ordre de 100pM et si $-\log EC_{50} = 8.3$, la concentration requise est de l'ordre de 10nM).

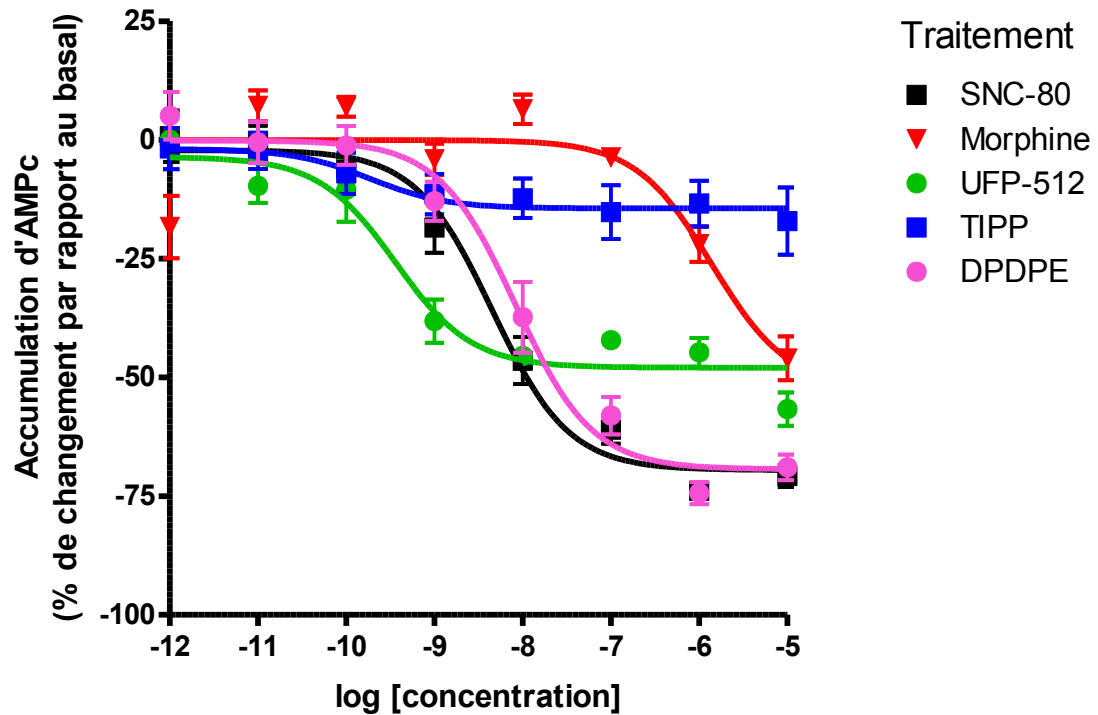


Figure 12. Signalisation des ligands du DOR dans la voie de l'adénylate cyclase : courbes doses-réponses.

Les cellules HEK-293, transfectées de façon stable avec le DOR, ont été utilisées dans les essais d'accumulation d'AMPC afin de générer des courbes doses-réponses pour chacune des drogues aux concentrations indiquées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de changement de la production d'AMPC par rapport au basal et représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 7 expériences pour chacun. Une analyse statistique ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) a démontré un effet du traitement ($p < 0.0001$), un effet de la concentration ($p < 0.0001$), ainsi qu'une interaction entre les deux facteurs ($p < 0.0001$). Les comparaisons post hoc de Bonferroni ont permis d'établir que la courbe produite par SNC-80 n'est pas différente de celle produite par le DPDPE ($p > 0.05$), les courbes produites par ces deux drogues diffèrent de celle produite par l'UFP-512 ($p < 0.01$), qui à son tour est différente de la courbe produite par le TIPP ($p < 0.001$). La morphine, quant à elle, donne une courbe différente de toutes les autres avec une puissance au moins deux fois moins grande ($p < 0.05$).

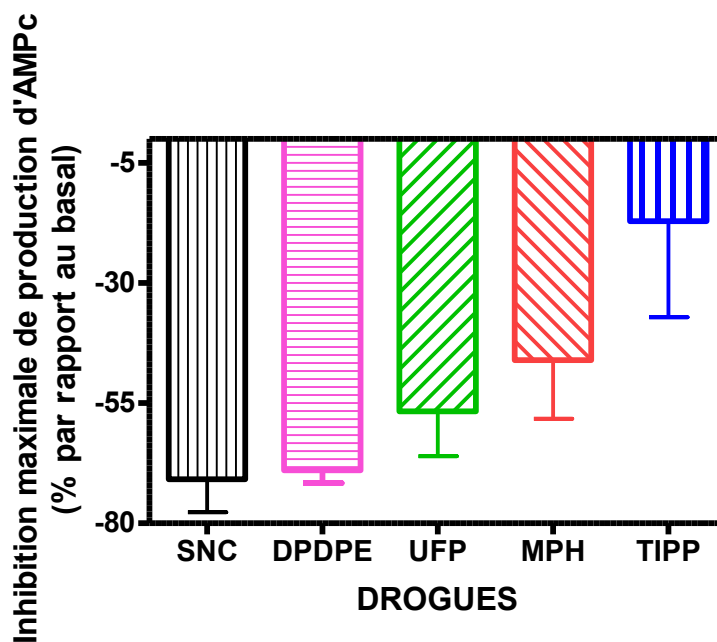


Figure 13. L'effet maximal d'inhibition de la production d'AMPc diffère selon le ligand.

La présence d'une interaction dans l'analyse antérieure nous a permis de faire des comparaisons plus poussées entre les différentes drogues. Nous avons donc opté pour l'ANOVA à un facteur (mesures non répétées) afin de comparer les E_{max} produits par les différents agonistes, ce qui nous a permis d'établir leurs efficacités relatives. Cette comparaison a révélé que le SNC-80 et le DPDPE ne sont pas différents dans leurs E_{max} ($p > 0.05$), mais différent des E_{max} de la morphine ($p < 0.001$) et du TIPP ($p < 0.0001$). Le E_{max} de l'UFP-512 n'est pas différent de celui correspondant à la morphine ($p > 0.05$) mais diffère de celui de TIPP ($p < 0.0001$).

2. Internalisation du DOR dans les cellules HEK-293

2.1. Cinétique et magnitude d'internalisation

L'internalisation est l'une des étapes du processus de désensibilisation des GPCR. On a voulu alors comparer la magnitude d'internalisation à l'efficacité de signalisation des différents ligands afin de déceler un éventuel indice de sélectivité fonctionnelle. Nous avons donc comparé la capacité des différents ligands à internaliser le DOR. La quantité des récepteurs membranaires internalisés a été quantifiée par la technique ELISA. Les résultats indiquent que seulement le DPDPE et le SNC-80 réussissent à faire internaliser le DOR dans les cellules HEK-293. Les autres drogues, agonistes partiels, à savoir l'UFP-512, la morphine et le TIPP ne le font pas (figure 14). Donc les différentes drogues modulent différemment l'internalisation du DOR. Le SNC-80 et le DPDPE produisent la même internalisation avec des demi-vies respectives de 11.5 et 17.0 min. Aussi, l'internalisation des différentes drogues a été proportionnelle à leur efficacité de signalisation dans la voie de l'adénylate cyclase. En effet, les drogues les plus efficaces

dans cette voie, à savoir le SNC-80 et le DPDPE internalisent le DOR, alors les agonistes partiels UFP-512, morphine et TIPP ne produisent aucune internalisation significative du DOR.

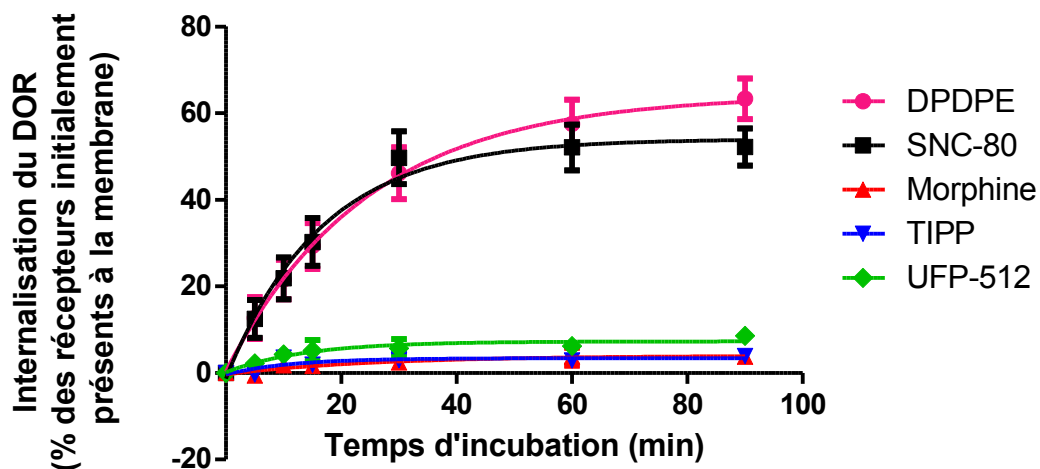


Figure 14. Les agonistes du DOR induisent différents degrés d'internalisation dans les cellules HEK-293.

Le graphique représente l'internalisation du DOR en fonction du temps, pour les différentes drogues. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la densité des récepteurs initialement présents à la membrane et représentent la moyenne \pm SEM de 6 expériences pour chacun des ligands. Une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) a démontré un effet du traitement ($p < 0.0001$), un effet du temps d'incubation ($p < 0.0001$), ainsi qu'une interaction entre les deux facteurs ($p < 0.0001$). Les comparaisons post hoc de Bonferroni ont permis d'établir que la cinétique d'internalisation produite par le DPDPE est similaire à celle produite par le SNC-80 ($p > 0.05$). Les internalisations produites par ces deux drogues sont différentes de celles produites par l'UFP-512, la morphine et le TIPP ($p < 0.0001$). Ces dernières ne sont pas différentes entre-elles ($p > 0.05$).

2.2. Mécanismes d'internalisation du DOR dans les cellules HEK-293

2.2.1. Rôle des kinases GRK2 et PKC

Etant donné que le DPDPE et le SNC-80 étaient les 2 drogues qui produisaient l'internalisation du DOR dans les cellules HEK-293 et de façon similaire, il était intéressant de déterminer si ces deux ligands reposent sur les mêmes mécanismes pour induire l'internalisation du DOR. Pour ce faire, on est allé évaluer l'implication d'une kinase responsable de la désensibilisation homologe et plus précisément l'internalisation du DOR, à savoir la GRK2 (233, 296) et une kinase impliquée dans la désensibilisation hétérologue et l'internalisation du DOR, à savoir la PKC (323). En effet, on a démontré que pour le MOR, il existe des mécanismes spécifiques de l'agoniste concernant sa

désensibilisation et son internalisation. Donc on a voulu savoir si cela s'applique également aux ligands du DOR.

La co-transfection avec le dominant négatif de la GRK2 (DMN GRK2), qui interfère avec l'activité kinase de la GRK2 réduisant sa capacité de phosphoryler le récepteur en raison de la mutation du résidu lysine (K) en position 220 en une arginine (R), produit une augmentation dans le taux de récepteurs internalisés par chaque ligand ($p < 0.0001$) (figure 15A et 15B). Ceci était assez surprenant étant donné que la littérature indique un rôle actif de cette kinase dans l'internalisation du DOR. Des explications probables seront discutées dans la section suivante.

Pour tester l'efficacité du DMN GRK2 dans notre système, on a effectué un contrôle positif avec un autre GPCR, qui est déjà connu pour faire intervenir la GRK2 dans son processus d'internalisation dans nos cellules HEK-293, à savoir le 5-HT_{4a} (18). Effectivement, l'internalisation de l'isoforme a du récepteur 5-HT₄ est sensible à l'interférence avec la fonction de la GRK2 par la GRK2-K220R (figure 25 de l'annexe I). Le blocage de l'internalisation du récepteur 5-HT_{4a} par le DMN GRK2 indique que ce mutant négatif est fonctionnel, et que la cause de l'observation inattendue avec les DOR ne peut pas être attribuée à une construction défectueuse du dominant négatif.

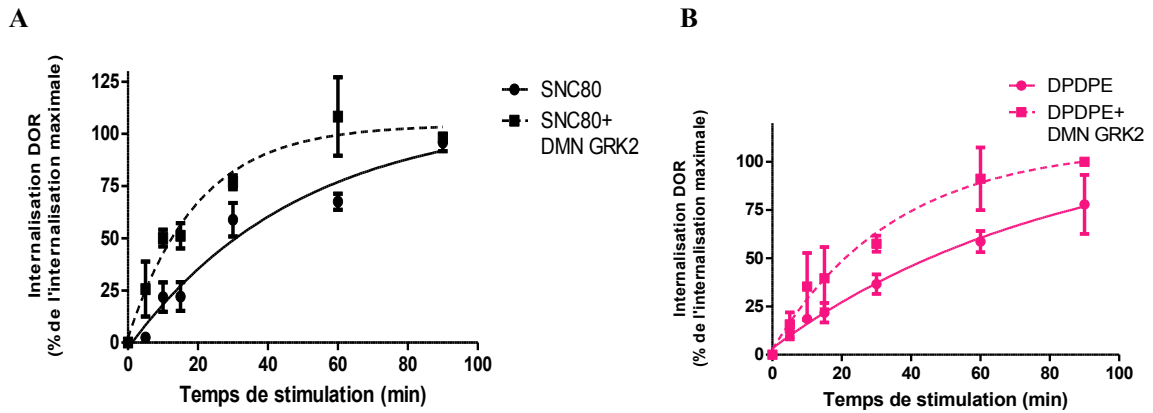


Figure 15. La GRK2 n'est pas essentielle pour l'internalisation du DOR produite par le SNC-80 et le DPDPE dans les cellules HEK-293.

Les cellules HEK-293, transitoirement co-transfectées avec le DOR et soit le mutant négatif de GRK2 (DMN GRK2) soit le vecteur vide pcDNA3, ont été exposées soit au DPDPE ou SNC-80 (1µM). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 3 expériences pour chacun. A : Pour le SNC-80, une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) a démontré un effet du DMN GRK2 ($p < 0.0001$) et un effet du temps de stimulation ($p < 0.0001$) sans interaction entre les deux facteurs. B : La présence du DMN GRK2 augmente l'internalisation du DOR induite par le DPDPE. Une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) donne une valeur de $p < 0.001$ pour l'effet DMN GRK2 et une valeur de $p < 0.0001$ pour l'effet temps de stimulation, également sans interaction entre les deux facteurs.

Afin de déterminer si la régulation hétérologue du DOR est spécifique de l'agoniste, comme dans le cas du MOR (143), nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la PKC, la chélérythrine, un alcaloïde naturel qui se fixe sur le domaine catalytique et plus particulièrement sur le site de liaison du substrat. Les résultats montrent que l'inhibition de la PKC n'altère pas l'internalisation maximale du DOR par les deux ligands, puisque les courbes correspondantes atteignent la même internalisation observée dans les contrôles ($98 \pm 6\%$ du contrôle pour le SNC-80 et $97 \pm 9\%$ du contrôle pour le DPDPE) (Figure 16A et 16B). On remarque cependant une différence dans la vitesse d'internalisation du DOR produite par le DPDPE en présence et absence de chélérythrine. On peut en conclure que la PKC n'affecte pas le taux d'internalisation maximale du DOR produite par les deux agonistes mais pourrait contribuer à déterminer la vitesse d'internalisation induite par le DPDPE.

Afin de contrôler l'efficacité de la chélérythrine, on a refait la même expérience mais avec le récepteur 5-HT_{4b}, un récepteur déjà connu pour impliquer la PKC dans son processus

d'internalisation au niveau des cellules HEK-293 (212). Effectivement, la chélérythrine bloque complètement la séquestration du récepteur (figure 26 de l'annexe I).

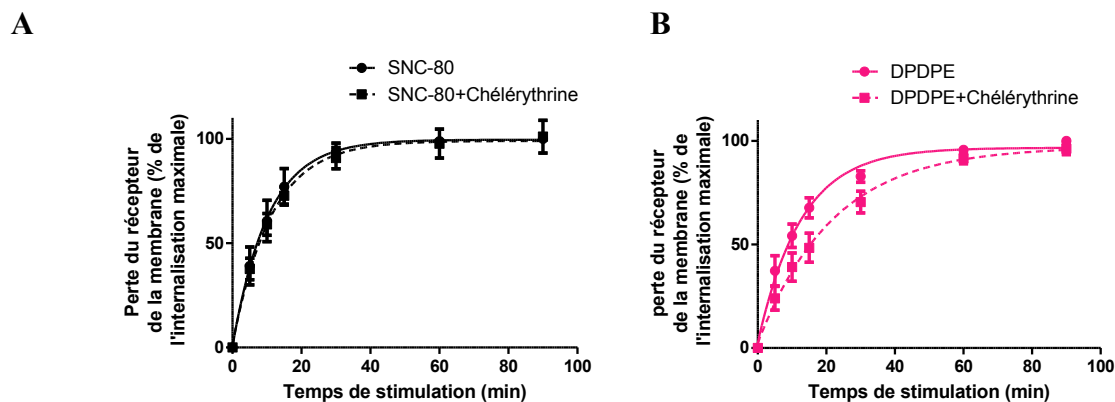


Figure 16. La PKC n'est pas essentielle à la séquestration du DOR produite par le SNC-80 et le DPDPE dans les cellules HEK-293.

Les cellules HEK-293, stablement transfectées avec le DOR, ont été prétraitées avec 6 μ M de chélérythrine ou véhicule pendant 15min, ensuite exposées soit au DPDPE et SNC-80 (1 μ M) durant les périodes de temps indiquées. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences pour chaque drogue. A : L'internalisation du DOR par le SNC-80 est insensible à l'inhibition de la PKC. Une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) donne une valeur de $p > 0.05$ (non significative) pour l'effet chélérythrine et une valeur de $p < 0.0001$ pour l'effet temps. B : Pour le DPDPE, ce même test donne une valeur de $p < 0.0001$ pour l'effet chélérythrine et temps sans interaction entre les deux facteurs.

2.2.2. Rôle de la β -arrestine

Afin de vérifier si la β arr serait impliquée de la même façon dans la séquestration du DOR par les deux agonistes, et pour déceler une éventuelle sélectivité fonctionnelle de ligands quant à l'implication de cette protéine dans le processus d'internalisation, comme dans le cas du MOR (143), nous avons utilisé la β arr(319-418), qui correspond à la portion C-terminale de la β arr1 et agit comme dominant négatif au niveau de l'internalisation, empêchant l'interaction de la β arr avec le récepteur (144, 277). Nous avons observé que la surexpression de la β arr(319-418) réduit l'internalisation du DOR à peu près de moitié, dans le cas des deux agonistes (réduction de l'internalisation maximale de 52% pour le SNC-80 et de 40% pour le DPDPE). Ces résultats démontrent que l'internalisation du DOR occupé par le DPDPE ou SNC-80 nécessite l'action de la β arr de façon similaire (figure 17).

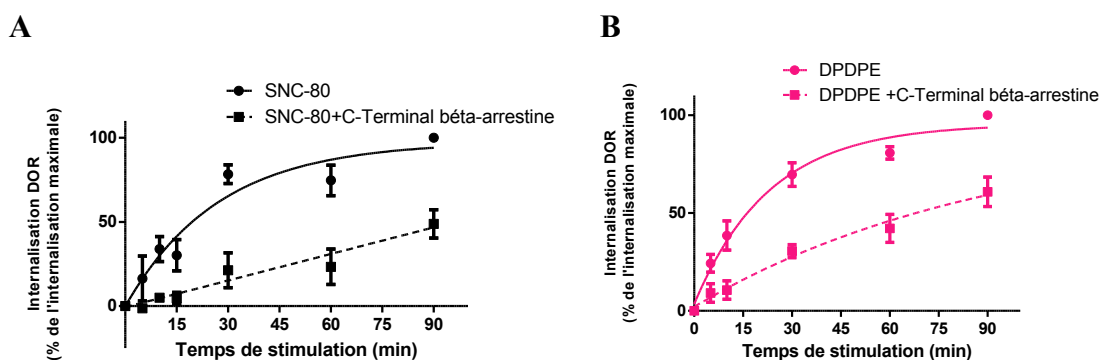


Figure 17. La β arr est impliquée dans l'internalisation du DOR par le SNC-80 et le DPDPE de façon similaire.

Les cellules HEK-293, transitoirement co-transfectées avec le DOR et soit le vecteur vide pcDNA3 soit la β arr(319-418), ont été exposées au DPDPE et SNC-80. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences pour chaque drogue. A : Pour le SNC-80, une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) démontre un effet de la β arr(319-418) ($p < 0.0001$) et un effet du temps de stimulation ($p < 0.0001$) avec une interaction entre les deux facteurs ($p < 0.01$). B : Pour le DPDPE, la même analyse statistique révèle un effet de la β arr(319-418) ($p < 0.0001$) et un effet du temps de stimulation ($p < 0.0001$) avec une interaction entre les deux effets ($p < 0.001$).

L'analyse de la signalisation et de l'internalisation du DOR démontre que les différences entre les ligands sont principalement reliées à leurs efficacités respectives sans évidence majeure de l'existence de sélectivité fonctionnelle concernant les mécanismes d'internalisation. Pour cela et afin de déceler une éventuelle différence plus importante, nous avons étudié une autre forme de trafic du DOR, en particulier le recyclage comme exemple de trafic post-endocytique.

3. Recyclage du DOR dans les cellules HEK-293

Plusieurs études réalisées dans des systèmes d'expression hétérologues ont montré que les DOR sont dégradés suite à leur internalisation (123, 319). Cependant, notre laboratoire a démontré que le DOR peut recycler, quand il est lié au DPDPE (6). La liaison de SNC-80 au DOR n'a pas encore été étudiée si elle produirait le recyclage du récepteur suite à son internalisation. Pour valider ceci, le trafic post-endocytique induit par chaque agoniste a été évalué dans les cellules HEK-293 suite à une exposition de 30 min au DPDPE et SNC-80 (1 μ M). Comme le montre la figure 18, aucun des récepteurs internalisés par SNC-80 n'a été en mesure de recycler, alors que 53% \pm 3% de ceux internalisés par le DPDPE réapparaissent à la membrane.

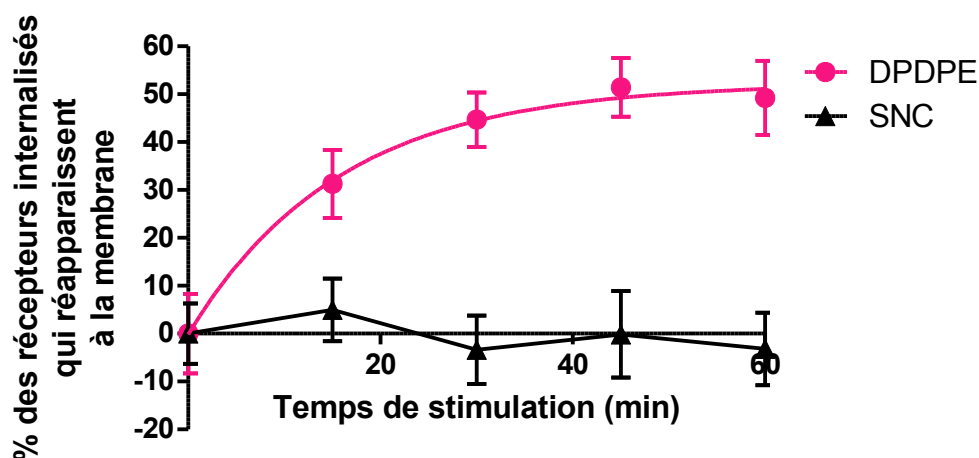


Figure 18. Différents profils de recyclage du DOR suite à l'exposition au DPDPE et SNC-80

Les cellules HEK-293, stablement transfectées avec le Flag-DOR, ont été prétraitées avec 10 μ M de cycloheximide pendant 1 heure afin de bloquer la synthèse protéique, ensuite exposées au DPDPE et SNC-80 (1 μ M) durant 30 min. À la fin du traitement, les agonistes ont été lavés et les cellules laissées récupérer pendant des temps d'incubation croissants. Le taux des récepteurs internalisés qui recyclent à la surface membranaire a été évalué par la technique ELISA et exprimé comme pourcentage des récepteurs internalisés suite à l'exposition à l'agoniste. Ce taux représente la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences pour chaque drogue. Une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) a démontré une différence entre les drogues ($p < 0.0001$), un effet du temps de stimulation ($p < 0.05$), ainsi qu'une interaction entre les deux facteurs ($p < 0.01$).

Par ailleurs, les essais de déplacement [3 H]naltrindole ont confirmé que l'absence de recyclage observée pour le SNC-80 ne pouvait pas être attribuée au lavage incomplet de la drogue, car la valeur de K_d pour le radioligand a été restaurée à sa valeur initiale de pré-traitement suite au retrait de l'agoniste (voir figure 27 de l'annexe I).

4. Internalisation et recyclage du DOR dans les neurones corticaux

Le trafic du DOR a également été évalué au niveau des neurones corticaux, afin d'assurer que les différences entre les ligands qui ont été observées ne sont pas dues à l'environnement cellulaire dans lequel les récepteurs sont exprimés. On est allé alors étudier si les deux ligands induisent une internalisation et un recyclage du DOR dans les neurones similaires à ceux observés au niveau des cellules HEK-293. L'internalisation a été évaluée par la technique d'immunofluorescence qui nous a permis d'étiqueter spécifiquement les DOR de surface avant de les exposer à des drogues ou véhicules (309). À la fin du traitement, tous les récepteurs restants à la membrane ont été dépouillés de l'anticorps primaire tels que seulement les DOR qui étaient protégées du lavage par

internalisation seront révélés par marquage ultérieur par immunofluorescence. La figure 19 montre que l'exposition au véhicule induit une faible augmentation du marquage intracellulaire en fonction du temps, ce qui est cohérent avec une faible internalisation constitutive du DOR. L'exposition aux DPDPE ou SNC-80 (10 μ M) induit un plus grand marquage intracellulaire dépendant du temps et semblable pour les deux agonistes. La quantification du marquage intracellulaire a confirmé que l'exposition de 60 min au DPDPE et SNC-80 conduit à une internalisation similaire pour les deux ligands (figure 20).

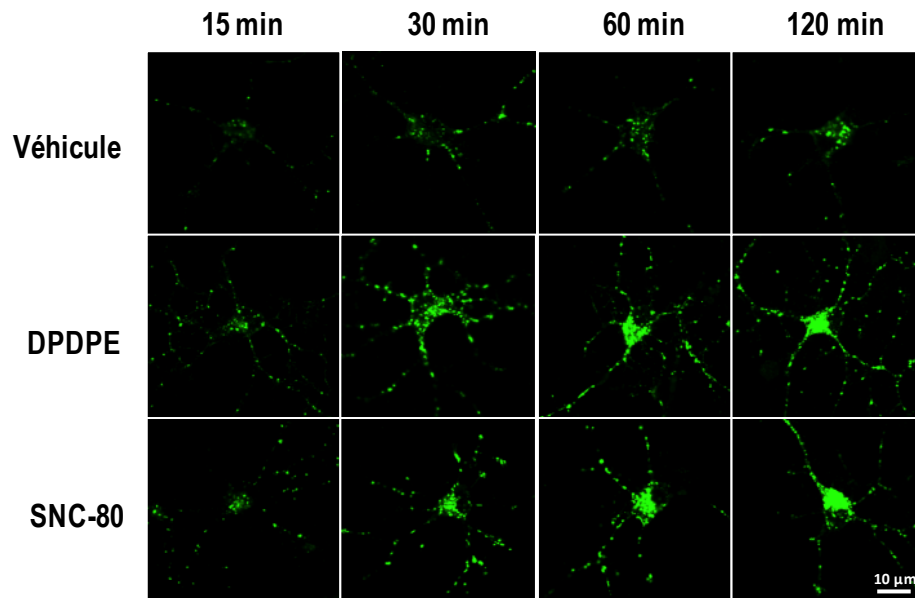


Figure 19. Le DPDPE et SNC-80 induisent l'internalisation du DOR dans les neurones

Des cultures de neurones corticaux transfectés avec le DOR ont été incubées avec l'anticorps primaire pour marquer les récepteurs de surface. Les neurones sont ensuite traités avec le DPDPE ou le SNC-80 (10 μ M) pendant les temps indiqués. Après arrêt du traitement, les anticorps liés aux récepteurs de surface ont été éliminés, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps secondaire pour la visualisation du marquage intracellulaire. Un exemple représentatif de trois expériences indépendantes est montré.

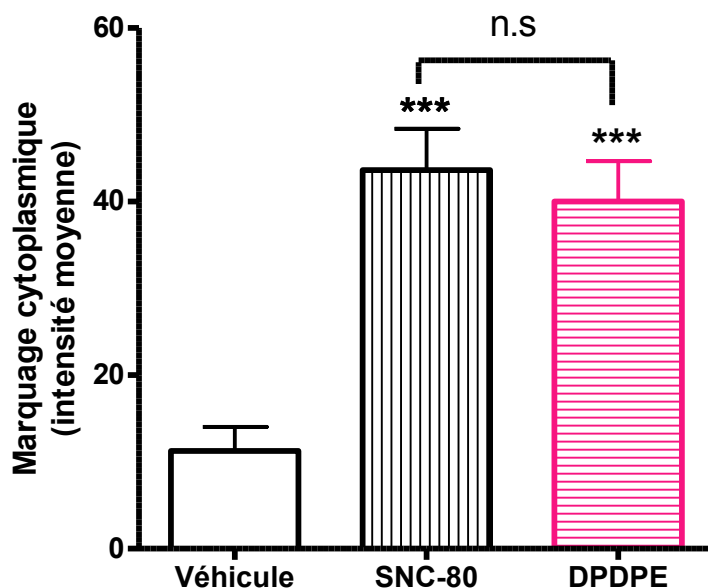


Figure 20. Quantification du marquage intracellulaire induit par l'exposition au DPDPE et SNC-80 (10 μ M) pendant 60min.

Les histogrammes correspondent à l'intensité moyenne de fluorescence intracellulaire quantifiée dans les neurones qui ont été exposés soit aux drogues soit au véhicule pendant 60 minutes et représentent la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes. Les données d'internalisation ont été analysées en utilisant le test d'ANOVA à un facteur (mesures non répétées). Ce test a permis d'établir que les drogues produisaient une internalisation significative par rapport à celle induite par le véhicule ($p < 0.0001$). La différence entre le marquage intracellulaire induit par les deux ligands n'était pas significative ($p > 0.05$), confirmant une internalisation similaire pour les deux drogues.

Donc de façon pareille à ce que nous avons obtenu au niveau des cellules HEK-293, il n'y a pas de différence entre les deux drogues à induire l'internalisation du DOR. On a voulu alors établir si les différences de recyclage entre les deux agonistes au niveau des cellules HEK-293 se reproduiraient au niveau des neurones. Pour ce faire, le recyclage du DOR a été évalué dans les neurones dans lesquels on avait induit l'internalisation par exposition de 60 min au DPDPE ou SNC-80 (10 μ M). Le recyclage a été évalué en effectuant deux mesures complémentaires: a) la proportion de récepteurs qui restent internalisés dans le cytosol 60 min après retrait de l'agoniste (figure 21 et 22) et b) le nombre de cellules traitées par l'agoniste qui ont récupéré leur marquage de surface suite au retrait de la drogue (figure 23 et 24). Pour obtenir la première mesure, nous avons quantifié la fluorescence intracellulaire dans les neurones qui ont été marqués immédiatement après l'exposition à l'agoniste et dans les neurones qui, après avoir été traités, ont récupéré en absence du ligand (figure 21). Le marquage intracellulaire a été de 44 ± 7 (unité arbitraire)

immédiatement après internalisation par SNC-80 et de 37 ± 5 (unité arbitraire) après récupération, ce qui indique que $84 \pm 8 \%$ ($n=4$) des DOR séquestrés restent piégés à l'intérieur de la cellule (figure 22). Dans le cas du DPDPE, cette proportion est réduite à $47 \pm 6 \%$ ($n = 4$) avec les valeurs d'intensité intracellulaire de 19 ± 5 et 40 ± 7 (unité arbitraire) avec et sans récupération, respectivement (figure 22). Ensuite, on est allé vérifier si les récepteurs qui ont disparu du compartiment intracellulaire ont effectivement recyclé, donc ont regagné la membrane après la récupération du traitement. Pour ce faire, les neurones ont été exposés à l'agoniste ou au véhicule et, à la fin du traitement, l'agoniste a été enlevé et les DOR restants à la membrane ont été dépouillés de leur premier anticorps, de telle façon que le marquage ultérieur ne révèle que les récepteurs qui regagnent la membrane après récupération de l'internalisation. Les neurones qui ont été exposés au véhicule ne démontrent aucun étiquetage de surface, ce qui est cohérent avec l'observation que l'internalisation indépendante du ligand a été trop faible, pour pouvoir observer du marquage membranaire après récupération (figure 23). D'autre part, le marquage membranaire était évident dans les cellules qui avaient été pré-exposées au DPDPE et SNC-80 indiquant un certain niveau de recyclage pour chaque ligand (figure 23). Le taux de récepteurs qui recyclaient à la membrane suite à l'exposition à chacun des agonistes a été estimé au moyen d'un «taux de récupération». Ce ratio a été calculé en divisant le nombre de neurones marqués qui récupèrent le marquage de surface dans les lamelles traitées avec chacun des agonistes par le nombre total de neurones marqués à la surface présents dans les lamelles qui n'étaient pas soumises à un traitement (voir matériels et méthodes). Les résultats montrent que le taux de récupération dans les neurones traités au DPDPE était plus grand que celui obtenu dans ceux exposés à SNC-80 (figure 24). Pris ensemble, ces résultats indiquent que suivant l'internalisation induite par SNC-80, les DOR restent majoritairement piégés dans le cytosol, tandis que ceux internalisés par le DPDPE quittent le compartiment intracellulaire pour regagner la membrane.

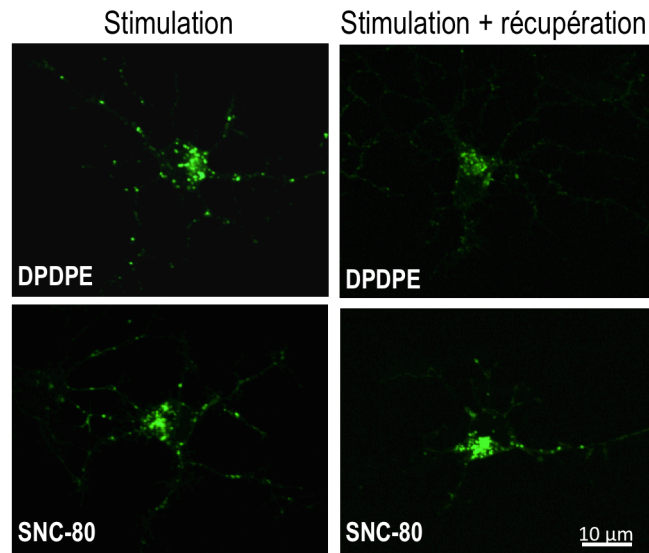


Figure 21. Le marquage intracellulaire après récupération diminue suite à l'exposition au DPDPE mais pas suite à l'exposition au SNC-80.

Les neurones sont traités, puis lavés et soit immédiatement traités pour le marquage intracellulaire (stimulation) ou laissés tout d'abord récupérer pendant 60 min, en absence du ligand (stimulation + récupération). Un exemple représentatif de quatre expériences indépendantes est montré. Le DPDPE et le SNC-80 produisent une internalisation similaire du DOR mais c'est seulement le traitement au DPDPE qui résulte en une diminution du marquage intracellulaire après récupération.

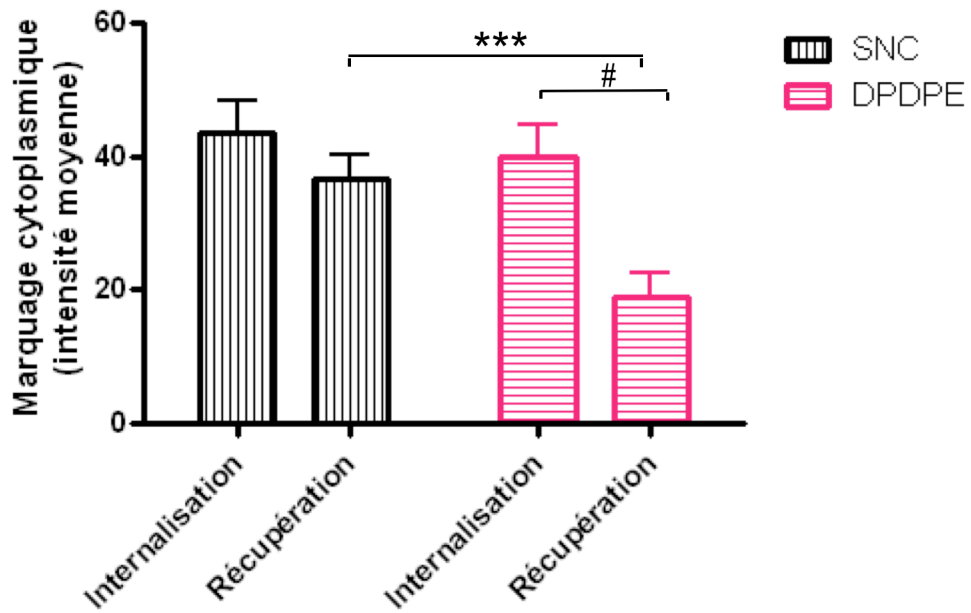


Figure 22. Quantification du marquage intracellulaire de l'internalisation et suite à la récupération

Les histogrammes représentent l'intensité moyenne de fluorescence intracellulaire dans les neurones qui ont été stimulés et immédiatement marqués (internalisation), ou dans les neurones qui ont d'abord récupéré en absence du ligand (récupération). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences indépendantes. Les données ont été analysées par un test d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) qui a démontré une interaction entre l'effet drogue et recyclage ($p < 0.001$). Les comparaisons Post hoc de Bonferroni ont permis d'établir que les récupérations induites par le DPDPE et le SNC-80 sont significativement différentes ($p < 0,001$) et que c'est seulement le DPDPE qui démontre une différence significative pour l'intensité du marquage intracellulaire avant et après récupération ($p < 0,001$).

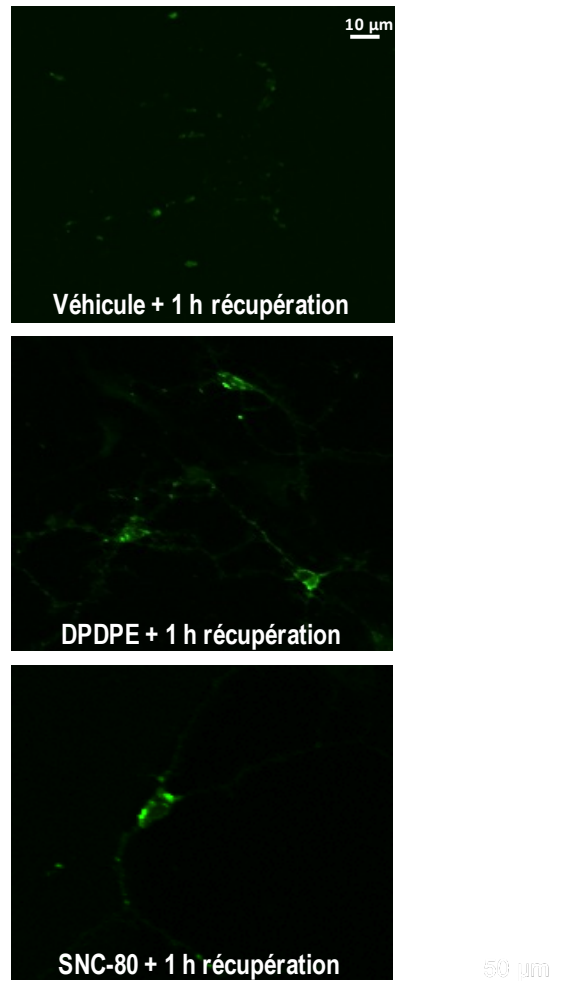


Figure 23. Les neurones marqués à la surface après récupération sont plus nombreux suite au traitement au DPDPE qu'au SNC-80.

Les neurones ont été traités et lavés avant de leur permettre de récupérer, en absence du ligand. À la fin de la période de récupération, les cellules ont été traitées pour le marquage de surface tel que décrit dans la section matériels et méthodes. L'image montre un exemple représentatif du marquage de surface obtenu dans des conditions de traitements différents et correspond à un exemple représentatif de quatre expériences indépendantes. On note un plus grand nombre de neurones marqués à la membrane après récupération dans le cas du traitement au DPDPE par rapport au SNC-80.

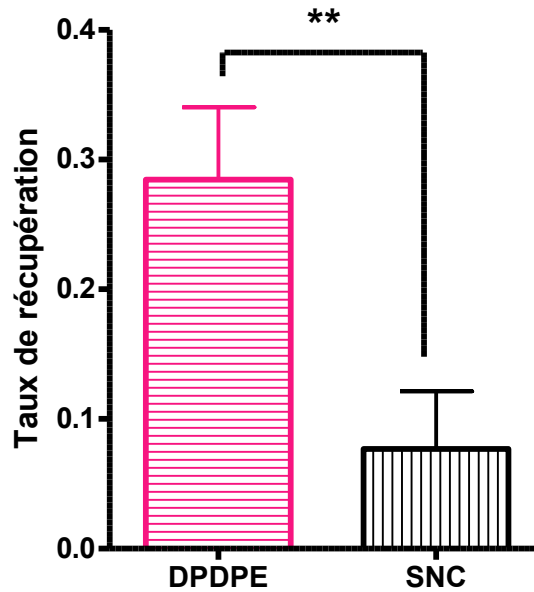


Figure 24. Le taux de récupération suite au traitement au DPDPE est plus grand que celui correspondant au SNC-80.

Les histogrammes représentent les "taux de récupération" obtenus après récupération de l'exposition au DPDPE ou SNC-80 et correspondent à la moyenne \pm SEM de quatre expériences indépendantes. Les "taux de récupération" ont été calculés en divisant le nombre de neurones marqués en surface présents dans les lamelles traitées à l'agoniste par le nombre total de neurones marqués en surface présents dans les lamelles qui n'étaient pas soumises à un traitement. Les taux de récupération ont été analysés par le test t non apparié qui a donné une valeur de $p < 0,01$.

Discussion

Notre étude a démontré que les différents ligands du DOR testés, à savoir le DPDPE, le SNC-80, la morphine, le TIPP et l'UFP-512 différaient dans leur efficacité de signalisation dans la voie d'accumulation d'AMPC, ce qui nous a permis de classer ces différentes drogues en deux groupes : le groupe des agonistes complets incluant le SNC-80 et le DPDPE et le groupe des agonistes partiels y figurant l'UFP-512, la morphine et le TIPP. Seulement les agonistes complets induisaient la séquestration du DOR dans les cellules HEK-293, ce qui nous mène à conclure que l'internalisation du DOR est proportionnelle à l'efficacité de signalisation de ses ligands dans la voie d'AMPC. Aussi, les mécanismes d'internalisation du DOR induite par les deux drogues qui ont réussi à induire sa séquestration (DPDPE et SNC-80) étaient pareils quant à l'effet de la GRK2 et la β arr. En effet, pendant que la β arr intervenait de façon significative dans la séquestration du DOR induite par les deux ligands, la GRK2 n'était pas essentielle pour cette internalisation au niveau des cellules HEK-293. La seule différence mécanistique était au niveau de l'intervention de la PKC. En effet, bien que cette kinase ne soit pas indispensable pour l'internalisation du DOR induite par les deux agonistes, elle modifie le profil de séquestration induite par le DPDPE sans en modifier l'effet maximal. La différence entre les ligands a été plus marquée au niveau du recyclage. En effet, bien que les deux ligands internalisent de façon similaire, aussi bien dans les cellules HEK-293 que dans les neurones corticaux, seulement les récepteurs traités au DPDPE arrivent à regagner la membrane, après récupération, et ceci dans les deux systèmes biologiques déjà cités.

Dans les essais d'accumulation d'AMPC, le DPDPE se comportait comme un agoniste complet du DOR, étant en accord avec les littératures physiologiques (98) et comportementales (285). En effet, par électrophysiologie, on a démontré que le DPDPE inhibait de façon maximale les courants post-synaptiques excitateurs au niveau de la lamina II de la moelle épinière (98). Aussi, le DPDPE démontre une efficacité maximale dans le test de mouvement brusque de la queue (tail flick test) (285). Le SNC-80 est également reporté comme un agoniste complet du DOR (39, 124). Cette drogue a démontré son efficacité maximale à inhiber les contractions induites électriquement au niveau du canal déférent de la souris (165). De façon cohérente avec ces données de la littérature, nous avons démontré que le DPDPE et le SNC-80 étaient des agonistes complets, possédant des

efficacités et puissances similaires dans la voie de signalisation de l'adénylate cyclase. Cependant, d'autres travaux suggèrent que le SNC-80 est plus efficace et puissant que le DPDPE (39, 128). Mais il est important de noter que dans ce cas, ces propriétés ont été démontrées dans des essais comportementaux et de déplacement de radioligand, dans un système biologique distinct et avec des concentrations différentes des nôtres. La morphine et l'UFP-512 sont caractérisés comme étant des agonistes partiels, c'est-à-dire possédant une faible activité intrinsèque responsable de leur efficacité limitée (37, 191). En effet, l'UFP-512 a été soumis à un essai d'inhibition de l'accumulation d'AMPc, et a subséquemment été considéré comme étant un agoniste partiel plus puissant que la morphine, mais d'efficacité similaire (191). Ceci est cohérent avec nos résultats de modulation de la production de l'AMPc. Le TIPP a été également classé comme un agoniste partiel potentiel du DOR (11), confirmant nos résultats de signalisation.

Par la suite, nous avons trouvé que le DOR, une fois lié au DPDPE, réussit à internaliser au niveau des cellules HEK-293, étant en accord avec les données de la littérature (6, 30, 32). Nous avons aussi rapporté l'internalisation du DOR induite par le SNC-80. Cette drogue a démontré sa capacité à induire l'internalisation du DOR dans les cellules SK-N-BE et les cellules de l'hippocampe et du striatum (238). L'internalisation et le trafic des GPCR sont déterminés par plusieurs intervenants incluant les kinases capables de phosphoryler les résidus Ser/Thr (85) et par la capacité de la β arr à interagir avec le récepteur (177). Les rôles de la PKC et de la GRK2 au niveau de la désensibilisation et l'internalisation du MOR ont été démontrés spécifiques du ligand (143). Dans le cas du DOR, et avec les deux ligands qu'on a utilisés, à savoir le DPDPE et le SNC-80, ni la PKC ni la GRK2 ne semblent essentielles pour le processus d'internalisation du DOR. Des contrôles positifs avec le récepteur 5HT4 ont été effectués en parallèle afin de valider l'efficacité des éléments inhibiteurs (chélérythrine et mutant négatif de la GRK2). Bien que la phosphorylation médiée par la GRK2 ou la PKC ait un rôle important dans l'induction de l'internalisation du DOR, dans différentes lignées cellulaires et avec différents agonistes (115, 296, 323, 326, 330), les résultats de notre étude indiquent que le DOR peut internaliser au niveau des cellules HEK-293, de façon indépendante de ces deux kinases. Ceci est en accord avec les travaux de l'équipe de Zhang, qui a démontré que le DOR peut internaliser dans les cellules HEK-293 de façon indépendante de la GRK2 (329). Cette même étude a démontré que cette internalisation indépendante de la GRK2 fait toujours

intervenir la β arr, résultat cohérent avec notre étude, où nous avons trouvé que même si le DOR internalise de façon indépendante de ces kinases, la β arr est impliqué dans la séquestration du DOR induite par le DPDPE et le SNC-80. Aussi, l'équipe de Traynor et al. a démontré qu'au niveau des cellules HEK-293, une voie alternative indépendante de la protéine G et de la GRK2 existe pour médier la phosphorylation et l'internalisation du DOR (32). Cette voie impliquerait probablement les GRK5 ou GRK6 qui sont exprimées dans les cellules HEK-293 (250) et qui ne sont pas recrutées par les protéines $G\beta\gamma$ (84, 185). En effet, ces kinases ont un rôle important dans la désensibilisation du DOR et l'internalisation des récepteurs β -adrénergiques (GRK6) (321) et dopaminergiques de type D2 (GRK5) (138). D'autres kinases qui n'appartiennent pas à la famille des GRK comme la caséine kinase I ou la CaMKII (357) pourraient aussi médier cette internalisation (32). L'équipe de Zhang, et dans une étude ultérieure à celle citée ci-haut, a démontré que l'internalisation du DOR induite par le DPDPE et indépendante de la GRK2 le dirige vers la voie de dégradation (328). Cependant, notre étude a démontré que 50% des DOR, qui internalisent indépendamment de la GRK2, recyclent au niveau des cellules HEK-293 traitées au DPDPE. Mais il est à noter que l'équipe de Zhang a utilisé le DOR mutée au niveau des trois sites de phosphorylation médiée par la GRK2, pour aboutir à ces résultats, ce qui pourrait expliquer la différence avec nos travaux. On peut alors suggérer que ces trois sites mutés au niveau du DOR à savoir le T³⁵⁸, le T³⁶¹ et le S³⁶³ pourraient être essentiels au recyclage du récepteur, indépendamment de l'action de la GRK2.

La phosphorylation des GPCR par les kinases prépare le récepteur activé à la liaison à la β arr (213). Nous avons démontré que, bien que la séquestration du DOR ne requière ni la PKC ni la GRK2, cette internalisation dépend en grande partie de l'action de la β arr. Cette observation pourrait être interprétée de deux façons : a) les kinases phosphorylant le DOR activé par le DPDPE et le SNC-80 n'incluent ni la PKC ni la GRK2. L'étude de l'effet d'autres kinases reconnues capables de phosphoryler les GPCR comme les GRK5 et GRK6 présentes au niveau des cellules HEK-293 pourrait confirmer cette hypothèse, b) les conformations du DOR activées par le DPDPE ou le SNC-80 pourraient recruter la β arr, bien que le récepteur ne soit pas phosphorylé. En effet, l'étude de l'internalisation du récepteur du leukotriène B4 (un récepteur appartenant à la famille des GPCR) a démontré que la translocation de la β arr à la membrane suite à la liaison de l'agoniste pourrait se produire à défaut de phosphorylation du récepteur (139).

Il faut bien noter que dans notre cas, l'internalisation du DOR stimulé par les deux agonistes DPDPE et SNC-80, a été augmentée en présence du mutant négatif de la GRK2. Outre son activité catalytique, cette kinase est impliquée dans le changement de l'interaction entre le récepteur et les sous unités α et $\beta\gamma$ de la protéine G, contribuant ainsi à la désensibilisation du récepteur (117). On pourrait alors spéculer que notre dominant négatif de la GRK2, bien qu'il réduise la phosphorylation du récepteur par cette kinase, rendait le récepteur plus efficace à recruter et interagir avec la β arr.

Malgré des capacités d'internalisation similaires, le DPDPE et le SNC-80 présentaient des phénotypes de recyclage différents. En effet, seulement le DOR activé par le DPDPE réussit à regagner la membrane cellulaire des fibroblastes et neurones, après récupération. Ceci n'était pas dû à un lavage incomplet de la drogue comme vérifié dans les expériences de déplacement du radioligand. Plusieurs études ont reporté le recyclage du DOR induit par le DPDPE dans les cellules HEK-293 (6, 30, 32), bien que dans les cellules du neuroblastome humain SK-N-BE, le DPDPE induise l'internalisation et la dégradation lysosomale du DOR (115, 201). Dans ce système biologique, le SNC-80 dirige le DOR, une fois internalisé, vers les lysosomes pour y être dégradé. Il en est de même au niveau des neurones de l'hippocampe et du striatum (238). Bien que la capacité du DOR de subir le recyclage a fréquemment été reportée (6, 295, 328), ces récepteurs ont aussi été décrits comme étant engagés dans la voie de dégradation via l'interaction avec les protéines GASPs. En effet, le DOR a été souvent rapporté comme appartenant à la classe B (123, 319, 329). Les résultats obtenus dans notre étude permettent de concilier les deux types d'observations, en montrant que le trafic post-endocytaire ne peut pas être une propriété fixe du récepteur, mais une propriété déterminée par l'agoniste qui stabiliserait une conformation spécifique du récepteur responsable de propriétés de trafic post-endocytaire distinctes. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la capacité des GASPs de cibler les DOR vers la régulation négative est soumise à des contraintes conformationnelles (293). Les propriétés de trafic (internalisation/recyclage) spécifiques du ligand sont d'une grande importance vu qu'elles pourraient indiquer le potentiel de tolérance analgésique induit par chaque ligand (annexe II). Cette observation a soulevé beaucoup d'attention car ce type de biais pourrait fournir la base pour développer des ligands opioïdes avec des actions analgésiques plus durables. Plusieurs données de la littérature indiquent que le DPDPE et le SNC-80 stabilisent des conformations distinctes du DOR. En effet, on a démontré qu'il y a plus de sites de phosphorylation du DOR par les protéines kinases dans

la conformation stabilisée par le SNC-80 que dans celle stabilisée par le DPDPE (308). Aussi, la troncature de la partie C-terminale du DOR à partir de la Gly³³⁸ n'affecte pas la phosphorylation, la désensibilisation et la régulation négative du DOR, induites par le SNC-80, contrairement au DPDPE (230). Aussi, la mutation du site primaire de phosphorylation putatif, la Ser³⁶³ (162), en alanine, atténue la régulation négative du DOR médiée par le DPDPE et non le SNC-80 au niveau des cellules CHO (221). Donc la phosphorylation du DOR et sa régulation négative médiée par le SNC-80 impliquent d'autres domaines du récepteur, en plus de la partie C-terminale, bien que les deux ligands présentent des efficacités similaires de signalisation et d'internalisation. Vu que, en règle générale, la liaison à la β arr est essentielle pour le découplage des GPCR de la protéine G activée, on a pu émettre l'hypothèse que le SNC-80 est aussi capable de recruter la β arr à proximité du DOR tronqué phosphorylé (308). Ceci souligne, encore une fois, que les conformations du DOR stabilisées par ces deux ligands ne sont pas les mêmes.

De plus, cette observation a pu être consolidée par le fait que, des changements de BRET spécifiques des ligands ont pu être observés en utilisant un biosenseur évaluant l'interaction entre le DOR et le dimère G $\beta\gamma$ (annexe II). En effet, à cette interface, l'activation prolongée du récepteur par le SNC-80 et le DPDPE rapprochait et séparait respectivement l'extrémité C-terminale du récepteur du domaine N-terminal de la protéine G $\gamma 2$, indiquant des changements conformationnels distincts par chaque agoniste (annexe II). Aussi, la capacité du radioligand [³H]naltrindole à se lier au DOR diffère selon sa pré-exposition au DPDPE ou SNC-80. En effet, bien que cette capacité de liaison demeure inchangée suite à un prétraitement au SNC-80, la pré-exposition au DPDPE diminue le nombre total des DOR étant capable de reconnaître le radioligand (annexe II). De plus, seulement la conformation du DOR stabilisée par le SNC-80 résulte en un recrutement de la β arr2 à proximité du domaine N-terminal de la sous unité G $\gamma 2$ de la protéine G. Les liaisons au sein du complexe DOR-G $\beta\gamma$ - β arr2 sont perturbées en présence de l'antagoniste naltrindole, dont l'association au SNC-80 change le profil de recyclage de ce dernier, en un profil de trafic post-endocytaire qui ressemble à celui du DPDPE. La conversion d'un phénotype conformationnel et fonctionnel à un autre fournit un lien de causalité entre les conformations stabilisées par différents ligands et leurs profils distincts de recyclage (annexe II).

Le profil de recyclage est inversement corrélé à la tendance de ces différents ligands à induire la tolérance analgésique aiguë, dans un modèle de douleur inflammatoire chronique

(annexe II). Effectivement, l'agoniste SNC-80, qui ne possède pas de profil positif de recyclage, produit une tolérance analgésique aiguë, qui était absente chez les souris traitées avec l'agoniste recyclant, à savoir le DPDPE. On pourrait alors spéculer que le recyclage du récepteur pourrait, du moins en partie, protéger contre la tolérance à l'échelle moléculaire. Donc le développement d'analgésiques opioïdes qui favorisent le recyclage du récepteur permettrait la production de ligands opioïdes ayant une activité analgésique plus durable. Toutefois, afin de concevoir ce type de ligands, une meilleure compréhension des déterminants moléculaires de ce trafic biaisé est nécessaire. En effet, il y a peu de connaissances sur la manière dont un récepteur s'engage dans les compartiments cellulaires responsables de son acheminement vers la voie de recyclage. Il sera alors intéressant d'étudier les interactions du récepteur avec les protéines de triage et de voir si elles sont spécifiques du ligand afin de consolider la compréhension actuelle du trafic des GPCR.

Conclusion

Nous avons démontré que le DOR peut subir différentes régulations en fonction du ligand qui lui est associé. En effet, même les agonistes qui présentaient des efficacités similaires dans l'activation de la protéine G et ses effecteurs (l'adénylate cyclase dans notre cas) et qui induisaient l'internalisation du DOR de façon similaire, différaient dans leur capacité à produire le recyclage du récepteur vers la membrane après récupération. Cette propriété de sélectivité des ligands est très importante, dans le sens qu'elle permettrait de choisir les ligands qui favorisent une conformation du récepteur responsable de l'effet thérapeutique souhaité. Dans notre cas, les ligands étant capables de produire un effet analgésique sans tolérance seraient ceux à privilégier. La compréhension de la tolérance analgésique aux opiacés repose en grande partie sur la détermination des mécanismes moléculaires sur lesquels est fondé le trafic des récepteurs opioïdes. De ce fait, une meilleure compréhension de ces mécanismes semble d'une importance inouïe, d'autant plus que les ligands du DOR, à part leurs propriétés analgésiques, ont démontré leur efficacité putative dans le traitement de plusieurs maladies affectives et neurodégénératives.

Annexe I

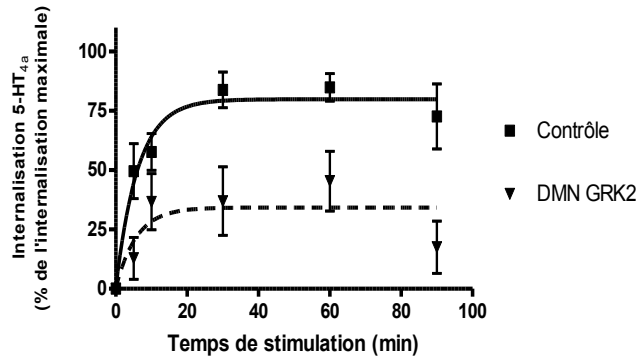


Figure 25. La GRK2 intervient dans l'internalisation du récepteur 5-HT_{4a} induite par la sérotonine (5-HT), dans les cellules HEK-293.

Les cellules HEK-293, transitoirement co-transfectées avec le 5-HT_{4a} et soit le mutant négatif de GRK2 (DMN GRK2) soit le vecteur vide pcDNA3, ont été exposées à la 5HT (1 μ M). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 3 expériences pour chacun. Une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) a démontré que la 5-HT induit une internalisation réduite face à l'inactivation de la GRK2 (effet du DMN GRK2 ($p < 0.0001$) et effet du temps de stimulation ($p < 0.0001$) sans interaction entre les deux facteurs) (résultat effectué par Ouissame Mnie Filali en parallèle à mes expériences sur le DOR).

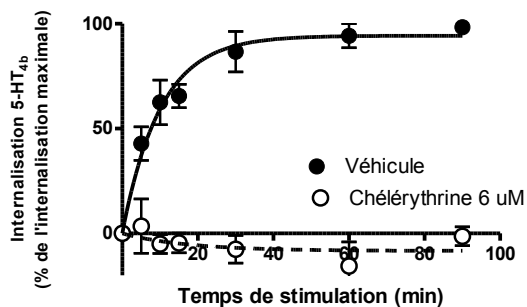


Figure 26. La PKC est indispensable pour l'internalisation du récepteur 5-HT_{4b} dans les cellules HEK-293.

Les cellules HEK-293, stablement transfectées avec le 5-HT_{4b}, ont été prétraitées avec 6 μ M de chélerythrine ou véhicule pendant 15min, ensuite exposées à la 5-HT (1 μ M) durant les périodes de temps indiquées. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'internalisation maximale dans la situation contrôle et représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 4 expériences pour chaque drogue. Le blocage de la PKC avec la chélerythrine prévient l'internalisation du récepteur 5-HT_{4b} induite par la 5-HT. Une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) a démontré un effet de la chélerythrine ($p < 0.0001$), un effet du temps de stimulation ($p < 0.0001$), ainsi qu'une interaction entre les deux facteurs ($p < 0.0001$) (résultat effectué par Ouissame Mnie Filali en parallèle à mes expériences sur le DOR).

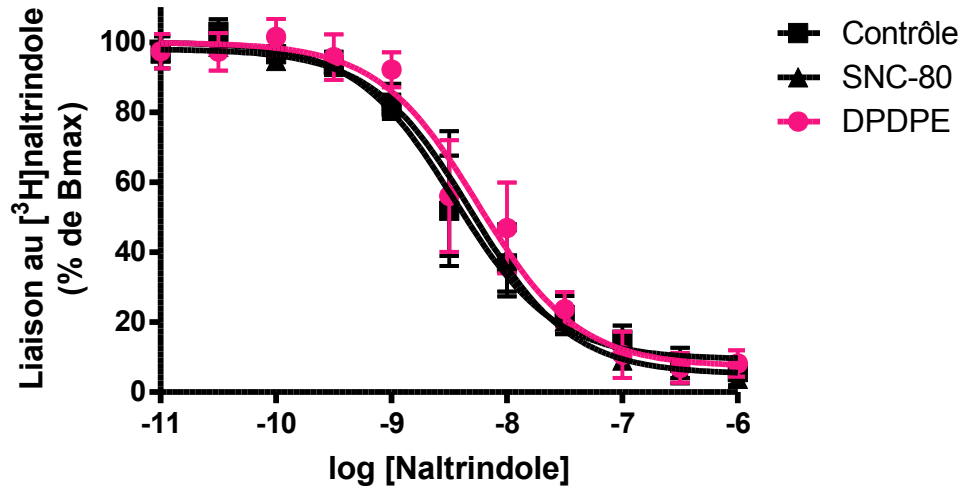


Figure 27. Étude du déplacement du [^3H]naltrindole après récupération par DPDPE et SNC-80.

Les cellules HEK-293 ont été traitées et lavées comme expliqué dans la figure 18 de la section résultats, avant d'être utilisées dans l'essai de déplacement du [^3H]naltrindole dans lequel le radioligand (1,5 nM) a été déplacé avec les concentrations indiquées de naltrindole froid. Les valeurs de K_d ont été calculées à partir des concentrations qui ont inhibé la liaison du [^3H]naltrindole de 50% (IC50) en utilisant l'équation de Cheng-Prusoff. K_d contrôle: 223 ± 40 pM, K_d suivant le SNC-80: 302 ± 42 pM; K_d suivant le DPDPE: 280 ± 40 pM. Une analyse statistique d'ANOVA à deux facteurs (mesures non répétées) n'a pas démontré de différences entre les courbes avec un effet de la concentration du naltrindole froid ($p < 0.0001$) (résultat effectué par Nicolas Audet).

Annexe II

The Journal of Neuroscience, April 4, 2012 • 32(14):4827–4840 • 4827

Cellular/Molecular

Differential Association of Receptor- $G\beta\gamma$ Complexes with β -Arrestin2 Determines Recycling Bias and Potential for Tolerance of Delta Opioid Receptor Agonists

Nicolas Audet,^{1,2} Iness Charfi,^{1,2} Ouissame Mnie-Filali,^{1,2} Mohammad Amraei,¹ Anne-Julie Chabot-Doré,³ Magali Millecamps,³ Laura S. Stone,^{3,4,5} and Graciela Piñeyro^{1,2,6}

¹Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada, ²Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada, ³Alan Edwards Centre for Research on Pain, McGill University, Montreal, Québec H3A 1A4, Canada,

⁴Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Québec H3G 1Y6, Canada, ⁵Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Québec H3A 2B2, Canada, and ⁶Département de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

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 that was absent in mice treated with DPDPE. Furthermore, both agonists stabilized different conformations, whose distinct interaction with $G\beta\gamma$ subunits led to different modalities of β -arrestin2 (β 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 β 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 β arr2 recruitment to the receptor but not in the vicinity of $G\gamma 2$. These differences were associated with stable DOR- β arr2 association, poor recycling, and marked desensitization following exposure to SNC-80, while DPDPE promoted transient receptor interaction with β arr2 and effective recycling, which conferred protection from desensitization. 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 that 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 a decrease in potency 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 knockout of β -arrestin2 (β arr2) reduced acute and chronic tolerance induced by morphine indicate that β arr2 plays an important role in the generation of each of these functional

adaptations (Bohn et al., 1999, 2000, 2002). At the molecular level, β 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 β arr2 (Zhang et al., 2008).

The exact mechanism by which β arrs contribute to analgesic tolerance remains unclear (Dang et al., 2011; Nagi and Piñeyro, 2011). Studies using μ -opioid receptor (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 (Arntamangkul et al., 2008), tolerance has been linked to differences in agonist ability to recruit β arrs and induce MOR sequestration (Martini and

Received July 21, 2011; revised Feb. 10, 2012; accepted Feb. 10, 2012.

Author contributions: N.A., L.S.S., and G.P. designed research; N.A., L.C., O.M.-F., M.A., A.-J.C.-D., M.M., and L.S.S. performed research; N.A. and G.P. analyzed data; N.A. and G.P. wrote the paper.

Research was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grant 311997 and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Main Operating Grant Program (MOP) 79432 to G.P. and CIHR MOP 86691 to L.S.S. L.C. received a studentship from Ste-Justine Research Center and A.-J.C.-D. from the CIHR. O.M.-F. received a fellowship from Fonds de la Recherche en Santé de Québec. We are grateful to Dr. M. Bouvier, L. Devi, and T. Hébert for kindly providing BRET pairs used in this study. We thank Dr. L.E. Trudeau and Dr. E. Archer-Lahlou for valuable advice on immunocytofluorescence in neurons and Dr. R. Elie for insightful comments on statistical analysis.

Correspondence should be addressed to Graciela Piñeyro, Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC H3T 1C5, Canada. E-mail: [REDACTED]

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/324827-14\$15.00/0

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, 2009). Furthermore, 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 that established distinct interactions with G $\beta\gamma$ subunits and β arr2.

Materials and Methods

DNA constructs

Constructs encoding human DORs fused to either the green fluorescent protein (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 G γ 2 were obtained by subcloning the human G γ 2 coding sequence into GFP or YFP vectors (Galés et al., 2005). The recombinant plasmid encoding for human G α_{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 α_{i1} between residues Leu91 and Lys92 (Audet et al., 2008). The GFP10-Epac-Rluc BRET²-cAMP biosensor was constructed in three steps as described by Leduc et al. (2009). First, GFP10, the linker GSAGT-(Acc65I/HindIII)-KLPAT, and Rluc were inserted in pCDNA3.1/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/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, San Francisco, CA).

Cell culture and transfections

Immortalized cell lines. Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were cultured in DMEM 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% CO₂. For transient expression of recombinant proteins, HEK293 cells were seeded at a density of 3×10^5 cells in 100 mm Petri dishes, cultured for 24 h, and transfected with vectors encoding BRET constructs for DORs, G-protein subunits, or β arr2 in combination with complementary signaling partners, as detailed below. Transfections were done with polyethylenimine (Polysciences) 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 μ g of DNA/100 mm Petri dish followed by selection with G418 (500 μ g/ml). For cAMP accumulation

assays, HEK293-Flag-DOR cells were plated onto 100 mm Petri dishes and transfected with 3 μ g of the GFP10-Epac-Rluc BRET²-cAMP biosensor using Lipofectamine (Invitrogen). Cells were then subject to selection using hygromycin (50 μ g/ml).

Primary neuronal cultures. 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 cryoanesthetized, their brains rapidly removed and transferred into ice-cold dissociation solution (NaSO₄ 90 mM; K₂SO₄ 30 mM; MgCl₂ 5.8 mM; CaCl₂;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 h. 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 μ g of DNA/well) by means of a modified calcium phosphate precipitation 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 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 μ M) 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 min at 4°C in paraformaldehyde (3%) and nonspecific binding was blocked by incubation with PBS/BSA 1%/CaCl₂ 1 mM at room temperature (RT) for 30 min. Cells were subsequently incubated with anti-FLAG M1 antibody (1:1000; Sigma-Aldrich) for 1 h (RT), washed three times, and incubated with peroxidase-conjugated (HRP) anti-mouse antibody (1:8000; GE Healthcare) for 30 min. After extensive washing, 200 μ l of the HRP substrate *o*-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMA FAST OPD, Sigma-Aldrich) was added to each well. The reaction was allowed to proceed for 8 min and stopped using 50 μ l of 3N HCl. Two-hundred microliters of the mix were then transferred to a 96-well plate for optical density (OD) evaluation at 492 nm in a microplate reader (Victor3; PerkinElmer). 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 percentage of receptors initially present at the membrane according to the following calculation: $100 \times (\text{OD}^{\text{Basal}} - \text{OD}^{\text{Stimulated}}) / (\text{OD}^{\text{Basal}})$ where 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 μ M; 30 min), protein synthesis was blocked with 10 μ M 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 \times 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 μ M), naloxone (1 μ M), or morphine (10 μ M), these drugs were introduced immediately after agonist washout and remained present in the incuba-

tion 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-piperazinyl]-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC-80) (1 μ M) for the indicated time periods. At the end of treatment, cells were washed three times in ice-cold PBS and subsequently resuspended in Tyrode's solution (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 5.6 mM D-glucose, 0.49 mM MgCl₂, 0.37 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES pH 7.4) at 4°C. Nonspecific 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, Invitrogen) 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). 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

Immunocytochemistry experiments were performed 2 d after transfection. Labeling of surface Flag-DORs was done by introducing Ca²⁺-dependent mouse anti-Flag M1 antibody (1:100; Sigma) to the incubation medium 30 min before vehicle (DMSO 0.01%), DPDPE, or SNC-80 (10 μ M). Following treatments of increasing durations (15–120 min), neurons were washed in Ca²⁺-free PBS (3 × 1 min, at 37°C). These washes allowed us 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. Nonspecific sites were blocked with PBS/BSA 1% (10 min at RT), and neurons were then exposed to second antibody (donkey anti-mouse Alexa-488; 1:1000; Invitrogen). 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 cytosolic intensity. Nuclear fluorescence was considered as the background.

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 Ca²⁺-free PBS (3 × 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 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: (1) evaluating intracellular fluorescence that remained present after recovery from agonist exposure, and (2) counting the number of cells that recovered surface labeling following incubation in the absence of ligand. In total, four independent experiments were performed in which 8–28 neurons/condition were sampled.

Intermolecular BRET assays

All BRET assays were performed 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 (Galés et al., 2005, 2006; Audet et al., 2008; Audet and Pinero,

2011). Briefly, 100 mm Petri dishes plated with HEK293 cells were transfected with: (1) DOR-GFP (8 μ g), G α 1-Luc (1 μ g), G β 1 (4 μ g), and G γ 2 (4 μ g) or (2) DOR-Luc (0.25 μ g), GFP-G γ 2 (6 μ g), G α 1 (4 μ g), and G β 1 (4 μ g). These BRET constructs have been previously shown to support normal signaling and to establish specific interactions among themselves (Galés et al., 2005, 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 μ 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 μ M, and BRET2 readings were obtained 2 min after substrate addition (Galés et al., 2005; Audet et al., 2008). In experiments assessing the acute effect of naltrindole (1 μ M) on cells that had been preexposed to DPDPE and SNC-80, HEK293 cells were treated and washed as above and the antagonist was introduced 2 min before coelenterazine. BRET2 readings were obtained using a modified top-count apparatus (TopCount; NXTM, 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 β 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: (1) β arr2-Luc (0.5 μ g), DOR-YFP (6 μ g), G α 1 (3 μ g), G β 1 (3 μ g), and G γ 2 (3 μ g) or (2) β arr2-Luc (0.5 μ g), YFP-G γ 2 (3 μ g), G α 1 (3 μ g), G β 1 (3 μ g), and Flag-DORs (6 μ g). The ability of the β arr2-Luc construct to support normal DOR internalization as well as the specificity of its interaction with DOR-YFP or YFP-G γ 2 were established before its use (data not shown). Two days after transfection, HEK293 cells were used to monitor one of the following: (1) the kinetics of β arr2-Luc recruitment to DOR-YFP or YFP-G γ 2; (2) the effect of sustained agonist exposure on each of these BRET pairs, or (3) the BRET signal generated by β arr2-Luc/DOR-YFP and β arr2-Luc/YFP-G γ 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 μ g/ml) was automatically injected into each well. DPDPE or SNC-80 (10 μ M) were injected 5 min later, and BRET1 measures were obtained every 18 s 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 μ M) for 30 or 60 min. At the end of treatment, cells were washed with PBS (3 × 1 min, DMEM, 37°C) and either immediately redistributed 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 5 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 5000 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 1 h before exposure to DPDPE, SNC-80 (1 μ M; 60 min) or vehicle (DMSO 0.01%)

cells were treated with 10 μ M cycloheximide, which was allowed to remain in the incubation medium throughout the experiment. In experiments in which monensin (50 μ 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 (2×1 min) with PBS at 37°C and were immediately incubated with Tyrode's solution containing 20 μ M forskolin, 750 μ 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 μ M. BRET2 readings were obtained 9 min after substrate addition to allow for cAMP accumulation to take place. Alternatively, cells were washed (3×1 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. Before carrying out experiments, the ability of the biosensor to detect changes in cAMP production was compared with a previously described radiometric method (Audet et al., 2005). EC₅₀ values for DPDPE-mediated modulation of cAMP production were 7 ± 1 and 4 ± 1 nM for radiometric and BRET-based assays, respectively ($n = 3–6$).

Coimmunoprecipitation and Western blot

This procedure was adapted from a previously described method (Archer-Lahlou et al., 2009). Briefly, HEK293 cells were transfected with β arr2-Luc (0.5 μ g), YFP-G γ 2 (3 μ g), G α i1 (3 μ g), G β 1 (3 μ g), and Flag-DORs (6 μ g). Two days later, HEK293 cells were treated with DPDPE or SNC-80 (1 μ M; 30 min), and, at the end of incubation, they were either immediately used for membrane preparation or washed (3×1 min, DMEM, 37°C) and allowed to recover for 30 min before their use. Membranes were prepared by suspending cells in lysis buffer (5 mM Tris pH 7.4, 3 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 μ g/ml leupeptine, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, and 10 μ g/ml benzamide) and homogenizing them in an ultraturax (IKA). Following a short centrifugation at 500 \times g to pellet mitochondria and nuclei, the supernatant containing membranes and cytosol was recovered and centrifuged at 30,000 \times g for 20 min. The resulting membrane pellet was resuspended in lysis buffer for a second round of centrifugation (30,000 \times g; 20 min). 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 Na₃VO₄, 5 μ g/ml leupeptine, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, and 10 μ g/ml benzamide) and agitated at 4°C for 2 h, following which the solubilized material was centrifuged at 20,000 \times g for 30 min. Flag-DORs were immunoprecipitated from the supernatant by means of an anti-FLAG M2 antibody resin. Briefly, 40 μ l of antibody-coupled resin equilibrated in solubilization buffer and supplemented with 0.1% bovine serum albumin (w/v) were added to 500 μ l of solubilized membranes and kept overnight at 4°C under gentle agitation. The next morning the resin was centrifuged, washed twice with 500 μ l of solubilization buffer, and four times with 500 μ 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 μ l of modified solubilization buffer containing the FLAG peptide (150 μ 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. Resulting gels were transferred onto nitrocellulose (GE Healthcare), and β arr2-Luc or YFP-G γ 2 recovered with Flag-DORs were revealed using mouse anti-Luc (1:1000 Millipore) or rabbit anti-GFP (1:10,000; Abcam) antibodies, followed by corresponding secondary HRP-conjugated antibodies (1:40,000; GE Healthcare). Flag-DORs in each sample were detected by probing membranes with rabbit anti-FLAG antibody (1:5000; Sigma) and the corresponding secondary antibody (1:40,000; GE Healthcare). 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). Densitometric values were used to calculate β arr2-Luc/Flag-DOR and YFP-G γ 2/Flag-DOR ratios for each condition.

Radioligand binding assays

Binding assays were performed in HEK293 cells stably transfected with Flag-DORs. The method used has been previously described (Piñeyro et al., 2001). Briefly, saturation curves were obtained by suspending 25 μ g of protein in 300 μ l of PBS and incubating cells for 1 h (21°C) at RT with increasing concentrations of [³H]naltrindole (0.05–5 nM). For competition binding assays, cells were similarly diluted and incubated with 1.5 nM [³H]naltrindole together with increasing concentration of the unlabeled antagonist. Nonspecific binding was determined in the presence of 10 μ M naltrindole. Incubation was terminated by rapid filtration in a cell harvester (Inotech) through GF/C filters (Whatman) presoaked in 0.1% polyethylenimine. Bound radioactivity was measured by scintillation counting, and binding parameters were calculated from nonlinear least-squares analysis of the experimental data using Prism (Graph-Pad Software).

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 (Millicamps 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 min 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, 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 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

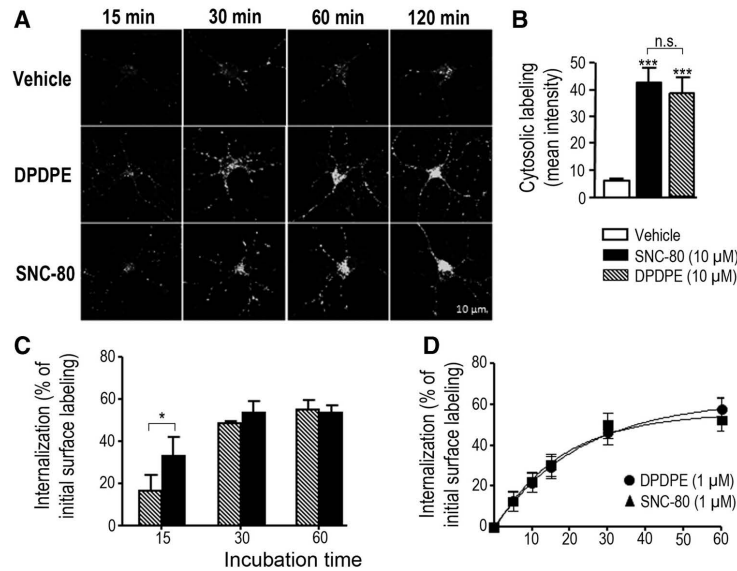


Figure 1. Internalization induced by DPDPE and SNC-80 is similar. *A*, Cortical neuron cultures were incubated with primary antibody to label surface Flag-DORs. Neurons were then treated with DPDPE or SNC-80 (10 μM) for the indicated times. After stopping treatment, antibody bound to surface receptors 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 h and represent mean ± SEM of four independent experiments. Internalization data were analyzed together with recycling results shown in Figure 2*B* by means of repeated measures two-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 μM) 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 percentage of receptors present at the membrane before internalization. Data represent mean ± SEM of four independent experiments that were analyzed by repeated measures two-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 μM) 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 percentage of receptors present at the membrane before internalization. Data represent mean ± SEM of six independent experiments that were analyzed by repeated measures two-way ANOVA (interaction $F_{(5,55)} = 0.8, p > 0.05$; difference among drugs $F_{(1,55)} = 0.2, p > 0.05$).

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. 1*B*).

To corroborate that the internalization capacity of DPDPE and SNC-80 were similar, endocytosis was assessed in HEK293 using flow cytometry (Fig. 1*C*) or an ELISA-based assay (Fig. 1*D*) 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. 1*C*).

Several studies performed 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 1*A* 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 μM). Recycling was evaluated by taking two complementary measures: (1) the proportion of internalized receptors that remained trapped in the cytosol 60 min after agonist removal (Fig. 2*A,B*) and (2) the number of agonist-treated cells that recovered surface labeling following incubation in the absence of agonist (Fig. 2*C,D*). 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 ± 7 immediately after internalization by SNC-80 and 37 ± 5 after recovery, indicating that $84 \pm 8\%$ ($n = 4$) of sequestered DORs remained trapped in the cytosol (Fig. 2*B*). In the case of DPDPE, this proportion dropped to $47 \pm 6\%$ ($n = 4$) with intracellular intensity values of 19 ± 5 and 40 ± 7 with and without recovery, respectively (Fig. 2*B*). To ascertain whether receptors that disappeared from the intracellular compartment were indeed recycling, we verified whether 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 preexposed 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. 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 μ 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 [3 H]naltrindole confirmed that the absence of recycling observed for SNC-80 could not be simply attributed to incomplete drug washout, since K_d (Fig. 3B) and B_{max} (see Fig. 6A) values for the radioligand were restored to pretreatment 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 1 h treatment with SNC-80 or DPDPE (1 μ 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 us to monitor intracellular variations in second messenger levels through changes in BRET. In naive cells that had been preexposed to vehicle, incubation with increasing concentrations

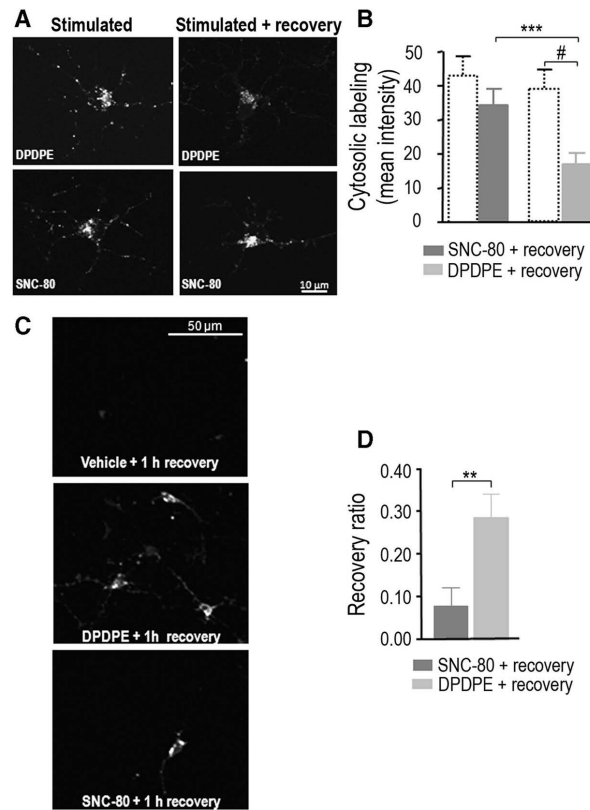


Figure 2. Recycling of neuronal DORs is different following exposure to DPDPE and SNC-80. *A*, Neurons were treated as in Figure 1A following which they were washed and either immediately processed for intracellular labeling (stimulated) or were first allowed to recover for 60 min in the absence of ligand (stimulated + recovery). Labeling of intracellular DORs was done as in Figure 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 SEM of four independent experiments. Recycling data were analyzed together with internalization results shown in Figure 1B by means of repeated measures two-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 versus 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 treatment conditions and corresponds to one 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 SEM 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; $**p < 0.01$.

of DPDPE induced a dose-dependent decrease in second messenger levels (Fig. 4A,B). Preexposure 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 maximally inhibit forskolin-stimulated cAMP production (E_{max} SNC-80: -70 ± 2 ; E_{max} DPDPE: -69 ± 3 ; EC_{50} SNC-80: 5 ± 1 nM; EC_{50}

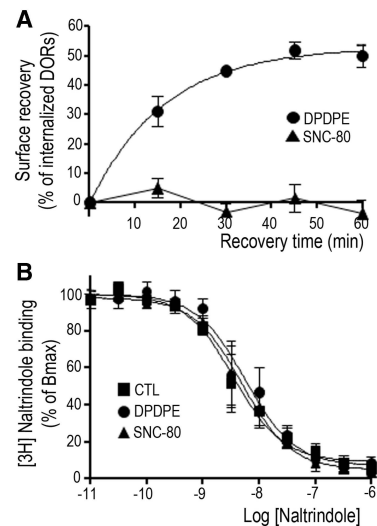


Figure 3. DPDPPE and SNC-80 elicit different DOR recycling in HEK293 cells. **A**, Cells stably expressing wild-type DORs were incubated with SNC-80 or DPDPPE ($1 \mu\text{M}$; 30 min) to induce internalization. At the end of treatment, cells were washed to remove agonist and allowed to recover for the indicated periods of time before membrane receptors were assessed using an ELISA-based method. Results were expressed as percentage of internalized DORs and represent mean \pm SEM 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 [^3H]naltrindole displacement assays in which the radioligand (1.5 nM) was displaced with the indicated concentrations of cold naltrindole. K_d values were calculated from concentrations that inhibited [^3H]naltrindole binding by 50% (IC_{50}) using the Cheng–Prusoff equation. K_d CTLs: $223 \pm 40 \text{ pM}$; K_d following SNC-80: $302 \pm 42 \text{ pM}$; K_d following DPDPPE: $280 \pm 40 \text{ pM}$.

DPDPPE: $8 \pm 1 \text{ nM}$; $p > 0.05$; two-way ANOVA; $n = 6$), which suggests that the observed differences in desensitization were not necessarily efficacy-related. On the other hand, desensitization by DPDPPE and SNC-80 were distinctively modified by monensin. In particular, monensin enhanced desensitization by DPDPPE 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 performed 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 (Fig. 4B). Although these data do not allow us 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 DPDPPE but not SNC-80. Thus, one would expect repeated administration of SNC-80 to cause larger loss of functional DORs as compared with DPDPPE 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, as follows: (1) DOR function is enhanced in both of these conditions (Cahill et al., 2007), (2) 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 (3) 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 to determine whether antiallodynic effects of DPDPPE and SNC-80 displayed different degrees of tolerance. Since mechanisms regulating receptor responsiveness are typically involved in the generation of acute analgesic tolerance (Christie, 2008), we determined whether two successive intrathecal injections of equianalgesic doses of either DPDPPE or SNC-80 resulted in differential loss of the analgesic response. 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 DPDPPE or SNC-80 similarly reduced pain sensitivity. However, while DPDPPE maintained its analgesic efficacy after its second injection, SNC-80 did not, indicating the development of acute analgesic tolerance for the non-recycling agonist.

Sustained activation by DPDPPE 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 us to assess whether DPDPPE 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 Piñeyro, 2011). We now used a similar approach to monitor how sustained activation by DPDPPE or SNC-80 ($1 \mu\text{M}$; 60 min) modified DOR interactions with $G\alpha\beta\gamma$ subunits. $G\alpha 1$ -Luc/DOR-GFP and DOR-Luc/GFP- $G\gamma 2$ were the biosensors used to monitor DOR interaction with $G\alpha 1$ and $G\beta 1\gamma 2$ subunits, respectively. In keeping with our previous observations, both BRET pairs displayed spontaneous energy transfer, confirming that DORs constitutively associate with $G\alpha 1\beta 1\gamma 2$ subunits (Audet et al., 2008). Spontaneous netBRET values generated by $G\alpha 1$ -Luc/DOR-GFP and DOR-Luc/GFP- $G\gamma 2$ were 0.051 ± 0.01 and 0.37 ± 0.03 ($n = 4-5$), respectively. Sustained exposure to either agonist reduced netBRET at the DOR $G\alpha 1$ interface (Fig. 5A). In contrast, both agonists had opposing effects at the DOR-Luc/GFP- $G\gamma 2$ pair, with DPDPPE 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

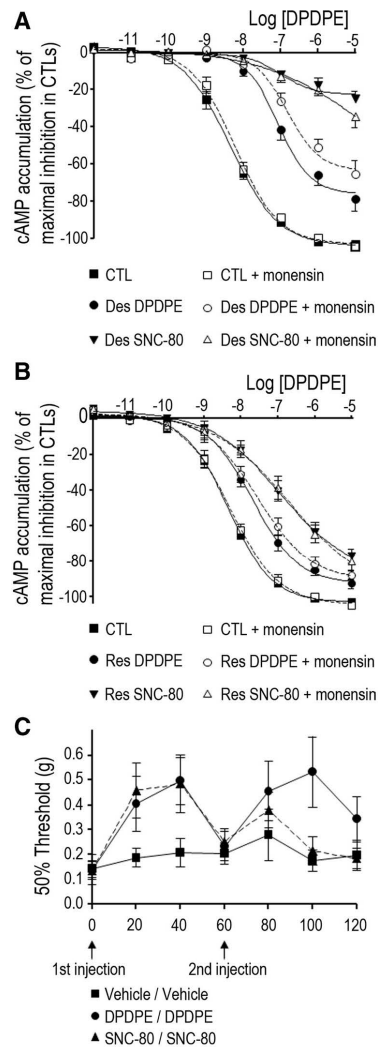


Figure 4. DPDPE and SNC-80 differ in their ability to induce desensitization and acute analgesic tolerance. HEK293 cells were incubated with $10 \mu\text{M}$ cycloheximide and treated or not with monensin ($50 \mu\text{M}$) before exposing them to vehicle (DMSO 0.01%), DPDPE, or SNC-80 ($1 \mu\text{M}$; 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 percentage of maximal inhibition obtained in corresponding untreated controls, and correspond to 5–6 independent experiments performed in duplicates. **A**, Desensitization data were analyzed by means of three-way ANOVA (agonist \times monensin \times concentration). Interaction for agonist \times monensin groups ($F_{(2,188)} = 7.20, p < 0.01$). Bonferroni *post hoc* for multiple comparisons: control versus desensitization by DPDPE $p < 0.001$; control versus desensitization by SNC-80 $p < 0.001$; desensitization by DPDPE versus desensitization by SNC-80 $p < 0.001$; desensitization by DPDPE versus desensitization by DPDPE + monensin $p < 0.001$; desensitization by SNC-80 versus desensitization by SNC-80 + monensin $p > 0.05$. **B**, Resensitization data were analyzed as above. Interaction for agonist \times monensin groups was nonsignificant ($F_{(2,235)} = 1.7, p > 0.05$). Effect of agonist factor: $F_{(2,235)} = 267, p < 0.001$; effect of monensin factor:

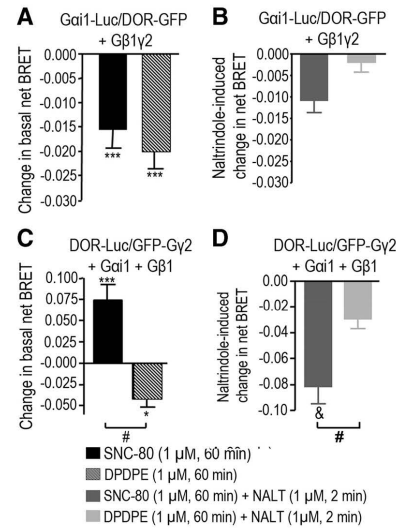


Figure 5. Sustained exposure to DPDPE and SNC-80 stabilized DORs into conformations that distinctively interact with $G\beta\gamma$ subunits. HEK293 cells were transfected with $G\alpha i1$ -Luc/DOR-GFP (**A, B**) or DOR-Luc/GFP- $G\gamma 2$ (**C, D**) plus indicated accessory proteins. On the day of the experiment they were exposed to DPDPE ($1 \mu\text{M}$), SNC-80 ($1 \mu\text{M}$), 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 before 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 ($1 \mu\text{M}$) in cells that had been preexposed to DPDPE or SNC-80, the antagonist was introduced 2 min before 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 \times 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 \times 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 versus SNC-80 in CTL groups and in naltrindole groups; $^{\#}p < 0.01$ comparing netBRET values in presence and in absence of naltrindole.

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

$F_{(1,225)} = 0.75, p > 0.05$. Bonferroni for *post hoc* comparisons showed resensitization following DPDPE versus 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 min, before administering a second identical dose of the corresponding treatment followed by similar assessment. Results are expressed as mean \pm SEM, $n = 10$ –20/treatment group. Data were analyzed using three-way ANCOVA (treatment \times testing over time \times 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 \times injection interaction ($F_{(1,231)} = 5.3, p < 0.05$) allowed the following comparisons: effect of first DPDPE injection versus effect of first SNC-80 injection: $p > 0.05$; effect of second DPDPE injection versus effect of second SNC-80 injection: $p < 0.01$; effect of first versus second DPDPE injection: $p > 0.05$; effect of first versus second SNC-80 injection: $p < 0.05$.

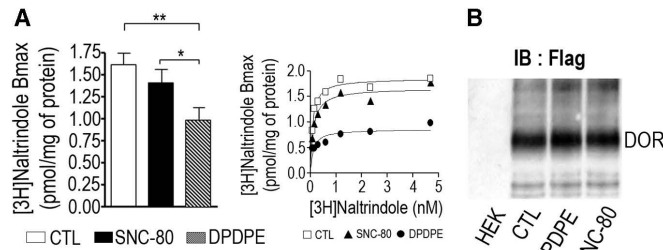


Figure 6. Sustained exposure to DPDPE and SNC-80 stabilized DORs into conformations that were distinctively recognized by [³H]naltrindole. **A**, HEK293 cells stably expressing Flag-DORs were exposed to DPDPE, SNC-80 (1 μ M; 1 h), or vehicle (0.01% DMSO). Following treatment, cells were washed and [³H]naltrindole binding was then assessed. Histograms represent mean \pm SEM of B_{max} 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 versus 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 solubilization product was then separated by electrophoresis SDS-PAGE and receptor protein was revealed by immunoblot. A representative example of four independent experiments is shown.

of the same two regions. These opposing BRET changes indicate that both agonists induced distinct orientation of the receptor C terminus relative to G γ 2.

The idea that DORs were distinctively modified by sustained exposure to either agonist (1 μ M; 60 min) was also supported by binding assays performed 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 [³H]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 downregulation and lingering free agonist as possible causes for the apparent loss of antagonist binding sites. Alternatively, [³H]naltrindole may have failed to recognize all conformational states stabilized by DPDPE, a phenomenon that has been previously reported for other DOR ligands (Piñeyro et al., 2001). Unlike DPDPE, preexposure to SNC-80 allowed complete recovery of B_{max} binding (Fig. 6A), suggesting that [³H]naltrindole similarly recognized DORs stabilized by the agonist and those present in naive cells. Furthermore, 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 β γ subunits indicated that addition of naltrindole to cells that had been preexposed to SNC-80 resulted in larger BRET changes than addition of the antagonist to cells that were pretreated with DPDPE (Fig. 5D).

Sustained exposure to SNC-80 and DPDPE induced agonist-specific interactions among DORs, G β 1 γ 2 subunits, and β arr2

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 β arr2 participate in the development of tolerance (Zhang et al., 2008; Dang et al., 2011). To compare β arr2 recruitment to receptors stabilized by DPDPE and SNC-80,

we turned to BRET assays, using β arr2-Luc/DOR-YFP as a biosensor. As shown in Figure 7A, DPDPE and SNC-80 both induced β arr2 recruitment with a half-life of <2 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 2 min 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 β γ dimer. We were therefore interested in finding out whether β arr2 recruitment by the two agonists would entail differential interaction with G β γ . To assess this possibility we used a biosensor that would allow us to monitor β arr2

recruitment from the vantage point of the G β γ dimer, i.e.: β arr2-Luc/YFP-G γ 2. Interestingly, only SNC-80 increased BRET at the β arr2-Luc/YFP-G γ 2 pair (Fig. 7C,D), indicating that this agonist was the only one bringing the regulatory protein in close proximity of the N-terminal domain of G γ 2. As for β arr2 interaction with the receptor, differences between DPDPE and SNC-80 appeared rapidly after agonist addition (Fig. 7C) and were maintained over 1 h of receptor stimulation (Fig. 7D). At this time, BRET changes induced by SNC-80 at β arr2-Luc/DOR-YFP and β arr2-Luc/YFP-G γ 2 pairs were respectively two- and six-fold higher than those induced by DPDPE.

β 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- β arr association is partly determined by the specific phospho-residues different receptor subtypes make available for β 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 β arr2 recruitment, we sought to determine whether DOR- β 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- β arr2 association. To do so, we induced β arr2 recruitment by DPDPE or SNC-80 (1 μ M, 30 min), and then measured the time required by β arr2-Luc/DOR-YFP and β arr2-Luc/YFP-G γ 2 pairs to recover their basal BRET values upon the removal of each agonist. As before, BRET changes monitored at the β arr2-Luc/DOR-YFP pair revealed significant β arr2 recruitment by DPDPE (Fig. 8A) and by SNC-80 (Fig. 8B). Furthermore, cells that were exposed to DPDPE recovered prestimulation 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 β arr2-Luc/YFP-G γ 2 pair (Fig. 8C), and, similar to β arr2 interaction with the receptor, BRET levels did not attain prestimulation values upon agonist removal (Fig. 8D). Finally, we verified whether coexpression with β arr2 could have modified agonist-induced conformational

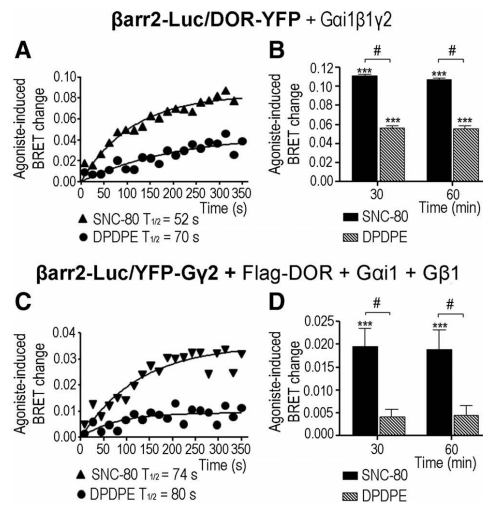


Figure 7. DORs stabilized by DPDPE and SNC-80 distinctively interact with β arr2. HEK293 cells were transfected with recombinant plasmids for the BRET pairs and accessory proteins as indicated in the figure to assess β arr2 recruitment from the vantage point or the receptor (A, B) or the G $\beta\gamma$ 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 5 min before adding DPDPE or SNC-80 (1 μ M). BRET1 measures were obtained every 18 s following agonist addition. Data correspond to one of three independent experiments. B, HEK293 cells were incubated with DPDPE or SNC-80 (1 μ M; 37°C) before resuspending them in PBS and taking BRET1 readings 5 min after manual addition of coelenterazine. 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 ± 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 versus 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 performed as in B. Results correspond to mean \pm SEM of five independent experiments. NetBRET values in vehicle-treated cells: 0.019 ± 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 versus SNC-80.

changes at the DOR-G $\beta\gamma$ interface. Results from these experiments are shown in Figure 8, E and F, and indicate that SNC-80 and DPDPE conserved their ability to respectively increase or reduce the BRET signal generated by DOR-Luc/YFP-Gy2. Furthermore, only DPDPE allowed this BRET pair to attain pre-stimulation values during recovery (Fig. 8D). Thus, together, observations obtained with these three BRET pairs indicate that receptor activation by SNC-80 induced a stable DOR-G $\beta\gamma$ - β arr2 association while DPDPE induced a transient interaction between the receptor and the regulatory protein.

To confirm observations obtained using BRET technology, we performed coimmunoprecipitation assays in which we assessed how DPDPE and SNC-80 modified the amount of β arr2-Luc and YFP-Gy2 that copurified with Flag-DORs. Purifications were performed either immediately after receptor stimulation (30 min, 1 μ 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 Gy2-YFP and β arr2-Luc (Fig. 9A), while incubation with DPDPE only increased the amount of β arr2 associated to the receptor (Fig. 9B). Copurifica-

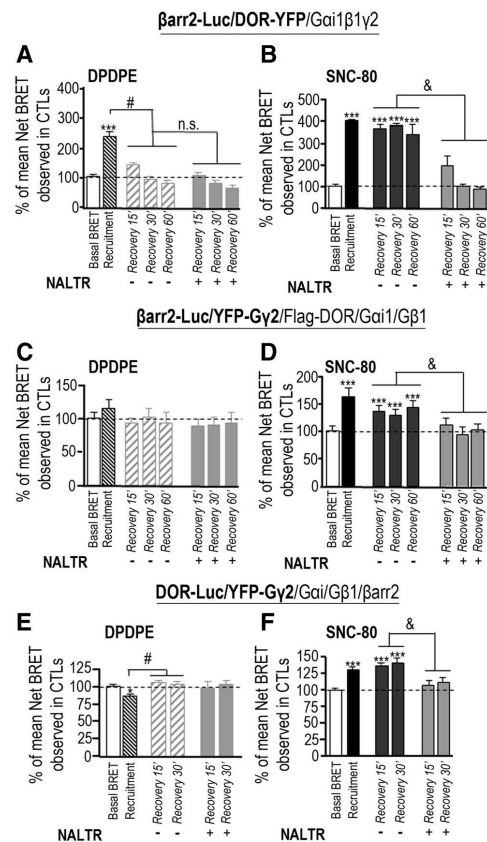


Figure 8. The duration of β arr2 association with DOR-G $\beta\gamma$ complexes depends on the activating agonist. HEK293 cells were transfected with recombinant plasmids for the indicated BRET pairs and accessory proteins. On the day of the experiment, they were exposed to 1 μ M DPDPE (A, C, E) or SNC-80 (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 μ M) for the indicated periods of time. BRET1 readings were taken 5 min after manual addition of coelenterazine. All data are expressed as percentage 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.

tion assays performed following recovery from agonist pretreatment were also consistent with BRET data. Thus, in cells that recovered from exposure to DPDPE, the amount of β arr2-Luc that coprecipitated with the receptor was reduced to pretreatment values (Fig. 9B). In contrast, in cells that recovered from exposure to SNC-80, the amounts of β arr2-Luc or Gy2-YFP that copurified with DORs was not different from those obtained immediately after recruitment (Fig. 9A), thus confirming the stable association of DORs, G $\beta\gamma$, and β arr2.

Data analyzed thus far indicate that each agonist caused the receptor C terminus to distinctively position itself with respect to

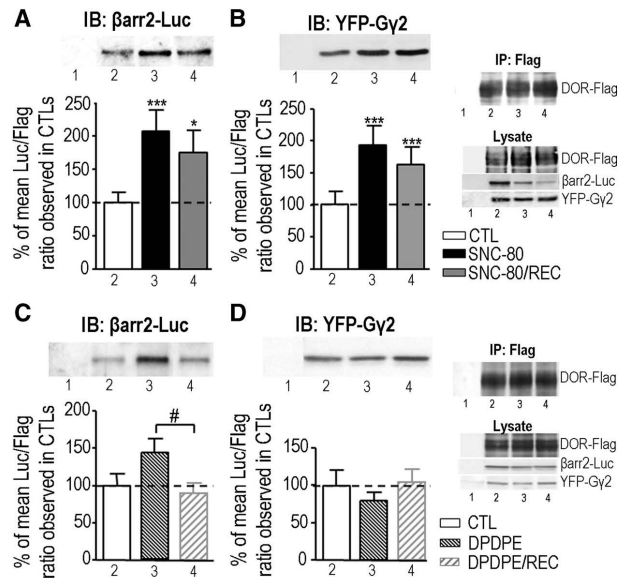


Figure 9. The stability of β arr2 association to DOR- $G\beta\gamma$ complexes depends on the activating agonist. HEK293 cells expressing or not Flag-DORs, β arr2-Luc, YFP- $G\gamma$ 2, and accessory heterotrimeric $G\alpha$ 1 and $G\beta$ 1 subunits were treated with $1 \mu\text{M}$ SNC-80 (A, B) or DPDPE (C, D) for 30 min. At the end of treatment, cells were washed and immediately used in coimmunoprecipitation 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 β arr2-Luc and YFP- $G\gamma$ 2 that were copurified with Flag-DORs in the following: (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 immunoprecipitation and amount of Flag-DOR immunoprecipitated for each sample. Histograms show results obtained by compiling densitometric measures of eight independent experiments. Data are expressed as percentage of β 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. β 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 β arr2-Luc/Flag-DOR 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.

the $G\beta\gamma$ dimer. SNC-80 caused β arr2 to be recruited in the proximity of the N-terminal domain of $G\gamma$ 2 and was accompanied by stable β arr2 association to the receptor and poor recycling. In the case of DPDPE, β arr2 did not approach the BRET tag present in $G\gamma$ 2, and its association to the receptor was transient. Moreover, kinetics of DOR- β 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 β 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- β 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 β arr2. To test this assumption we assessed whether naltrindole ($1 \mu\text{M}$), 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- $G\beta\gamma$ - β 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 8B,D,E.

The presence of the antagonist during recovery from exposure to SNC-80 caused the DOR- $G\gamma$ 2- β arr2 complex to fall apart, as indicated by the recovery of pre-treatment BRET signals at pairs monitoring different interactions within the complex (Fig. 8B,D,F). In contrast, the addition of naltrindole to cells recovering from exposure to DPDPE was without effect at each of the BRET pairs tested (Fig. 8A,C,E).

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

Discussion

Results obtained in this study indicate that agonist ability to support DOR recycling was associated with distinct degrees of receptor desensitization and different potential for inducing acute analgesic tolerance. Differences in recycling were supported by the adoption of agonist-specific conformations whose distinctive interaction with $G\beta\gamma$ subunits led to specific modalities of β arr2 recruitment by DOR/ $G\beta\gamma$ 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, 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, 2007), 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.

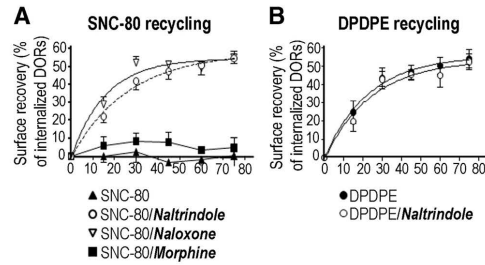


Figure 10. Naltrindole allows us to rescue DOR recycling following SNC-80 exposure. HEK293 cells stably expressing wild-type DORs were incubated with SNC-80 (**A**) or DPDPE (**B**; 1 μ M, 30 min) to induce internalization. At the end of treatment, cells were washed to remove agonist and allowed to recover 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 percentage of internalized DORs and represent mean \pm SEM of 4–9 independent experiments. Data were analyzed with mixed two-way ANOVA. **A**, Time \times 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 \times treatment interaction was observed for DPDPE ($F_{(5,48)} = 0.4$, $p > 0.05$), $p > 0.05$ comparing DPDPE to DPDPE + naltrindole.

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 [3 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_{max} that was not determined by downregulation of receptor protein. The fact that naltrindole's apparent affinity for the receptor remained unchanged indicated that the decrease in B_{max} could neither be explained by lingering free agonist. It is also unlikely that slow dissociation kinetics may have accounted for B_{max} reduction by DPDPE. Actually, if slow agonist dissociation were the basis for the loss of naltrindole binding sites, k_{off} values would predict a B_{max} reduction by both agonists (Knapp et al., 1991, 1996). Furthermore, based on dissociation kinetics, SNC-80 would be expected to produce a greater loss of [3 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_{max} may have resulted from the adoption of a conformation that was poorly recognized by [3 H]naltrindole. Data showing that naltrindole-induced BRET changes at the DOR-G γ 2 interface were much smaller in cells that had been pretreated 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 [3 H]naltrindole-binding conformations. Changes in DOR isomerization constants have been previously reported following prolonged incubation with other DOR ligands (Piñeyro et al., 2001). Furthermore, 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-G $\beta\gamma$ - β arr2 interactions promoted by each agonist.

Distinct modalities of β arr2 recruitment support agonist-related differences in recycling

β arrs interact both with the C-terminal domain and intracellular loops of GPCRs (Hanson and Gurevich, 2006; Bennett et al., 2000). For example, β arrs may associate with the second intracellular loop of the receptor and displace G α (Krupnick et al., 1997). In doing so they provide a mechanism that supports the classical idea of β arrs 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; Galés et al., 2005; Ayoub et al., 2007), sustained exposure to DPDPE or SNC-80 both reduced the spontaneous BRET signal generated by the G α i-Luc/DOR-GFP pair by more than two thirds. On the other hand, we found that DOR interaction with the G $\beta\gamma$ 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 γ 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 γ 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 preexisting 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 β arr recruitment and even later on, after receptor uncoupling from G α 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 β arr recruitment (Kouhen et al., 2000; Qiu et al., 2007), conferring receptors the ability to simultaneously associate both with β arrs and G $\beta\gamma$. Conversely, β arrs may interact with G β subunits (Yang et al., 2009) through residues that do not necessarily contribute to G β 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 coimmunoprecipitation data obtained in this study are consistent with such scenario because both DOR agonists promoted β arr2 recruitment to receptors that remained at least partly associated to the G $\beta\gamma$ dimer. However, only SNC-80 supported recruitment of β arr2 in close proximity of the N-terminal domain of G γ 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- β arr2 association was further evidenced by results obtained with naltrindole. Indeed, this antagonist caused the receptor C terminus to move away from G γ 2 and destabilized the DOR- β arr2 interaction promoted by SNC-80. The antagonist was without effect on the stability of DOR- β arr2 association by DPDPE, which did not involve G γ 2 in the first place. Together with conformational changes that disrupted the DOR-G $\beta\gamma$ - β arr2 complex, naltrindole changed the recycling phenotype of the conformation stabilized by SNC-80 into one that resembled recycling elicited by DPDPE. The interconversion 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 different internalization patterns could contribute to agonist differences in producing DOR desensitization and analgesic tolerance (Pradhan et al., 2009, 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 acute 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 mitigated desensitization caused by DPDPE but not SNC-80. Since desensitization is thought to actively contribute to the development of acute tolerance (Bohn et al., 2004; Christie, 2008; Nagi and Piñeyro, 2011), it is tempting to speculate that acute analgesic tolerance may result from distinct recycling patterns that determine agonist ability to induce desensitization. On the other hand, Pradhan et al. (2010) have clearly demonstrated that the tendency to induce chronic analgesic tolerance is not necessarily dependent on agonist ability to induce DOR 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 that 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.

References

- Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, Huard K, Paquin-Gobeil M, Piñeyro 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, Piñeyro G (2011) Using BRET to detect ligand-specific conformational changes in performed signalling complexes. *Methods Mol Biol* 756:149–163.
- Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, Schiller PW, Piñeyro 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, Galés C, Archer-Lahlou E, Vallières M, Schiller PW, Bouvier M, Piñeyro 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, Prézéau L, Ansanay H, Pin JP (2007) Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galphai1 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, Piñeyro 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-Gagné 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, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286:2495–2498.
- 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, Lefkowitz RJ, Caron MG (2002) Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knockout mice. *J Neurosci* 22:10494–10500.
- 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.
- 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, Lagacé 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 (2012) Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br J Pharmacol* 165:1704–1716.
- 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–S2.
- 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.
- Galés C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hébert TE, Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2:177–184.
- Galés 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.
- Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessard 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 JL, Wilcox GL (1980) Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67:313–316.
- Kenakin T (2007) 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 (1991) [D-Pen2,4'-125I-Phe4,D-Pen5]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.
- 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, Galés C, Le Gouill C, Bouvier M, Chemtob S, Hecker 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* 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.
- Millicamps M, Laferrère 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, Grò 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, Baños JE, Kieffer BL, Maldonado R (2006) Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* 23:830–834.
- Nagi K, Piñeyro 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.
- Piñeyro G, Azzi M, De Léan 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, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL (2009) In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PLoS One* 4:e5425.
- 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.
- 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, Gavériaux-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. *J Pain* 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, 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.
- 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.

Références

1. Afify, E. A., P. Y. Law, et al. (1998). "Role of carboxyl terminus of mu- and delta-opioid receptor in agonist-induced down-regulation." *Brain Res Mol Brain Res* 54(1): 24-34.
2. Allouche, S., M. Roussel, et al. (1999). "Differential desensitization of human delta-opioid receptors by peptide and alkaloid agonists." *Eur J Pharmacol* 371(2-3): 235-240.
3. Alt, A., M. J. Clark, et al. (2002). "Mu and Delta opioid receptors activate the same G proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Br J Pharmacol* 135(1): 217-225.
4. Ammer, H. and R. Schulz (1993). "Coupling of prostaglandin E1 receptors to the stimulatory GTP-binding protein Gs is enhanced in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells chronically exposed to an opioid." *Mol Pharmacol* 43(4): 556-563.
5. Apkarian, A. V., M. C. Bushnell, et al. (2005). "Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease." *Eur J Pain* 9(4): 463-484.
6. Archer-Lahlou, E., N. Audet, et al. (2009). "Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling." *J Cell Mol Med* 13(1): 147-163.
7. Argoff, C. (2011). "Mechanisms of pain transmission and pharmacologic management." *Curr Med Res Opin* 27(10): 2019-2031.
8. Arttamangkul, S., M. Torrecilla, et al. (2006). "Separation of mu-opioid receptor desensitization and internalization: endogenous receptors in primary neuronal cultures." *J Neurosci* 26(15): 4118-4125.
9. Attramadal, H., J. L. Arriza, et al. (1992). "Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family." *J Biol Chem* 267(25): 17882-17890.
10. Audet, N., E. Archer-Lahlou, et al. (2010). "[Functional selectivity of opioid receptors ligands]." *Med Sci (Paris)* 26(8-9): 734-739.
11. Audet, N., M. Paquin-Gobeil, et al. (2005). "Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands." *J Biol Chem* 280(9): 7808-7816.
12. Avidor-Reiss, T., I. Nevo, et al. (1996). "Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma." *J Biol Chem* 271(35): 21309-21315.
13. Avidor-Reiss, T., I. Nevo, et al. (1997). "Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific." *J Biol Chem* 272(8): 5040-5047.
14. Bagley, E. E., B. C. Chieng, et al. (2005). "Opioid tolerance in periaqueductal gray neurons isolated from mice chronically treated with morphine." *Br J Pharmacol* 146(1): 68-76.

15. Bailey, C. P., J. Llorente, et al. (2009). "Role of protein kinase C and mu-opioid receptor (MOPr) desensitization in tolerance to morphine in rat locus coeruleus neurons." *Eur J Neurosci* 29(2): 307-318.
16. Balboni, G., S. Salvadori, et al. (2002). "Potent delta-opioid receptor agonists containing the Dmt-Tic pharmacophore." *J Med Chem* 45(25): 5556-5563.
17. Bals-Kubik, R., T. S. Shippenberg, et al. (1990). "Involvement of central mu and delta opioid receptors in mediating the reinforcing effects of beta-endorphin in the rat." *Eur J Pharmacol* 175(1): 63-69.
18. Barthet, G., F. Gaven, et al. (2005). "Uncoupling and endocytosis of 5-hydroxytryptamine 4 receptors. Distinct molecular events with different GRK2 requirements." *J Biol Chem* 280(30): 27924-27934.
19. Basbaum, A. I., D. M. Bautista, et al. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." *Cell* 139(2): 267-284.
20. Bellet, M., J. L. Elghozi, et al. (1980). "Central cardiovascular effects of narcotic analgesics and enkephalins in rats." *Br J Pharmacol* 71(2): 365-369.
21. Benovic, J. L., H. Kuhn, et al. (1987). "Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 8879-8882.
22. Berger, A. C. and J. L. Whistler (2010). "How to design an opioid drug that causes reduced tolerance and dependence." *Ann Neurol* 67(5): 559-569.
23. Bernstein, M. A. and S. P. Welch (1997). "Effects of spinal versus supraspinal administration of cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors on morphine tolerance in mice." *Drug Alcohol Depend* 44(1): 41-46.
24. Bigliardi-Qi, M., L. T. Sumanovski, et al. (2004). "Mu-opiate receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin." *Dermatology* 209(3): 183-189.
25. Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *EMBO J* 18(7): 1723-1729.
26. Bohn, L. M., R. R. Gainetdinov, et al. (2000). "Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence." *Nature* 408(6813): 720-723.
27. Bonci, A. and J. T. Williams (1997). "Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine." *J Neurosci* 17(2): 796-803.
28. Bonica, J. J. (1979). "The need of a taxonomy." *Pain* 6(3): 247-248.
29. Borgland, S. L. (2001). "Acute opioid receptor desensitization and tolerance: is there a link?" *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(3): 147-154.
30. Bot, G., A. D. Blake, et al. (1997). "Opioid regulation of the mouse delta-opioid receptor expressed in human embryonic kidney 293 cells." *Mol Pharmacol* 52(2): 272-281.

31. Boussif, O., F. Lezoualc'h, et al. (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(16): 7297-7301.
32. Bradbury, F. A., J. C. Zelnik, et al. (2009). "G protein independent phosphorylation and internalization of the delta-opioid receptor." *J Neurochem* 109(5): 1526-1535.
33. Broom, D. C., E. M. Jutkiewicz, et al. (2002). "Behavioral effects of delta-opioid receptor agonists: potential antidepressants?" *Jpn J Pharmacol* 90(1): 1-6.
34. Bruera, E. and J. Pereira (1997). "Acute neuropsychiatric findings in a patient receiving fentanyl for cancer pain." *Pain* 69(1-2): 199-201.
35. Bunemann, M. and M. M. Hosey (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." *J Physiol* 517 (Pt 1): 5-23.
36. Burt, A. R., I. C. Carr, et al. (1996). "Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation." *Biochem J* 320 (Pt 1): 227-235.
37. Buzas, B., J. Rosenberger, et al. (1996). "Mu and delta opioid receptor gene expression after chronic treatment with opioid agonist." *Neuroreport* 7(9): 1505-1508.
38. Calderon, S. N., K. C. Rice, et al. (1997). "Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 23. Synthesis, opioid receptor binding, and bioassay of the highly selective delta agonist (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80) and related novel nonpeptide delta opioid receptor ligands." *J Med Chem* 40(5): 695-704.
39. Calderon, S. N., R. B. Rothman, et al. (1994). "Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist." *J Med Chem* 37(14): 2125-2128.
40. Carlezon, W. A., Jr., J. Thome, et al. (1998). "Regulation of cocaine reward by CREB." *Science* 282(5397): 2272-2275.
41. Celerier, E., C. Rivat, et al. (2000). "Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine." *Anesthesiology* 92(2): 465-472.
42. Chakrabarti, S., P. Y. Law, et al. (1998). "Distinct differences between morphine- and [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]-enkephalin-mu-opioid receptor complexes demonstrated by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation." *J Neurochem* 71(1): 231-239.
43. Chakrabarti, S., M. Oppermann, et al. (2001). "Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: a novel mechanism for modulating cell signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 4209-4214.

44. Chakrabarti, S., W. Yang, et al. (1997). "The mu-opioid receptor down-regulates differently from the delta-opioid receptor: requirement of a high affinity receptor/G protein complex formation." *Mol Pharmacol* 52(1): 105-113.
45. Charlton, J. J., P. B. Allen, et al. (2008). "Multiple actions of spinophilin regulate mu opioid receptor function." *Neuron* 58(2): 238-247.
46. Chaturvedi, K., P. Bandari, et al. (2001). "Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors." *J Biol Chem* 276(15): 12345-12355.
47. Chavkin, C. and A. Goldstein (1984). "Opioid receptor reserve in normal and morphine-tolerant guinea pig ileum myenteric plexus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22): 7253-7257.
48. Chen, J., M. B. Kelz, et al. (1997). "Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments." *J Neurosci* 17(13): 4933-4941.
49. Chen, L. and L. Y. Huang (1991). "Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid." *Neuron* 7(2): 319-326.
50. Chen, L. and L. Y. Huang (1991). "Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid." *Neuron* 7(2): 319-326.
51. Chen, L. and L. Y. Huang (1992). "Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation." *Nature* 356(6369): 521-523.
52. Chia, Y. Y., K. Liu, et al. (1999). "Intraoperative high dose fentanyl induces postoperative fentanyl tolerance." *Can J Anaesth* 46(9): 872-877.
53. Chieng, B. and J. T. Williams (1998). "Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal." *J Neurosci* 18(17): 7033-7039.
54. Christie, M. J. (2008). "Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction." *Br J Pharmacol* 154(2): 384-396.
55. Christie, M. J., J. T. Williams, et al. (1987). "Cellular mechanisms of opioid tolerance: studies in single brain neurons." *Mol Pharmacol* 32(5): 633-638.
56. Christie, M. J., J. T. Williams, et al. (1997). "Where is the locus in opioid withdrawal?" *Trends Pharmacol Sci* 18(4): 134-140.
57. Chu, P., S. Murray, et al. (1997). "Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist." *J Biol Chem* 272(43): 27124-27130.
58. Connor, M. and M. D. Christie (1999). "Opioid receptor signalling mechanisms." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(7): 493-499.
59. Craft, C. M., D. H. Whitmore, et al. (1994). "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family." *J Biol Chem* 269(6): 4613-4619.

60. Crain, S. M. and K. F. Shen (1990). "Opioids can evoke direct receptor-mediated excitatory effects on sensory neurons." *Trends Pharmacol Sci* 11(2): 77-81.
61. Crain, S. M. and K. F. Shen (2000). "Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability." *Pain* 84(2-3): 121-131.
62. Cvejic, S., N. Trapaizze, et al. (1996). "Thr353, located within the COOH-terminal tail of the delta opiate receptor, is involved in receptor down-regulation." *J Biol Chem* 271(8): 4073-4076.
63. Dang, V. C., B. Chieng, et al. (2011). "Cellular morphine tolerance produced by betaarrestin-2-dependent impairment of mu-opioid receptor resensitization." *J Neurosci* 31(19): 7122-7130.
64. Dang, V. C. and M. J. Christie (2012). "Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons." *Br J Pharmacol* 165(6): 1704-1716.
65. Dang, V. C., I. A. Napier, et al. (2009). "Two distinct mechanisms mediate acute mu-opioid receptor desensitization in native neurons." *J Neurosci* 29(10): 3322-3327.
66. Dang, V. C. and J. T. Williams (2004). "Chronic morphine treatment reduces recovery from opioid desensitization." *J Neurosci* 24(35): 7699-7706.
67. Dang, V. C. and J. T. Williams (2005). "Morphine-Induced mu-opioid receptor desensitization." *Mol Pharmacol* 68(4): 1127-1132.
68. Daniels, D. J., N. R. Lenard, et al. (2005). "Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52): 19208-19213.
69. De Luca, A. and I. M. Coupar (1996). "Insights into opioid action in the intestinal tract." *Pharmacol Ther* 69(2): 103-115.
70. Decailot, F. M., K. Befort, et al. (2003). "Opioid receptor random mutagenesis reveals a mechanism for G protein-coupled receptor activation." *Nat Struct Biol* 10(8): 629-636.
71. Denavit-Saubie, M., J. Champagnat, et al. (1978). "Effects of opiates and methionine-enkephalin on pontine and bulbar respiratory neurones of the cat." *Brain Res* 155(1): 55-67.
72. Derkach, V. A., M. C. Oh, et al. (2007). "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* 8(2): 101-113.
73. Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats." *J Pharmacol Exp Ther* 244(3): 1067-1080.
74. Duttaroy, A. and B. C. Yoburn (1995). "The effect of intrinsic efficacy on opioid tolerance." *Anesthesiology* 82(5): 1226-1236.

75. Ehrlich, G. K., M. L. Andria, et al. (1998). "Functional significance of cysteine residues in the delta opioid receptor studied by site-directed mutagenesis." *Can J Physiol Pharmacol* 76(3): 269-277.
76. Eisinger, D. A. and R. Schulz (2005). "Mechanism and consequences of delta-opioid receptor internalization." *Crit Rev Neurobiol* 17(1): 1-26.
77. Evans, C. J., D. E. Keith, Jr., et al. (1992). "Cloning of a delta opioid receptor by functional expression." *Science* 258(5090): 1952-1955.
78. Fan, G. H., W. B. Zhang, et al. (1997). "Modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II of functional response of delta opioid receptor in neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15) cells." *Neuropharmacology* 36(11-12): 1763-1769.
79. Fan, L. W., S. Tanaka, et al. (2002). "Withdrawal from dependence upon butorphanol uniquely increases kappa(1)-opioid receptor binding in the rat brain." *Brain Res Bull* 58(2): 149-160.
80. Fan, L. W., L. T. Tien, et al. (2003). "Changes in the brain kappa-opioid receptor levels of rats in withdrawal from physical dependence upon butorphanol." *Neuroscience* 121(4): 1063-1074.
81. Fan, T., G. Varghese, et al. (2005). "A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers." *J Biol Chem* 280(46): 38478-38488.
82. Fasano, C., D. Thibault, et al. (2008). "Culture of postnatal mesencephalic dopamine neurons on an astrocyte monolayer." *Curr Protoc Neurosci* Chapter 3: Unit 3 21.
83. Ferguson, G., K. R. Watterson, et al. (2000). "Subtype-specific kinetics of inhibitory adenosine receptor internalization are determined by sensitivity to phosphorylation by G protein-coupled receptor kinases." *Mol Pharmacol* 57(3): 546-552.
84. Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* 53(1): 1-24.
85. Ferguson, S. S. and M. G. Caron (1998). "G protein-coupled receptor adaptation mechanisms." *Semin Cell Dev Biol* 9(2): 119-127.
86. Fields, H. L. and A. I. Basbaum (1978). "Brainstem control of spinal pain-transmission neurons." *Annu Rev Physiol* 40: 217-248.
87. Fukuda, K., S. Kato, et al. (1996). "Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells." *J Neurochem* 67(3): 1309-1316.
88. Fyfe, L. W., D. R. Cleary, et al. (2010). "Tolerance to the antinociceptive effect of morphine in the absence of short-term presynaptic desensitization in rat periaqueductal gray neurons." *J Pharmacol Exp Ther* 335(3): 674-680.

89. Gage, H. D., J. C. Gage, et al. (2001). "Morphine-induced spinal cholinergic activation: in vivo imaging with positron emission tomography." *Pain* 91(1-2): 139-145.
90. Garzon, J., M. Castro, et al. (1998). "Influence of Gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors." *Eur J Neurosci* 10(8): 2557-2564.
91. Gastard, M. (2000). "Delta-opioid receptor endocytosis in spinal cord after dermenkephalin activation." *BMC Neurosci* 1: 1.
92. Gaveriaux-Ruff, C. and B. L. Kieffer (2011). "Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches." *Behav Pharmacol* 22(5-6): 405-414.
93. Gendron, L., M. J. Esdaile, et al. (2007). "Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin." *Neuroscience* 144(1): 263-274.
94. George, S. R., R. L. Zastawny, et al. (1994). "Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain." *Biochem Biophys Res Commun* 205(2): 1438-1444.
95. Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." *Endocr Rev* 21(1): 90-113.
96. Gibson, S. K., J. H. Parkes, et al. (2000). "Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin." *Biochemistry* 39(19): 5738-5749.
97. Gintzler, A. R. and S. Chakrabarti (2006). "Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules." *Life Sci* 79(8): 717-722.
98. Glaum, S. R., R. J. Miller, et al. (1994). "Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord." *J Neurosci* 14(8): 4965-4971.
99. Gold, S. J., M. H. Han, et al. (2003). "Regulation of RGS proteins by chronic morphine in rat locus coeruleus." *Eur J Neurosci* 17(5): 971-980.
100. Gomes, I., B. A. Jordan, et al. (2000). "Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy." *J Neurosci* 20(22): RC110.
101. Grecksch, G., K. Bartzsch, et al. (2006). "Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats." *Psychopharmacology (Berl)* 186(2): 177-184.
102. Grecksch, G., S. Just, et al. (2011). "Analgesic tolerance to high-efficacy agonists but not to morphine is diminished in phosphorylation-deficient S375A mu-opioid receptor knock-in mice." *J Neurosci* 31(39): 13890-13896.
103. Groer, C. E., K. Tidgewell, et al. (2007). "An opioid agonist that does not induce mu-opioid receptor--arrestin interactions or receptor internalization." *Mol Pharmacol* 71(2): 549-557.

104. Gucker, S. and J. M. Bidlack (1992). "Protein kinase C activation increases the rate and magnitude of agonist-induced delta-opioid receptor down-regulation in NG108-15 cells." *Mol Pharmacol* 42(4): 656-665.
105. Guignard, B., A. E. Bossard, et al. (2000). "Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement." *Anesthesiology* 93(2): 409-417.
106. Guo, J., Y. Wu, et al. (2000). "Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation." *Mol Pharmacol* 58(5): 1050-1056.
107. Hack, S. P., C. W. Vaughan, et al. (2003). "Modulation of GABA release during morphine withdrawal in midbrain neurons in vitro." *Neuropharmacology* 45(5): 575-584.
108. Halfpenny, P. R., D. C. Horwell, et al. (1990). "Highly selective kappa-opioid analgesics. 3. Synthesis and structure-activity relationships of novel N-[2-(1-pyrrolidinyl)-4- or -5-substituted-cyclohexyl]arylamide derivatives." *J Med Chem* 33(1): 286-291.
109. Hall, R. A., R. T. Premont, et al. (1998). "The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange." *Nature* 392(6676): 626-630.
110. Hallett, P. J. and J. M. Brotchie (2007). "Striatal delta opioid receptor binding in experimental models of Parkinson's disease and dyskinesia." *Mov Disord* 22(1): 28-40.
111. Han, M., V. V. Gurevich, et al. (2001). "Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation." *Structure* 9(9): 869-880.
112. Handler, C. M., E. B. Geller, et al. (1992). "Effect of mu-, kappa-, and delta-selective opioid agonists on thermoregulation in the rat." *Pharmacol Biochem Behav* 43(4): 1209-1216.
113. Harris, G. C. and G. Aston-Jones (1994). "Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome." *Nature* 371(6493): 155-157.
114. Harris, G. C. and J. T. Williams (1991). "Transient homologous mu-opioid receptor desensitization in rat locus coeruleus neurons." *J Neurosci* 11(8): 2574-2581.
115. Hasbi, A., S. Allouche, et al. (2000). "Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism." *J Pharmacol Exp Ther* 293(1): 237-247.
116. Hassen, A. H., G. Feuerstein, et al. (1982). "mu Receptors and opioid cardiovascular effects in the NTS of rat." *Peptides* 3(6): 1031-1037.
117. Hausdorff, W. P., M. Bouvier, et al. (1989). "Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization." *J Biol Chem* 264(21): 12657-12665.

118. He, L. and J. L. Whistler (2005). "An opiate cocktail that reduces morphine tolerance and dependence." *Curr Biol* 15(11): 1028-1033.
119. Hendry, I. A., K. L. Kelleher, et al. (2000). "Hypertolerance to morphine in G(z alpha)-deficient mice." *Brain Res* 870(1-2): 10-19.
120. Herz, A., K. Albus, et al. (1970). "On the central sites for the antinociceptive action of morphine and fentanyl." *Neuropharmacology* 9(6): 539-551.
121. Heurich, M., S. A. Mousa, et al. (2007). "Influence of pain treatment by epidural fentanyl and bupivacaine on homing of opioid-containing leukocytes to surgical wounds." *Brain Behav Immun* 21(5): 544-552.
122. Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 195-201.
123. Hislop, J. N., A. G. Henry, et al. (2009). "Ubiquitination regulates proteolytic processing of G protein-coupled receptors after their sorting to lysosomes." *J Biol Chem* 284(29): 19361-19370.
124. Holl, R., B. Jung, et al. (2009). "Synthesis and pharmacological evaluation of SNC80 analogues with a bridged piperazine ring." *ChemMedChem* 4(12): 2111-2122.
125. Holzer, P. (2007). "Treatment of opioid-induced gut dysfunction." *Expert Opin Investig Drugs* 16(2): 181-194.
126. Holzer, P. (2009). "Opioid receptors in the gastrointestinal tract." *Regul Pept* 155(1-3): 11-17.
127. Holzer, P. (2010). "Opioid antagonists for prevention and treatment of opioid-induced gastrointestinal effects." *Curr Opin Anaesthesiol* 23(5): 616-622.
128. Hosohata, Y., T. W. Vanderah, et al. (2000). "delta-Opioid receptor agonists produce antinociception and [35S]GTPgammaS binding in mu receptor knockout mice." *Eur J Pharmacol* 388(3): 241-248.
129. Hsu, M. M. and C. S. Wong (2000). "The roles of pain facilitatory systems in opioid tolerance." *Acta Anaesthesiol Sin* 38(3): 155-166.
130. <http://georges.dolisi.free.fr/La%20douleur/Douleur.htm> (date de consultation : 10-12-2011)
131. http://www-ulpmed.u-strasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap20-analgesiques_centrau.pdf (date de consultation : 12-12-2011)
132. Hurle, M. A. (2001). "Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in rat brain during opioid tolerance and supersensitivity." *J Neurochem* 77(2): 486-492.
133. Hyman, S. E., R. C. Malenka, et al. (2006). "Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory." *Annu Rev Neurosci* 29: 565-598.
134. Ignatova, E. G., M. M. Belcheva, et al. (1999). "Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence." *J Neurosci* 19(1): 56-63.

135. Ingram, S. L., T. A. Macey, et al. (2008). "Tolerance to repeated morphine administration is associated with increased potency of opioid agonists." *Neuropsychopharmacology* 33(10): 2494-2504.
136. Ingram, S. L., C. W. Vaughan, et al. (1998). "Enhanced opioid efficacy in opioid dependence is caused by an altered signal transduction pathway." *J Neurosci* 18(24): 10269-10276.
137. Inturrisi, C. E. (2002). "Clinical pharmacology of opioids for pain." *Clin J Pain* 18(4 Suppl): S3-13.
138. Ito, K., T. Haga, et al. (1999). "Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5." *Eur J Biochem* 260(1): 112-119.
139. Jala, V. R., W. H. Shao, et al. (2005). "Phosphorylation-independent beta-arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors." *J Biol Chem* 280(6): 4880-4887.
140. Jeanjean, A. P., S. M. Moussaoui, et al. (1995). "Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P." *Neuroscience* 68(1): 151-157.
141. Jessell, T. M. (2000). "Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes." *Nat Rev Genet* 1(1): 20-29.
142. Ji, R. R., Y. Kawasaki, et al. (2007). "Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain." *Handb Exp Pharmacol*(177): 359-389.
143. Johnson, E. A., S. Oldfield, et al. (2006). "Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells." *Mol Pharmacol* 70(2): 676-685.
144. Jones, K. T., M. Echeverry, et al. (2006). "Agonist mediated internalization of M2 mAChR is beta-arrestin-dependent." *J Mol Signal* 1: 7.
145. Joyce, E. M. and S. D. Iversen (1979). "The effect of morphine applied locally to mesencephalic dopamine cell bodies on spontaneous motor activity in the rat." *Neurosci Lett* 14(2-3): 207-212.
146. Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* 413(6852): 203-210.
147. Kauer, J. A. and R. C. Malenka (2007). "Synaptic plasticity and addiction." *Nat Rev Neurosci* 8(11): 844-858.
148. Keith, D. E., S. R. Murray, et al. (1996). "Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization." *J Biol Chem* 271(32): 19021-19024.
149. Kelso, S. R., T. E. Nelson, et al. (1992). "Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes." *J Physiol* 449: 705-718.
150. Kenakin, T. (2007). "Allosteric theory: taking therapeutic advantage of the malleable nature of GPCRs." *Curr Neuropharmacol* 5(3): 149-156.

151. Kieffer, B. L. (1999). "Opioids: first lessons from knockout mice." *Trends Pharmacol Sci* 20(1): 19-26.
152. Kieffer, B. L., K. Befort, et al. (1992). "The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24): 12048-12052.
153. Kieffer, B. L. and C. J. Evans (2009). "Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo." *Neuropharmacology* 56 Suppl 1: 205-212.
154. Kieffer, B. L. and C. Gaveriaux-Ruff (2002). "Exploring the opioid system by gene knockout." *Prog Neurobiol* 66(5): 285-306.
155. Kim, J. A., S. Bartlett, et al. (2008). "Morphine-induced receptor endocytosis in a novel knockin mouse reduces tolerance and dependence." *Curr Biol* 18(2): 129-135.
156. Ko, J. L., U. Arvidsson, et al. (1999). "Visualization of time-dependent redistribution of delta-opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure." *Brain Res Mol Brain Res* 69(2): 171-185.
157. Koch, T. and V. Holtt (2008). "Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence." *Pharmacol Ther* 117(2): 199-206.
158. Koch, T., T. Krosiak, et al. (1997). "Site mutation in the rat mu-opioid receptor demonstrates the involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in agonist-mediated desensitization." *J Neurochem* 69(4): 1767-1770.
159. Komatsu, H., A. Ohara, et al. (2011). "Decreased response to social defeat stress in mu-opioid-receptor knockout mice." *Pharmacol Biochem Behav* 99(4): 676-682.
160. Koppert, W. (2004). "[Opioid-induced hyperalgesia. Pathophysiology and clinical relevance]." *Anaesthetist* 53(5): 455-466.
161. Koppert, W. and M. Schmelz (2007). "The impact of opioid-induced hyperalgesia for postoperative pain." *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 21(1): 65-83.
162. Kouhen, O. M., G. Wang, et al. (2000). "Hierarchical phosphorylation of delta-opioid receptor regulates agonist-induced receptor desensitization and internalization." *J Biol Chem* 275(47): 36659-36664.
163. Kramer, H. K., M. L. Andria, et al. (2000). "Mutation of tyrosine 318 (Y318F) in the delta-opioid receptor attenuates tyrosine phosphorylation, agonist-dependent receptor internalization, and mitogen-activated protein kinase activation." *Brain Res Mol Brain Res* 79(1-2): 55-66.
164. Kramer, H. K. and E. J. Simon (2000). "Mu and delta-opioid receptor agonists induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the absence of receptor internalization." *Neuropharmacology* 39(10): 1707-1719.
165. Kramer, T. H., P. Davis, et al. (1993). "In vitro potency, affinity and agonist efficacy of highly selective delta opioid receptor ligands." *J Pharmacol Exp Ther* 266(2): 577-584.

166. Krumins, S. A., A. I. Faden, et al. (1985). "Opiate binding in rat hearts: modulation of binding after hemorrhagic shock." *Biochem Biophys Res Commun* 127(1): 120-128.
167. Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 289-319.
168. Kuhn, W. F. (1984). "Chronic pain." *South Med J* 77(9): 1103-1106.
169. Kunapuli, P., J. J. Onorato, et al. (1994). "Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5." *J Biol Chem* 269(2): 1099-1105.
170. Lane-Ladd, S. B., J. Pineda, et al. (1997). "CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence." *J Neurosci* 17(20): 7890-7901.
171. Latimer, L. G., P. Duffy, et al. (1987). "Mu opioid receptor involvement in enkephalin activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area." *J Pharmacol Exp Ther* 241(1): 328-337.
172. Lavoie, J. L., A. Calderone, et al. (2002). "A farnesyltransferase inhibitor attenuated beta-adrenergic receptor downregulation in rat skeletal muscle." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(1): R317-322.
173. Law, P. Y., D. S. Hom, et al. (1983). "Opiate receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes." *Mol Pharmacol* 24(3): 413-424.
174. Law, P. Y., D. S. Hom, et al. (1983). "Opiate regulation of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate level in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells. Relationship between receptor occupancy and effect." *Mol Pharmacol* 23(1): 26-35.

175. Leadem, C. A. and S. V. Yagenova (1987). "Effects of specific activation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat." *Neuroendocrinology* 45(2): 109-117.
176. Lecoq, I., N. Marie, et al. (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(2): 666-677.
177. Lefkowitz, R. J. (1998). "G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization." *J Biol Chem* 273(30): 18677-18680.
178. Lefkowitz, R. J. and S. K. Shenoy (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." *Science* 308(5721): 512-517.
179. Li, H., L. Wu, et al. (2003). "Opioid peptides modulate the response of neurons of the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn to GABA." *Biochem Biophys Res Commun* 307(3): 730-736.

180. Li, L. Y. and K. J. Chang (1996). "The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors." *Mol Pharmacol* 50(3): 599-602.
181. Likar, R., S. A. Mousa, et al. (2004). "Increased numbers of opioid expressing inflammatory cells do not affect intra-articular morphine analgesia." *Br J Anaesth* 93(3): 375-380.
182. Lisman, J., R. C. Malenka, et al. (1997). "Learning mechanisms: the case for CaM-KII." *Science* 276(5321): 2001-2002.
183. Liu, J. G. and K. J. Anand (2001). "Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence." *Brain Res Brain Res Rev* 38(1-2): 1-19.
184. Liu, J. G., X. P. Liao, et al. (1999). "The difference between methadone and morphine in regulation of delta-opioid receptors underlies the antagonistic effect of methadone on morphine-mediated cellular actions." *Eur J Pharmacol* 373(2-3): 233-239.
185. Lodowski, D. T., V. M. Tesmer, et al. (2006). "The structure of G protein-coupled receptor kinase (GRK)-6 defines a second lineage of GRKs." *J Biol Chem* 281(24): 16785-16793.
186. Loh, H. H., D. A. Brase, et al. (1976). "beta-Endorphin in vitro inhibition of striatal dopamine release." *Nature* 264(5586): 567-568.
187. Loh, H. H. and A. P. Smith (1990). "Molecular characterization of opioid receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 123-147.
188. Lohse, M. J., J. L. Benovic, et al. (1990). "Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors." *J Biol Chem* 265(6): 3202-3211.
189. Lou, L., T. Zhou, et al. (1999). "Modulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat hippocampus: differential regulation of alpha and beta isoforms." *Mol Pharmacol* 55(3): 557-563.
190. Loudon, R. P. and J. L. Benovic (1997). "Altered activity of palmitoylation-deficient and isoprenylated forms of the G protein-coupled receptor kinase GRK6." *J Biol Chem* 272(43): 27422-27427.
191. Mabrouk, O. S., M. Marti, et al. (2009). "The novel delta opioid receptor agonist UFP-512 dually modulates motor activity in hemiparkinsonian rats via control of the nigro-thalamic pathway." *Neuroscience* 164(2): 360-369.
192. MacDonald, J. F., X. G. Xiong, et al. (1998). "Modulation of NMDA receptors." *Prog Brain Res* 116: 191-208.
193. Malatynska, E., Y. Wang, et al. (1996). "Human delta opioid receptor: functional studies on stably transfected Chinese hamster ovary cells after acute and chronic treatment with the selective nonpeptidic agonist SNC-80." *J Pharmacol Exp Ther* 278(3): 1083-1089.

194. Maldonado, R., L. Stinus, et al. (1992). "Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome." *J Pharmacol Exp Ther* 261(2): 669-677.
195. Maldonado, R., O. Valverde, et al. (1995). "Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the expression of opiate withdrawal." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352(5): 565-575.
196. Mameli, M., B. Balland, et al. (2007). "Rapid synthesis and synaptic insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the ventral tegmental area." *Science* 317(5837): 530-533.
197. Mansour, A., C. A. Fox, et al. (1995). "Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications." *Trends Neurosci* 18(1): 22-29.
198. Mansour, A., C. A. Fox, et al. (1994). "Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study." *J Comp Neurol* 350(3): 412-438.
199. Marie, N., B. Aguila, et al. (2006). "Tracking the opioid receptors on the way of desensitization." *Cell Signal* 18(11): 1815-1833.
200. Marie, N., B. Aguila, et al. (2008). "Different kinases desensitize the human delta-opioid receptor (hDOP-R) in the neuroblastoma cell line SK-N-BE upon peptidic and alkaloid agonists." *Cell Signal* 20(6): 1209-1220.
201. Marie, N., I. Lecoq, et al. (2003). "Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists." *J Biol Chem* 278(25): 22795-22804.
202. Martini, L. and J. L. Whistler (2007). "The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence." *Curr Opin Neurobiol* 17(5): 556-564.
203. Massotte, D. and B. L. Kieffer (1998). "A molecular basis for opiate action." *Essays Biochem* 33: 65-77.
204. Mathieu-Kia, A. M., L. Q. Fan, et al. (2001). "Mu-, delta- and kappa-opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients." *Brain Res* 893(1-2): 121-134.
205. Matsuoka, I., R. Maldonado, et al. (1994). "Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA." *Eur J Pharmacol* 268(2): 215-221.
206. Mayer, J. H., S. C. Steffensen, et al. (1995). "Site-selective acute desensitization following local administration of opioid in the hippocampus." *Brain Res* 686(2): 134-142.
207. McIntire, W. E. (2009). "Structural determinants involved in the formation and activation of G protein betagamma dimers." *Neurosignals* 17(1): 82-99.
208. McLaughlin, J. P., L. C. Myers, et al. (2004). "Prolonged kappa opioid receptor phosphorylation mediated by G-protein receptor kinase underlies sustained analgesic tolerance." *J Biol Chem* 279(3): 1810-1818.

209. Meng, F., G. X. Xie, et al. (1993). "Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 9954-9958.
210. Mercadante, S., A. Casuccio, et al. (1998). "Morphine versus methadone in the pain treatment of advanced-cancer patients followed up at home." *J Clin Oncol* 16(11): 3656-3661.
211. Milligan, G. (2005). "Opioid receptors and their interacting proteins." *Neuromolecular Med* 7(1-2): 51-59.
212. Mnie-Filali, O., M. G. Amraei, et al. (2010). "Serotonin 4 receptor (5-HT₄R) internalization is isoform-specific: effects of 5-HT and RS67333 on isoforms A and B." *Cell Signal* 22(3): 501-509.
213. Moore, C. A., S. K. Milano, et al. (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." *Annu Rev Physiol* 69: 451-482.
214. Morikawa, H., K. Fukuda, et al. (1998). "Desensitization and resensitization of delta-opioid receptor-mediated Ca²⁺ channel inhibition in NG108-15 cells." *Br J Pharmacol* 123(6): 1111-1118.
215. Mousa, S. A., C. P. Bopaiah, et al. (2007). "Inhibition of inflammatory pain by CRF at peripheral, spinal and supraspinal sites: involvement of areas coexpressing CRF receptors and opioid peptides." *Neuropsychopharmacology* 32(12): 2530-2542.
216. Mulder, A. H., G. Wardeh, et al. (1984). "Kappa- and delta-opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release." *Nature* 308(5956): 278-280.
217. Murakami, A., T. Yajima, et al. (1993). "X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome." *FEBS Lett* 334(2): 203-209.
218. Murray, S. R., C. J. Evans, et al. (1998). "Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor." *J Biol Chem* 273(39): 24987-24991.
219. Narita, M., N. Kuzumaki, et al. (2006). "Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection." *J Neurochem* 97(5): 1494-1505.
220. Narita, M., M. Makimura, et al. (1994). "Influence of chronic morphine treatment on protein kinase C activity: comparison with butorphanol and implication for opioid tolerance." *Brain Res* 650(1): 175-179.
221. Navratilova, E., E. V. Varga, et al. (2004). "Mutation S363A in the human delta-opioid receptor selectively reduces down-regulation by a peptide agonist." *Eur J Pharmacol* 485(1-3): 341-343.
222. Nestler, E. J. (1996). "Under siege: The brain on opiates." *Neuron* 16(5): 897-900.
223. Nestler, E. J. (2001). "Molecular neurobiology of addiction." *Am J Addict* 10(3): 201-217.
224. Nestler, E. J. and G. K. Aghajanian (1997). "Molecular and cellular basis of addiction." *Science* 278(5335): 58-63.

225. Nestler, E. J., M. B. Kelz, et al. (1999). "DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity." *Brain Res* 835(1): 10-17.
226. Nishizuka, Y. (1995). "Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses." *FASEB J* 9(7): 484-496.
227. Noble, F. and B. M. Cox (1996). "Differential desensitization of mu- and delta- opioid receptors in selected neural pathways following chronic morphine treatment." *Br J Pharmacol* 117(1): 161-169.
228. Nye, H. E. and E. J. Nestler (1996). "Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration." *Mol Pharmacol* 49(4): 636-645.
229. Okura, T., S. M. Cowell, et al. (2000). "Differential down-regulation of the human delta-opioid receptor by SNC80 and [D-Pen(2),D-Pen(5)]enkephalin." *Eur J Pharmacol* 387(2): R11-13.
230. Okura, T., E. V. Varga, et al. (2003). "Agonist-specific down-regulation of the human delta-opioid receptor." *Eur J Pharmacol* 459(1): 9-16.
231. Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 22(2): 153-183.
232. Peckys, D. and G. B. Landwehrmeyer (1999). "Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study." *Neuroscience* 88(4): 1093-1135.
233. Pei, G., B. L. Kieffer, et al. (1995). "Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C." *Mol Pharmacol* 48(2): 173-177.
234. Penn, R. B., R. A. Panettieri, Jr., et al. (1998). "Mechanisms of acute desensitization of the beta2AR-adenylyl cyclase pathway in human airway smooth muscle." *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(2): 338-348.
235. Petty, M. A. and W. De Jong (1982). "Cardiovascular effects of beta-endorphin after microinjection into the nucleus tractus solitarii of the anaesthetised rat." *Eur J Pharmacol* 81(3): 449-457.
236. Pineyro, G. and E. Archer-Lahlou (2007). "Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation." *Cell Signal* 19(1): 8-19.
237. Pitcher, J. A., N. J. Freedman, et al. (1998). "G protein-coupled receptor kinases." *Annu Rev Biochem* 67: 653-692.
238. Pradhan, A. A., J. A. Becker, et al. (2009). "In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists." *PLoS One* 4(5): e5425.
239. Pradhan, A. A., W. Walwyn, et al. (2010). "Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance." *J Neurosci* 30(49): 16459-16468.
240. Premont, R. T. (1994). "Identification of adenylyl cyclases by amplification using degenerate primers." *Methods Enzymol* 238: 116-127.

241. Pu, L., G. B. Bao, et al. (2002). "Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates." *J Neurosci* 22(5): 1914-1921.
242. Puttfarcken, P. S. and B. M. Cox (1989). "Morphine-induced desensitization and down-regulation at mu-receptors in 7315C pituitary tumor cells." *Life Sci* 45(20): 1937-1942.
243. Puttfarcken, P. S., L. L. Werling, et al. (1988). "Effects of chronic morphine exposure on opioid inhibition of adenylyl cyclase in 7315c cell membranes: a useful model for the study of tolerance at mu opioid receptors." *Mol Pharmacol* 33(5): 520-527.
244. Qiu, Y., P. Y. Law, et al. (2003). "Mu-opioid receptor desensitization: role of receptor phosphorylation, internalization, and representation." *J Biol Chem* 278(38): 36733-36739.
245. Qiu, Y., H. H. Loh, et al. (2007). "Phosphorylation of the delta-opioid receptor regulates its beta-arrestins selectivity and subsequent receptor internalization and adenylyl cyclase desensitization." *J Biol Chem* 282(31): 22315-22323.
246. Quillinan, N., E. K. Lau, et al. (2011). "Recovery from mu-opioid receptor desensitization after chronic treatment with morphine and methadone." *J Neurosci* 31(12): 4434-4443.
247. Rachinger-Adam, B., P. Conzen, et al. (2011). "Pharmacology of peripheral opioid receptors." *Curr Opin Anaesthesiol* 24(4): 408-413.
248. Rasmussen, K., D. B. Beitner-Johnson, et al. (1990). "Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates." *J Neurosci* 10(7): 2308-2317.
249. Remmers, A. E., M. J. Clark, et al. (1998). "Delta opioid receptor down-regulation is independent of functional G protein yet is dependent on agonist efficacy." *J Pharmacol Exp Ther* 287(2): 625-632.
250. Ren, X. R., E. Reiter, et al. (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(5): 1448-1453.
251. Rezvani, A., J. P. Huidobro-Toro, et al. (1983). "A rapid and simple method for the quantitative determination of tolerance development to opiates in the guinea-pig ileum in vitro." *J Pharmacol Exp Ther* 225(2): 251-255.
252. Rittner, H. L. and A. Brack (2007). "Leukocytes as mediators of pain and analgesia." *Curr Rheumatol Rep* 9(6): 503-510.
253. Rittner, H. L., D. Labuz, et al. (2006). "Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells." *FASEB J* 20(14): 2627-2629.

254. Russell, J. A., G. Leng, et al. (1995). "Opioid tolerance and dependence in the magnocellular oxytocin system: a physiological mechanism?" *Exp Physiol* 80(3): 307-340.
255. Saitoh, A., A. Sugiyama, et al. (2011). "The novel delta opioid receptor agonist KNT-127 produces antidepressant-like and antinociceptive effects in mice without producing convulsions." *Behav Brain Res* 223(2): 271-279.
256. Sanyal, A. J., J. Bosch, et al. (2008). "Portal hypertension and its complications." *Gastroenterology* 134(6): 1715-1728.
257. Satoh, M. and M. Minami (1995). "Molecular pharmacology of the opioid receptors." *Pharmacol Ther* 68(3): 343-364.
258. Schafer, M., L. Carter, et al. (1994). "Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4219-4223.
259. Scherrer, G., P. Tryoen-Toth, et al. (2006). "Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(25): 9691-9696.
260. Schertler, G. F. (1998). "Structure of rhodopsin." *Eye (Lond)* 12 (Pt 3b): 504-510.
261. Schiller, P. W., T. M. Nguyen, et al. (1992). "Differential stereochemical requirements of mu vs. delta opioid receptors for ligand binding and signal transduction: development of a class of potent and highly delta-selective peptide antagonists." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24): 11871-11875.
262. Schmidt, H., S. Schulz, et al. (2000). "Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells." *J Neurochem* 74(1): 414-422.
263. Schultz, J. E. and G. J. Gross (2001). "Opioids and cardioprotection." *Pharmacol Ther* 89(2): 123-137.
264. Scott, M. T., A. Ingram, et al. (2002). "PDK1-dependent activation of atypical PKC leads to degradation of the p21 tumour modifier protein." *EMBO J* 21(24): 6771-6780.
265. Seifert, F., G. Kiefer, et al. (2009). "Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome." *Brain* 132(Pt 3): 788-800.
266. Self, D. W. and E. J. Nestler (1995). "Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction." *Annu Rev Neurosci* 18: 463-495.
267. Shapira, M., O. Keren, et al. (2001). "Divers pathways mediate delta-opioid receptor down regulation within the same cell." *Brain Res Mol Brain Res* 96(1-2): 142-150.
268. Sharma, S. K., M. Nirenberg, et al. (1975). "Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(2): 590-594.

269. Shenoy, S. K. and R. J. Lefkowitz (2003). "Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling." *Biochem J* 375(Pt 3): 503-515.
270. Shieh, P. B., S. C. Hu, et al. (1998). "Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression." *Neuron* 20(4): 727-740.
271. Shippenberg, T. and A. Herz (1987). "Motivational properties of opioids." *Pol J Pharmacol Pharm* 39(5): 577-583.
272. Shoji, Y., J. Delfs, et al. (1999). "Presynaptic inhibition of GABA(B)-mediated synaptic potentials in the ventral tegmental area during morphine withdrawal." *J Neurosci* 19(6): 2347-2355.
273. Sim, L. J. and S. R. 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(4): 562-572.
274. Sim, L. J., D. E. Selley, et al. (1996). "Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain." *J Neurosci* 16(8): 2684-2692.
275. Sittl, R., M. Nuijten, et al. (2006). "Patterns of dosage changes with transdermal buprenorphine and transdermal fentanyl for the treatment of noncancer and cancer pain: a retrospective data analysis in Germany." *Clin Ther* 28(8): 1144-1154.
276. Smith, H. S. (2008). "Peripherally-acting opioids." *Pain Physician* 11(2 Suppl): S121-132.
277. Sneddon, W. B. and P. A. Friedman (2007). "Beta-arrestin-dependent parathyroid hormone-stimulated extracellular signal-regulated kinase activation and parathyroid hormone type 1 receptor internalization." *Endocrinology* 148(8): 4073-4079.
278. Soignier, R. D., A. L. Vaccarino, et al. (2004). "Analgesic tolerance and cross-tolerance to i.c.v. endomorphin-1, endomorphin-2, and morphine in mice." *Neurosci Lett* 366(2): 211-214.
279. Stafford, K., A. B. Gomes, et al. (2001). "mu-Opioid receptor downregulation contributes to opioid tolerance in vivo." *Pharmacol Biochem Behav* 69(1-2): 233-237.
280. Stamford, J. A. (1995). "Descending control of pain." *Br J Anaesth* 75(2): 217-227.
281. Stander, S., M. Gunzer, et al. (2002). "Localization of mu-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin." *Regul Pept* 110(1): 75-83.
282. Stein, C., M. J. Millan, et al. (1989). "Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 248(3): 1269-1275.

283. Stein, C., M. Pfluger, et al. (1996). "No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia." *J Clin Invest* 98(3): 793-799.
284. Stevens, K. E., F. M. Leslie, et al. (1988). "BAM-18: analgesia, hyperalgesia and locomotor effects." *Neuropeptides* 12(1): 21-27.
285. Stewart, P. E. and D. L. Hammond (1993). "Evidence for delta opioid receptor subtypes in rat spinal cord: studies with intrathecal naltriben, cyclic[D-Pen2, D-Pen5] enkephalin and [D-Ala2, Glu4]deltorphin." *J Pharmacol Exp Ther* 266(2): 820-828.
286. Stoffel, M., R. Espinosa, 3rd, et al. (1994). "Human G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK1) gene (KCNJ3): localization to chromosome 2 and identification of a simple tandem repeat polymorphism." *Genomics* 21(1): 254-256.
287. Straub, R. H., C. Wolff, et al. (2008). "Antiinflammatory role of endomorphins in osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and adjuvant-induced polyarthritis." *Arthritis Rheum* 58(2): 456-466.
288. Tanowitz, M. and M. Von Zastrow (2002). "Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes." *J Biol Chem* 277(52): 50219-50222.
289. Tanowitz, M. and M. von Zastrow (2003). "A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors." *J Biol Chem* 278(46): 45978-45986.
290. Tao, P. L., L. R. Chang, et al. (1988). "Decrease in delta-opioid receptor density in rat brain after chronic [D-Ala2,D-Leu5]enkephalin treatment." *Brain Res* 462(2): 313-320.
291. Teng, L., J. Zhao, et al. (2010). "A GPCR/secretase complex regulates beta- and gamma-secretase specificity for Abeta production and contributes to AD pathogenesis." *Cell Res* 20(2): 138-153.
292. Terrillon, S. and M. Bouvier (2004). "Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes." *EMBO J* 23(20): 3950-3961.
293. Thompson, D., M. Pusch, et al. (2007). "Changes in G protein-coupled receptor sorting protein affinity regulate postendocytic targeting of G protein-coupled receptors." *J Biol Chem* 282(40): 29178-29185.
294. Trang, T., R. Quirion, et al. (2005). "The spinal basis of opioid tolerance and physical dependence: Involvement of calcitonin gene-related peptide, substance P, and arachidonic acid-derived metabolites." *Peptides* 26(8): 1346-1355.
295. Trapaidze, N., I. Gomes, et al. (2000). "Recycling and resensitization of delta opioid receptors." *DNA Cell Biol* 19(4): 195-204.
296. Trapaidze, N., D. E. Keith, et al. (1996). "Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization." *J Biol Chem* 271(46): 29279-29285.

297. Trujillo, K. A. (2000). "Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioral plasticity? A review of preclinical studies." *Psychopharmacology (Berl)* 151(2-3): 121-141.
298. Trujillo, K. A. and H. Akil (1991). "Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801." *Science* 251(4989): 85-87.
299. Turban, S. and E. Hajduch (2011). "Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance." *FEBS Lett* 585(2): 269-274.
300. Ueda, H. (2004). "Locus-specific involvement of anti-opioid systems in morphine tolerance and dependence." *Ann N Y Acad Sci* 1025: 376-382.
301. Ulens, C., M. Van Boven, et al. (2000). "Interaction of p-fluorofentanyl on cloned human opioid receptors and exploration of the role of Trp-318 and His-319 in mu-opioid receptor selectivity." *J Pharmacol Exp Ther* 294(3): 1024-1033.
302. Urban, J. D., W. P. Clarke, et al. (2007). "Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology." *J Pharmacol Exp Ther* 320(1): 1-13.
303. Urtreger, A. J., M. G. Kazanietz, et al. (2012). "Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression." *IUBMB Life* 64(1): 18-26.
304. Van Ree, J. M. (1979). "[Neuropeptides and addiction]." *Ned Tijdschr Geneeskd* 123(37): 1595-1596.
305. Van Rijn, R. M., D. I. Brissett, et al. (2010). "Dual efficacy of delta opioid receptor-selective ligands for ethanol drinking and anxiety." *J Pharmacol Exp Ther* 335(1): 133-139.
306. Vanderah, T. W. (2010). "Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain." *Clin J Pain* 26 Suppl 10: S10-15.
307. Varga, E. V. (2003). "The molecular mechanisms of cellular tolerance to delta-opioid agonists. A minireview." *Acta Biol Hung* 54(2): 203-218.
308. Varga, E. V., E. Navratilova, et al. (2004). "Agonist-specific regulation of the delta-opioid receptor." *Life Sci* 76(6): 599-612.
309. Vargas, G. A. and M. Von Zastrow (2004). "Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor." *J Biol Chem* 279(36): 37461-37469.
310. Vaughan, C. W., S. L. Ingram, et al. (1997). "How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission." *Nature* 390(6660): 611-614.
311. Vergura, R., G. Balboni, et al. (2008). "Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist." *Peptides* 29(1): 93-103.
312. Virk, M. S., S. Arttamangkul, et al. (2009). "Buprenorphine is a weak partial agonist that inhibits opioid receptor desensitization." *J Neurosci* 29(22): 7341-7348.
313. Vishnivetskiy, S. A., C. L. Paz, et al. (1999). "How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin?" *J Biol Chem* 274(17): 11451-11454.

314. Wang, H. and J. Sagen (1994). "Absence of appreciable tolerance and morphine cross-tolerance in rats with adrenal medullary transplants in the spinal cord." *Neuropharmacology* 33(5): 681-692.
315. Wang, J. B. (2003). "Study of opioid receptor phosphorylation using cell-labeling method with ³²P-orthophosphate." *Methods Mol Med* 84: 47-51.
316. Wang, J. F. (1993). "[Analgesic synergism of endogenous opioid substances and effects of calcium ion and adenosine cyclic monophosphate on opium analgesia]." *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 24(1): 58-60.
317. Wang, Z. J. and L. X. Wang (2006). "Phosphorylation: a molecular switch in opioid tolerance." *Life Sci* 79(18): 1681-1691.
318. Whistler, J. L., H. H. Chuang, et al. (1999). "Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction." *Neuron* 23(4): 737-746.
319. Whistler, J. L., J. Enquist, et al. (2002). "Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors." *Science* 297(5581): 615-620.
320. Whistler, J. L., P. Tsao, et al. (2001). "A phosphorylation-regulated brake mechanism controls the initial endocytosis of opioid receptors but is not required for post-endocytic sorting to lysosomes." *J Biol Chem* 276(36): 34331-34338.
321. Willets, J. and E. Kelly (2001). "Desensitization of endogenously expressed delta-opioid receptors: no evidence for involvement of G protein-coupled receptor kinase 2." *Eur J Pharmacol* 431(2): 133-141.
322. Williams, J. T., M. J. Christie, et al. (2001). "Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence." *Physiol Rev* 81(1): 299-343.
323. Xiang, B., G. H. Yu, et al. (2001). "Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization." *J Biol Chem* 276(7): 4709-4716.
324. Zadina, J. E., L. M. Harrison, et al. (1994). "Differential regulation of mu and delta opiate receptors by morphine, selective agonists and antagonists and differentiating agents in SH-SY5Y human neuroblastoma cells." *J Pharmacol Exp Ther* 270(3): 1086-1096.
325. Zaki, P. A., E. J. Bilsky, et al. (1996). "Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 379-401.
326. Zhang, J., S. S. Ferguson, et al. (1999). "Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin." *J Recept Signal Transduct Res* 19(1-4): 301-313.
327. Zhang, X., L. Bao, et al. (2006). "Role of delivery and trafficking of delta-opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance." *Trends Pharmacol Sci* 27(6): 324-329.
328. Zhang, X., F. Wang, et al. (2008). "Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms." *J Neurochem* 106(2): 781-792.

329. Zhang, X., F. Wang, et al. (2005). "Beta-arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors." *J Neurochem* 95(1): 169-178.
330. Zhao, J., G. Pei, et al. (1997). "Carboxyl terminus of delta opioid receptor is required for agonist-dependent receptor phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* 238(1): 71-76.

