

Université de Montréal

**Régulation du complexe constitutif formé par le récepteur
opioïde delta et le canal potassique de la famille Kir3**

par
Karim Nagi

Département de Pharmacologie
Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en Pharmacologie
option Neuropharmacologie

Janvier, 2015

© Karim Nagi, 2015
Université de Montréal

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée
Régulation du complexe constitutif formé par le récepteur
opioïde delta et le canal potassique de la famille Kir3

présentée par :
Karim Nagi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Audrey Claing
Président-rapporteur

Graciela Pineyro
Directrice de recherche

Denis deBlois
Membre du jury

Marc G. Caron
Examineur externe

Pierre-Paul Rompré
Représentant du doyen

Résumé

Les opioïdes sont les analgésiques les plus efficaces dans le traitement des douleurs sévères. Ils produisent leurs effets en ciblant spécifiquement les récepteurs opioïdes localisés tout le long de la voie de perception de la douleur où ils modulent la transmission de l'information douloureuse. La plupart des études dans ce domaine essaient de caractériser les récepteurs opioïdes à l'état isolé de tout partenaire de signalisation. Cette thèse, par contre, montre que le récepteur opioïde delta (DOR) peut former un complexe avec sa protéine G et l'un de ses effecteurs impliqués dans la production de l'effet analgésique, le canal potassique à rectification entrante activée par les protéines G (Kir3 ou GIRK). Après avoir établi la présence de ce complexe constitutif, on a ensuite caractérisé sa stabilité, modulation et régulation suite à une stimulation avec des agonistes opioïdes.

En premier lieu, on a caractérisé la transmission de l'information du récepteur DOR, suite à son activation par un agoniste, vers le canal Kir3. On a remarqué que cette transmission ne suit pas le modèle de collision, généralement accepté, mais nécessite plutôt un simple changement dans la conformation du complexe préformé. Ensuite, on a déterminé que même suite à l'activation prolongée du récepteur DOR par un agoniste complet, le complexe DOR/Kir3 maintenait son intégrité et a été reconnu par la β arrestine (β arr) comme une seule unité signalétique provoquant ainsi l'internalisation de DOR et Kir3 par un mécanisme clathrine et dynamine-dépendant.

Ainsi, prises ensemble, ces données montrent que l'activation du récepteur DOR déclenche non seulement l'activation de l'effecteur Kir3 mais également un mécanisme de régulation qui élimine cet effecteur de la membrane plasmique.

Mots-clés : Complexes multimériques, récepteur opioïde delta, canaux Kir3, protéine G, β arrestine, internalisation, désensibilisation, conformation, analgésie, tolérance, régulation, signalisation, modèle opérationnel, BRET, opioïdes.

Abstract

Opioids are the most effective analgesics in the treatment of severe pain. They produce their effects by specifically targeting opioid receptors located all along the pain perception pathway where they modulate the transmission of pain information. Most studies in this area try to characterize the opioid receptor in isolation from any signaling partner. This thesis, on the other hand, shows that the delta opioid receptor (DOR) can form a complex with its G protein and one of its effectors involved in the production of the analgesic effect, the G protein coupled inward rectifying potassium channel (Kir3 or GIRK). Having established the presence of this constitutive complex, we then characterized its stability, modulation and regulation following stimulation with opioid agonists.

First, we characterized the transmission of information from DOR, following its activation by an agonist, to the Kir3 channel. We have noticed that this transmission does not follow the collision model, generally accepted, but rather requires a simple change in the conformation within the preformed complex. Then, we have determined that even following prolonged DOR activation by a full agonist, the DOR/Kir3 complex maintained its integrity and was recognized by β arrestin (β arr) as a single signaling unit producing the internalization of DOR and Kir3 by a clathrin and dynamin-dependent mechanism.

Thus, taken together, these data show that DOR activation triggers not only activation of the Kir3 effector but also a regulatory mechanism that removes this effector from the plasma membrane.

Keywords : Multimeric complexes, delta opioid receptor, Kir3 channels, G protein, β arrestin, internalization, desensitization, conformation, analgesia, tolerance, regulation, signaling, operational model, BRET, opioids.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements.....	xiv
1. Introduction	1
1.1 Les circuits de la douleur.....	1
1.2 Les récepteurs opioïdes et leurs partenaires de signalisation	3
1.2.1 Les récepteurs opioïdes	4
1.2.2 Ligands du récepteur DOR.....	7
1.2.3 Les protéines G hétérotrimériques.....	10
1.2.3.1 Diversité dans les sous-unités de la protéine G	10
1.2.3.2 Libération de GDP	10
1.2.3.3 Structure des protéines G.....	13
1.2.4 Les principaux effecteurs des RO.....	15
1.2.4.1 Les canaux calciques voltage-dépendants	15
1.2.4.2 Les canaux potassiques à rectification entrante de la famille Kir3.....	18
1.2.4.3 L'adénylate cyclase	22
1.3 Complexes multi-protéiques.....	25
1.3.1 Relation récepteur - protéine G	26
1.3.2 Relation protéine G - effecteur	29
1.3.3 Relation récepteur - effecteur	32
1.4 Désensibilisation, endocytose et tolérance aux opioïdes	34
1.4.1 La tolérance à l'analgésie.....	34
1.4.2 Mécanismes moléculaires de la désensibilisation des RO	37
1.4.3 L'internalisation des RO	41

1.4.4 Relation entre l'internalisation et le développement de la tolérance aux opioïdes	42
1.4.5 Désensibilisation au niveau des effecteurs	43
2. Hypothèse et objectifs	45
3. Résultats	46
3.1 Première publication	46
3.1.1 Introduction et mise en contexte du premier article	46
3.1.2 Article 1	49
3.2 Deuxième publication	102
3.2.1 Introduction et mise en contexte du deuxième article	102
3.2.2 Article 2	104
4. Discussion	153
4.1 Étude des interactions réalisées entre le récepteur DOR, la protéine G et le canal Kir3	153
4.1.1 Le récepteur DOR forme un complexe constitutif avec les sous-unités de la protéine G et du canal Kir3	153
4.1.2 Le complexe constitutif ne se défait pas mais change sa conformation suite à l'activation du récepteur	155
4.1.3 Le récepteur DOR transmet l'information conformationnelle à son effecteur Kir3 via les sous-unités de la protéine G	156
4.2 Étude de la régulation du complexe constitutif DOR/Kir3 suite à une stimulation prolongée avec un agoniste DOR	160
4.2.1 La β arr est recrutée vers le complexe DOR/Kir3 suite à l'activation du récepteur	160
4.2.2 Le recrutement de la β arr va de pair avec l'internalisation concomitante du récepteur DOR et du canal Kir3	161
4.2.3 L'internalisation du récepteur DOR et du canal Kir3 par la β arr se réalise via un mécanisme clathrine et dynamine-dépendant	163
4.3 Perspectives et directions futures	165
4.3.1 Les ligands DOR stabilisent différemment l'interaction entre le récepteur DOR, le canal Kir3 et la β arr2	165

4.3.2 La différence dans la signalisation des ligands DOR comme outil pour identifier de meilleurs analgésiques opioïdes	167
4.3.3 Y a-t-il un intérêt à exploiter la régulation différentielle des complexes préformés afin d'identifier un meilleur analgésique opioïde ?	177
5. Conclusion	179
6. Bibliographie.....	180
7. Annexes.....	xvi
7.1 Annexe 1	xvi
Regulation of Opioid Receptor Signalling: Implications for the Development of Analgesic Tolerance.....	xvi
7.2 Annexe 2.....	xvii
Kir3 Channel Signaling Complexes: Focus on Opioid Receptor Signaling	xvii
7.3 Annexe 3.....	xviii
Ligand- and Cell-dependent Determinants of Internalization and cAMP Modulation by Delta Opioid Receptor (DOR) Agonists	xviii
7.4 Annexe 4.....	xix
Procédure d'analyse des courbes dose-réponse en utilisant le modèle opérationnel.....	xix

Liste des figures

Figure 1. Physiologie des voies de la douleur.....	3
Figure 2. Organisation spatiale putative du récepteur DOR avec les sous-unités $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$	4
Figure 3. Représentation de la partie supérieure divergente de la poche de liaison des RO.....	5
Figure 4. Structure des ligands opioïdes sélectionnés pour être utilisés dans nos études.....	9
Figure 5. Réarrangement structural putatif observé au niveau des sous-unités de la protéine G suite à l'activation du récepteur DOR par un agoniste.....	11
Figure 6. Modèle généralement accepté du cycle d'activation des sous-unité de la protéine G.....	12
Figure 7. Représentation des sites d'interaction du dimère $G\beta_1\gamma_2$ sur la sous-unité $G\alpha_{i1}(GDP)$	14
Figure 8. Représentation de la sous unité α d'un canal Cav2 et des sites d'interaction du dimère $G\beta\gamma$ sur cette dernière.....	17
Figure 9. Représentation schématique du canal Kir3 en interaction avec le dimère $G\beta\gamma$	19
Figure 10. Voie de signalisation des canaux Kir3 au niveau de la fente synaptique.....	21
Figure 11. Représentation schématique de l'adénylate cyclase en interaction avec l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$	24
Figure 12. Principe de la technique de BRET.....	28
Figure 13. Représentation des sites d'interaction de la sous-unité $G\alpha(GDP)$ avec l'effecteur.....	31
Figure 14. Les paliers de l'OMS pour le traitement des douleurs nociceptives.....	36
Figure 15. Désensibilisation homologue et internalisation des RCPG.....	38
Figure 16. Représentation des sites d'interaction de la sous-unité $G\alpha(GTP)$ et de la β arr sur le récepteur β_2AR	40
Figure 17. Les biosenseurs de protéine G et Kir comme outils pour mesurer l'efficacité d'une drogue à produire un effet analgésique.....	166
Figure 18. Le biosenseur de recrutement de la Barr.....	167
Figure 19. Le biosenseur EPAC.....	168
Figure 20. Modèle «multi-états»: plusieurs conformations actives d'un même récepteur.....	169

Figure 21. Transition de la phase "courbe dose-réponse" à la phase " $\Delta \log (t / KA)$ ".....	170
Figure 22. Les ligands du récepteur rDOR présentent des profils signalétiques différents....	172
Figure 23. Comparaison par extrapolation des profils signalétiques de ligands opioïdes chez rDOR et hDOR.....	173
Figure 24. La régulation des complexes préformés comme outil pour identifier de meilleurs analgésiques opioïdes.....	175

Liste des sigles et abréviations

5-HT	Sérotonine
7TM	7 domaines transmembranaires
AC	Adénylate cyclase
AMPC	Adénosine mono-phosphate cyclique
AP-2	Protéine adaptatrice 2
AR-M1000390	<i>N,N</i> -diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidene-methyl)-benzamide
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
BRET	Transfert de la bioluminescence par résonance énergétique
BSA	Bas seuil d'activation
CaM	Calmoduline
Cav	Canaux calciques voltage dépendants
co-ip	Co-immunoprecipitation
CXCR4	Récepteur aux chemokines à motif CXC de type 4
DAG	Diacyl glycérol
DAMGO	H-Tyr-D-Ala-Gly-N-MePhe-Gly-OH
DOR	Récepteur opioïde delta
DPDPE	[D-Pen ^{2,5}]Enkephalin , [D-Pen ² ,D-Pen ⁵]Enkephalin
DRG	Ganglion de la racine dorsale
EPAC	Protéine d'échange activé par l'AMPC
FLAsH	Fluorescein arsenical hairpin binder
FRET	Transfert de la fluorescence par résonance énergétique
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GASP	Protéine de triage associée aux RCPG
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Protéine fluorescente verte
GIRK	Canaux potassiques à rectification entrante
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GRK	Protéine kinase des RCPG

GTP	Guanosine triphosphate
G α	Sous-unité α de la protéine G
G β	Sous-unité β de la protéine G
G γ	Sous-unité γ de la protéine G
hDOR	Récepteur opioïde delta humain
HEK293	Cellules rénales embryonnaires humaines immortalisées avec le gène du virus SV40
HSA	Haut seuil d'activation
I _{KACH}	Courant K ⁺ activé par l'acétylcholine
KA	Affinité fonctionnelle
Kir	Canal potassique à rectification entrante
KO	Knock-out
KOR	Récepteur opioïde kappa
LC	Locus coeruleus
log τ /KA	Coefficient de transduction
M2R	Récepteurs muscariniques de type 2
MHF	Migraine hémiplégique familiale
MOR	Récepteur opioïde mu
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORL-1	Récepteur à la nociceptine
PC12	Cellules issues de phéochromocytome de rat
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
rDOR	Récepteur opioïde delta de rat
RE	Réticulum endoplasmique
Rluc	Renilla Luciférase
RO	Récepteur opioïde
Ser	Sérine
siRNA	Petits ARN interférents

SNC-80	4-[(R)-[(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethylpiperazin-1-yl](3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide
Src	Tyrosine kinase qui n'est pas un récepteur
τ	Efficacité fonctionnelle
Thr	Thréonine
TICP	H-Tyr-Tic Ψ [CH ₂ -NH]Cha-Phe-OH
TIPP	H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH
UFP512	H-Dmt-Tic-NH-CH(CH ₂ -COOH)-Bid
α_2 AR	Récepteur α -adrénergique de type 2
β_2 AR	Récepteur β -adrénergique de type 2
β arr	β arrestine

Je dédie cette thèse à mes parents

Remerciements

Mes premiers sentiments de reconnaissance vont à ma directrice de recherche, Dre Graciela Pineyro. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté et soutenu tout au long des dernières années non seulement comme une directrice mais comme une mère pour moi. Sa très grande disponibilité, son aide et ses encouragements ont été toujours précieux et sans quoi, cette thèse aurait été impossible. Ça me fait plaisir, aujourd'hui, d'ajouter votre nom dans les premières lignes de la liste des personnes qui ont marqué ma vie. Je vous remercie de m'avoir donné la chance de faire la recherche dans votre laboratoire, d'avoir investi en moi et d'avoir contribué à la sculpture de mes accomplissements sur le plan académique et professionnel. Vous n'y étiez pas obligée et en plus, vous l'aviez fait avec amour et je vous en suis infiniment reconnaissant.

Je remercie ensuite mes parents Chafic et Mona qui ont toujours été là pour moi. Je ne saurais jamais capable de trouver des mots qui pourront exprimer mes sentiments envers vous. Je peux juste vous dire que je vous aime du plus profond de mon cœur. Vous avez sacrifié votre vie pour que vos enfants gagnent les leurs et si, j'écris ma thèse aujourd'hui, c'est à cause de vous que je suis capable de le faire. Finalement, je tiens à vous rappeler que je vous ai promis, le premier jour que j'ai quitté votre maison pour venir au Canada, que je ne lâcherai pas avant d'obtenir mon Ph.D et me voici, aujourd'hui, en train de tenir ma promesse. Je voulais vous remercier d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, un adulte responsable.

Je tiens aussi à remercier mon oncle Omar et sa femme Hala qui m'ont épaulé et supporté durant toutes les années de mon séjour au Canada. Cher oncle, même si j'ai pas toujours écouté vos conseils, ils se sont toujours avérés très judicieux. Vos encouragements m'ont permis de progresser sans cesse. Vous avez eu un impact positif sur mon parcours académique et personnel et je vous en remercie infiniment.

Toute ma gratitude à mon frère Rami et ma sœur Lina qui m'ont soutenu financièrement durant ma première année au Canada et pour leur soutien moral qui persiste

jusqu'à nos jours. Un grand merci aussi à mes grands-parents, sachiez que votre soutien a été bien apprécié et m'a été d'une très grande aide.

Une vague de remerciements va à mes collègues de laboratoire avec qui j'ai eu plein de discussions animées, spécifiquement Iness Charfi, Hanieh Bagheri, Ouissame Mnie-Filali, Mohammad Amraei, Mélissa Richard-Lalonde, Derek Robertson et Nicolas Audet. Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire que j'ai côtoyés, durant les cinq dernières années, pour votre amitié et votre camaraderie. Aussi, un grand merci à mes amis Redouane Allache, Mohab Aly, Khalil Rouibi, Adham Ismail, Fares Kharfallah, Hicham Ezzat, Yasser Shaban et Ahmed A. Aziz qui ont constitué, ensemble, ma famille à Montréal.

Finalement, je profite de cette page pour remercier les organismes subventionnaires qui m'ont accordé des bourses d'études, notamment la Fondation du CHU Sainte-Justine, la Fondation des étoiles et la Faculté des études supérieures et postdoctorales. Merci pour votre confiance et soyez assurés que vos gestes généreux ont stimulé ma motivation et m'ont permis de persévérer durant toutes mes années d'études.

1. Introduction

1.1 Les circuits de la douleur

L'Association internationale pour l'étude de la douleur a défini la douleur comme étant "une expérience subjective sensorielle et émotionnelle désagréable associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en terme d'un tel dommage" [1]. La douleur est capable de revêtir plusieurs formes, donc, peut être décrite et classifiée de différentes manières. D'un point de vue chronologique, on peut opposer la douleur aiguë à la douleur chronique. La douleur aiguë est une douleur immédiate, transitoire et qui généralement disparaît suite à un bref traitement. Indiquant la présence d'une lésion due à un traumatisme ou une affection. Cette dernière joue un rôle d'alarme et permet à l'organisme de se protéger contre un stimulus thermique, mécanique ou chimique. Cependant, une douleur est dite chronique lorsqu'elle s'avère rebelle aux traitements usuels pour une durée qui peut excéder trois mois tout en étant répétitive.

La douleur peut aussi être classifiée d'un point de vue neurophysiologique en trois grandes catégories: les douleurs par "excès de nociception", les douleurs neurogènes et les douleurs psychogènes. La douleur par excès de nociception (ou douleur nociceptive) est une douleur déclenchée par l'excitation de récepteurs périphériques capteurs de la douleur dénommés nocicepteurs. Ces derniers s'activent suite à une lésion d'un tissu périphérique provoquent ainsi la transmission d'un excès d'influx douloureux au cerveau via les nerfs périphériques, puis la moelle épinière. La douleur nociceptive peut engendrer tantôt des douleurs aiguës et tantôt des douleurs chroniques et peut être ressentie comme constante, localisée et souvent pulsatile mais qui généralement disparaît une fois la lésion tissulaire réparée. Contrairement à la douleur nociceptive, la douleur neuropathique (ou neurogène) est déclenchée suite à une lésion au niveau du système nerveux lui-même, que ce soit au niveau périphérique (à la suite de la section d'un nerf, d'une amputation, d'un zona, etc.) ou central (après un infarctus cérébral, un traumatisme médullaire, etc.). La douleur neurogène peut résulter d'un stimulus normalement non douloureux ou même peut être spontanée (se présenter en l'absence de tout stimulus) et généralement persiste longtemps après la guérison de la cause apparente. Finalement, la douleur psychogène, d'origine psychique, regroupe toutes sortes de

douleurs inclassables dans l'une des deux catégories précédentes. C'est une douleur, sans lésions apparentes, qui peut déclencher des syndromes douloureux habituellement difficiles à faire disparaître tant que leur origine n'est pas identifiée par le patient. Étant donné que les douleurs nociceptives sont de loin les plus fréquentes à l'échelle mondiale, la suite de la thèse s'intéressera à cette catégorie de douleurs.

Dans le passé, on pensait qu'une sensation douloureuse est envoyée directement au cerveau par un nerf unique. Avec le temps, on s'est aperçu que la science de la douleur révèle un processus beaucoup plus complexe. De nouveaux récepteurs et voies de signalisations sont étudiés tous les jours. De plus, on sait maintenant que entre le stimulus nociceptif et la douleur ressentie se succèdent quatre processus marqués par une série de réactions chimiques et électriques: la transduction, la transmission, la modulation et la perception [2] (Figure 1). En premier lieu, la transduction, qui correspond au processus cellulaire par lequel des stimuli chimiques, mécaniques ou thermiques sont transformés en impulsions électriques nécessaires pour transmettre l'information douloureuse [3]. Ensuite, la transmission, qui se définit par le transport de l'impulsion de la douleur à travers les fibres nociceptives de la périphérie vers le tronc cérébral et le thalamus via la moelle épinière et enfin du thalamus au cortex, où l'impulsion peut finalement être traitée [3]. Deux types de fibres nociceptives interviennent dans la transmission de l'information douloureuse à partir de la périphérie: les fibres *A-delta* et les fibres C. Les fibres *A-delta* de diamètre moyen, myélinisées et de conduction rapide transmettent la douleur primaire, c'est-à-dire la douleur aiguë et bien localisée. Ces fibres sont moins grosses que les fibres $A\beta$, qui elles, communiquent spécifiquement la stimulation mécanique. Et finalement, les fibres C de petit diamètre et amyélinisées [4] qui conduisent lentement la douleur secondaire, moins bien localisée. La modulation, le troisième processus, fait plutôt référence à la modification de la transmission de l'impulsion douloureuse. Elle se produit à plusieurs endroits dans le système nerveux central [3] et implique deux voies principales: la voie ascendante (de la périphérie vers le cortex) et la voie descendante (du tronc cérébral vers la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 1). Dans ces voies, plusieurs mécanismes, impliquant principalement la libération d'opioïdes endogènes, la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline jouent un rôle primordial. Une fois libérés, les opioïdes endogènes par exemple, agissent sur leurs récepteurs respectifs, qui à leur tour activent leurs partenaires

de signalisations menant à l'inhibition de la transmission des stimuli douloureux et produisant ainsi de l'analgésie [5]. L'ouvrage présenté ici portera sur l'interaction entre les récepteurs opioïdes (RO) et leurs partenaires de signalisations ainsi que la régulation de ces derniers lorsque le récepteur devient activé par les ligands opioïdes.

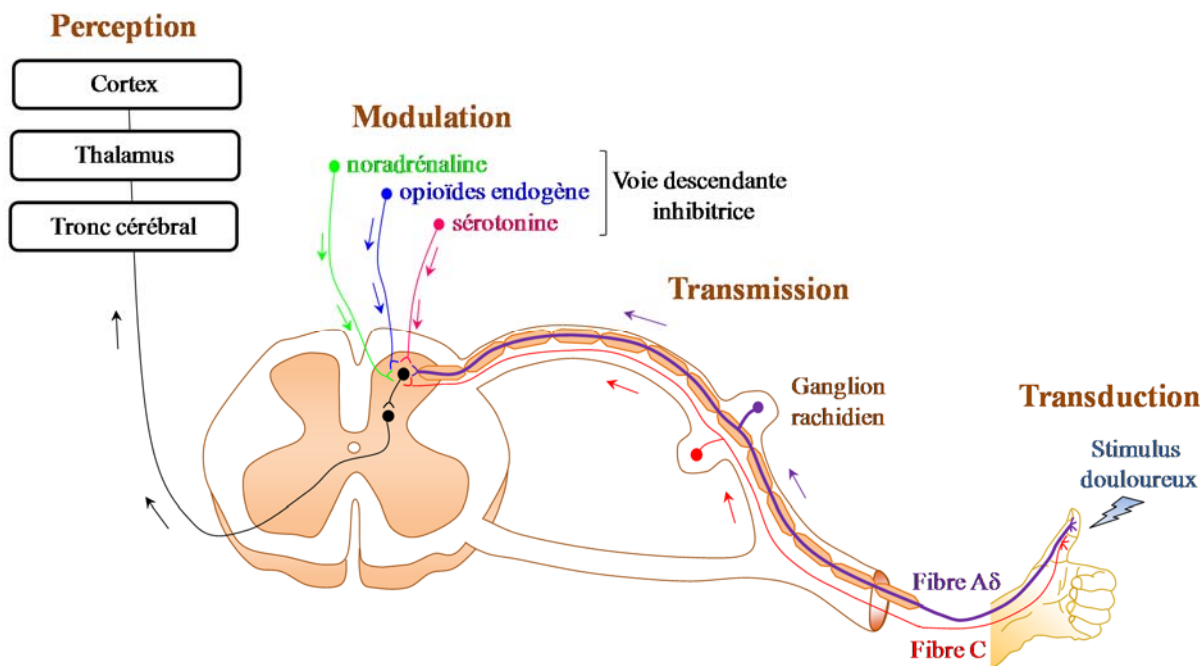


Figure 1. Physiologie des voies de la douleur.

À l'étape finale, la perception de la douleur qui se définit par l'expérience subjective de la douleur [3]. L'interprétation personnelle du stimulus nociceptif est influencée par des facteurs comportementaux [6], la situation émotionnelle de l'individu et fait référence à la sommation de ses expériences passées.

1.2 Les récepteurs opioïdes et leurs partenaires de signalisation

Étant des dérivés naturels ou synthétiques de l'opium, les opiacés produisent leurs effets analgésiques en ciblant spécifiquement les RO qui stimulent à leur tour les protéines G hétérotrimériques ($G\alpha\beta\gamma$). Ces dernières interviennent dans la transduction du signal. En d'autres termes, les protéines G transmettent l'information générée par un récepteur activé en

stimulant différents effecteurs pour produire un signal cellulaire qui résulte en une réponse analgésique.

1.2.1 Les récepteurs opioïdes

Les analgésiques opioïdes sont les composés les plus puissants, utilisés depuis des siècles, pour soulager les douleurs sévères. Ces substances agissent spécifiquement sur des protéines membranaires, appelées récepteurs opioïdes, découverts au début des années 1970. On connaît au moins quatre types de RO, désignés respectivement par des lettres grecques "δ", "μ" et "κ" pour le récepteur opioïde delta (DOR), mu (MOR) et kappa (KOR) respectivement ainsi qu'un quatrième membre correspondant au récepteur à la nociceptine (ORL-1). Les RO appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TM) couplés aux protéines G hétérotrimériques de type $G\alpha_i/o$ (Figure 2).

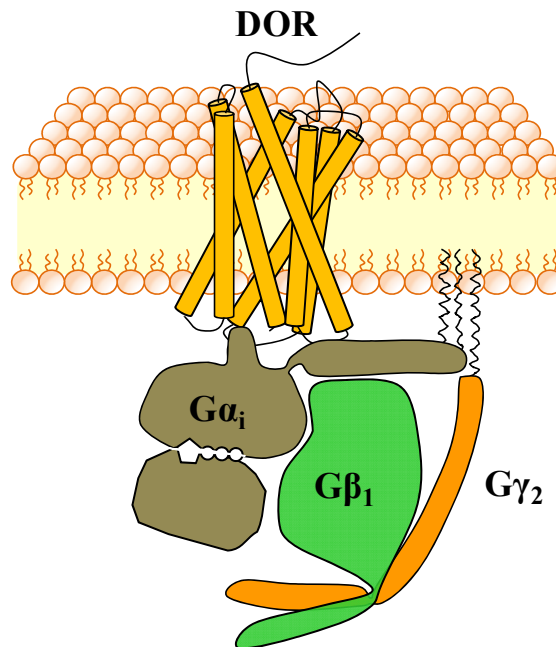


Figure 2. Organisation spatiale putative du récepteur DOR avec les sous-unités $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$. La représentation a été construite en utilisant la structure cristalline publiée du récepteur β_2 -adrénergique en complexe avec l'hétérotrimère $G\alpha_s\beta_1\gamma_2$ (PDB: 3sn6) [7] comme modèle. Dans cette dernière, la topographie du récepteur adrénergique a été superposée par alignement structural puis remplacée avec celle correspondant au récepteur DOR (PDB: 4EJ4) [8] en utilisant le logiciel Chimera (www.cgl.ucsf.edu/chimera/). De manière similaire, la topographie de la sous-unité $G\alpha_i$ (PDB: 1GP2) [9] est venue remplacer celle de la sous-unité $G\alpha_s$. À l'étape finale, une représentation schématique a été construite à partir de la structure cristalline finale obtenue.

Ayant une forte homologie au niveau des séquences primaires, les différences les plus marquées entre les récepteurs se trouvent au niveau de leurs sites de liaison aux ligands opioïdes [8]. Ces différences peuvent cependant être clairement expliquées en étudiant l'architecture structurale et la composition des poches de liaison en acides aminées. Les études montrent que les poches de liaison des RO peuvent être divisées en deux régions distinctes: une partie inférieure hautement conservée parmi les RO et une partie supérieure divergente qui confère la sélectivité différentielle pour chaque sous-type de récepteur (Figure 3) [8]. Ces poches de liaison sont localisées au niveau des 7TM et se trouvent largement ouvertes et fortement accessibles par le domaine extracellulaire [10] ce qui expliquerait ainsi l'extraordinaire rapidité d'action des ligands opioïdes [11]. Les récepteurs et leurs ligands correspondant constituent le système opioïde, qui étant un système neuromodulateur, contrôle une série de fonctions physiologiques, y compris la nociception, dû à la vaste distribution des RO dans le système nerveux central [12]. En effet, les agonistes des RO sont reconnus pour leurs effets dans la gestion des douleurs modérées à sévères, aiguës et chroniques.

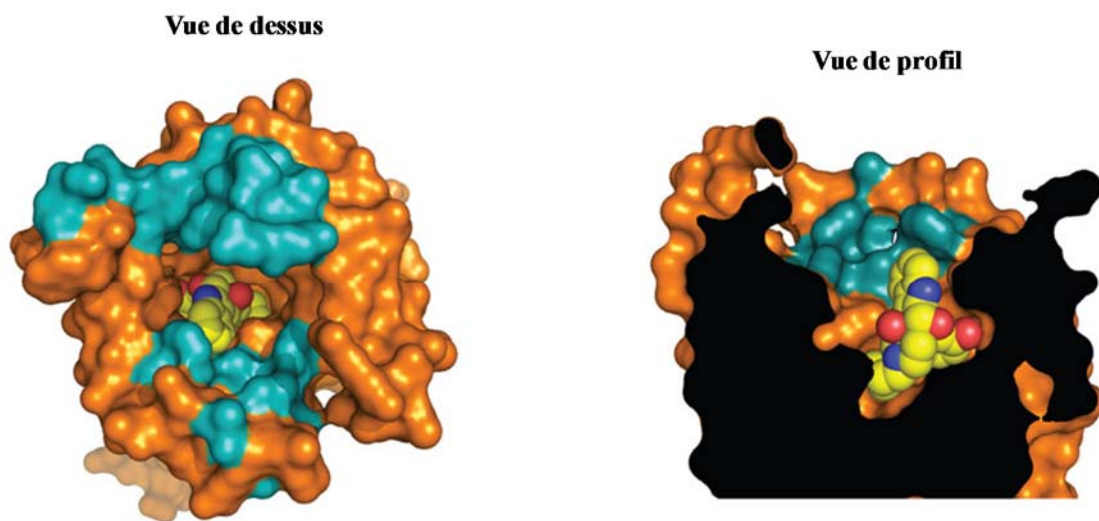


Figure 3. Représentation de la partie supérieure divergente de la poche de liaison des RO. Représentation cristalline indiquant les résidus qui confèrent la sélectivité différentielle (cyan) du récepteur DOR (orange) lié au naltrindole (jaune). Modifié à partir de: (Granier S et al. 2012) [8].

En dépit de l'efficacité analgésique établie pour les agonistes de MOR, DOR et KOR, l'activation de ces différents sous-types de récepteurs résulte en un ensemble distinct d'effets indésirables qui limitent l'application thérapeutique de leurs agonistes. Parmi les effets

secondaires les plus courants en milieu clinique, on pourrait citer la dépression respiratoire, la constipation, les nausées, les vomissements, la sédation ainsi que le développement de la tolérance et de la dépendance [13-16]. Malgré que ces effets sont liés à de nombreux facteurs comme l'âge, la pathologie, les dysfonctions organiques et la voie d'administration [17], beaucoup de ces actions indésirables, en particulier la dépression respiratoire [18, 19], les effets secondaires gastro-intestinaux [18, 20, 21] et la dépendance physique [22, 23] sont moins graves ou même absentes avec les agonistes DOR. De plus, parmi les RO, seulement les agonistes DOR démontrent une activité dans la neurogenèse et la neuroprotection [24]. Néanmoins, malgré ces avantages, il faut avouer que les agonistes DOR produisent une réponse analgésique moindre que les agonistes MOR en aigue [25] et que leur potentiel pour la tolérance [26, 27] reste une limitation pour leur utilisation à long terme. De plus, les agonistes DOR [28-30], tout comme ceux de MOR [31] induisent une hyperexcitabilité de l'hippocampe qui, à son tour, peut entraîner des convulsions. Dans le cas spécifique des agonistes DOR, l'hyperexcitabilité est brève et non-létale. En outre, les convulsions sont rares aux doses analgésiques [32], ne paraissent pas avec tous les ligands [33, 34] et peuvent être supprimées en contrôlant la vitesse d'administration de l'agoniste [28]. Ainsi, dans l'ensemble, les effets secondaires des agonistes DOR sont moins importants que ceux de MOR, et leur efficacité prouvée dans la gestion de la douleur chronique font particulièrement de DOR une cible attirante pour le développement de meilleurs analgésiques [35]. Cette dernière notion est renforcée par le fait que les agonistes DOR démontrent une efficacité putative dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [36, 37] et de Parkinson [38] ainsi que dans le traitement de troubles psychologiques comme la dépression [34, 39-41] et l'anxiété [37, 40]. Pour conclure, le DOR affiche un profil limité d'effets indésirables et constitue une cible intéressante pour le traitement de nombreuses pathologies. Voilà donc pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude du récepteur DOR.

1.2.2 Ligands du récepteur DOR

Comme on vient de mentionner dans la section précédente, les agonistes DOR présentent un profil d'effets secondaires moindre que ceux présentés par les agonistes MOR. Cependant, certaines limitations, comme le développement d'une tolérance à l'effet analgésique, limite toujours leur utilisation chronique. Même si on n'en retrouve toujours pas en milieu clinique, plusieurs ligands DOR ont été développés et identifiés. Dans ce qui suit, on s'intéressera principalement à un groupe spécifique de ligands qui furent sélectionnés pour être utilisés dans nos études. Ces derniers peuvent être structurellement subdivisés en deux catégories, les ligands peptidiques : DPDPE, UFP-512, TIPP et TICP, et les ligands non peptidiques : SNC-80, morphine, naltrindole et naloxone.

Il faudrait noter que pour atteindre leurs sites d'action, l'introduction des médicaments dans le système nerveux central nécessite que ces derniers aient la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière est considérablement efficace pour protéger le milieu cérébral ce qui explique que environ 98 % des médicaments concevables pour traiter le système nerveux central ne la franchissent pas [42]. Afin de pouvoir traverser la barrière hématoencéphalique, certains ligands peptidiques, comme le c[D-pénicillamine²,D-pénicillamine⁵]enképhaline (DPDPE), un peptide synthétisé à partir de l'enképhaline, nécessitent un transporteur d'anion organique [43]. Par conséquent, les ligands non peptidiques sont privilégiés pour les études d'imagerie cérébrale et sont donc avantageux pour stimuler les récepteurs DOR du système nerveux central. Cependant, certains ligands peptidiques peuvent constituer une exception à cette règle. le ligand H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid (UFP-512), par exemple, synthétisé à partir d'un pharmacophore antagoniste du DOR, le Dmt-Tic, contient un groupement CH₂COOH qui lui permet de traverser la barrière hématoencéphalique [40].

Pendant longtemps l'évaluation de l'efficacité antalgique des ligands agissant sur le récepteur DOR a été retardée par l'absence d'agonistes sélectifs pour ce récepteur [44]. Le DPDPE et la deltorphine, par exemple, deux agonistes peptidiques les plus utilisés pour stimuler les récepteurs opioïdes en recherche, produisent leurs effets antalgiques in vivo en activant les récepteurs DOR et MOR [44]. De même, la morphine (molécule alcaloïde extraite de l'opium) et la naloxone (composé polycyclique agissant comme antagoniste des récepteurs

de la morphine), déjà reconnus comme étant des ligands pour le récepteur MOR, agissent également sur le DOR. Le problème de manque de sélectivité a été résolu par la synthèse de ligands non peptidiques, sélectifs pour le récepteur DOR et stables in vivo comme le (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC-80), le naltrindole et le TIPP. Le SNC-80, un agoniste complet du récepteur DOR, qui a montré être 495- et 248-fois plus sélectif pour le récepteur DOR que les récepteurs mu ou kappa respectivement [45], a aussi été trouvé être plus efficace que le DPDPE [46]. Alors que pour les antagonistes, une avancée majeure dans la recherche d'opiacés delta a été la découverte des antagonistes sélectifs du récepteur DOR, le 17-cyclopropylmethyl-6,7-dehydro-4,5a-epoxy-3,14-dihydroxy-6,7,20,30-indolomophinan (naltrindole) [47] ainsi que le térapeptide H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH (TIPP) [48, 49] et son dérivé plus stable, puissant et sélectif, le H-Tyr-Tic-Cha-Phe-OH (TICP) [50, 51].

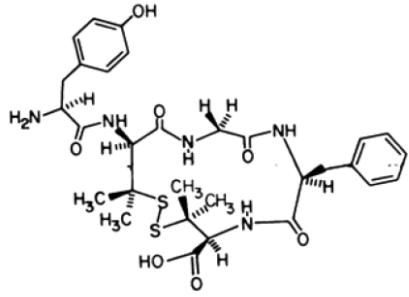
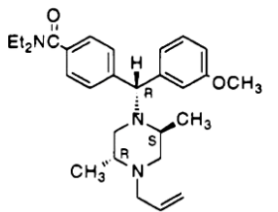
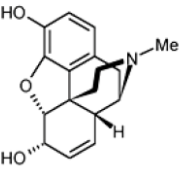
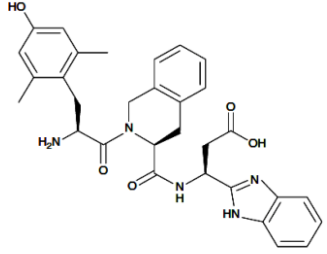
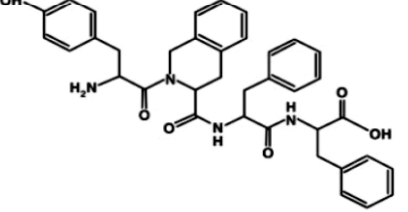
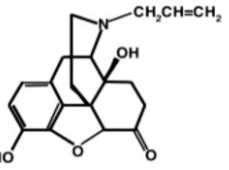
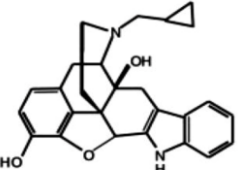
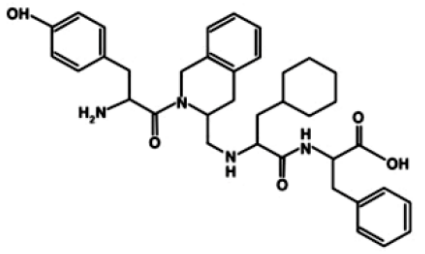
		Sélectivité pour le récepteur DOR	
		Moins sélectif	Très sélectif
Agoniste complet	 <p>DPDPE</p>	 <p>SNC-80</p>	
	 <p>Morphine</p>	 <p>TIPP</p>  <p>UFP-512</p>	
Antagoniste	 <p>Naloxone</p>	 <p>Naltrindole</p>	
Agoniste inverse		 <p>TICP</p>	

Figure 4. Structure des ligands opioïdes sélectionnés pour être utilisés dans nos études.
Sources: (Mosberg et al. 1983; Tryoen-Toth et al. 2005; Aguila et al. 2007; et Hudzik et al. 2011) [52-55].

1.2.3 Les protéines G hétérotrimériques

1.2.3.1 Diversité dans les sous-unités de la protéine G

Les protéines G intègrent une multitude de réponses cellulaires. Elles agissent comme médiateurs dans la signalisation de nombreux composés extracellulaires, allant de plusieurs neurotransmetteurs, hormones et autres facteurs de signalisation [56], chacun conduisant à une réponse biologique différente. Par conséquent, les protéines G doivent constamment faire face à une masse de signaux entrants, qui doivent être intégrés et distribués de manière appropriée. Pour pouvoir accueillir cette pléthore d'informations, les protéines G adoptent une méthodologie pour cibler spécifiquement les effecteurs visés par le signal extracellulaire et s'assurer que seule la réponse appropriée est déclenchée. Cette précision dans le traitement de l'information est obtenue grâce à la diversité et l'activité caractéristique de chacune des sous-unités constituant les protéines G hétérotrimériques. Les protéines G sont constituées ainsi de trois sous-unités essentielles: $G\alpha$, $G\beta$, et $G\gamma$ [57] (Figure 2). Chez les humains, les gènes codant pour au moins seize sous-unités α , cinq sous-unités β et douze sous-unités γ ont été identifiés. Ces différentes isoformes de chaque sous-unité peuvent faire, ensemble, des centaines de combinaisons de protéines $G\alpha\beta\gamma$. Cette diversité dans les combinaisons ne fournit pas seulement aux protéines G une spécificité dans leur affinité de liaison avec le récepteur mais aussi, leur permet d'adopter une sélectivité dans la transmission de l'information aux différents effecteurs. De cette façon, la diversité dans les sous-unités de la protéine G permet à cette dernière de cibler les processus physiologiques spécifiques en réponse à des stimuli externes distincts.

1.2.3.2 Libération de GDP

Les protéines G sont des protéines intracellulaires qui se lient à la surface interne de la membrane plasmique. À ce niveau, la concentration cytoplasmique du Guanosine triphosphate (GTP) est plusieurs fois supérieure à celle du Guanosine diphosphate (GDP). Aussi, la qualité chimique de la sous-unité $G\alpha$ lui permet de se lier facilement à l'une des deux sous-unités de la guanine, le GDP ou GTP. Une fois activé, le récepteur change sa conformation permettant ainsi à la sous-unité $G\alpha$ de libérer son GDP, dans la fente de liaison des nucléotides guanine,

en échange de GTP. La protéine $G\alpha$ adopte ainsi sa forme active ($G\alpha$ -GTP). En comparant la structure cristalline de cette forme active (Figure 4A) [58, 59] avec l'hétérotrimère inactif $G\alpha\beta\gamma$ (Figure 4B) [9, 60], les études révèlent le déroulement d'un réarrangement structural suite à la liaison du GTP.

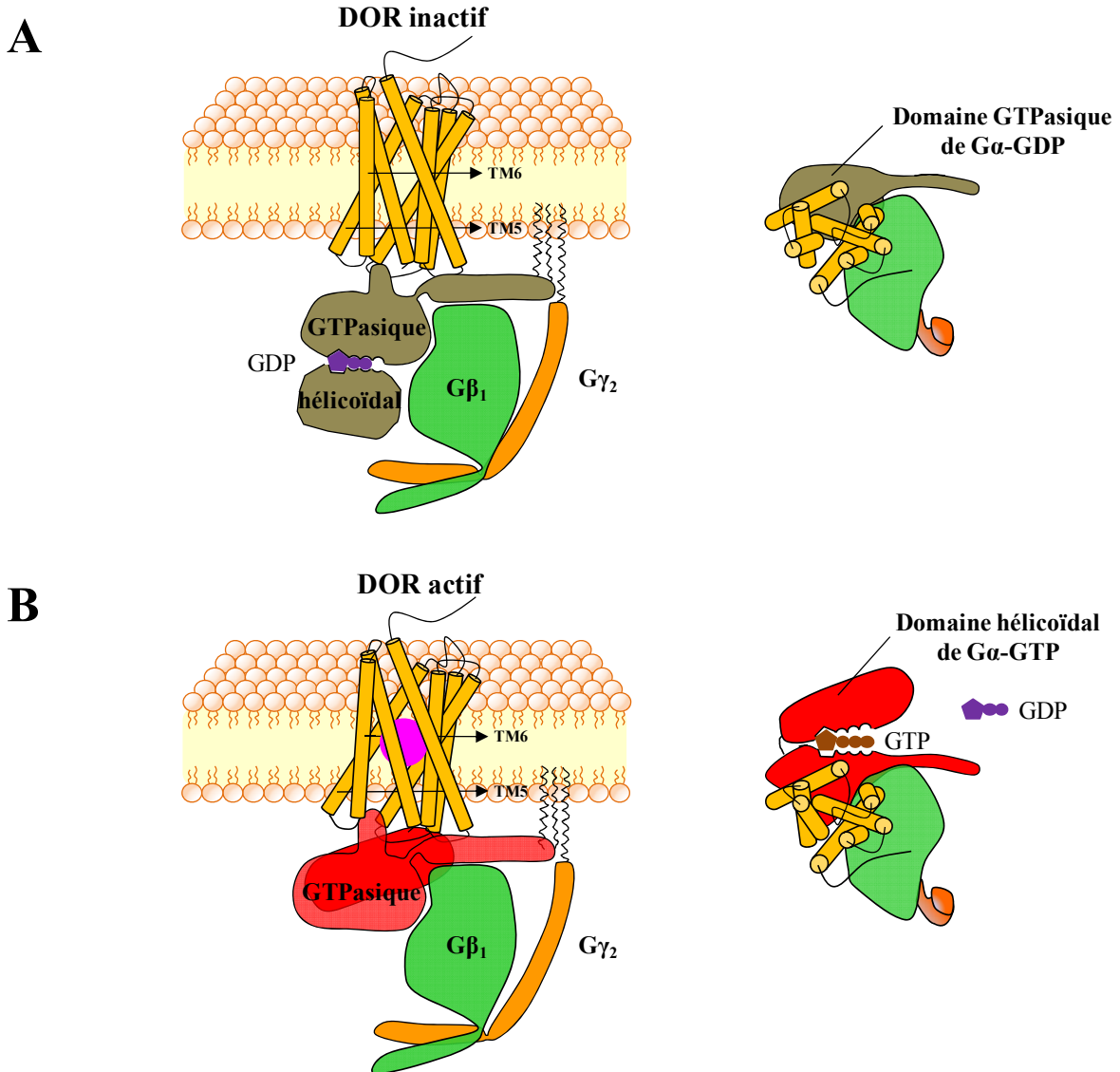


Figure 5. Réarrangement structural putatif observé au niveau des sous-unités de la protéine G suite à l'activation du récepteur DOR par un agoniste. La représentation a été construite en remplaçant la topographie du récepteur adrénergique par celle correspondant au récepteur DOR (tel qu'expliqué dans la légende de la Figure 2). Dans la structure résultante, la topographie de la sous-unité $G\alpha_s$ (GTP) a été maintenue (B) ou remplacée (A) avec celle de $G\alpha_i$ (GDP) (PDB: 1GP2) [9]. Dans la forme active (B), l'agoniste (rose) a été lié au récepteur et l'extrémité C-terminale de $G\alpha$ glissée entre les boucles intracellulaires 2 et 3 du récepteur. Suite à l'ajout de l'agoniste, un déplacement du domaine hélicoïdal de la sous-unité $G\alpha$ peut être observé. En insert, sont schématisées les structures putatives vue de dessus.

Ces changements affaiblissent l'affinité de $G\alpha$ à $G\beta\gamma$ [61, 62] permettant ainsi, suivant le modèle généralement accepté, la dissociation de ces sous-unités et la formation de sous-unités libres, capables d'interagir avec l'effecteur (Figure 5). Plusieurs régions au niveau de la protéine G sont touchées par ces changements [61]. Ces régions impliquent le site d'interaction entre $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ qui joue un rôle crucial dans l'activation des protéines G. En effet, plusieurs mutations Alanine à l'interface sur $G\beta$ empêchent l'échange de nucléotides malgré la formation normal de l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$ [63].

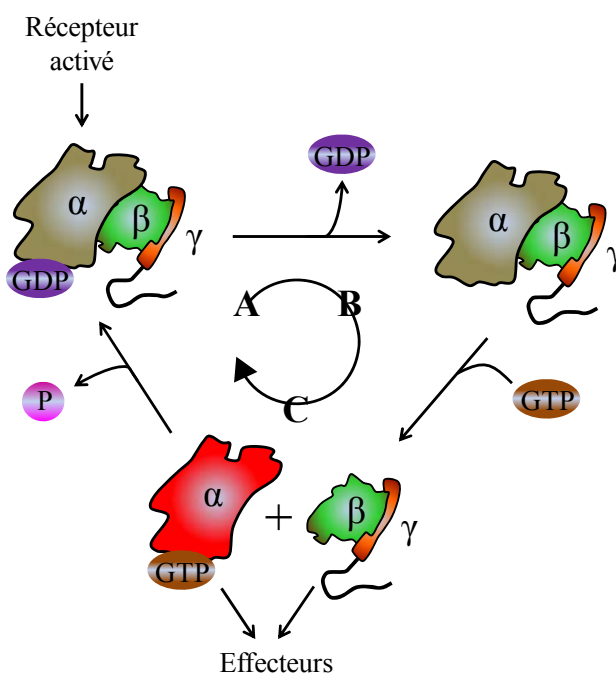


Figure 6. Modèle généralement accepté du cycle d'activation des sous-unités de la protéine G. Lorsque lié au GDP, la sous-unité $G\alpha$ s'associe au dimère $G\beta\gamma$ pour former l'hétérotrimère inactif $G\alpha(GDP)\beta\gamma$ (A). Suite à l'activation du récepteur, la sous-unité $G\alpha$ change sa conformation réduisant ainsi l'affinité de $G\alpha$ pour le GDP, qui se trouve libéré dans le cytoplasme (B) et remplacé par un GTP (C). La liaison du GTP permet à la sous-unité $G\alpha$ d'adopter sa forme active $G\alpha(GTP)$ qui se dissocie du dimère $G\beta\gamma$ formant ainsi deux unités libres capables d'activer les effecteurs. La signalisation de la protéine G reste maintenue jusqu'à hydrolyse du GTP qui ramène $G\alpha$ à sa conformation inactif et permet la réassociation des sous-unités de la protéine G pour former de nouveau hétérotrimère inactif $G\alpha(GDP)\beta\gamma$. Idée du schéma adoptée de [64].

La signalisation de la protéine G est contrôlée par la durée de liaison du GTP. Cependant, le niveau intrinsèque de l'hydrolyse du GTP par la sous-unité $G\alpha$ est trop lent (quatre à huit conversions par seconde), ce qui signifie que les sous-unités libres possèdent beaucoup de temps pour trouver leurs cibles. Une des premières fonctions attribuées à la

protéine G était l'activation de la GMPc phosphodiesterase retinale par $G\alpha_i$ et de l'adénylate cyclase (AC) par $G\alpha_s$ [65]. À cette époque, $G\alpha$ été reconnue être la seule sous-unité impliquée dans la régulation des effecteurs. Le dimère $G\beta\gamma$, par contre, été estimé intervenir dans l'arrêt de la signalisation médiée par $G\alpha$ et dans l'amélioration de la liaison de cette dernière à la membrane plasmique, mais dans l'ensemble, sa fonction première était mal connue. La première preuve qui montrait que $G\beta\gamma$ pouvait réguler un effecteur est parue quelques années plus tard et a montré que $G\beta\gamma$ était responsable de la production d'un courant ionique (I_{KACH}) dans les cellules auriculaires cardiaques [66].

1.2.3.3 Structure des protéines G

En se basant principalement sur la similarité des séquences primaires, qui varient entre 56%-95%, les sous-unités $G\alpha$ sont généralement divisées en quatre catégories: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$ [67, 68]. Les sous-unités $G\alpha$ possèdent une structure conservée qui inclue la présence de deux domaines : un domaine GTPasique qui joue le rôle principal dans l'hydrolyse du GTP et fournit les surfaces de liaison pour le dimère $G\beta\gamma$, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les protéines effectrices [61, 64] ainsi qu'un domaine hélicoïdal (Figure 4). Ce dernier, étant le domaine le plus divergent entre les différentes catégories de $G\alpha$, permet de diriger la spécificité de liaison de la sous-unité $G\alpha$ avec le récepteur et l'effecteur [69].

La sous-unité $G\gamma$ ne fait pratiquement aucun contact avec elle-même, mais en fait l'ensemble de ses contacts avec la sous-unité $G\beta$. Cette dernière, possède une structure qui présente des unités en répétition. L'analyse des séquences répétitives de la sous-unité $G\beta$ suggère que chacune acquiert une fonction spécialisée qui a été conservée, pour au moins, 1,2 milliard d'années [70]. La structure cristalline a permis d'identifier plusieurs de ces fonctions. Certaines unités, par exemple, sont spécialisées dans l'interaction avec $G\gamma$ alors que d'autres sont nécessaires pour interagir spécifiquement avec $G\alpha$. Finalement, d'autres séquences différentielles, qui donnent à chaque unité son caractère individuel, permettent l'interaction avec l'effecteur.

Dans les cellules vivantes, les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ s'associent pour former une unité fonctionnelle qui ne peut être dissociée que dans des conditions dénaturantes [71]. Bien que la

plupart des sous-unités $G\beta$ peuvent interagir avec la plupart des sous-unités $G\gamma$, quelques exceptions peuvent toutefois être observées [71-73]. Par exemple, $G\beta_2$ peut se combiner avec $G\gamma_2$ mais pas $G\gamma_1$ [74, 75].

La caractérisation de deux structures cristallines identifiées pour l'hétérotrimère de la protéine G, $G\alpha_{i1}(GDP)\beta_1\gamma_1$ et $G\alpha_{i1}(GDP)\beta_1\gamma_2$, montrent la présence de deux sites d'interaction entre la sous-unité $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$ [9, 60]. Cette surface d'interaction inclue une poche hydrophobe et une moindre contribution de l'hélice N-terminale de $G\alpha$ (Figure 6). L'activation de la sous-unité $G\alpha$ et la liaison du GTP fait disparaître la poche hydrophobe et réduit l'affinité de $G\alpha$ pour le dimère $G\beta\gamma$ [61, 62].

Les cellules humaines expriment quatre à cinq isoformes différentes de sous-unités $G\alpha$ [76]. De plus, on sait que plusieurs dimères $G\beta\gamma$ peuvent interagir avec une même isoforme de $G\alpha$. Ensemble, ces données suggèrent ainsi que l'expression différentielle et la localisation subcellulaire jouent un rôle primordial dans l'activation et la régulation des voies de signalisation médiées par les protéines G [77].

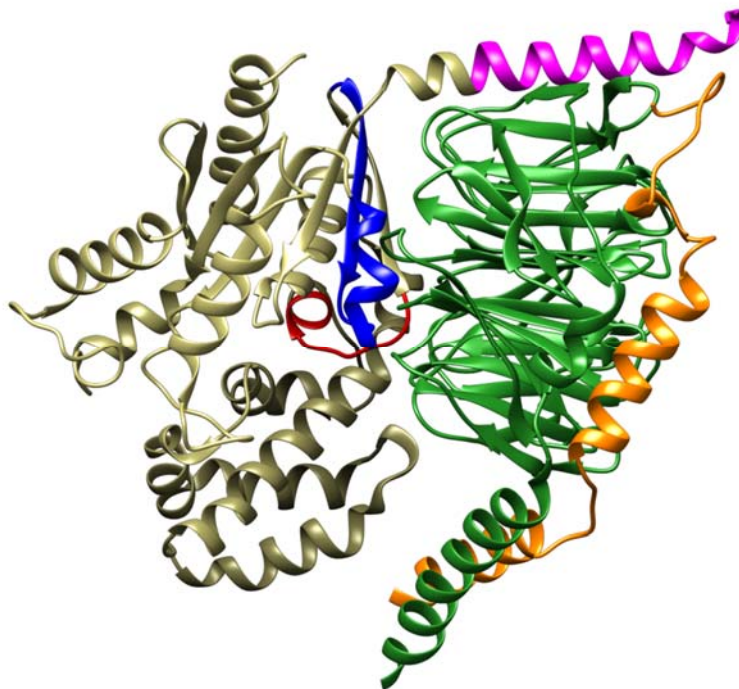


Figure 7. Représentation des sites d'interaction du dimère $G\beta_1\gamma_2$ sur la sous-unité $G\alpha_{i1}(GDP)$. La structure cristalline de l'hétérotrimère $G\alpha_{i1}(GDP)\beta_1\gamma_1$ (PDB: 1GP2) indique la présence de deux sites d'interaction entre la sous-unité $G\alpha_{i1}(GDP)$ (gris) et le dimère $G\beta_1\gamma_2$ formé par les sous-unités $G\beta_1$ (vert) et $G\gamma_2$

(orange) [60]. Les sites d'interaction correspondent à la poche hydrophobe, constituée par les switch I (rouge) et le switch II (bleu), ainsi que le domaine N-terminal (magenta) de la sous-unité $G\alpha_{11}$ (GDP).

1.2.4 Les principaux effecteurs des RO

Lors de la transduction d'un signal, les effecteurs jouent un rôle primordial. Ces derniers traduisent le signal extracellulaire reçu par le récepteur membranaire puis transmettent par la protéine G un effet moléculaire et physiologique. Ces effecteurs peuvent être des canaux ioniques (ex: canaux à conductance potassique ou calcique), des pompes ioniques (qui permettent le passage intracellulaire des ions contre leur gradient de concentration) ou même des enzymes, comme l'AC, la phospholipase C (PLC) et la GMP phosphodiesterase, qui catalysent la synthèse dans le cytoplasme d'un second messager. Dans ce qui suit, on s'intéressera aux trois principaux effecteurs des RO: les canaux calciques voltage dépendant (Cav), les canaux Kir3 et l'enzyme adénylate cyclase.

1.2.4.1 Les canaux calciques voltage-dépendants

Au niveau moléculaire, la transmission de l'influx nociceptif dépend largement de diverses conductances ioniques [78] telles que les conductances potassiques, sodiques, mais également calciques. Dans les neurones, les canaux calciques voltage dépendants représentent une des voies majeures d'entrée de calcium d'où leurs implications au contrôle de l'excitabilité cellulaire et aux processus moléculaires de la transmission synaptique [79]. Ces canaux ont, de ce fait, été considérés depuis longtemps comme une cible pharmacologique intéressante pour le traitement de la douleur.

Les canaux Cav jouent un rôle essentiel dans un large éventail de fonctions cellulaires, cela comprend la libération d'hormones et de neurotransmetteurs [80-84], la contraction musculaire, l'activation de certaines enzymes, l'expression des gènes et la différenciation cellulaire. Ces nombreux événements sont contrôlés d'une manière spatio-temporellement précise grâce, en partie, à la diversité fonctionnelle des canaux Cav médiée par des combinaisons distinctes de sous-unités formant chaque canal. De plus, les sous-unités du canal peuvent subir un épissage alternatif (processus durant lequel l'ARN messager subit des étapes

de coupure et de ligature induisant ainsi sa maturation), qui peut dépendre de l'âge et du tissu dans lequel les canaux sont exprimés [85-90] donnant ainsi naissance à une diversité fonctionnelle supplémentaire.

Sur la base des propriétés électrophysiologiques, la famille des canaux Cav est subdivisée en deux grandes catégories: les canaux à « haut seuil d'activation » (HSA) activés par de fortes dépolarisations membranaires et les canaux à « bas seuil d'activation » (BSA) qui s'ouvrent en réponse à de plus petits changements dans le voltage membranaire. Les analyses moléculaires et biochimiques [91], nous indiquent que les canaux HSA sont des protéines hétéromultimériques composées d'un assemblage de sous-unités Cav α 1, qui forment le pore du canal, et d'autres sous-unités auxiliaires Cav β et Cav α 2 δ . Par contre, les canaux BSA sont constitués seulement de sous-unités Cav α 1 [92].

Les sous-unités Cav α 1 affichent une topologie transmembranaire commune. Ces dernières sont formées de quatre grands domaines transmembranaires (domaine I à domaine IV), chacun contenant six hélices transmembranaires (appelés S1-S6) dont le segment S4, de charge positive, qui contrôle l'activité voltage-dépendante du canal (Figure 7) [93]. Le canal contient aussi un motif P sur les boucles S5-S6 contenant des résidus hautement conservés d'acides aminés chargés négativement qui contribuent à la formation d'un pore hautement sélectif aux cations. Ce pore permet ainsi l'entrée du calcium [94, 95], mais aussi d'autres cations comme le potassium, [96], sodium [96], baryum [97] et le cadmium [98]. Bien que les canaux Cav présentent la particularité commune de permettre l'entrée de certains cations dans la cellule, chacun de ces canaux présente des propriétés biophysiques et pharmacologiques propres et possède, par sa spécificité tissulaire, une importance spécifique dans le mécanisme de transmission de l'information nociceptive. La sous-unité Cav α 1 est le facteur essentiel pour déterminer le sous-type de canal calcique et pour cette raison, trois grandes familles de sous-unités Cav α 1 se présentent: Cav1, Cav2 et Cav3 [92].

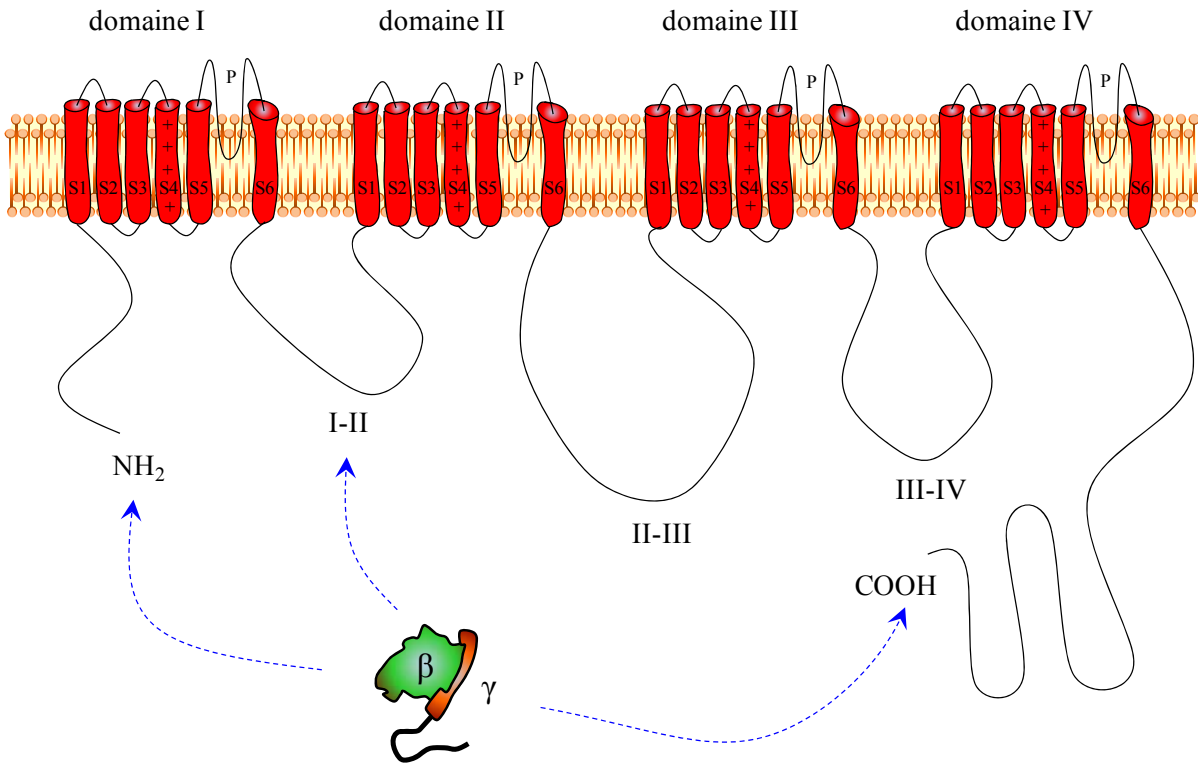


Figure 8. Représentation de la sous unité α d'un canal Cav2 et des sites d'interaction du dimère $G\beta\gamma$ sur cette dernière.

D'un point de vue fonctionnel, plusieurs RCPG comme les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) [99], sérotonine [100], adrénaline [101], opioïde [102], prostaglandine [103] et de la somatostatine [104, 105] régulent l'activité des canaux Cav par différents mécanismes. Ces derniers incluent l'intervention de la protéine G (action directe) ou de la protéine kinase A (PKA), protéine kinase C (PKC) ou la tyrosine kinase Src (action indirecte) [106-108]. Ce dernier mode de régulation est commun à tous les Cav, cependant, seuls les canaux de la famille Cav2 sont modulés par les protéines G. L'inhibition des canaux calciques par les RCPG a été décrit il y a 35 ans dans deux articles fondamentaux de Dunlap et Fischbach (1978, 1981) [109, 110]. Ces auteurs ont montré l'implication des récepteurs GABA_B, sérotoninergiques, ou adrénérgiques dans la réduction de la durée du potentiel d'action et l'amplitude du courant calcique dans les neurones du ganglion de la racine dorsale (DRG) chez le poussin. La diversité et la complexité de la signalisation des RCPG prédit que plusieurs voies distinctes pourraient influencer le fonctionnement des canaux calciques. Une

de ces voies, peut-être la plus importante, mais certainement la plus étudiée est l'inhibition induite par la liaison directe de la sous-unité $G\beta\gamma$ sur la sous-unité $Cav\alpha1$ des canaux $Cav2$. Au niveau présynaptique, l'activation des récepteurs MOR amène à l'inhibition des courants calciques, notamment ceux des canaux Cav [111] et ceci grâce à la fixation du dimère $G\beta\gamma$ sur le canal [106, 112]. Les données actuelles suggèrent que la liaison de $G\beta\gamma$ à $Cav2$ a été circonscrite au niveau des terminaisons N- et C- terminales [107] et la boucle intracellulaire connectant les domaines I et II de la sous unité $Cav\alpha1$ du canal [106, 112-114] (Figure 7). Cette dernière région contient la séquence QXXER, retrouvée également au niveau des canaux Kir et de l'AC [115].

Quelques études ont montré également que la nature des sous-unités à l'intérieur de l'hétérodimère $G\beta\gamma$ pourrait avoir de l'influence sur le degré d'inhibition des canaux $Cav2$, avec $G\beta_1$ et $G\beta_2$ étant plus efficaces que les autres sous-unités $G\beta$ à inhiber les canaux calciques [116] et $G\gamma_2$ provoquant une plus grande inhibition que $G\gamma_1$, $G\gamma_3$ ou $G\gamma_{13}$ [117, 118]. L'effet inhibiteur exercé par $G\beta\gamma$ peut être réduit suite à la phosphorylation du canal au niveau de son résidu Thr422, localisé au niveau de la boucle intracellulaire I-II, par la protéine kinase C (PKC) [106, 119]. Encore dans ce cas, la nature des sous-unités de l'hétérodimère $G\beta\gamma$ pourrait influencer l'effet exercé par la PKC, avec seulement une réduction de l'inhibition médiée par $G\beta_1$ [120]. Enfin, une étude récente a révélé que la mutation S218L au niveau de la boucle intracellulaire connectant les domaines transmembranaires S4-S5 de la sous-unité $\alpha1$ du canal $Cav2$, que l'on retrouve chez les patients avec migraine hémiplésique familiale (MHF), facilite la récupération de l'inhibition des canaux médiée par $G\beta\gamma$, peut-être en facilitant la dissociation entre ce dimère et le canal [121]. Deux autres mutations MHF (R192Q, Y1245C) ont également montré leurs effets pour diminuer l'inhibition médiée par $G\beta\gamma$ [122, 123].

1.2.4.2 Les canaux potassiques à rectification entrante de la famille Kir3

Les canaux Kir3 sont des éléments importants dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire. Exprimés dans la plupart des régions du cerveau et dans le cœur, ils fonctionnent pour stabiliser le potentiel de repos membranaire en réduisant l'activité électrique. En raison de

cette grande distribution, ils agissent en tant que médiateurs d'une large gamme d'hormones et de neurotransmetteurs.

Cinq sous-unités du canal Kir3 ont été identifiées jusqu'à présent. Les mammifères en expriment quatre (Kir3.1 à Kir3.4) alors que la cinquième sous-unité est d'origine aviaire [124]. Ces différentes sous-unités se rassemblent en groupe de 4 pour former un canal Kir fonctionnel (tétramère) (Figure 8). La longueur des sous-unités varie entre 393 (Kir3.3) et 501 (Kir3.1) acides aminés [124]. Parmi ces derniers, plusieurs séquences ont été identifiées comme responsables du transport intracellulaire de chacune des sous-unités Kir3. En bref, des analyses de suppression de certaines séquences de la sous-unité Kir3.2 montrent la présence un signal d'exportation du réticulum endoplasmique (RE) au niveau des domaines N- et C-terminaux permettant ainsi au canal de se rendre à la membrane [125]. Ce signal d'exportation du RE est absent dans les sous-unités Kir3.1 et Kir3.3, ce qui explique l'abondance des formes hétérotétramériques présentes au niveau de la membrane cellulaire.

Bien que les quatre sous-unités du canal Kir3 (Kir3.1-Kir3.4) sont exprimés dans le système nerveux périphérique [126] et central [127-129], des études ont démontré que l'hétérotétramère prédominant dans le cerveau est celui formé de Kir3.1/Kir3.2 [130]. Ce dernier se retrouve en colocalisation avec les récepteurs MOR au niveau de la membrane postsynaptique des cellules excitatrices [131]. Cela explique pourquoi l'hétérotétramère Kir3.1/Kir3.2 a été choisi pour notre étude.

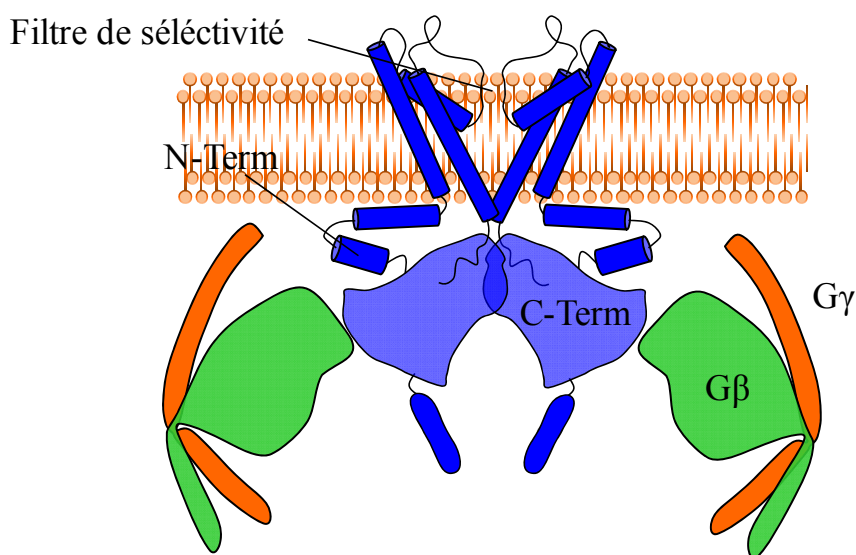


Figure 9. Représentation schématique du canal Kir3 en interaction avec le dimère Gβγ.

Les canaux Kir sont activés par des récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_{i/o}$ [124, 132]. Également, il a été démontré que le dimère constitué de sous-unités $G\beta_1$ et $G\gamma_2$ peut activer les canaux Kir3.1 en hétérodimère avec Kir3.2 ou Kir3.4 [133]. Cependant, un autre dimère contenant les sous-unités $G\beta_5$ et $G\gamma_2$ inhibe le courant de ces mêmes canaux [134]. C'est pour cette raison que les sous-unités $G\alpha_o$, $G\beta_1$ et $G\gamma_2$ ont été choisies pour former la protéine hétérotrimérique dans notre étude.

Encore, le canal Kir3 est considéré comme un des effecteurs des récepteurs DOR [135]. Une fois activé par la liaison du dimère $G\beta\gamma$, ce canal contribue à l'hyperpolarisation de la membrane empêchant ainsi la transmission de l'information douloureuse d'où l'effet analgésique des opiacés (Figure 9). La contribution du canal Kir3 au mécanisme d'analgésie des agonistes opioïdes a été initialement suggérée par le fait que les souris, portant une mutation qui rend les sous-unités Kir3.2 insensibles à l'activation des protéines G [136, 137], affichent des réponses analgésiques réduites à la morphine [138, 139]. Ces observations ont ensuite été confirmées en utilisant des souris KO (*Knock-out*) du gène codant pour les différentes sous-unités du canal Kir3 [131, 140]. Des études similaires ont permis d'impliquer également Kir3.1 [141] et Kir3.3 [142] dans la modulation de la transmission de l'information douloureuse. De même, une réduction dans les réponses à l'administration intrathécale de morphine a été observée chez les souris génétiquement modifiées dépourvues de sous-unités Kir3.1 ou Kir3.2 [131, 141], indiquant ainsi l'implication de ces deux sous-unités dans les mécanismes spinaux de l'analgésie aux opioïdes. Cette interprétation est étayée par des rapports qui montrent l'expression des sous-unités Kir3.1 et Kir3.2 au niveau des interneurons de la lamina II de la moelle épinière et leurs colocalisations avec les récepteurs MOR [143]. Des études fonctionnelles ont également indiqué qu'une régulation négative des sous-unités Kir3.1 ou Kir3.2 ou même une infusion intrathécale de bloqueurs des canaux Kir3 (tertiapin-Q) interfèrent avec la réponse analgésique des agonistes MOR et DOR administrés par cette même voie [131].

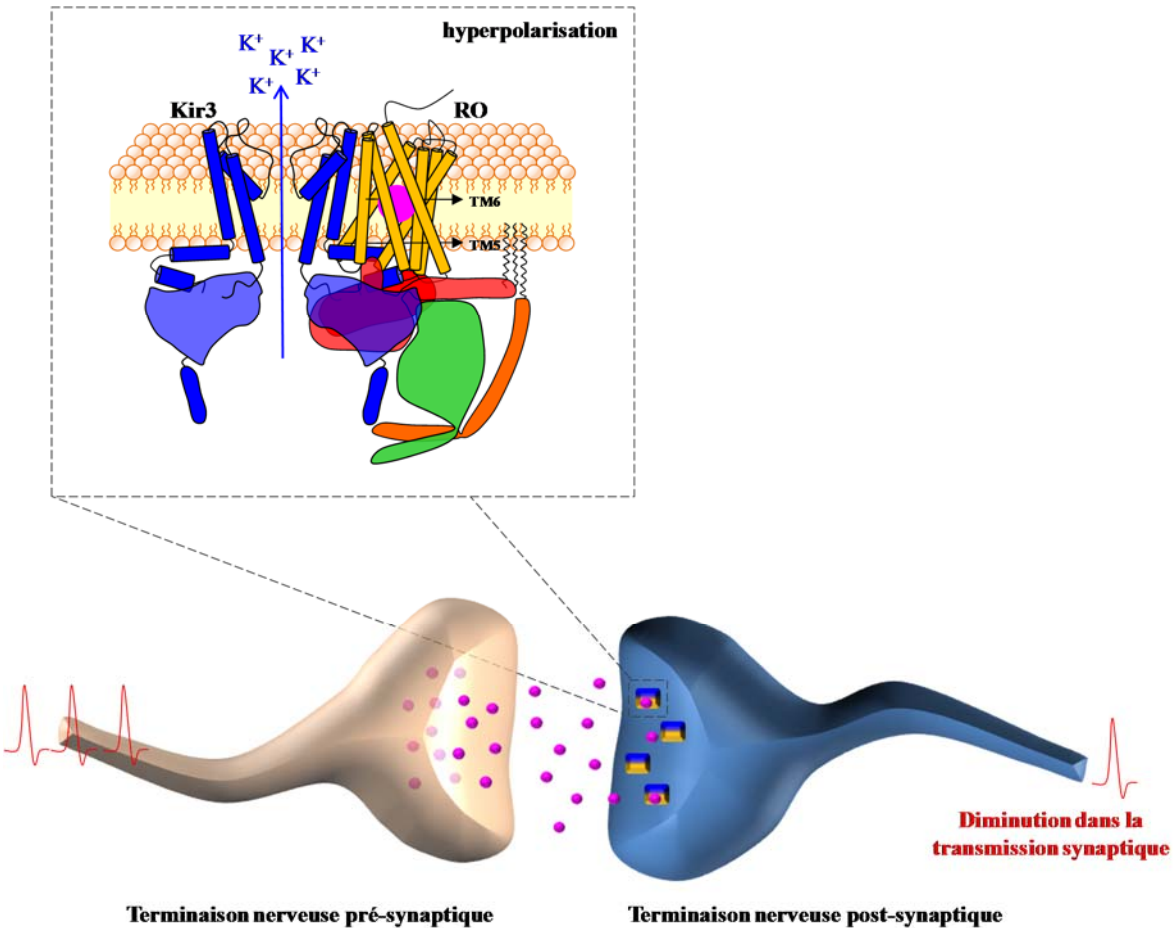


Figure 10. Voie de signalisation des canaux Kir3 au niveau de la fente synaptique. Lorsque émis dans la fente synaptique, des neurotransmetteurs tels que les opioïdes endogènes (rose) activent les RO (jaune doré) du neurone post-synaptique, qui activent à leur tour les canaux Kir3 (bleu). L'activation des canaux Kir3 produit une hyperpolarisation au niveau de la membrane post-synaptique réduisant ainsi la transmission de l'influx nociceptif. Idée du schéma adoptée de [144].

En dehors du cerveau et de la moelle épinière, les RO sont également présents dans les neurones sensoriels du DRG [145-148] et dans les terminaisons périphériques où ils interviennent dans les effets analgésiques des opioïdes injectés en périphérie [149-151]. Tout de même, l'expression des sous-unités Kir3.1 et Kir3.2 a été détectée dans les DRG humains et dans les nocicepteurs de rat, mais pas chez la souris [126, 152]. Cette répartition vient en parallèle à des différences dans la sensibilité de ces espèces à l'administration périphérique d'opioïdes suggérant que lorsqu'exprimées, les sous-unités Kir3 du DRG participent activement à l'analgésie des opioïdes. En effet, une injection intraplantaire d'agonistes MOR ne produit pas de l'analgésie chez la souris [152], mais réduit efficacement la douleur dans des

modèles de rats inflammatoires ou neuropathiques [150, 152-154] ainsi que la douleur postopératoire et arthritique chez les humains [151, 155]. En outre, la contribution active des canaux Kir3.2 à l'analgésie opioïde périphérique a été établie expérimentalement en utilisant des souris transgéniques génétiquement modifiées pour exprimer ces sous-unités dans les neurones sensoriels. Contrairement à leurs homologues de type sauvage, ces souris montrent une réponse analgésique à l'application plantaire de DAMGO, un agoniste du récepteur MOR [152].

1.2.4.3 L'adénylate cyclase

Lors de la stimulation extracellulaire, l'adénylate cyclase est l'enzyme qui catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPC), un second messager intracellulaire clé dans de nombreux processus physiologiques. Depuis le travail de pionnier réalisé par Sutherland [156], il a été connu que la signalisation de l'AC joue un rôle crucial dans les fonctions biologiques normales, par exemple, la respiration [157], l'organisation du cytosquelette [158], la lipolyse [159] ainsi que son implication dans les troubles neurodégénératifs [160], la tumorigenèse [161] et les maladies cardiaques [162, 163]. L'importance de l'AC dans la transduction du signal du système nerveux central a été mise en évidence par deux propriétés particulières de l'enzyme. En premier lieu, il faut souligner que la majorité de la famille des AC peut être modulée par des récepteurs d'un grand nombre de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs indispensables pour le système nerveux central. Cela comprend les récepteurs de neurotransmetteurs classiques comme la dopamine, sérotonine et l'adrénaline indiquant ainsi que l'AC est une molécule cruciale dans la médiation d'une large gamme de réponses physiologiques. La deuxième propriété essentielle est la diversité des AC permettant aux membres de cette superfamille de fonctionner dans différentes voies de transduction du signal. Toutes les isoformes membranaires de l'AC ont été détectées dans le système nerveux central des mammifères [164-168]. Cependant, le profil d'expression de chaque isoforme est un indicateur important qui peut suggérer que l'isoforme identifiée est peut-être couplée à des voies de signalisation spécifiques pour la région du cerveau indiquée. Par exemple, l'AC de type V est exprimée principalement dans les neurones

du striatum exprimant des récepteurs dopaminergiques D1, et par conséquent, a été impliquée dans la détection de la fonction dopaminergique [165].

La structure caractéristique de l'AC consiste en deux régions hydrophobes (M1 et M2) contenant chacune six hélices transmembranaires et deux domaines cytoplasmiques (C1 et C2), subdivisés en C1a, C1b et C2a, C2b respectivement (Figure 10). L'unité catalytique de base de l'AC membranaire comprend les domaines C1a et C2a [169-171]. La structure de cette unité, révélée par des études aux rayons X [172], est hautement conservée parmi les différentes isoformes de l'AC. D'ailleurs, des progrès récents vers la compréhension des domaines fonctionnels de l'enzyme cyclase ont été examinés [173-175]. Ces derniers montrent que les domaines fonctionnels interagissent, en majorité, avec les sous-unités de la protéine G [175] permettant ainsi la régulation de l'AC. Toutes les isoformes isolées à ce jour catalysent la synthèse d'AMPc suite à leur activation par la sous-unité $G\alpha_s$. Néanmoins, $G\alpha_s$ stimule chaque isoforme d'AC d'une manière fondamentalement distincte [176]. De même, chaque isoforme présente une sensibilité différente à l'effet inhibiteur exercé par la sous-unité $G\alpha_i$ [177]. Différentes isoformes y compris l'ACI, ACV et ACVI sont efficacement inhibées par $G\alpha_i$ alors que d'autres, l'ACII par exemple, est insensible à l'influence exercée par cette sous-unité [177-179]. Le dimère $G\beta\gamma$, à son tour, active les isoformes ACII, ACIV, ACVII, mais inactive l'ACI [180].

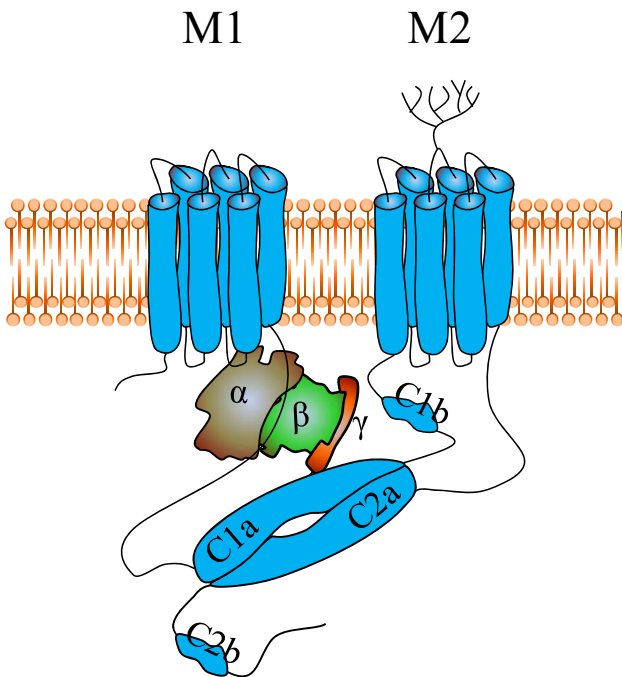


Figure 11. Représentation schématique de l'adénylate cyclase en interaction avec l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$.

De façon surprenante, l'AC peut servir physiologiquement comme un régulateur dans la signalisation des protéines G. Deux régions hautement conservées dans le domaine C2 de l'ACV ont été reconnues pour améliorer efficacement l'activité GTPasique de la sous-unité $G\alpha_s$ et faciliter l'échange GTP/GDP médié par les RCPG [181]. L'AC accélère ainsi l'apparition et la terminaison du signal généré par les récepteurs couplés à $G\alpha_s$. Une telle propriété est d'une importance particulière dans le système nerveux central où les signaux provenant de différents récepteurs actifs ont besoin d'être traités rapidement. Finalement, il faudrait signaler que durant la dernière décennie, une série d'expériences indépendantes ont démontré que les différentes isoformes d'AC pourraient aussi être modulées par des signaux indépendants de la protéine G, tels que la protéine kinase C, protéine kinase A, la CaM Kinase (kinase dépendante de la calmoduline) et même la protéine phosphatase 2A.

La tolérance à l'analgésie est un des principaux effets secondaires observés en clinique suite à l'administration des opioïdes. Cependant, une étroite corrélation lie ce phénomène à la voie de signalisation de l'AC. Cette dernière a été connue depuis longtemps pour être impliquée dans le développement des états de tolérance et de dépendance [182] aux opioïdes. Dans les conditions normales, l'administration aigue de la morphine, ou autres agonistes

opioïdes, provoque une diminution de l'activité des AC par l'intermédiaire de la voie $G\alpha_i$ [183-186]. Par contre, suite à une exposition prolongée à la morphine, l'effet inhibiteur diminue et d'autres effets excitateurs émergent. Chez les souris traitées d'une manière chronique avec la morphine, une augmentation de l'activité de l'AC a été détectée dans le cortex cérébral [187, 188], le striatum [189, 190], le locus coeruleus (LC) mais pas dans le cervelet, qui se trouve dépourvu de RO [191] indiquant ainsi une étroite corrélation entre l'activité de l'AC et la signalisation opioïde. Ce nouvel état provoque des signes comportementaux et physiques derrière lesquels se trouve un ensemble complexe de phénomènes biochimiques. Une étude parue en 2005 [192] montre que les principaux effets secondaires de la morphine, y compris la tolérance, l'activité locomotrice, la récompense et la dépendance physique sont atténués chez les souris n'exprimant pas l'adénylate cyclase de type 5 (AC5), une forme d'AC hautement enrichie dans le striatum. Cette même étude prouve aussi que les effets comportementaux des agonistes sélectifs de MOR et DOR sont perdus dans les souris KO de l'AC5. Ensemble, ces résultats établissent l'AC5 comme une composante importante dans les mécanismes de transduction du signal des RO *in vivo*.

Outres que les mécanismes impliquant les RO, plusieurs phénomènes se trouvent en corrélation avec les effets secondaires observés suite à l'activation prolongée de l'AC. Ces derniers incluent une augmentation de la synthèse de différentes isoformes d'AC qui se trouvent stimulées par $G\beta\gamma$ au lieu d'être inhibés par $G\alpha_i$ [193]. De même, une augmentation de la phosphorylation de certaines isoformes d'AC, comme l'AC II et AC VII, par la PKC serait aussi responsable d'augmenter leurs stimulations par $G\alpha_s$ et $G\beta\gamma$ [194].

1.3 Complexes multi-protéiques

Dans les sections précédentes, on a identifié la majorité des protéines d'intérêt de notre étude. Cependant, on n'a toujours pas mentionné la manière qu'utilisent ces protéines pour communiquer entre elles. En fait, décrire avec précision les différentes étapes d'une communication récepteur-effecteur, n'est pas aussi évident et par suite, une question essentielle se pose: Comment le récepteur stimulé arrive à reconnaître et activer spécifiquement ses effecteurs parmi tant d'autres présents à la membrane plasmique ?

Autrement dit, est-ce que le récepteur et son effecteur interagissent physiquement entre eux sous forme d'un complexe signalétique ou bien communiquent entre eux par simple interaction aléatoire ? Durant les dernières années, de nombreuses études se sont intéressées à caractériser les complexes multi-protéiques et à identifier leurs rôles dans les voies de transduction du signal. Ces études montrent, un jour après l'autre que les complexes multi-protéiques sont la pierre angulaire de nombreuses activités physiologiques. Dans ce qui suit, nous allons présenter plusieurs types d'interactions qui s'avèrent essentielles pour transmettre l'information d'un récepteur à son effecteur.

1.3.1 Relation récepteur - protéine G

L'interaction entre le récepteur et sa protéines G est un événement précoce dans la transduction du signal qui est largement reconnu pour se produire à la suite de l'activation du récepteur par son agoniste. Cette interaction peut être extrêmement rapide, réversible et peut également adopter une stœchiométrie spécifique pour chaque type de récepteur. Dans le cas bien étudié de la liaison du récepteur visuel rhodopsine à sa protéine G (G_t ou transducine), un récepteur activée peut induire l'activation de plusieurs milliers de protéines G_t par seconde [195, 196]. Bien que des évidences ont montré que la rhodopsine est capable de former différents oligomères, l'activation maximale a été signalée pour les complexe contenant un rapport de 1:1 de rhodopsine/ G_t [196]. Cette grande capacité d'activation que possède la rhodopsine ne peut être généralisée, car d'autres RCPG comme le récepteur adénosine A_{2A} , n'est capable d'activer que seulement quelques sous-unités $G\alpha_s$ [197].

Plusieurs sites d'interaction entre le récepteur et la protéine G ont été identifiés, encore une fois, avec plus de détails pour l'interaction rhodopsine/ G_t . Les données ont montré que suite à l'activation du récepteur rhodopsine, une ouverture apparait du côté cytoplasmique des régions hélicoïdaux suite au mouvement de l'hélice transmembranaires 6 [198] et que la queue C-terminale de la transducine s'introduit dans cette cavité [199-201]. De plus, des données montrent la contribution de l'extrémité N-terminale ainsi que les boucles $\alpha 3$ - $\beta 5$ et $\alpha 4$ - $\beta 6$ [202-204] dans la liaison de la sous-unité $G\alpha$ au récepteur.

Concernant la dynamique de l'interaction récepteur/protéine G, le modèle généralement accepté, déduit à partir des études *in vitro*, suppose que les récepteurs et les protéines G sont tous deux mobiles et que cela conduit à des collisions entre eux. En effet, ce modèle propose que l'activation de la protéine hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$ se réalise suite à son recrutement puis sa collision avec un récepteur actif (occupé par un agoniste) [205-207]. Cependant, ce modèle classique à base de collision a récemment été contestée par plusieurs études [208-212]. Ces dernières supposent que les récepteurs et les protéines G sont "précouplés" [213-216] en des complexes protéiques constitutifs et suggèrent que l'activation d'un récepteur conduit à l'activation immédiate de sa protéine G. Aussi, il faudrait signaler que le modèle classique suggère qu'un récepteur est capable d'activer de nombreuses protéines G alors que dans le modèle de précouplage, le nombre de protéines G accessibles à un seul récepteur est très limité.

Bien que des modèles d'activation de la protéines G par le récepteur ont été proposés, l'absence d'informations sur le caractère statique des changements dynamiques qui se produisent suite à l'activation du récepteur limite notre compréhension sur la transmission de l'information d'un récepteur à sa protéine G dans les cellules vivantes. Bien que plusieurs études ont été capables de caractériser les interactions établies entre les composants de la machinerie de signalisation des RCPG, aucune n'était essentiellement capable de visualiser ces interactions protéiques. Deux lignes récentes de technologies et de données ont contribué à identifier la trajectoire de déplacement des protéines en interaction. La première se réalise en temps réelle et dans des cellules vivantes et utilise le transfert d'énergie entre deux protéines pour évaluer la proximité entre elles. Alors que la deuxième, s'intéresse à l'élucidation des structures cristallines non seulement de la forme inactive et active de plusieurs RCPG, mais plus récemment, de l'interaction de ces derniers avec leurs protéines G en aval [201, 217-221]. Durant les dernières années, les techniques de transfert de la bioluminescence et fluorescence par résonance énergétique (BRET et FRET) (Figure 11) ont été présentées afin de caractériser les interactions protéine-protéine (ou donneur-accepteur). Plusieurs études se sont intéressées à identifier les interactions établies par les RCPG avec leurs partenaires de signalisation [222] ainsi qu'étudier les changements conformationnels des récepteurs suite à leur activation [222-224]. Ces techniques et en se basant sur la nécessité d'avoir une très faible distance (100 Å)

entre le donneur et l'accepteur sont considérées, de nos jours, les meilleurs outils pour mesurer, en temps réel, les changements dynamiques d'une structure protéique.

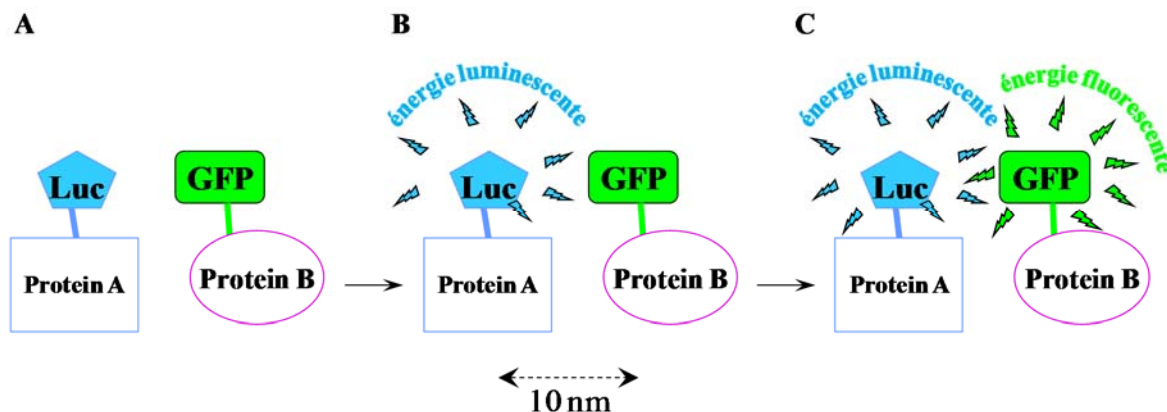


Figure 12. Principe de la technique de BRET.

(A) Afin d'étudier l'interaction entre deux protéines, la protéine A est étiquetée par la luciférase (Luc) alors que la protéine B est étiquetée par une protéine fluorescente (GFP par exemple). La technique consiste à stimuler la luciférase par l'addition de son substrat. La luciférase ainsi activée catalyse l'oxydation du substrat et émet une énergie lumineuse (B). Si la protéine B est proche de la protéine A (moins que 10 nm), l'énergie émise par la luciférase serait captée par la protéine fluorescente qui se trouve ainsi activée. Une fois activée, la protéine GFP émet une énergie fluorescente (C). Le ratio BRET correspond au quotient de l'énergie fluorescente sur celle lumineuse.

En utilisant ces techniques, plusieurs études ont accordé une attention pour caractériser l'interaction récepteur-protéine G. Ces dernières ont montré que l'augmentation agoniste-dépendante du signal FRET entre le récepteur et la protéine G a été maintenue aussi longtemps que l'agoniste était présent dans le milieu de culture [212, 225-227]. Cela était surprenant étant donné que le modèle classique à base de collision supposait que la protéine G se dissocie du récepteur une fois activée [228, 229]. Cela suggère qu'une fraction des récepteurs et des protéines G restent étroitement couplés pour produire le signal FRET observé, ou plus probable, que les complexes récepteur-protéine G étudiés (les récepteurs β_2 -adrénergiques (β_2 AR) et A_{2A} de l'adénosine avec G_{α_s} ainsi que les récepteurs α_{2A} -adrénergiques (α_{2A} AR) avec G_{α_i}) maintiennent leurs intégrités même suite à l'activation du complexe par un agoniste. En d'autres termes, l'activation du récepteur conduit plutôt à une réorganisation structurale du complexe lui-même permettant à la protéine G de transmettre l'information conformationnelle à l'effecteur tout en restant en contact étroit avec le récepteur. Durant les dernières années, des études très innovantes ont permis, en évaluant la proximité entre deux protéines par les

techniques de transfert énergétique, d'identifier clairement la réorganisation stérique d'un complexe protéinique. Cela a été rendu possible en évaluant, par plusieurs angles de vision, les changements dans la distance séparant les deux protéines étudiées, suite à l'activation du récepteur. Une première étude de ce type a été parue en 2006 [226] durant laquelle les auteurs ont évalué l'interaction du récepteur β_2 AR, étiqueté par une protéine fluorescente, avec des protéines $G\alpha_{i1}$ étiquetées par une protéine luminescente à des endroits différents. Cette étude a été suivie par deux études similaires démontrant la réorganisation structurale observée entre la sous-unité $G\alpha_{i1}$ et le récepteur DOR [230] ou le récepteur α_2 AR [231].

À part les techniques de transfert d'énergie, la résolution des structures cristallines a fourni une étape essentielle pour la compréhension des réarrangements structuraux impliqués dans l'activation de la protéine G [217, 232-234]. Les études biophysiques et biochimiques se sont intéressées, ces dernières années, sur le récepteur β_2 AR. Ces dernières ont montré que le récepteur β_2 AR consistait en une protéine flexible et dynamique avec les domaines TM5, TM6 et la troisième boucle intracellulaire comme étant les régions les plus flexibles. Cette propriété dynamique que possédait le récepteur empêchait ainsi la formation de cristaux de bonne qualité. Cependant, pour contrecarrer cette problématique, des approches qui consistaient à l'utilisation de la lysosyme (T4L) [233, 234], des fragments d'anticorps monoclonaux [217] ainsi que des nanoparticules [234] ont permis de faciliter la cristallisation de la forme inactive [217, 233] et récemment de la forme active du récepteur β_2 AR [234] avec les sous-unités de sa protéine G [7]. Les différences observées entre les états actifs et inactifs ont été relativement modestes, impliquant principalement des réarrangements structuraux qui jouent un rôle clé dans l'échange GDP/GTP [7, 58, 235]. L'importance d'un tel échange ainsi que son implication dans le processus de transduction du signal sera discuté dans la section suivante.

1.3.2 Relation protéine G - effecteur

La transmission du signal dans une cellule débute par un changement de conformation du récepteur, ce qui entraîne l'activation de sa protéine G. Cette activation se manifeste par un échange du GDP lié pour un GTP au niveau de la sous-unité $G\alpha$ (Figure 5). La liaison du GTP est l'étape cinétiquement limitante dans l'activation des protéines G. Cette dernière change la conformation de la protéine hétérotrimérique [236] permettant ainsi aux sites de contact avec

l'effecteur, à la fois au niveau de la sous-unité $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$, de se libérer. Ainsi, de nouvelles surfaces de contact se forment et permettent aux sous-unités de la protéine G de lier et activer (ou inhiber) les différents effecteurs en aval. La sous-unité $G\alpha_s$ active (et $G\alpha_i$ inhibe) l'adénylate cyclase [194], $G\alpha_t$ active la GMP phosphodiesterase [237, 238] alors que $G\alpha_q$ active la PLC [239] et module l'activité de certains canaux ioniques [240-243] conduisant finalement à la génération d'une panoplie de réponses physiologiques.

La sous-unité $G\alpha$ utilise l'énergie de liaison du GTP pour stabiliser la conformation qui permet sa liaison avec l'effecteur. Cette énergie est dissipée par l'hydrolyse du GTP, le signal est ainsi terminé. En conséquence, on pourrait dire que la longueur du signal d'activation de la protéine G est contrôlée par la durée de liaison du GTP à la sous-unité $G\alpha$.

Les sous-unités de la protéine G régulent une panoplie d'effecteurs. Pour une liste complète des effecteurs régulés par les différentes sous-unités de la protéine G, voir [244, 245]. Cette régulation est parfois directe et implique des interactions physiques entre les partenaires signalétiques. Au cours des trois dernières décennies, de nombreuses études ont fourni des preuves de complexes protéiniques constitués par la protéine G et des effecteurs qu'ils régulent. Dans ce qui suit, on s'intéressera principalement aux interactions établies entre les sous-unités de la protéine G et les principaux effecteurs des RO.

Une des premières études caractérisant les interactions entre la protéine G et les effecteurs des RO fut réalisée au début des années 1990 [246]. Dans cette dernière, une analyse approfondie de chimères $G\alpha_{i2}/G\alpha_s$ a pu identifier trois régions, dans la sous-unité $G\alpha_s$, nécessaires pour l'activation de l'AC. La première correspond à l'extrémité C-terminale de l'hélice α_2 . La deuxième, également identifiée par Itoh & Gilman [247], correspond à la boucle α_3 - β_5 . Finalement, la troisième région, également capable d'activer [248] et de relier l'extrémité C-terminale de la GMP phosphodiesterase [249], correspond à la boucle α_4 - β_6 .

Peu de temps après, certains auteurs ont eu l'idée de générer des protéines chimères à partir de sous-unités $G\alpha$ qui interagissent spécifiquement avec différents effecteurs. Les résultats ont permis d'identifier des sites de liaison potentiels pour certains effecteurs en comparant la structure des régions de $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_t$ dans leur état actif (lié à GTP) et leur état inactif (lié à GDP) [59, 250]. Finalement, Hepler et al. ont pu identifier l'extrémité N-terminale de $G\alpha$ comme une nouvelle surface de contact avec l'effecteur suite à une étude réalisée entre la sous-

unité $G\alpha_q$ et la PLC β [251]. Un résumé de toutes les régions de contact de $G\alpha$ avec l'effecteur est représenté dans la Figure 12.

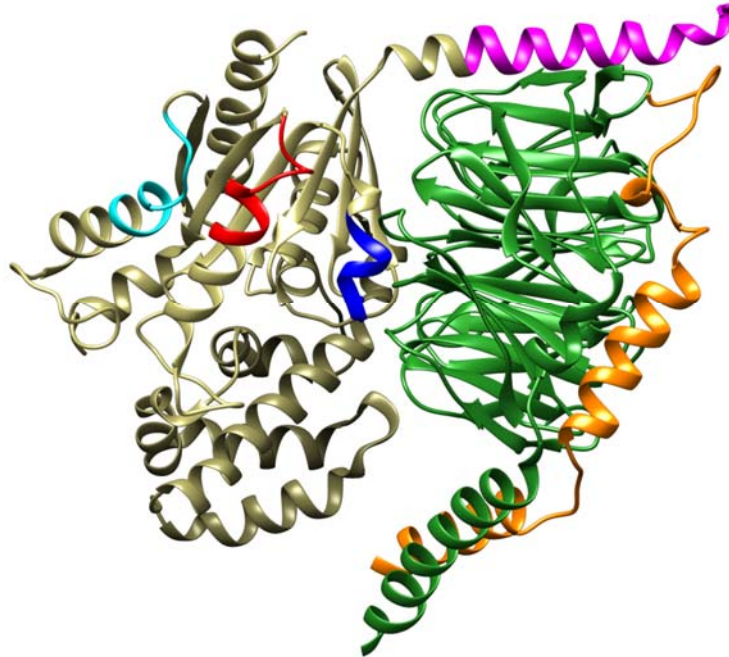


Figure 13. Représentation des sites d'interaction de la sous-unité $G\alpha$ avec l'effecteur. La structure cristalline de l'hétérotrimère $G\alpha\beta\gamma$ (PDB: 1GP2) indique la présence de quatre sites d'interaction entre la sous-unité $G\alpha$ et le récepteur. Ces dernières sont formées par le domaine N-terminal (magenta), l'hélice α_2 (bleu), la boucle α_3 - β_5 (rouge) et la boucle α_4 - β_6 (cyan) sur la sous-unité $G\alpha$ (gris).

L'interaction entre la sous-unité $G\alpha$ et l'AC a aussi été vérifiée, dans des cellules vivantes, en utilisant la technique de BRET [133]. Dans cette étude, deux effecteurs différents, l'AC et le canal potassique Kir3.1 ont été étiquetés avec la Renilla Luciférase (Rluc) alors que les différentes sous-unités de la protéine G ont été étiquetées avec la protéine fluorescente verte (GFP). Les auteurs ont été capable de montrer que: 1) les effecteurs interagissent avec les sous-unités $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$, 2) l'interaction optimale observée entre l'ACII et $G\alpha$ exige une interaction initiale avec le dimère $G\beta\gamma$, 3) l'ajout de la sous-unité $G\alpha$ est nécessaire pour rendre les complexes naissants fonctionnels avant leur transport à leurs sites d'action initial et finalement que 4) les sous-unités de $G\alpha_s$ sont capables de jouer un rôle dans la stabilisation des complexes signalétiques puisqu'une prévention de l'interaction avec $G\alpha$, réalisée en utilisant des mini-gènes dominants négatifs, réduit le signal BRET entre le récepteur et l'ACII. Toutes

ensembles, ces données montrent que les sous-unités de la protéine G jouent un rôle clé dans la spécificité, l'assemblage, l'activation et la stabilité des complexes de signalisation.

Les canaux calciques voltage-dépendant sont également régulés par les protéines G. Ces dernières antagonisent les effets de la sous-unité β du canal. De plus, des indications montrent que les déterminants de la protéine G responsables de cette régulation résident dans l'hétérodimère $G\beta\gamma$ [116, 252]. Une étude réalisée dans des cellules vivantes, mais cette fois-ci en utilisant la technique de FRET, a montré la présence d'une interaction entre $G\beta\gamma$ et les canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q [253]. En effet, les données FRET ont démontré que la sous-unité $G\beta_2$ pouvait se relier au domaine C-terminal et la boucle intracellulaire entre les domaines I et II de la sous-unité α_1 du canal ($Cav\alpha_12.1$) [253]. Les données ont montré aussi que $G\beta_2$ était capable de modifier l'orientation entre les sous-unités $Cav\alpha_1$ et $Cav\beta$, fournissant ainsi une indication possible concernant l'implication de la protéine G dans le mécanisme de régulation des canaux calciques de type P/Q.

Dans le cas du dimère $G\beta\gamma$, la situation est un peu plus complexe. Ce dernier a été longtemps considéré comme ayant un rôle mineur dans la signalisation cellulaire, c'est-à-dire qu'il ne devait servir qu'à maintenir inactif la sous-unité $G\alpha$. Aujourd'hui, la situation a changé et le dimère $G\beta\gamma$ est reconnu pour sa capacité à interagir et activer une très grande quantité d'effecteurs incluant l'AC [254], des PLC [255] ainsi que certains canaux ioniques comme les canaux calciques [252] et potassiques [256]. Une liste complète des sites de liaison des différentes sous-unités du canal potassique de la famille Kir3 sur les différentes sous-unités de la protéine G est illustrée dans l'Annexe 2.

1.3.3 Relation récepteur - effecteur

Comme expliqué dans les sections précédentes, des études ont montré que les protéines G forment des complexes avec les récepteurs à 7TM, alors que d'autres, ont montré que les protéines G forment des complexes avec certains effecteurs [257, 258]. De telles évidences soulèvent la possibilité que de gros complexes contenant à la fois les trois composants essentiels de signalisation: le récepteur, la protéine G et l'effecteur pourraient exister. Si tel est le cas, il serait raisonnable de penser que la proximité entre les récepteurs à 7TM et les

effecteurs serait aussi grande pour être détectée *in vivo* par des expériences de transfert d'énergie de résonance (RET).

La première démonstration *in vivo* d'un complexe contenant à la fois un récepteur à 7TM et son effecteur provenait d'une étude BRET [259] durant laquelle les canaux Kir3 ou l'AC ont été étiquetés avec Rluc alors que le récepteur β_2 AR a été étiqueté avec la GFP. Dans cette dernière, les données BRET générées ont montré la présence d'une proximité stérique entre le récepteur β_2 AR et chacun de ces deux effecteurs. De plus, les signaux BRET obtenus furent inchangés même suite à l'ajout de l'agoniste isoprotérénol ce qui suggère que l'interaction récepteur/effecteur persiste pendant la transduction du signal. Finalement, des méthodes biochimiques comme la co-immunoprécipitation (co-ip) et le GST pull-down ont été utilisées pour vérifier les résultats de BRET obtenus et ont montré la présence d'une interaction physique entre les protéines d'intérêt.

Toutes ensemble, ces données ont montré que les canaux Kir3 ou l'AC s'associent d'une manière constitutive au récepteur β_2 AR et que les complexes étaient capables de maintenir leur intégrité même suite à l'activation du récepteur. Suite à cette étude, une série d'autres études, utilisant le BRET et/ou des techniques biochimiques, ont pu identifier la présence de différents complexes récepteur-effecteur [260-263].

À ce jour, la liste des complexes récepteur-effecteur identifiés est devenue longue. Cependant, parmi toutes les études réalisées, très peu sont celles qui se sont intéressées à caractériser l'assemblage des effecteurs naissants avec le récepteur ou à identifier si cet assemblage se produit avant ou suite à l'adressage des protéines à la membrane plasmique. Plusieurs publications provenant d'un même laboratoire se sont penchées sur ces questions. Une première observation a montré qu'un blocage au niveau du transport des protéines du RE vers les membranes du Golgi avec la brefeldine A n'empêche pas l'association du récepteur dopaminergique de type 4 avec les canaux Kir3 [259]. Cette observation suggère ainsi que le canal Kir3 interagit avec ses partenaires de signalisation avant son apparition à la membrane plasmique. De même, d'autres études ont permis l'identification d'un complexe entre le récepteur β_2 AR et le canal Kir3 [263] ou l'ACII [260] durant le transport des protéines vers la membrane plasmique.

Récemment, une étude a permis de montrer non seulement la formation d'un complexe entre les canaux Kir3 et les récepteurs GABA_B exprimés dans les cellules de Purkinje [262], mais

aussi, d'indiquer l'implication de ces mêmes canaux dans la modulation de la neurotransmission glutamatergique dans le cervelet. Ces données indiquent clairement que les complexes récepteur-effecteur peuvent être fonctionnels et occuper des rôles d'intérêt dans les fonctions biologiques.

Une fois en complexe, certains récepteurs et effecteurs se comportent comme une seule unité signalétique. Il a été récemment rapporté, dans des systèmes d'expression et dans les neurones DRG, que les récepteurs ORL1, structurellement liés aux MOR, DOR et KOR [264-266], forment des complexes de signalisation avec les canaux calciques de type N [267]. Il a été rapporté aussi qu'une stimulation prolongée (30 min) à la nociceptine induit non seulement une internalisation du récepteur ORL1 mais aussi du canal calcique [102]. Un effet qui a été mis en parallèle à une diminution au niveau de l'entrée de calcium médiée par ces canaux. Ces résultats indiquent que le récepteur et l'effecteur en complexe se comportent comme une seule unité signalétique et que la formation d'un tel complexe de signalisation est capable de générer des mécanismes, précédemment non reconnus, pour la régulation de l'activité des effecteurs dans les voies de la douleur.

1.4 Désensibilisation, endocytose et tolérance aux opioïdes

Le développement d'une tolérance à l'effet analgésique est un des principaux obstacles qui limitent l'utilisation des opioïdes pour traiter les douleurs sévères en milieu clinique. Dans ce qui suit, nous allons examiner les différentes formes de tolérance et mettrons un accent particulier sur les récents efforts réalisés pour comprendre les principaux mécanismes moléculaires qui contribuent au développement de la tolérance à l'analgésie lors de l'administration répétée d'opioïdes.

1.4.1 La tolérance à l'analgésie

Les analgésiques dérivés de l'opium figurent parmi les analgésiques les plus efficaces dans le traitement des douleurs sévères. Cependant, ils produisent une tolérance à l'analgésie qui se définit par la diminution de l'efficacité thérapeutique d'une drogue suite à son

administration répétée. Par conséquent, ce phénomène explique la nécessité d'augmenter la dose de drogue administrée pour maintenir un effet analgésique constant. La tolérance peut être séparée en deux catégories principales: innée ou acquise. La tolérance innée se réfère à une diminution dans la sensibilité déterminée génétiquement pour un médicament. Dans la plupart des situations, la tolérance innée est déterminée lors de l'administration de la dose initiale. En revanche, la tolérance acquise se définit par une diminution progressive, à posologie constante, de la réponse observée suite à l'utilisation continue d'un médicament. La tolérance acquise peut être subdivisée en trois types principaux, basés sur le mécanisme en vigueur: pharmacocinétique, pharmacodynamie ou apprise.

La tolérance pharmacocinétique se produit lorsque apparaît, en fonction du temps, des changements dans la distribution, l'élimination ou le métabolisme du médicament. Ce phénomène apparaît souvent en conséquence du médicament étant un inducteur ou un inhibiteur du transporteur ou de l'enzyme métabolique. Un des mécanismes les plus communs est une augmentation de la vitesse du métabolisme de certaines drogues, comme dans le cas des barbituriques. La tolérance pharmacodynamique, de son côté, se manifeste par des changements adaptatifs tels que des changements dans la densité des récepteurs à la membrane induisant ainsi une réduction de la réponse à une concentration donnée du médicament. Comme on peut le voir à partir de la description ci-dessus, les approches pharmacocinétiques et pharmacodynamiques se complètent. L'évaluation de la quantité du médicament arrivant au site d'action ainsi que l'identité de l'action elle-même sont deux activités essentielles à l'enquête complète de l'interaction entre le médicament et le corps. Par conséquent, ces activités jouent un rôle important dans le développement de nouveaux médicaments et l'utilisation de ces derniers dans le cadre clinique. La dernière classe de tolérance acquise est attribuée à l'apprentissage (tolérance apprise). Cette dernière peut être comportementale ou conditionnée (associée à des repères situationnels ou à des signaux dans l'environnement) et fait référence à une réduction de l'effet d'un médicament suite à l'activation de certains mécanismes de compensation qui peuvent être appris suite à l'administration répétée de ce médicament.

Somme toute, on pourrait dire que l'utilisation à long terme d'opioïdes pourrait être problématique en raison du développement de plusieurs formes de tolérance limitant ainsi l'effet analgésique de ces médicaments suite à leur administration prolongée.

Les maladies chroniques, comme le cancer, peuvent être accompagnées de douleurs sévères, surtout dans leurs phases évoluées. Pour soulager ce type de douleur, plusieurs classes de médicaments peuvent être conseillées. Ces dernières peuvent être utilisées seules ou en association. Cependant, pour s'opposer aux défis présentés par la tolérance aux opiacés, une approche thérapeutique qui suit l'échelle préétablie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pourra être proposée (Figure 13).

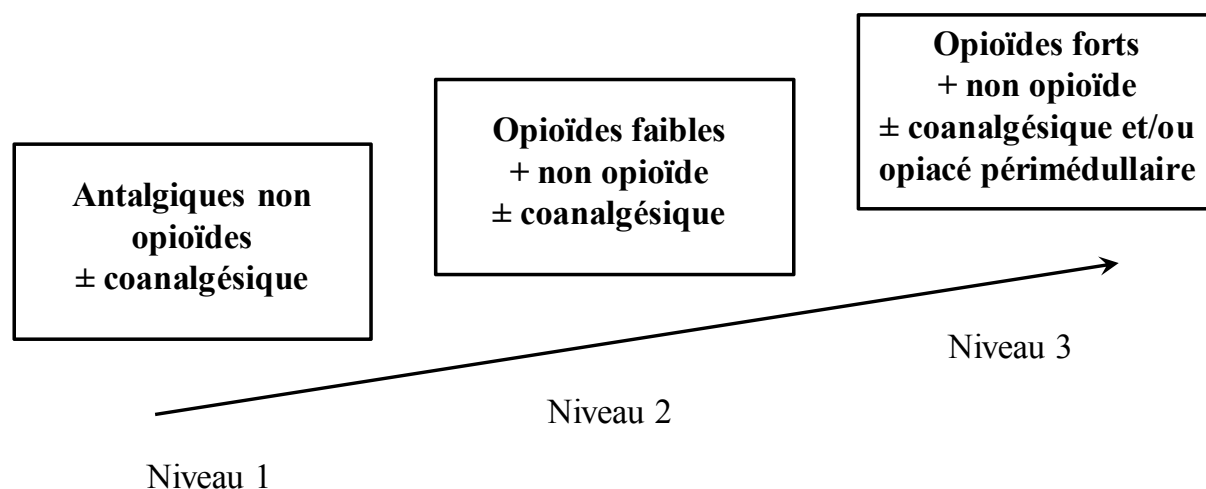


Figure 14. Les paliers de l'OMS pour le traitement des douleurs nociceptives.

Dans cette approche, la thérapie analgésique est initiée avec un analgésique non opioïde. Si la condition progresse et la douleur devient insupportable, le non-opioïde est remplacé par un opioïde faible. Finalement, un opioïde fort est présenté comme une étape terminale [268].

Bien que les recommandations établies par l'OMS visent à soulager la douleur ressentie et améliorer la qualité de vie des personnes souffrant de douleurs chroniques, le problème sous-jacent de la tolérance aux opiacés reste entier. En conséquence, la nécessité de développer des stratégies claires et efficaces pour produire des médicaments qui préservent leur efficacité thérapeutique persiste. La suffisance d'une telle nécessité peut cependant être achevée par la conception et le développement de nouveaux agents qui n'activent pas les voies de la tolérance ou par l'utilisation de traitements auxiliaires qui peuvent réduire ou inverser la tolérance développée. Pour ce faire, une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires activés lors de l'administration répétée des opiacés s'avère nécessaire.

1.4.2 Mécanismes moléculaires de la désensibilisation des RO

Certaines des actions indésirables comme la tolérance, la dépendance et l'abus apparaissent habituellement après une administration répétée d'opioïdes, et ont été liés à des adaptations qui se développent pour contrecarrer l'activation prolongée des RO [269, 270]. Ces changements adaptatifs ont été décrits à différents niveaux d'organisation dans le système nerveux central, allant du récepteur et les altérations cellulaires jusqu'aux modifications fonctionnelles de différents réseaux de neurones [271]. Cependant, malgré la présence d'une exposition chronique à un signal (ligand) dans l'environnement péricellulaire, les réponses cellulaires générées sont en général de courte durée (secondes à quelques minutes). Pour éviter la production d'une réponse cellulaire intensifiée, de nombreux mécanismes moléculaires se déclenchent pour désactiver les voies de signalisation et atténuer la sensibilité d'un tissu à une stimulation continue. Cette régulation qui se produit à plusieurs niveaux (ligand extracellulaire, récepteur membranaire et protéines régulatrices cytoplasmiques) résulte par un déclin progressif de l'efficacité de signalisation, un phénomène connu sous le nom de désensibilisation.

Les mécanismes de désensibilisation des RO ont été initialement caractérisés dans des lignées cellulaires immortalisées [272], mais des études plus récentes ont étendu ces observations jusqu'aux cultures neuronales [273-275] et les modèles animaux [26, 276-278]. Les études réalisées sur des lignées cellulaires immortalisées ont montré que, comme pour bien d'autres RCPG, l'activation des RO comprend une série de changements conformationnels [230, 279] qui déclenchent non seulement les mécanismes de signalisation mais aussi ceux de la désensibilisation du récepteur [280, 281]. En conséquence, la signalisation du récepteur est atténuée rapidement (cinétique de l'ordre de secondes à quelques minutes) après son activation [280]. Deux mécanismes de désensibilisation se présentent: la désensibilisation homologue, impliquant une phosphorylation par les protéines kinases des RCPG (kinases de la famille des GRKs) et la désensibilisation hétérologue qui fait intervenir des protéines kinases activées par des seconds messagers (l'AMPc dans le cas de la PKA ainsi que le diacyl glycérol (DAG) et le calcium pour la PKC) [282, 283]. La désensibilisation hétérologue, comme son nom l'indique, peut être initiée indépendamment de l'état conformationnel du récepteur. Autrement dit, elle peut se produire sur un récepteur inactif

suite à sa phosphorylation par la PKA ou la PKC activée par un autre récepteur. Pour les fins de cette thèse, seule la désensibilisation homologue sera présentée (Figure 14). Comme on a déjà mentionné, la désensibilisation dite homologue fait intervenir des kinases spécifiques aux RCPG, les GRKs. La famille des GRKs est composée de sept isoformes différentes (GRK1-7) qui présentent de fortes homologues de séquence et qui appartiennent à la famille des sérines/thréonines kinases [283]. La phosphorylation par les GRKs est un phénomène très rapide et ne cible que le récepteur dans sa conformation active [284]. Les GRKs phosphorylent les résidus Ser/Thr de la troisième boucle intracellulaire et de la queue C-terminale du récepteur augmentant ainsi l'affinité de recrutement d'une protéine cytoplasmique appelée la β arr au récepteur activé [285, 286]. Une étude parue en 2001 montre que la β arr pourrait se lier directement au domaine C-terminal et à la troisième boucle intracellulaire du récepteur DOR [287]. En même temps, une autre étude est venue compléter cette première étude et montre que la β arr ne pourrait se lier au domaine C-terminal que lorsque ce dernier devient phosphorylé [288].

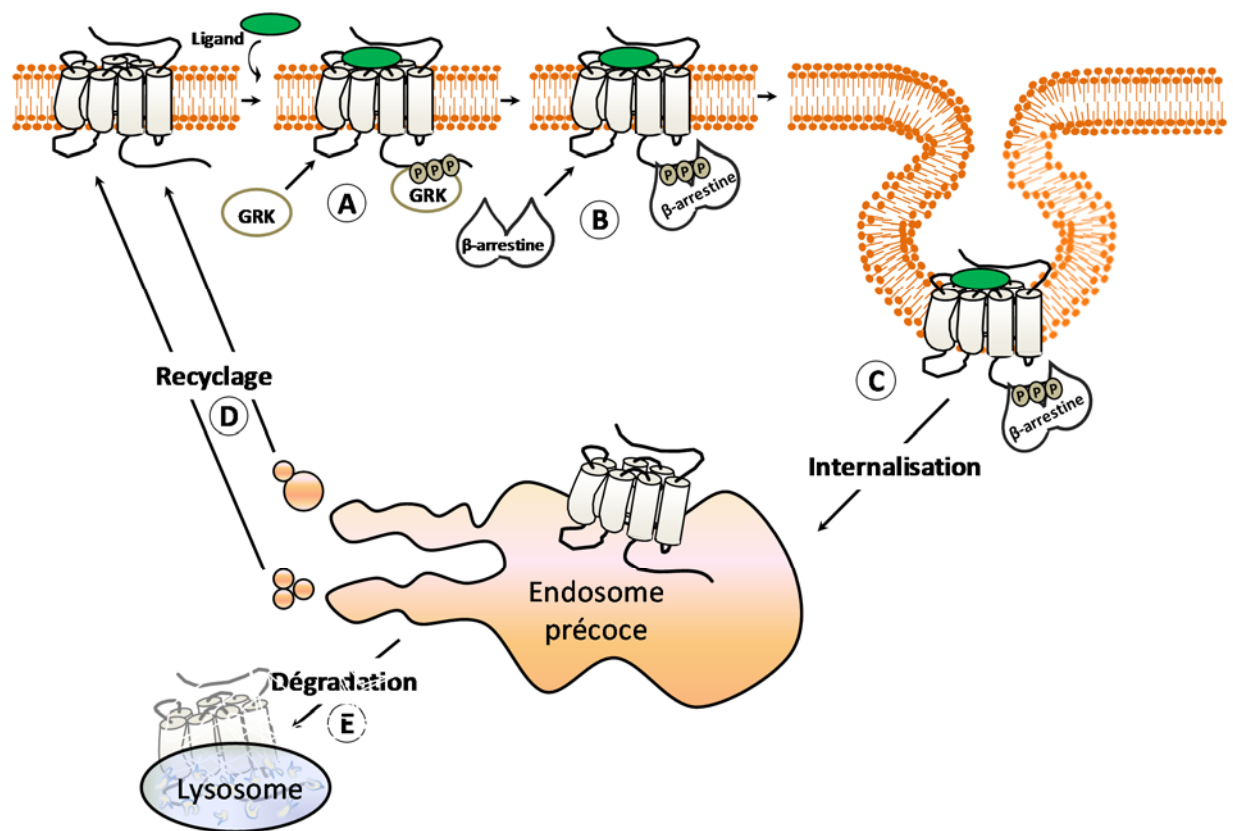


Figure 15. Désensibilisation homologue et internalisation des RCPG. Lorsqu'un ligand vient activer un récepteur, un mécanisme de régulation de ce dernier est déclenché. Ce mécanisme débute par la phosphorylation du récepteur par la GRK (A). Cette phosphorylation augmente l'affinité pour la β -arrestine qui se trouve ainsi recrutée vers le récepteur phosphorylé (B). L'interaction avec la β -arrestine empêche toutes nouvelles activations des protéines G par le récepteur et induit l'endocytose de ce dernier (C). Dans les endosomes, le récepteur internalisé peut recycler à la membrane (D) ou bien se diriger vers les lysosomes (E) pour être dégradé.

Une fois recrutée, la β arr provoque un découplage fonctionnel entre le récepteur et sa protéine G (240) conduisant ainsi à l'arrêt de la signalisation protéine G-dépendante médiée par le récepteur. Pour réussir sa mission de découplage, la β arr devrait être capable d'occuper, du moins en partie, le domaine permettant l'activation de la protéine G par le récepteur. Si cela serait possible, la β arr recrutée entamerait une compétition avec la sous-unité $G\alpha$ pour le site de liaison sur le récepteur phosphorylé induisant ainsi l'arrêt de la signalisation malgré la présence continue de l'agoniste. Cette hypothèse a récemment été vérifiée en modélisant le cristal du complexe formé entre le récepteur β_2 AR et la β arr1 indiquant ainsi l'insertion de la protéine régulatrice à l'intérieur des domaines hélicoïdaux suite au mouvement des passages transmembranaires 3, 5 et 6 du récepteur [289] (Figure 15).

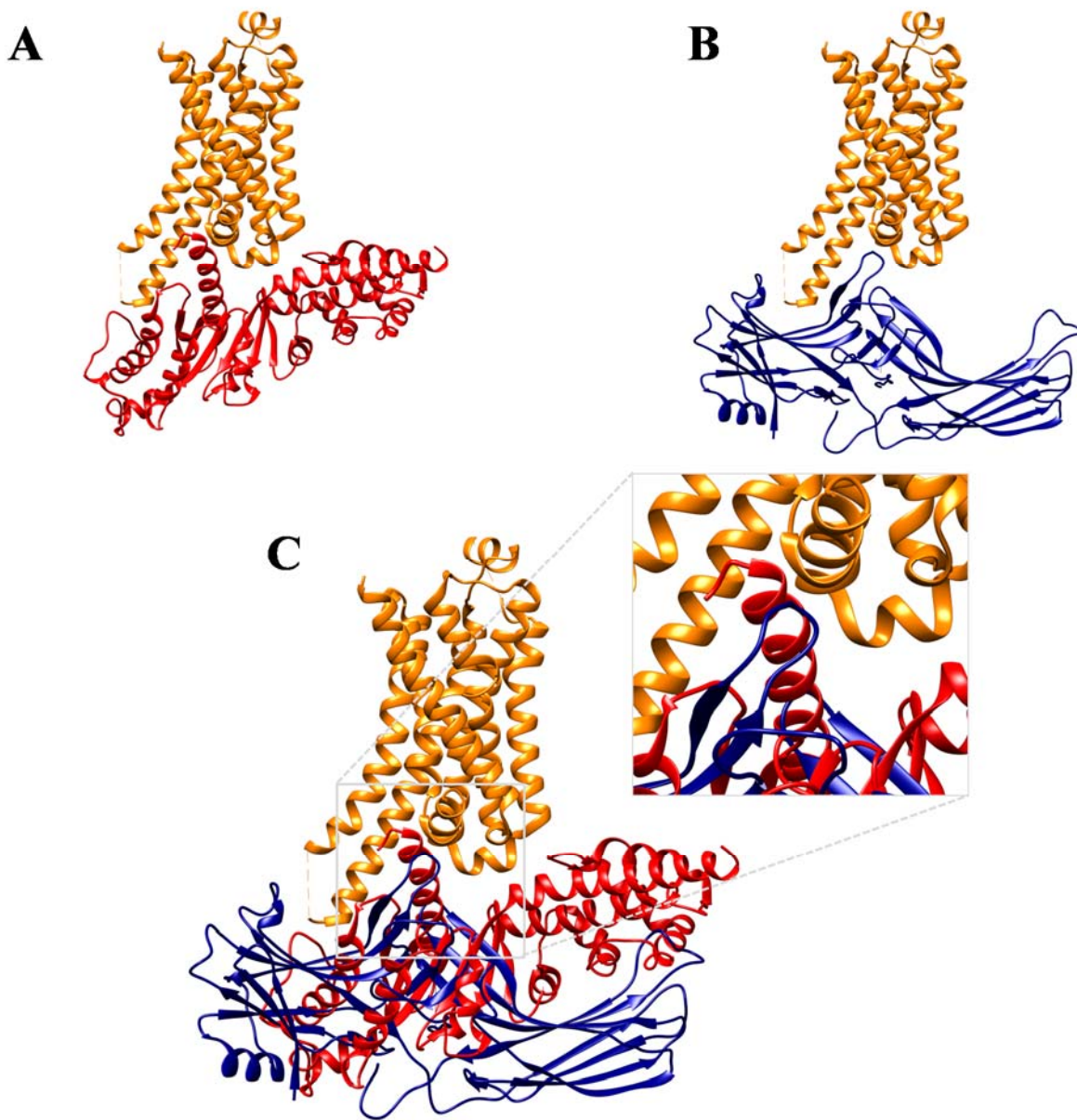


Figure 16. Représentation des sites d'interaction de la sous-unité $G\alpha$ (GTP) et de la β arr sur le récepteur β_2 AR. La structure cristalline du récepteur β_2 AR (orange) en complexe avec la sous-unité $G\alpha_s$ (GTP) (rouge) (A) (modifiée à partir de PDB: 3sn6) ou la β arr1 (bleu) (B) (modifiée à partir de PDB: 4JQI) indiquent que ces deux dernières protéines partagent un site de liaison commun à l'intérieur des domaines hélicoïdaux du récepteur β_2 AR. Une superposition des deux structures cristallines du récepteur β_2 AR en utilisant le logiciel Chimera est représenté en (C) avec un agrandissement du site de compétition entre la sous-unité $G\alpha_s$ (GTP) et la β arr1 sur les domaines hélicoïdaux du récepteur.

1.4.3 L'internalisation des RO

La désensibilisation des RO par la β arr, consécutive à leur phosphorylation par les GRK et/ou les protéines kinases activées par les seconds messagers, se poursuit par leur disparition de la surface cellulaire. Les récepteurs ainsi internalisés pourraient être dirigés vers les endosomes pour y être déphosphorylés et libérés de leurs ligands puis relocalisés à la surface pour initier un nouveau cycle cellulaire [290, 291]. Autrement dit, l'internalisation permettrait de restituer les RO fonctionnels à la membrane, un phénomène connu sous le nom de resensibilisation. Des études ont montré que les récepteurs MOR [292] et DOR [293-295] peuvent subir un recyclage qui contribue à leur resensibilisation fonctionnelle. Cependant, les récepteurs pourraient aussi être dirigés vers le compartiment lysosomal [296, 297] mettant ainsi une fin éternelle à leur signalisation. Dans ce dernier cas, l'internalisation conduit à une désensibilisation prolongée du fait de la dégradation protéolytique du récepteur. Somme toute, l'internalisation est sans contredit une étape importante dans la signalisation des RO.

Plusieurs mécanismes d'internalisation des RO se présentent dont les principaux sont l'internalisation par des puits tapissés de clathrines et l'internalisation par des compartiments lipidiques de type caveolae. Or, étant donné que les RO sont majoritairement internalisés par la voie des vésicules de clathrine [298], seule cette dernière sera abordée. Là aussi, la β arr joue un rôle crucial. En plus de son rôle dans la désensibilisation des récepteurs, la β arr joue le rôle d'une protéine d'échafaudage et facilite ainsi la connexion des récepteurs à la machinerie d'endocytose. Dans cette machinerie, plusieurs protéines comme la sous-unité β 2-adaptin de la protéine adaptatrice 2 (AP-2) [299] et la chaîne lourde des clathrines [300] jouent un rôle important dans la formation des puits de clathrines. Une fois les puits formés, une GTPase nommée dynamine intervient dans la fermeture et la scission des puits au niveau de la membrane permettant ainsi leur libération dans le cytoplasme [244]. Ce dernier rôle identifié pour la β arr explique pourquoi la grande majorité des ligands qui favorisent la désensibilisation fonctionnelle induisent aussi l'internalisation du récepteur.

Des études sur les tranches de cerveau et les cultures neuronales ont confirmées que les récepteurs MOR neuronaux peuvent subir une internalisation β arr-dépendante par des agonistes complets comme le DAMGO et des agonistes partiels comme la morphine [273]. Cependant, l'internalisation qui suit une exposition de courte durée à la morphine peut varier

entre les différentes populations neuronales. En particulier, alors que ce médicament induit une endocytose du récepteur MOR dans les neurones du striatum [273] et du plexus entérique [301, 302], ce dernier fut sans effet dans le locus coeruleus [274, 303] ou même dans les neurones du DRG [275]. Ces différences ne sont pas surprenantes puisqu'une internalisation par un agoniste partiel, comme la morphine, est estimée être influencée par le type et le profil d'expression endogène de protéines d'endocytose exprimées dans chaque sous-type neuronal. En accord avec cette interprétation, il a été montré qu'une exposition prolongée à la morphine augmente l'expression de la dynamine dans les neurones entériques, faisant de cet agoniste un ligand capable d'internaliser les récepteurs MOR exprimés dans ce type de neurones [302].

1.4.4 Relation entre l'internalisation et le développement de la tolérance aux opioïdes

La relation entre l'internalisation et le développement de la tolérance à l'analgésie se poursuit d'une manière active pour DOR. Un rapport par Pradhan et al, 2009 [278] a récemment établi qu'une seule injection de SNC-80 produit l'internalisation *in vivo* de DOR et le développement d'une tolérance analgésique aigue. Par contre, l'administration d'une dose équianalgésique de AR-M1000390 ne fut capable de produire ni une internalisation du récepteur ni une modification au niveau de la réponse analgésique. Sur la base de ces observations, il serait probable de spéculer que la tolérance aigue aux agonistes DOR est déterminée par l'internalisation. Toutefois, cette interprétation a été exclue par les résultats obtenus avec la deltorphine II, qui malgré sa forte capacité à induire de l'internalisation [304], ne fut capable de produire une tolérance aigue [305]. La raison qui expliquerait la différence au niveau du potentiel de tolérance affichée entre le SNC-80 et la deltorphine II reste à être élucidée. Cependant, l'analyse du transport post-endocytique pourrait aider à clarifier cette différence. Des études sur des lignées cellulaires immortalisées indiquent que l'internalisation par SNC-80 n'est pas suivie par un recyclage des récepteurs [294]. De plus, des études *in vivo* montrent que l'administration du SNC-80 est suffisante pour piéger les récepteurs DOR dans le cytosol pour une durée de quatre heures durant lesquelles la tolérance analgésique est maximale [278]. D'autre part, l'internalisation par des analogues de la deltorphine est associée

à un recyclage partiel et à une resensibilisation de la signalisation de DOR [306]. Ensemble, ces deux derniers phénomènes contribuent à produire une récupération plus rapide de l'efficacité analgésique lors d'une administration répétée de ce type de ligands [305]. L'implication du transport post-endocytaire a été corroboré par une étude récente, qui a permis d'expliquer la différence dans la capacité de deux agonistes complets, le SNC-80 et le DPDPE, capables d'internaliser efficacement le récepteur DOR, à conserver différemment leur efficacité à induire une réponse analgésique aiguë. Il faut pourtant signaler que les facteurs moléculaires responsables du triage des RO vers les voies de recyclage ou de dégradation sont multiples. Ces derniers incluent la stabilisation des récepteurs dans des conformations agonistes-dépendantes qui pourraient favoriser ou non l'interaction des récepteurs avec des protéines de triage comme les GASPs (protéine de triage associée aux RCPG) ou la β arr [27]. Cette dernière notion est supportée par des données qui indiquent que le récepteur DOR est capable d'adopter plusieurs conformations actives [230] qui sont distinctivement modulées par la tyrosine kinase Src [307, 308] qui à son tour est impliquée dans la modulation de la capacité du récepteur DOR à recycler [295]. L'existence d'une multitude de facteurs intervenant dans la régulation de la capacité des récepteurs à signaler n'étaient pas nécessairement prévue dans les études réalisées dans les systèmes hétérologues. Cependant, ces réponses devraient être examinées avec précaution pour produire des analgésiques qui préservent leur capacité à signaler.

1.4.5 Désensibilisation au niveau des effecteurs

La comparaison des actions analgésiques évoquées par les agonistes qui produisent ou non une internalisation du récepteur DOR confirme que, semblable à ce qui a été observé pour le récepteur MOR, ces deux types d'agonistes induisent une tolérance suite à leurs administrations répétées [26, 305]. Remarquablement pour certains de ces agonistes, les mécanismes conduisant à la désensibilisation des signaux, médiés par l'activation du récepteur DOR, impliquent le récepteur lui-même alors que pour d'autres, la désensibilisation se réalise au niveau de l'effecteur. Par exemple, tandis que la tolérance induite par le SNC-80 implique la désensibilisation du récepteur DOR [27], le ligand AR-M1000390, de son côté, laisse DOR non affecté, mais réduit la capacité des canaux Cav à répondre aux stimuli [26].

De plus, les études montrent que la relation entre l'internalisation du récepteur et la désensibilisation des effecteurs semble être influencée par le type cellulaire et l'effecteur considéré. En particulier, des données montrent que 20 à 30 min d'exposition des neurones DRG et des neurones du LC à des ligands capables d'induire l'internalisation du récepteur MOR a été associée à la désensibilisation des réponses médiées par les canaux ioniques [274, 303]. Cependant, les données ont montré aussi que la séquestration de MOR ne semble pas être un facteur nécessaire pour la production de la désensibilisation observée [274, 303]. D'autre part, en interférant avec la séquestration des récepteurs MOR du striatum, une réduction partielle de la désensibilisation de la réponse cyclase évoquée par DAMGO et la morphine a été observée [309].

En plus de l'influence que pourrait induire l'internalisation du récepteur, le mécanisme de base de la désensibilisation semble également être effecteur spécifique. En effet, il a été montré, dans les neurones DRG, que les canaux Cav de type N subissent une désensibilisation rapide qui n'a pas été affectée par β arr2 KO [310], mais a plutôt été médiée par un mécanisme hétérologue agissant en aval de l'activation du récepteur [275, 311]. En revanche, la désensibilisation des canaux Kir dans les neurones du LC était homologue [303] et dépendait de la combinaison de l'activité de ERK1/2, de la protéine GRK2 et de la β arr2 [312]. La β arr2 a été aussi impliquée dans la désensibilisation des réponses de l'adénylate cyclase suite à une exposition prolongée des récepteurs MOR du striatum à la morphine et au DAMGO [309]. Cependant, en dépit de sa capacité à déclencher la régulation de MOR, l'exposition à la morphine induit la suractivation de la cascade d'AMPC dans le striatum [313], ce qui suggère que la désensibilisation du récepteur MOR, lorsque associé à cet effecteur, pourrait ne pas suffire pour complètement éviter les mécanismes cellulaires compensatoires.

Cette multiplicité dans les mécanismes de régulation témoigne de la difficulté de développer un moyen universel pour contrôler la tolérance analgésique. Mais, d'autre part, peut fournir une nouvelle stratégie pour le développement de nouveaux analgésiques plus spécifiques.

2. Hypothèse et objectifs

Dans cette thèse, nous avons testé l'hypothèse qui indique que le récepteur DOR pourrait interagir directement avec ses partenaires de signalisation. Pour tester cette hypothèse, nous avons débuté, dans la première partie de l'étude, par surveiller les interactions entre ce récepteur, les sous-unités de la protéine G et un des effecteurs du récepteur DOR, le canal Kir3. Dans le cas où ces interactions pourraient avoir lieu et sachant que le récepteur DOR internalise suite à une stimulation prolongée avec les agonistes opioïdes, on s'était demandé si le canal Kir serait capable de suivre le récepteur dans le compartiment intracellulaire. Pour ce faire, nous avons évalué, dans la deuxième partie de l'étude, la stabilité de l'interaction DOR/Kir3 au cours de différentes périodes de stimulation du récepteur DOR avant de finalement caractériser l'effet de telles stimulations sur l'internalisation de chacun des composants membranaires du complexe signalétique DOR/Kir3.

1) Étude de l'interaction entre le récepteur DOR, sa protéine G et le canal Kir3: L'information conformationnelle est transmise du récepteur au canal via la protéine G.

Cette étude fut effectuée à la suite de nombreux indices démontrant la présence de plusieurs interactions RCPG/protéine G [7, 226, 230, 314-316] et RCPG/effecteur [260-263, 267] et a permis de montrer que le récepteur DOR, la protéine $G\alpha\beta\gamma_2$ et le canal Kir3.1/Kir3.2 forment un complexe constitutif qui maintient son intégrité suite à une stimulation aigue avec un agoniste complet du DOR. Une fois le complexe établi, notre objectif consistait à identifier la voie que le récepteur adoptait pour activer son effecteur ionique. On a estimé ainsi qu'une surveillance, en temps réel, des interactions établies entre les composants de notre complexe suite à une stimulation avec différents agonistes DOR serait d'une grande utilité pour accomplir un tel objectif.

2) Étude de la régulation du complexe DOR/Kir3 suite à une stimulation prolongée par différents agonistes DOR: l'effecteur Kir3 internalise avec le récepteur.

Cette étude fait suite à nos premiers résultats qui montrent que le canal Kir reste en complexe avec le récepteur DOR durant les premières phases de transduction du signal. Étant donné que plusieurs données montrent l'internalisation du récepteur DOR suite à sa

stimulation soutenue [27, 278, 317], l'objectif de la présente étude consiste à caractériser la stabilité de l'interaction DOR/Kir suite à l'internalisation du récepteur et à identifier, dans le cas où l'interaction reste maintenue, la voie d'internalisation du complexe DOR/Kir.

3. Résultats

3.1 Première publication

Conformational Dynamics of Kir3.1/Kir3.2 Channel Activation via δ -Opioid Receptors

Melissa Richard-Lalonde*, **Karim Nagi***, Nicolas Audet, Rory Sleno, Mohammad Amraei, Mireille Hogue, Gianfranco Balboni, Peter W. Schiller, Michel Bouvier, Terence E. Hébert and Graciela Pineyro.

* Equal contribution

Molecular Pharmacology, 83(2):416-428, (2013).

3.1.1 Introduction et mise en contexte du premier article

Les interactions protéine-protéine présentent une grande importance pour pratiquement tous les processus biologiques. Ces interactions nous aident à caractériser la formation et le comportement d'un complexe multi-protéique et parfois, à déterminer et même réguler de nouvelles voies de signalisation d'une protéine tout en lui identifiant de nouveaux partenaires d'interaction et des ligands qui la modulent. Par conséquent, l'analyse détaillée de ce type d'interactions est essentielle non seulement pour comprendre la plupart des processus physiologiques mais aussi, pour le développement de nouveaux ligands thérapeutiques. Plusieurs méthodes expérimentales non radioactives ont été développées, durant les dernières années, pour détecter les interactions protéine-protéine en temps réel. Parmi ces dernières, certaines techniques, comme la spectroscopie par résonance plasmonique, nécessitent l'insertion de protéines purifiées à l'intérieur d'une membrane bi-couche lipidique artificielle

[318, 319]. Alors que d'autres, comme la co-immunopurification ou la purification par fusion avec la Glutathion S-transférase (GST-pull down), réussissent à détecter les interactions voulues mais dans des lysats cellulaires ou des protéines purifiées. Le défi de ce premier article était donc de détecter, dans des *cellules vivantes*, les interactions protéine-protéine nécessaires pour transmettre l'information, codifiée par la liaison du ligand au récepteur DOR, vers l'effecteur Kir3.

Pour aborder ce défi, nous avons décidé d'utiliser la technique de BRET ou transfert de la bioluminescence par résonance énergétique. Cette technique utilise la capacité d'une protéine à émettre son énergie bioluminescente vers une autre protéine fluorescente qui reçoit cette énergie et émet une fluorescence de couleur verte. Le transfert énergétique, représenté par le ratio de l'énergie fluorescente produite sur celle lumineuse émise (appelée aussi ratio BRET), impose que les deux protéines d'intérêt soient en proximité d'où son utilité pour étudier les interactions protéine-protéine. La reproductibilité élevée des essais BRET et la fiabilité de ses mesures font de cette technique une option intéressante pour la conception d'essais de criblage à haut débit de molécules thérapeutiques. Cette application, récemment observée pour le BRET concerne le développement de biosenseurs. Chaque biosenseur BRET représente une interaction protéine-protéine qui permet de déterminer l'efficacité d'une drogue à initier sélectivement une cascade signalétique fonctionnelle impliquant une protéine cible. Par conséquent, cet outil permet de sélectionner à partir d'une librairie de drogues, celles capables de produire le meilleur effet spécifique voulu.

En utilisant le BRET, nous avons détecté la présence d'une proximité stérique entre le récepteur DOR, le dimère $G\beta\gamma$ et le canal Kir3.1/Kir3.2 à l'état basal. Cela nous a encouragé à utiliser la technique de co-ip pour identifier la nature des interactions protéine-protéine observées. Nos résultats ont permis de montrer la présence d'une interaction physique constitutive entre nos protéines d'intérêt qui persistait même après la stimulation aigue du récepteur avec un agoniste complet. De plus, notre surveillance des changements BRET détectés entre les différents composants du complexe montre que le récepteur active son effecteur en lui transmettant un message conformationnel. Finalement, on a voulu caractériser la voie de transmission de ce message. Nos données montrent que le récepteur transmet l'information conformationnelle au dimère $G\beta\gamma$ par voie directe ou via la sous-unité $G\alpha$ et que le dimère $G\beta\gamma$ activé transmet l'information à son tour aux sous-unités Kir3.1 et Kir3.2 du

canal. Les résultats montrent aussi que les changements BRET, induits par les ligands DOR, à l'interface G β γ /Kir étaient prédictifs de la capacité d'un ligand à susciter un courant Kir3. Ensemble, ces données tracent les changements observés dans l'interaction G β γ /Kir comme voie indispensable pour transmettre l'information conformationnelle de DOR à Kir3 d'où l'idée d'utiliser cette interaction protéine-protéine comme biosenseur pour identifier l'efficacité d'un ligand opioïde à activer le canal Kir3. Cette étude est une des rares à montrer, à la fois, la présence d'un complexe entre un récepteur, sa protéine G et son effecteur et une des premières à identifier la voie de transmission d'une information conformationnelle d'un récepteur à son effecteur ionique.

Contribution: Dans cet article, j'ai conçu et réalisé des expériences pour les figures 1 à 4 ainsi que les figures 6 et 9 (participation à la conception de l'image présentée). Aussi, j'ai participé à l'analyse des résultats et l'écriture de l'article.

3.1.2 Article 1

CONFORMATIONAL DYNAMICS OF KIR3.1/KIR3.2 CHANNEL ACTIVATION VIA δ -OPIOID RECEPTORS (DORs)

Melissa Richard-Lalonde*; Karim Nagi*; Nicolas Audet; Rory Sleno; Mohammed Amraei;
Mireille Hogue; Gianfranco Balboni; Peter W. Schiller; Michel Bouvier; Terence E. Hébert
and Graciela Piñeyro

Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada (MR-L, KN, NA, MA, GP).

Département de Pharmacologie (MR-L, KN, NA, GP), Département de Psychiatrie (GP),
Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada.

Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Québec, H3G
1Y6, Canada (RS, TEH).

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), Université de Montréal,
Montréal, Québec, H3T- 1J4 Canada (MH, MB).

Department of Life and Environment Sciences, University of Cagliari, Italy (GB).

Laboratory of Chemical Biology and Peptide Research, Clinical Research Institute of
Montreal, Montreal, QC, Canada (PWS).

* Equal contribution (MR-L and KN).

Running title page

Running title: Kir3.1//Kir3.2 channel activation by DORs

Corresponding author:

Graciela Pineyro

Centre de Recherche du CHU Ste-Justine,

3175, Cote Ste-Catherine, Bureau 2722

Montréal, (Québec), H3T 1C5

Document statistics

Number of text pages: 35

Number of tables: 1

Number of figures: 9

References: 42

Abstract: 237 words

Introduction: 474 words

Discussion: 1604 words

List of non-standard abbreviations

ACII: adenylyl cyclase II; BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer; DOR: δ -opioid receptor; GPCR: G protein-coupled receptor; HK: high potassium; NMR: nuclear magnetic resonance; PTX: pertussis toxin; SNC-80: (+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide; TICP: H-Tyr-Ticpsi[CH₂-NH] Cha-Phe-OH; TIPP: H-Tyr-Tic-Phe-Phe-OH; UFP512: H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid

Abstract

This study assessed how conformational information encoded by ligand binding to δ -opioid receptors (DORs) is transmitted to Kir3.1/Kir3.2 channels. HEK293 cells were transfected with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) donor/acceptor pairs that allowed us to independently evaluate reciprocal interactions among signaling partners. These and co-immunoprecipitation studies indicated that DORs, $G\beta\gamma$ and Kir3 subunits constitutively interacted with one another. $G\alpha_o$ associated with DORs and $G\beta\gamma$ but, despite being part of the complex, no evidence of its direct association with the channel was obtained. DOR activation by different ligands left DOR-Kir3 interactions unmodified, but modulated BRET between DOR- $G\alpha_o$, DOR- $G\beta\gamma$, $G\alpha_o$ - $G\beta\gamma$ and $G\beta\gamma$ -Kir3 interfaces. Ligand-induced BRET changes assessing $G\beta\gamma$ -Kir3.1 subunit interaction: i) followed similar kinetics as those monitoring the $G\alpha_o$ - $G\beta\gamma$ interface, ii) displayed same order of efficacy as those observed at the DOR- $G\beta\gamma$ interface, iii) were sensitive to pertussis toxin and iv) were predictive of whether a ligand could evoke channel currents. Conformational changes at the $G\beta\gamma$ /Kir3 interface were lost when Kir3.1 subunits were replaced by a mutant lacking essential sites for $G\beta\gamma$ -mediated activation. Thus, conformational information encoded by agonist binding to the receptor is relayed to the channel via structural rearrangements that involve repositioning of $G\beta\gamma$ with respect to DORs, $G\alpha_o$ and channel subunits. Further, the fact that BRET changes at the $G\beta\gamma$ -Kir3 interface are predictive of ligand ability to induce channel currents points to these conformational biosensors as screening tools for identifying GPCR ligands that induce Kir3 channel activation.

Introduction

G protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK or Kir3) channels mediate slow postsynaptic inhibitory potentials and help regulate cell excitability in the heart and the brain [320]. Their activity is controlled by neurotransmitters such as monoamines, amino acids and peptides which upon binding to their respective receptors trigger Kir3 channel opening via stimulation of pertussis toxin (PTX)-sensitive Gi/o proteins [320]. The specificity and temporal precision of this signaling process has been attributed to the constitutive association of G protein-coupled receptors (GPCRs), G proteins and channel subunits [133, 321, 322]. In particular, *in vitro* and *in vivo* studies indicate that Gβγ subunits may directly associate with cytosolic domains of the channel [133, 323], an interaction that is present both before and during channel activation [321, 324]. Gαi/o is also thought to be part of the Kir3-G protein complex, but the way in which this subunit interacts with other complex components, particularly the channel, remains to be fully elucidated. Indeed, biochemical and biophysical studies show that Gα-GTP may directly interact with channel subunits [325, 326] while Gα-GDP would associate with the complex via the Gβγ dimer [324, 327]. Functional studies indicate that Gα actively participates in channel modulation both in its GDP- and GTP-bound states [324, 325] and have identified Gβγ interactions with Kir3 subunits as the mediator of channel activation [66, 321].

Altogether, the data available indicate that Kir3 activity is regulated by well-coordinated interactions at the interface of the channel and heterotrimeric Gαβγ subunits. What is less well defined are the dynamics of channel activation via GPCRs. In particular, little is known regarding how conformational information encoded by ligand binding to the

receptor is transmitted to the channel. Here we used BRET to investigate how ligand binding to δ -opioid receptors (DORs) modulated constitutive interactions among receptors, $G\alpha\beta1\gamma2$ subunits and neuronal Kir3.1/Kir3.2 channels. Results obtained showed that ligand binding to the receptor induced correlated conformational changes at BRET pairs assessing $G\beta\gamma$ interaction with DORs and Kir3 subunits. DOR activation also induced conformational rearrangements between DORs and $G\alpha$ and among the latter and $G\beta\gamma$ subunits. However, no evidence was found for conformational changes being directly transferred to the channel via $G\alpha$. Similarly, despite close proximity between DORs and Kir3 subunits, BRET assays did not reveal relevant structural rearrangements at this interface. We conclude that conformational information encoded by ligand binding to the receptor is essentially transferred to the channel via the $G\beta\gamma$ dimer and propose that a BRET biosensor that captures these changes may be a useful tool to screen for GPCR ligands that modulate Kir3 channel function.

Materials and Methods

Reagents.- Buffer chemicals, protease inhibitors, DPDPE, morphine, naloxone, naltrindole, pertussis toxin, anti-FLAG M2 affinity resin, and FLAG peptide were purchased from Sigma. [³⁵S]GTPγS and coelenterazine were from Perkin-Elmer. SNC-80 was from Tocris Cookson (Ellisville, MO), TIPP and TICPΨ were kindly provided by Dr. Schiller (Université de Montréal, Canada) and UFP512 was a generous gift from Dr. Balboni (University of Ferrara, Italy). Anti-rabbit Alexa-488 and anti-mouse Alexa 647-conjugated antibodies were from Molecular Probes.

DNA constructs.- Constructs encoding the yellow fluorescent protein (YFP) or *Renilla* luciferase (RLuc) fused in frame at the C-terminus of human DORs have been previously described [328] as have plasmids encoding YFP fused at the N-terminus of human Gγ2 or at the C-terminus of CD8-YFP [212]. Kir3.1/3.2 human subunits bearing Rluc at their C-terminus have also been described [132]. The recombinant plasmid encoding for GαoA tagged with luciferase at position 99 (GαoA99-Luc) was created from overlapping PCR from three fragments, then digested with the restriction enzymes SalI + NheI and, cloned in the XhoI + NheI sites of the expression vector pCDNA3.1 zeo(+) (Invitrogen). Two of the PCR fragments were created from pcDNA3.1(+) G protein αhαoA EE-tagged (cat number: #GNA00AEI00 from Missouri S&T cDNA Resource Center) with the primers: GNAO NheI forward: 5'-CAATGCTAGCGATATCGGTAC CACCATGGGATGTACTCTGAGCGCA-3', GNAoA Nterm-NAAIRS L reverse: 5'-CACCTTGCTGGTCATGGACCGAATGGCGGCATTCTCCTTATCACCATATTCGATGCCAA-3', GNAoA NAAIRS-Cterm forward: 5'-AATGCCGCTATTCGGTCCACTTTGGG

CATCGAATATGGT-3', GNAOa SalI reverse: 5'-CCCTCTAGAGTCGACTCAGTAC AAGCCGCAGCCCCG-3'. The third fragment encoding RlucII flanked by NAAIRS linkers was created by PCR from pCDNA3.1 Hygro (+) EPAC db bret2 sensor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584306>) with the following primers: NAAIRS-RlucII forward: 5'-AATGCCGCCATTCGGTCCATGACCAGCAAGGTGTACGACC-3' and RlucII-NAAIRS reverse: 5'-GGACCGAATAGCGGCATTCTGCTCGTTCTTCAGCACTCT-3'. Once assembled in one fragment by an overlapping PCR, the resulting product encoding a human EE-tagged GaoA Gprotein subunit with an internal RlucII flanked by NAAIRS linkers and the loop connecting helices α A and α B of the helical domain. The mutant human Kir3.1-Luc subunit lacking residues 183-342 (Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴²) was produced using overlapping PCR on a Kir3.1-Rluc in pRC-CMV. Primers used were T7 forward primer and 5'-GGAACTGGGAGAT-GAACATGCAGCCGATG-3' (PCR1). Forward 5'-CATGTTTCATCTCCCAGTTCCACG-CAAC-3' and reverse 5'-GGATCA TAACTTTTCGAAGTCATGG'3' (PCR2) followed by forward T7 primer and reverse 5'-GGATCATAAACTTTTCGAAGTCATGG-3' (PCR on the products of PCR1 and PCR2). The resulting product was subcloned into Kir3.1-Rluc in pRC-CMV using the NheI site. Kir3.1 subunits bearing a Flag tag at position 114 (extracellularly tagged FLAG-Kir3.1) were kindly provided by Dr. Deborah J. Nelson (University of Chicago, Chicago, Illinois).

Cell culture and transfections.- Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit/ml penicillin-streptomycin, at 37°C in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂. For transient expression of recombinant proteins, HEK293 cells were seeded at a

density of 3×10^6 cells in 100 mm petri dishes, cultured for 24 h and transfected with vectors encoding BRET constructs for DORs, G protein and Kir3.1/3.2 subunits along with untagged complementary complex components as specified in Table 1. Unless otherwise specified, transfections were performed with polyethylenimine (Polysciences, Warrington, PA) as previously described [329]. Forty-eight hours after transfection, cells were used for BRET, immunoprecipitation or electrophysiological experiments. For [^{35}S]GTP γ S binding assays HEK293 cells were stably transfected with Flag-DORs. Clonal cell lines were produced using Lipofectamine (Invitrogen) to transfect 6 μg of DNA/100 mm petri dish followed by selection with G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

BRET experiments.- Titration BRET assays were performed as previously described [330], in order to determine the relative amount of DNA constructs necessary to achieve a maximal BRET signal. Briefly, a fixed amount of donor-tagged proteins was co-expressed with increasing amounts of the vector coding for the acceptor. Untagged complementary signaling partners were also included, at levels that would support membrane expression of the complete signaling complex at all points of the titration curve. Donor-acceptor DNA ratios corresponding to the beginning of the saturation plateau were subsequently used for single point assays. Two days after transfection HEK293 cells expressing different BRET pairs were washed with phosphate buffered solution (PBS), and distributed into 96-well microplates (white Optiplate; PerkinElmer Life Sciences) at a concentration of 1-2 mg/ml. Cells were then incubated for three minutes with coelenterazine h (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) prior to the addition of the indicated ligands (10 μM), which were in turn introduced 2 min before taking BRET1 readings. The latter were obtained using a Victor3 plate reader (PerkinElmer; Life Sciences)

that allows the sequential integration of signals detected in the 440-480 nm (RLuc emission) and 520-550 nm (YFP emission) windows using filters with the appropriate band pass (Chroma). The BRET signal generated by each sample was determined by calculating the ratio of light emitted by YFP over the light emitted by RLuc. These values were then corrected by subtracting the background signal (detected when the RLuc-tagged construct was expressed without acceptor) from the BRET ratio detected in cells coexpressing both RLuc- and YFP (netBRET). For kinetic assays, cells were suspended and transferred to 96-well plates following which BRET was measured using a Mithras LB940 plate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) equipped with a microinjector that allowed automatic delivery of coelenterazine h and SNC-80 (10 μ M). The agonist was injected five minutes after the RLuc substrate, and BRET1 measures were obtained at room temperature, every 0.8 sec for a period of 6 min. Corrected netBRET1 values were obtained as above. Finally, for the calculation of a Z' factor describing reliability of the Kir3.1-RLuc/YFP-G γ 2 as a screening biosensor, the construct and complementary complex components were transfected into cells plated in 100mm dishes (4 million) using Lipofectamine (Life Technologies). The day after transfection cells were transferred onto 96 well plates (150,000 cells/well) and the following day readings were taken on attached cells (so as to emulate conditions used in screening campaigns). The day of the experiment cells were exposed to coelenterazine h 5 min prior to the addition of SNC-80 (10 μ M) or vehicle (DMSO). Immediately after these injections, 48 alternate readings were obtained for each condition, using the Mithras LB940 plate reader. Note: Because filters in the different plate readers were not the same, netBRET values obtained for Z' calculations were different from those obtained with the Victor3 plate reader.

The Z' factor for these assay conditions were calculated from the formula: $1 - (3\sigma_{\text{ligand}} + 3\sigma_{\text{CTL}}) / |\mu_{\text{ligand}} - \mu_{\text{CTL}}|$, as described by Zhang et al, (1999).

Immunoprecipitation assays were carried out as previously described [Audet et al, 2008]. Two days after transfection, HEK293 cells were exposed to DPDPE (10 μM ; 2 min) or vehicle and, at the end of incubation, were immediately used for membrane preparation. Membranes were prepared by suspending cells in lysis buffer (5 mM Tris pH 7.4, 3 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ soybean trypsin inhibitor, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ benzamidine) and homogenizing them in an Ultra-turrax homogenizer (IKA, Wilmington, NC). Following centrifugation at 500 g to pellet mitochondria and nuclei, the supernatant containing membranes and cytosol was recovered and centrifuged at 30,000 x g for 20 minutes. The resulting membrane pellet was resuspended in lysis buffer for a second round of centrifugation (30,000 x g; 20 minutes). Finally, membranes were suspended in solubilization buffer (0.5% n-dodecyl-maltoside, 25 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ soybean trypsin inhibitor and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ benzamidine) and agitated at 4°C for 2 hours, following which the solubilized material was centrifuged at 20,000 x g for 30 minutes. Flag-DORs or extracellularly tagged FLAG-Kir3 subunits were immunoprecipitated from the supernatant using anti-FLAG M2 antibody resin. Briefly, 40 μl of antibody-coupled resin equilibrated in solubilization buffer and supplemented with 0.1% bovine serum albumin (w/v) were added to 500 μl of solubilized membranes and incubated overnight at 4°C under gentle agitation. The next morning the resin was centrifuged, washed twice with 500 μl of solubilization buffer and four times with 500 μl of modified solubilization buffer (containing

0.1% instead of 0.5% *n*-dodecyl-maltoside (w/v)). Flag-tagged proteins were then eluted by incubating the resin for 10 minutes at 4°C with 100 µl of modified solubilization buffer containing the FLAG peptide (150 µg/mL). This elution was repeated three times, and the eluates were combined and concentrated by membrane filtration over Microcon-30 concentrators (Millipore). SDS sample buffer was then added and samples were used for SDS-PAGE. Resulting gels were transferred onto nitrocellulose (GE Healthcare) and Kir3.1-Luc or YFP-Gγ2 respectively recovered with Flag-DORs or extracellularly tagged FLAG-Kir3. subunits were revealed using mouse anti-Luc (1:1,000 Millipore) or rabbit anti-GFP (1:10,000; Abcam) antibodies followed by corresponding secondary HRP-conjugated antibodies (1:40,000; Amersham Biosciences). Chemiluminescence detection reagents (GE Healthcare) were used to reveal blotted proteins.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy.- Forty-eight hours after transfection HEK293 cells were seeded on L-polylysine-coated coverslips and grown as described above. Labelling of surface Flag-DORs was done by a “feeding technique” in which rabbit anti-Flag M2 antibody (1:100; Sigma) was introduced into the incubation medium for 30 min. At the end of this incubation period cells were washed in PBS and fixed with 3% paraformaldehyde (15 min, RT) followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 (15 min). Cells were then washed three times in PBS-1% BSA and incubated with mouse anti-Luc (1:100; Millipore) to label different Kir3.1-RLuc constructs. Corresponding fluorescence-conjugated anti-rabbit antibody Alexa 467 or anti-mouse antibody Alexa 488 (1:1000) were then introduced for a period of 30 min. At the end of incubation, cells were extensively washed and coverslips were mounted onto slides using mounting medium (Immu-Mount, Fisher). Immunofluorescence

microscopy was performed using a Leica DM550 Q microscope. Images were analysed using ImageJ software.

[³⁵S]GTPγS binding assays were carried out on membrane preparations as previously described [331]. Membranes were prepared as above and immediately resuspended in [³⁵S]GTPγS assay buffer (50 mM Hepes; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0.5% BSA and 3 μM GDP; pH 7.4) to yield 10 μg protein/tube. [³⁵S]GTPγS was used at 50nM and non-specific binding was determined in the presence of 100 μM cold GTP. Ligands were introduced at a final concentration of 100 nM and incubation was allowed to proceed for one hour at RT. The reaction was terminated by rapid filtration onto Whatman GF/C glass filters pre-soaked in water. Filters were washed twice with ice-cold wash buffer (pH 7) containing 50 mM Tris, 5 mM MgCl₂ and 50 mM NaCl, and the radioactivity retained was determined by liquid scintillation.

Electrophysiological experiments.- Twenty four hours post transfection, cells were trypsinized and resuspended in DMEM before plating on poly-D-lysine coated 35mm culture dishes. The following day cells were used for electrophysiological recordings. On the day when experiments were conducted, culture media was replaced with high potassium solution (HK⁺ external; 5mM NaCl; 140mM KCl; 2mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 20mM HEPES; 10 mM glucose pH 7.4; 300 mOsmol/L). The plate was placed on the microscope stage and the cells were perfused with HK external by a large volume gravity fed perfusion system until seal formation began. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass and when filled with a high potassium ATP/GTP containing solution (140mM KCl; 20 mM NaCl; 5mM EGTA; 5.4 mM MgCl₂; 10mM HEPES; 2.5 mM K₂ATP; 0.3mM Li₂GTP) had an internal resistance

between 2-5 M Ω . Cells were patched in the whole cell configuration and were voltage clamped with 85% compensation for series resistance using an Axopatch 200B and ensuring that cell capacitance was <30 pF. Cells were then subjected to a ramp protocol which changes the membrane potential from -100mV to +50mV at a rate of 1mV/ms using Clampex 10.2 software. The ramping protocol was then repeated every 250 ms for 75 s. Agonists were suspended in HK external (1 μ M final) and were applied to the cell by a small volume gravity fed perfusion system directly next to the patched cell. Once peak current was observed, agonists were washed out of the bath by perfusing HK external from a large volume gravity fed perfusion system. Trace data were presented by plotting the current at -100 mV during the ramp protocol against time using Clampfit 10.2. Data were collected with a low pass Bessel filter at 5kHz and digitized with a Digidata 1440A.

Results

Constitutive association of DORs, G β 1 γ 2 and Kir3.1/3.2 subunits

Kir3.1/3.2 subunits form the most abundant type of neuronal Kir3 channel and mediate the actions of numerous inhibitory neurotransmitters including GABA, dopamine and opioids [144]. In the particular case of opioids, Kir3.1/3.2 channels are essential for the analgesic actions of these drugs [142]. Within this context, we were interested in determining how agonist binding to DOR results in Kir3.1/3.2 channel activation. We had previously shown that Kir3.1/3.2 channels interact with GABA-B [263] and dopamine D2 receptors in HEK293 cells and native tissue [259], and had demonstrated that Kir3 subunits [133, 263] and GPCRs [212], including DORs [230] both constitutively and specifically associate to the G β γ dimer. To corroborate whether DORs were able to constitutively associate with Kir3.1/3.2 channels we used BRET and co-immunoprecipitation assays, two approaches that we have previously applied to monitor protein interactions within multimeric signaling complexes [133, 230, 263]. The association between DORs and Kir3.1/3.2 channels was first assessed by generating BRET titration curves in which a fixed amount of the donor Kir3.1-Rluc was co-transfected with increasing concentrations of the acceptor DOR-YFP, as well as with all relevant complementary complex components indicated in Figure 1A. As shown therein, cumulative amounts of DOR-YFP progressively increased energy transfer until reaching a plateau, indicating the existence of a spontaneous and specific interaction between Kir3.1-Luc and DOR-YFP [332]. Indeed, co-transfection of Kir3.1-Luc subunits with a CD8-YFP construct that has similar distribution as the receptor but does not interact with the channel or G proteins [212], produced marginal energy transfer that did not follow saturation kinetics. The specificity of DOR interaction with the channel effector was also established in displacement

assays where increasing amounts of untagged Kir3.1 subunits, but not adenylyl cyclase II (ACII), competed for the BRET signal generated by the Kir3.1-Luc/DOR-YFP pair. Moreover, the failure of ACII to compete for the Kir3.1-Luc/DOR-YFP BRET signal was not due to inadequate expression as indicated by the presence of increasing amounts of ACII immunoreactivity in progressive transfections (Figure 1A; *inset*).

DOR stimulation with the agonist DPDPE (10 μ M, 2 min) did not modify the titration curve generated for the Kir3.1-Luc/DOR-YFP pair. Comparison of titration curves by simultaneous fitting [333] indicated that addition of agonist did not alter BRET₅₀ (CTL: 1.5 ± 0.4 ; DPDPE: 1.3 ± 0.3 ; $p=0.78$; $n=3$) or B_{MAX} (CTL: 0.048 ± 0.004 ; DPDPE: 0.047 ± 0.003 ; $p=0.85$; $n=3$) values. This observation is consistent with the notion that neither the total amount of receptor associating with the channel, nor the way in which both proteins interact with one another, were modified by receptor activation. The spontaneous interaction between DORs and Kir3 subunits was then corroborated in co-immunoprecipitation assays carried out in HEK293 cells co-expressing Flag-DOR, heterotrimeric G $\alpha\beta\gamma$ 2 subunits and Kir3.1-Luc/3.2 channel subunits. In keeping with the constitutive interaction observed in living cells using BRET, immunoprecipitation of the receptor resulted in recovery of Kir3 channel subunits. Also consistent with BRET assays, the amount of channel subunits co-purified with the receptor was not modified by DOR stimulation with the agonist DPDPE (Figure 1B).

A second series of BRET assays also revealed a constitutive and specific transfer of resonance energy in the Kir3.1-Luc/YFP-G γ 2 pair (Figure 2A), corroborating the established ability of Kir3.1/3.2 channels to associate with G $\beta\gamma$ subunits [133, 321, 334]. This interaction could be observed both in cells that expressed DOR (Figure 2A) and in those that did not (*inset*), but only DOR-expressing cells displayed a BRET signal that was sensitive to receptor

stimulation by DPDPE (10 μ M, 2 min). Simultaneous curve fitting revealed that in cells expressing the receptor, DPDPE significantly increased B_{MAX} (CTL: 0.16 ± 0.01 ; DPDPE: 0.20 ± 0.01 ; $p < 0.01$; $n=3$) without modification of $BRET_{50}$ values (CTL: 5.1 ± 1.2 ; DPDPE: 3.6 ± 0.6 ; $p=0.23$; $n=3$). In contrast, the non-specific interaction between Kir3.1-Luc and CD8-YFP did not respond to agonist. Immunoprecipitation experiments showing that G γ 2 subunits could be co-immunopurified with Kir3.1 subunits corroborated the constitutive association of the channel and the G $\beta\gamma$ dimer (Figure 2B). On the other hand, pre-exposure to DPDPE failed to modify the amount of Kir3.1-G γ 2 complex recovered. Thus, taken together, the data characterizing Kir3/G $\beta\gamma$ subunits interaction are consistent with a scenario in which receptor activation does not necessarily change the total amount of complexes that are present in the cell, but imposes conformational changes at the G $\beta\gamma$ -Kir3.1 interface.

Activation of DORs does not modify their interaction with the channel, but evokes conformational rearrangements at the receptor G $\beta\gamma$ interface

Results from the previous section indicate that DOR, G $\beta\gamma$ and Kir3 channel subunits associate in a constitutive complex whose components remain together despite conformational changes that occur during early stages of signal transduction. To further characterize how receptor activation modified interactions among these different complex components we used a range of DOR ligands and assessed BRET changes from a variety of conformational vantage points within the signaling complex.

In a first series of experiments, we assessed whether ligands other than DPDPE could modify BRET at the Kir3.1-Luc/DOR-YFP BRET pair. These included drugs classified as full agonists (SNC-80), partial agonists (morphine, UFP512 and TIPP), inverse agonists

(TICP) and neutral antagonists (naloxone and naltrindole) for DOR [40, 51, 335]. As shown in Figure 3A, none of the ligands tested significantly modified the basal BRET signal generated by this BRET pair. To rule out that the absence of response might have been caused by the location of BRET tags, experiments were repeated using a pair in which donor and acceptor positions were switched (DOR-Luc/Kir3.1-GFP; Figure 3B) and another pair in which the donor was placed at the C-terminal end of the Kir3.2 subunit (Kir3.2-Luc/DOR-YFP; Figure 3C). Except for TIPP (Figure 3C), ligand-induced BRET changes did not attain significance and were not efficacy-related, implying that ligand-encoded conformational information is not transferred to the channel via this interaction.

Since three different BRET pairs failed to reveal direct transfer of conformational information between the receptor and the channel, we sought alternative sources for information transfer. We had previously established that DOR activation modified the interaction of the receptor C-terminus with $G\alpha$ and $\beta\gamma$ subunits in the absence of channel effectors [230]. To determine whether this was also the case when Kir3 channels were present, we assessed if the same DOR ligands that were without effect at the DOR-channel interface, could modify the transfer of energy between DOR and $G\beta\gamma$ subunits. To do so, cells were transfected with a BRET pair constituted by DOR-Luc/YFP- $G\gamma 2$, together with the Kir3.1/Kir3.2 and complementary $G\alpha oA$ and $G\beta 1$ subunits. As shown in Figure 3D, DOR activation (2 min) by different ligands induced a concentration-dependent increase in energy transfer. Simultaneous fitting established that the dose response curve generated by SNC-80 resulted in a greater E_{max} value than that generated by DPDPE ($p < 0.0001$; $n=4$). Further, E_{max} values for both these agonists were larger than those observed for UFP512 and morphine ($p < 0.05$; $n=4$). In turn, the E_{max} for morphine was not different from E_{max} values

for TIPP, naltrindole and TICP, while the Emax for TICP was higher than the one determined for naloxone ($p < 0.05$; $n=4$). Thus, the resulting rank order of magnitude for BRET changes observed at the DOR-Luc/YFP-G γ 2 pair was: SNC-80 > DPDPE > UFP512 = morphine \geq TIPP \geq Naltrindole = TICP > Naloxone.

Ligand-induced conformational rearrangements at the DOR-G $\beta\gamma$ interface are correlated with those observed at a BRET pair assessing G $\beta\gamma$ interaction with channel subunits

DOR activation modified the relative positioning of the receptor C-terminus with respect to G γ 2 but not with respect to Kir3 subunits, suggesting that the G $\beta\gamma$ dimer could be the mobile species among all three interacting partners. Therefore, we next examined if and how DOR activation modified G $\beta\gamma$ interaction with other complex components. We first monitored G $\beta\gamma$ movement from two different vantage points within the cytosolic portion of the channel: the C-termini of Kir3.1 and Kir3.2 subunits. Figure 4A shows that DOR ligands produced a concentration-related increase in the BRET signal generated by the Kir3.1-Luc/YFP-G γ 2 pair, indicating that the free end of the G $\beta\gamma$ dimer was drawn closer to the C-terminus of these Kir3 subunits. Comparison of Emax values from the different dose-response curves revealed the following rank order: SNC-80 > DPDPE \geq UFP512 \geq morphine \geq TIPP \geq Naltrindole = TICP > Naloxone (SNC-80 vs DPDPE $p < 0.0001$; DPDPE vs morphine $p < 0.05$; TICP vs Naloxone $p = 0.05$; $n=4$). DOR activation by different agonists also induced concentration-dependent BRET changes at the Kir3.2-Luc/YFP-G γ 2 interface (Figure 4B), with the magnitude of Emax values displaying the following rank order: SNC-80 > DPDPE = morphine = UFP512 \geq TIPP = Naltrindole \geq TICP = Naloxone (SNC-80 vs DPDPE $p <$

0.0001; DPDPE *vs* naloxone $p < 0.05$; $n=3$). Ligand-dependent BRET changes at both interfaces were correlated (Figure 4C), which is consistent with the notion that G $\beta\gamma$ repositioning with respect to either channel subunit correspond to similar phenomena. The idea the G $\beta\gamma$ dimer was the mobile species contributing to BRET changes at its interaction with the receptor and channel subunits is further supported by two observations: ligand potency to produce conformational changes at the G $\beta\gamma$ /DOR and G $\beta\gamma$ /Kir3 interfaces were correlated (Figure 4D) as were E_{max} values for BRET changes observed at both interfaces (Figure 4E).

Agonist-evoked conformational rearrangements at the G $\beta\gamma$ /channel interface require the proximal portion of the C-terminal domain of Kir3.1 subunits

G $\beta\gamma$ binding sites have been mapped to proximal and distal portions of the C-terminal end of Kir3 subunits [336, 337]. While the most distal sites are unique to Kir3.1 subunits [336], more proximal residues within β D- β E and β L- β M strands have been identified as critical for G $\beta\gamma$ -mediated activation of different Kir3 subunits, including Kir3.1 [338, 339]. To determine the relative contribution of proximal C-terminal regions to the dynamics of DOR-mediated channel activation, we generated Kir3.1 donor BRET constructs lacking β D- β E and β L- β M strands together with connecting residues (Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴²). Membrane expression of wild-type and mutant constructs was first assessed as a prelude to their use in BRET experiments. To do so wild type and mutated Kir3.1 BRET donors were co-transfected with DORs bearing the Flag epitope at the N-terminus (Flag-DOR) as well as with G α oA β 1 γ 2 and Kir3.2 subunits. Receptors present at the cell surface were labeled by antibody feeding of live cells, and donor Kir3.1-Luc constructs were subsequently labeled *in vitro*, by permeabilizing

the cells and exposing them to anti-Luc antibody. Figure 5A shows that when co-expressed with Kir3.2 subunits, Kir3.1-Luc^{wt} constructs colocalized with membrane DOR. However, expression of Kir3.1-Luc^{wt} constructs in the absence of Kir3.2 subunits resulted in intracellular retention of Kir3.1-Luc^{wt}. Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴² constructs were similarly retained within the intracellular compartment, despite co-expression with Kir3.2 subunits.

Different Kir3.1-Luc constructs were then co-expressed together with YFP-G γ 2 and the corresponding signaling partners, to assess if the mutation disrupted channel/G $\beta\gamma$ interaction. The inset in Figure 5B shows constitutive BRET generated by Kir3.1-Luc^{wt} in the presence and absence of Kir3.2 subunits. Despite the absence of Kir3.2 subunits, basal BRET generated by G $\beta\gamma$ and intracellular Kir3.1-Luc^{wt} subunits was not different from that measured in Kir3.1-Luc^{wt}/Kir3.2 channels that were adequately distributed. Consistent with its intracellular location, Kir3.1-Luc^{wt} interaction with G $\beta\gamma$ was insensitive to DOR activation by DPDPE (Figure 5B, right panel), a hydrophilic, peptidic ligand that does not readily cross the cell membrane. In contrast, the hydrophobic, cell permeable agonist SNC-80 evoked a significant increase of the basal BRET signal (Figure 5B, left panel). Unlike intracellularly-trapped wild-type constructs, the basal net BRET signal generated by the Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴²/YFP-G γ 2 pair was lower than the one observed for the WT channel (Figure 5B; inset) and, more importantly, it was not modified by exposure to SNC-80 (Figure 5B, left panel). As above, DPDPE was also without effect in cells expressing the cytosolic Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴² mutant (Figure 5B, right panel).

DOR-evoked changes at the Gβγ/Kir3 subunit interface are concomitant with conformational rearrangements among GαoA/Gβγ subunits and predictive of ligand ability to induce channel currents

Gα subunits are thought to modulate channel activity both through direct interaction with Kir3 subunits and by making Gβγ readily available in the proximity of channel subunits [326, 327, 334, 340]. We were therefore interested in characterizing whether DOR activation modified Gα interactions with different complex components. To address this question we expressed the GαoA99-Luc donor together with either of the following acceptors: DOR-YFP, YFP-Gγ2 or Kir3.1-YFP, as well as corresponding complementary signaling partners. We noted a specific (data not shown), constitutive BRET signal for GαoA99-Luc/DOR-YFP (BRET_{Max}: 0.086 ± 0.006 , n=5) and for GαoA99-Luc/YFP-Gγ2 (BRET_{Max}: 0.135 ± 0.002 , n=5) but not for the GαoA99-Luc /Kir3.1-YFP pair.

In a second series of experiments, we assessed how two of the most efficacious agonists, SNC-80 and DPDPE, influenced GαoA interactions with other complex components. Neither of the agonists induced BRET at the GαoA/Kir3.1 interface where there was none detected in the absence of ligand. However, BRET changes observed at GαoA/DOR and GαoA/Gβγ interfaces indicated that DOR activation caused loop αA-αB in the helical portion of GαoA subunits to approach the receptor C-terminus and separate from the free end of Gβγ (Figure 6A). Moreover, BRET changes at the GαoA/Gβγ and Gβγ/Kir3.1 interfaces followed similar kinetics (Figure 6B), indicating that the conformational changes that separated Gβγ from Gα were concomitant with those that brought it into closer proximity of the channel. Indeed, Gβγ separated from GαoA in a two phase movement whose kinetics were not different from those observed for Gβγ approaching Kir3.1 channel subunits (see inset in Figure 6B).

Mutagenesis studies [63] and structural analyses [341] have shown that Kir3 association with G $\beta\gamma$ subunits takes place at a surface that normally interacts with G α subunits, known as the “hot spot”. For the “hot spot” to become available for effector interaction, G α subunits must exchange GDP for GTP [342]. In keeping with this mechanism, ligand-induced BRET changes at the pair monitoring G $\beta\gamma$ /Kir3.1 interaction were sensitive to pertussis toxin (DPDPE-induced BRET changes in CTL cells: $0,022 \pm 0,005$ and in cells pre-exposed to PTX: $-0,002 \pm 0,005$; $p < 0.01$; $n=6$, unpaired t-test). Interestingly, and despite coordinated conformational rearrangements at the G $\beta\gamma$ interfaces with G α and Kir3 subunits, we found no significant correlation between EC₅₀ (Figure 6D, upper right panel) and E_{max} (Figure 6D, lower right panel) values obtained in GTP γ S binding and in BRET assays assessing ligand-promoted conformational changes at the G $\beta\gamma$ /Kir3.1 interface. This dissociation between readouts of G protein activation and G $\beta\gamma$ interaction with the channel implies the possibility of effector responses being determined by ligand-specific structural determinants as much as GDP/GTP exchange by the G α subunit.

Finally, we assessed agonist ability to evoke peak channel currents. To do so, HEK293 cells expressing the Kir3.1-Luc/YFP-G γ 2 pair, DORs and Kir3.2 subunits were studied using whole cell patch clamp. Transfected cells displayed characteristic basal currents (1122 ± 213 pA; $n=9$) in presence of a high extracellular K⁺ concentration (140 mM). The stimulation of DOR by DPDPE induced an evoked current (-3593 ± 615 pA; $n=16$) that could be blocked by pre-incubation with the antagonist naltrindole (1 μ M) and disappeared upon agonist removal (Figure 7A). Other agonists like SNC-80, UFP512 and morphine (1 μ M) also produced channel currents (7B and 7C). At this concentration peak currents produced by DPDPE were larger than those induced by SNC-80, which in turn produced greater hyperpolarization than

UFP512 and morphine. Although the magnitude of these currents was not correlated with E_{max} values of ligand-induced conformational changes, they are not incompatible with ligand-induced conformational changes observed at 1 μ M concentration, where SNC-80 did not attain its maximal effect (Figure 4A and 4B). Independent of the latter, agonists that displayed highest potency and efficacy to induce conformational changes at the $G\beta\gamma$ /Kir3.1 and $G\beta\gamma$ /Kir3.2 interfaces were also found to activate the channel, pointing to the predictive validity of the conformational changes captured by the Kir3/ $G\gamma$ 2 biosensors as a rapid means for identifying ligands that activate Kir3 channels via GPCR activation.

One of the prerequisites for establishing whether a biosensor can be reliably used in an assay with screening validity is its ability to confidently discriminate signal from background. The evaluation of the Kir3.1-Luc/YFP- $G\gamma$ 2 BRET biosensor with respect to these parameters was done by means of a Z' factor [343]. To obtain the latter we monitored basal and agonist-induced netBRET readings over a period of 3 min (Figure 8). The Z' factor was calculated as described in experimental procedures, yielding a value of 0.686.

Discussion

Although it is now well established that Kir3 channels, G α i/o proteins and GPCRs may constitutively interact [144, 259, 263, 344], the way in which these interactions are modified during signal transduction remains to be fully elucidated. Biochemical and biophysical results obtained in this study confirmed and extended our previous observations by showing that DOR spontaneously associates not only with heterotrimeric G proteins [230] but also with Kir3.1 channel subunits. Additionally, G β 1 γ 2 dimers associated with G α oA, Kir3.1 and Kir3.2 subunits indicating that with the exception of G α oA, all signaling partners in the complex constitutively interacted with one another. Indeed, in keeping with previous reports we observed that G α oA interacted with the receptor and G β γ subunits [212, 230] but obtained no evidence for its direct association to the channel. Previous studies had similarly reported that inactive G α did not directly interact with Kir3.1/3.2 subunits [324, 344], and had proposed that this subunit associates with Kir3 channels via the G β γ dimer [324]. On the other hand, nuclear magnetic resonance (NMR) studies have revealed a direct interaction between the switch 2 region of GTP-bound G α i3 and the α A helix of Kir3.1 subunits [326], suggesting that G α and the channel may come into direct contact upon G protein activation. We did not find evidence for this type of reorganization since DOR stimulation by highly efficacious agonists failed to show BRET at the G α oA/Kir3.1 interface. However, since tagging of G α subunits has been shown to interfere with the activation of Kir3 effectors [324], we cannot exclude that defects in Kir3 signal transduction might have prevented conformational changes between G α oA and channel subunits. In contrast, the BRET pair assessing G α oA99-Luc interaction with YFP-G γ 2 revealed that DOR activation caused donor/acceptor moieties at the G α oA/G β γ interface to separate from one another. Furthermore, conformational changes that took place at the

$G\alpha A/G\beta\gamma$ interface followed similar 2 phase kinetics as rearrangements that repositioned $G\beta\gamma$ with respect to the channel. In addition, it was also established that similar to conformational changes undergone by heterotrimeric subunits [230], rearrangements between $G\beta\gamma$ and Kir3.1 subunits were sensitive to PTX. This was evidenced by sensitivity of conformational rearrangements between $G\beta\gamma$ and Kir3.1 subunits to PTX. Thus, taken together these observations support a scenario where DOR activation promotes an initial conformational change that leads to nucleotide exchange by $G\alpha$, followed by a conformational alteration in $G\beta\gamma$ for its interaction with the channel.

DOR agonists enhanced BRET at pairs assessing interactions between the receptor C-terminus and $G\beta\gamma$ as well as $G\alpha A$ subunits. The fact that these increases in energy transfer took place while the receptor C-terminus remained stationary with respect to channel subunits, suggests that ligand-evoked BRET changes at DOR interface with G protein components were most likely due to the displacement of heterotrimeric subunits and not the C-terminal domain of the receptor. This reasoning would imply that instead of actively participating in the transfer of conformational information from activated DORs, the C-terminus would be a bystander for rearrangements taking place within its proximity. Such an interpretation is consistent with NMR and crystallization studies of an activated $\beta_2AR-G\alpha s\beta\gamma$ complex, where the agonist-stabilized receptor was associated with $G\alpha$ not via its C-terminus but through its second intracellular loop and transmembrane domains 5 and 6 [7, 316]. These studies also reported the absence of direct interaction between the receptor and $G\beta\gamma$ [7, 316], pointing to $G\alpha$ as the initial relay for conveying conformational information from the receptor to the effector. Agonist-induced conformational changes that were captured by the different biosensors used in this study are schematically represented in figure 9.

DORs have been previously shown to adopt agonist-specific conformations that distinctively interact with heterotrimeric G proteins [27, 230]. In particular, this was evidenced by the fact that ligand-induced BRET changes among DOR-G $\alpha\beta\gamma$ complex components did not correlate with functional responses evoked at cyclase or ERK effectors (Audet et al, 2008). Here we compared ligand-induced structural rearrangements at the interface of the receptor with G $\beta\gamma$ subunits and that of the G $\beta\gamma$ dimer with Kir3.1 and 3.2 channel subunits. The data obtained revealed that different ligands induced correlated conformational changes at these interfaces. On the other hand, we found that E_{max} and EC₅₀ values that described ligand tendency to induce nucleotide exchange by G α subunits did not correlate with parameters describing agonist tendency to induce different conformational rearrangements nor the magnitude of channel currents produced by the different agonists. One possible interpretation to these observations is that effector responses (in this case magnitude of channel currents) are not only determined by ligand ability to promote GDP/GTP exchange, but by the unique set of conformational changes that each ligand imposes among complex components. However, although it is tempting to speculate that organization within a signaling complex allows channel subunits to be influenced by the conformational diversity of the ligand-receptor pair, we cannot exclude that mismatches between BRET and GTP γ S binding data could have been related to the fact that the former were obtained in presence of overexpressed G α oA β 1 γ 2 while the latter describe nucleotide exchange by endogenous G proteins.

On the other hand, conformational changes at either G $\beta\gamma$ /Kir3.1 or G $\beta\gamma$ /Kir3.2 interfaces were predictive of whether a ligand could evoke channel currents, since drugs that displayed the highest potency and relative efficacy to modify BRET at these pairs were also shown to increase channel permeability. Within this context, we propose that a conformational

biosensor that monitors G $\beta\gamma$ /Kir3 subunit interactions could prove a valuable screening tool for identifying GPCR ligands that are capable of modulating Kir3 channel function. To assess the reliability of this type of tool, we calculated a Z' factor, as an indicator of biosensor ability to discriminate signal from noise [343]. The value obtained was well above the 0.5 limit that ensures robust screening capacity [343], further underscoring the potential of these conformational biosensors as a viable means for fast and precise screening of ligands that modulate Kir3 channel function via GPCRs. Importantly, although these biosensors may function as a screening tool, they do not necessarily represent conformational changes undergone by these signaling proteins in their natural neuronal environment.

Mutagenesis and functional studies have identified leucine residues within β D- β E [339] and β L- β M strands [338, 345] as being essential for evoking Kir3 channel activation via GPCRs. Both of these strands have also been confirmed as direct binding sites for G $\beta\gamma$ subunits [341]. Based on these observations it was predicted that if the Kir3.1-Luc/YFP-G γ 2 BRET pair did indeed capture conformational changes associated with GPCR-mediated activation of Kir3 channels, then removal of β D- β E and β L- β M strands (Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴²) should interfere with structural rearrangements as monitored by the G $\beta\gamma$ /Kir3 biosensor. This assumption was confirmed by showing that a highly efficacious agonist like SNC-80 failed to modify the basal signal produced by the Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴²/YFP-G γ 2 pair. Since the mutant construct did not reach the cell surface, it was first necessary to establish whether the lack of response was due to the mutation or to intracellular retention of the complex. To discriminate between the two possibilities SNC-80 was also tested on cells expressing the Kir3.1-Luc^{wt}/YFP-G γ 2 BRET pair together with all complex components except for Kir3.2 subunits. Since Kir3.1 subunits lack the endoplasmic reticulum export signal that is present in Kir3.2

[125], Kir3.1-Luc^{wt} constructs remained trapped in the intracellular compartment when Kir3.2 subunits were absent. We have previously shown that different complex components associate early during synthesis [133], and that such complexes respond to cell-permeable agonists without reaching the cell surface [263]. In keeping with these observations the membrane-permeable agonist SNC-80 enhanced energy transfer in cells in which the Luc^{wt}/YFP-G γ 2 pair was retained intracellularly while the membrane-impermeable agonist DPDPE was without effect. Thus, despite being able to evoke a conformational change at intracellular Kir3.1Luc^{wt} constructs, SNC-80 failed to modify BRET between YFP-G γ 2 and Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴² mutants that were also retained intracellularly. This deficient response cannot be attributed to lack of G $\beta\gamma$ interaction with the mutant channel subunit since, despite being reduced with respect to the spontaneous BRET signal generated by normally distributed channels, the Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴²/YFP-G γ 2 pair also displayed basal energy transfer. We therefore conclude that a biosensor in which Kir3.1 subunits lack β D- β E and β L- β M strands loses its ability to adequately respond to GPCR stimulation. Further, the observed reduction in spontaneous BRET is not only consistent with previous reports showing that leucine residues within β D- β E and β L- β M strands help determine basal currents [337], but it also supports the idea that these channel regions contribute to an optimal constitutive interaction between G $\beta\gamma$ and Kir3.1 subunits.

In conclusion, data obtained in this study provide evidence that DOR, G proteins and Kir3 channel subunits form a signaling complex whose integrity is maintained in the early stages of signal transduction. Despite multiple interactions among different components, conformational information encoded by agonist binding to the receptor was relayed to the channel via a specific route of structural rearrangements which involved repositioning of heterotrimeric subunits among themselves, with respect to the receptor and the channel. In

particular, the occurrence of measurable conformational changes at BRET pairs assessing G β γ interaction with Kir3 subunits was predictive of ligand ability to evoke channel currents and could function as a conformational biosensor to screen for GPCR ligands that induce Kir3 channel opening.

Authorship Contributions:

Participated in research design: TEH and GP.

Conducted experiments: MR-L; KN; NA; RS; MA.

Contributed new reagents or analytic tools: MH; GB, PWS, MB

Performed data analysis: MR-L; KN; NA; RS.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: MR-L; KN; RS; TEH and GP.

References

- Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, Amraei M, Chabot-Dore AJ, Millecamps M, Stone LS and Pineyro G (2012) Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *J Neurosci* **32**(14): 4827-4840.
- Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M and Pineyro G (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *The Journal of biological chemistry* **283**(22): 15078-15088.
- Audet N and Pineyro G (2011) Using BRET to detect ligand-specific conformational changes in preformed signalling complexes. *Methods Mol Biol* **756**: 149-163.
- Berchiche YA, Gravel S, Pelletier ME, St-Onge G and Heveker N (2011) Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2b ligands on beta-arrestin recruitment, Galphai signaling, and receptor internalization. *Molecular pharmacology* **79**(3): 488-498.
- Berlin S, Keren-Raifman T, Castel R, Rubinstein M, Dessauer CW, Ivanina T and Dascal N (2010) G alpha(i) and G betagamma jointly regulate the conformations of a G betagamma effector, the neuronal G protein-activated K⁺ channel (GIRK). *The Journal of biological chemistry* **285**(9): 6179-6185.
- Berlin S, Tsemakhovich VA, Castel R, Ivanina T, Dessauer CW, Keren-Raifman T and Dascal N (2011) Two distinct aspects of coupling between Galphai protein and G protein-activated K⁺ channel (GIRK) revealed by fluorescently labeled Galphai3 protein subunits. *The Journal of biological chemistry* **286**(38): 33223-33235.

- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B and Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(16): 7297-7301.
- Breit A, Gagnidze K, Devi LA, Lagace M and 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. *Molecular pharmacology* **70**(2): 686-696.
- Clancy SM, Fowler CE, Finley M, Suen KF, Arrabit C, Berton F, Kosaza T, Casey PJ and Slesinger PA (2005) Pertussis-toxin-sensitive Galpha subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Molecular and cellular neurosciences* **28**(2): 375-389.
- David M, Richer M, Mamarbachi AM, Villeneuve LR, Dupre DJ and Hebert TE (2006) Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels. *Cellular signalling* **18**(12): 2172-2181.
- Finley M, Arrabit C, Fowler C, Suen KF and Slesinger PA (2004) betaL-betaM loop in the C-terminal domain of G protein-activated inwardly rectifying K(+) channels is important for G(beta gamma) subunit activation. *The Journal of physiology* **555**(Pt 3): 643-657.
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ and Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein beta gamma subunits with effectors. *Science* **280**(5367): 1271-1274.

- Fowler CE, Aryal P, Suen KF and Slesinger PA (2007) Evidence for association of GABA(B) receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. *The Journal of physiology* **580**(Pt 1): 51-65.
- Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**(3): 177-184.
- He C, Yan X, Zhang H, Mirshahi T, Jin T, Huang A and Logothetis DE (2002) Identification of critical residues controlling G protein-gated inwardly rectifying K(+) channel activity through interactions with the beta gamma subunits of G proteins. *The Journal of biological chemistry* **277**(8): 6088-6096.
- He C, Zhang H, Mirshahi T and Logothetis DE (1999) Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *The Journal of biological chemistry* **274**(18): 12517-12524.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I and Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews* **90**(1): 291-366.
- Huang CL, Jan YN and Jan LY (1997) Binding of the G protein betagamma subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *FEBS letters* **405**(3): 291-298.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN and Jan LY (1995) Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* **15**(5): 1133-1143.
- Ivanina T, Rishal I, Varon D, Mullner C, Frohnwieser-Steinecke B, Schreibmayer W, Dessauer CW and Dascal N (2003) Mapping the Gbetagamma-binding sites in GIRK1

and GIRK2 subunits of the G protein-activated K⁺ channel. *The Journal of biological chemistry* **278**(31): 29174-29183.

Lavigne N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE and Van Tol HH (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* **277**(48): 46010-46019.

Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ and Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* **325**(6102): 321-326.

Luscher C and Slesinger PA (2010) Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **11**(5): 301-315.

Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, Fried SR, Jan YN and Jan LY (2002) Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* **33**(5): 715-729.

Marker CL, Cintora SC, Roman MI, Stoffel M and Wickman K (2002) Hyperalgesia and blunted morphine analgesia in G protein-gated potassium channel subunit knockout mice. *Neuroreport* **13**(18): 2509-2513.

Mase Y, Yokogawa M, Osawa M and Shimada I (2012) Structural Basis for Modulation of Gating Property of G Protein-gated Inwardly Rectifying Potassium Ion Channel (GIRK) by i/o-family G Protein alpha Subunit (Galpai/o). *The Journal of biological chemistry* **287**(23): 19537-19549.

Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A and Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by

- bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* **277**(47): 44925-44931.
- Peleg S, Varon D, Ivanina T, Dessauer CW and Dascal N (2002) G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron* **33**(1): 87-99.
- Pineyro G (2009) Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cellular signalling* **21**(2): 179-185.
- Pineyro G, Azzi M, De Lean A, Schiller P and Bouvier M (2001) Short-term inverse-agonist treatment induces reciprocal changes in delta-opioid agonist and inverse-agonist binding capacity. *Molecular pharmacology* **60**(4): 816-827.
- Pineyro G, Azzi M, deLean A, Schiller PW and Bouvier M (2005) Reciprocal regulation of agonist and inverse agonist signaling efficacy upon short-term treatment of the human delta-opioid receptor with an inverse agonist. *Molecular pharmacology* **67**(1): 336-348.
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah ST, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK and Kobilka BK (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**(7366): 549-555.
- Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M and Hebert TE (2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* **119**(Pt 13): 2807-2818.
- Riven I, Iwanir S and Reuveny E (2006) GIRK channel activation involves a local rearrangement of a preformed G protein channel complex. *Neuron* **51**(5): 561-573.

- Robitaille M, Ramakrishnan N, Baragli A and Hebert TE (2009) Intracellular trafficking and assembly of specific Kir3 channel/G protein complexes. *Cellular signalling* **21**(4): 488-501.
- Rubinstein M, Peleg S, Berlin S, Brass D, Keren-Raifman T, Dessauer CW, Ivanina T and Dascal N (2009) Divergent regulation of GIRK1 and GIRK2 subunits of the neuronal G protein gated K⁺ channel by GalphaiGDP and Gbetagamma. *The Journal of physiology* **587**(Pt 14): 3473-3491.
- Schiller PW, Weltrowska G, Berezowska I, Nguyen TM, Wilkes BC, Lemieux C and Chung NN (1999) The TIPP opioid peptide family: development of delta antagonists, delta agonists, and mixed mu agonist/delta antagonists. *Biopolymers* **51**(6): 411-425.
- Smrcka AV, Lehmann DM and Dessal AL (2008) G protein betagamma subunits as targets for small molecule therapeutic development. *Comb Chem High Throughput Screen* **11**(5): 382-395.
- Vergura R, Balboni G, Spagnolo B, Gavioli E, Lambert DG, McDonald J, Trapella C, Lazarus LH, Regoli D, Guerrini R, Salvadori S and Calo G (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.
- Westfield GH, Rasmussen SG, Su M, Dutta S, DeVree BT, Chung KY, Calinski D, Velez-Ruiz G, Oleskie AN, Pardon E, Chae PS, Liu T, Li S, Woods VL, Jr., Steyaert J, Kobilka BK, Sunahara RK and Skiniotis G (2011) Structural flexibility of the G alpha s alpha-helical domain in the beta2-adrenoceptor Gs complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(38): 16086-16091.
- Yokogawa M, Osawa M, Takeuchi K, Mase Y and Shimada I (2011) NMR analyses of the Gbetagamma binding and conformational rearrangements of the cytoplasmic pore of G

protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). *The Journal of biological chemistry* **286**(3): 2215-2223.

Zhang JH, Chung TD and Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**(2): 67-73.

Footnotes

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to GP [311997]; from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to GP [MOP 79432], TEH [MOP 79354] and PWS [MOP 89716], and from the Consortium québécois sur la découverte du médicament (CQDM) to GP, TEH and MB. PWS was also supported by the National Institutes of Health (NIH) [DA004443]. TEH holds a Chercheur National award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). MB holds a Canada Research Chair in Cell signalling and Molecular Pharmacology. RS holds a studentship from the McGill-CIHR Drug Development Training Program. KN holds a studentship from Ste-Justine Hospital Research Center.

Figure Legends

Figure 1. *Kir3.1 subunits constitutively and specifically associate with DORs.*

(A) Titration assays were performed in HEK293 cells transfected with increasing concentrations of DOR-YFP or CD8-YFP and a fixed amount of Kir3.1-Luc, together with untagged Kir3.2 channel subunits and the Gαoβ1γ2 heterotrimer. Results correspond to a representative example of 3 independent experiments carried out in duplicate (means of duplicates are shown). BRET measures were taken in absence or presence of DPDPE (10 μM; 2 min). *Inset:* competition assay in which a fixed amount of the Kir3.1-Luc/DOR-YFP pair was co-expressed with the same complementary signaling partners as indicated above, plus increasing amounts of Kir3.1-Flag or ACII. Data correspond to the means obtained in one experiment carried out in triplicate (means of triplicates are shown). Western blot shows expression of ACII at increasing levels of transfection. (B) HEK293 cells were transiently transfected to express the indicated proteins and exposed or not to DPDPE (10 μM, 2min). At the end of treatment cells were washed, lysed and Flag-DORs immunopurified. Resulting products were separated by SDS-PAGE and Kir3.1-Luc subunits recovered with the receptor were revealed by immunoblot. *Inset:* shows proteins present in cellular lysates before immunopurification. (C) Histograms show results obtained by compiling densitometric measures of 4 co-immunoprecipitation experiments. Data were normalized to the mean of the Kir3.1-Luc/Flag-DOR ratio observed in non-stimulated controls. Statistical comparison of immunoreactivity ratios was done by paired Student's *t*-test and results are shown on the figure.

Figure 2. Kir3.1 subunits constitutively and specifically associate with the obligatory Gβγ dimer. (A) Titration assays to monitor the *in cellulo* interaction between Kir3.1 and the Gβ1γ2 dimer were performed by transfecting cells with the Kir3.1-Luc donor and increasing amounts of the acceptor YFP-Gγ2 together with DOR, Kir3.2 and GαoAβ1 subunits. Results correspond to a representative example of 3 independent experiments carried out in duplicate (means of duplicates are shown), in absence or presence of DPDPE (10 μM; 2 min). *Inset:* shows the lack of effect of DPDPE in cells that were transfected in the same way as above expect for the absence of DOR. Data correspond to the means obtained in one of two independent experiments carried out in triplicate. (B) HEK293 cells were transiently transfected to express the indicated proteins and treated or not with DPDPE (10 μM, 2min) as indicated. Kir3.1-Flag subunits were immunopurified, the resulting products were separated by SDS-PAGE and YFP-Gγ2 purified with channel subunits was revealed by western blot. *Inset:* shows proteins present in cellular lysates before immunopurification. (C) Histograms show results obtained by compiling densitometric measures of 3 independent experiments. Data were normalized to the mean of the YFP-Gγ2/Flag-DOR ratio observed in non-stimulated cells. Statistical comparison of immunoreactivity ratios was done by paired Student's *t*-test and results are shown on the figure.

Figure 3. DOR stimulation did not modify receptor interaction with Kir3.1/3.2 channel subunits, but induced conformational rearrangements between receptor and the Gβ1γ2 dimer. HEK293 cells were transfected with the indicated BRET pairs together with untagged signaling partners in order to assess DOR interaction with Kir3 (A-B) or Gγ2 (D) subunits. (A-B) BRET measures were obtained in the presence or absence of indicated DOR

ligands (10 μ M; 2 min) and results were expressed as the difference between these readings, corresponding to mean \pm SEM of 3-7 independent experiments. Statistical comparisons for each BRET pair were carried out on net BRET values using repeated measures one-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test for multiple comparisons. * $p < 0.05$ indicates significance as compared to untreated controls. Spontaneous net BRET for the Kir3.1-Rluc/DOR-YFP pair: 0.042 ± 0.002 (n=3). Spontaneous net BRET for the DOR-Rluc/Kir3.1-GFP pair: 0.032 ± 0.002 (n=5). Spontaneous net BRET for the Kir3.2-Rluc/DOR-YFP pair: 0.087 ± 0.003 (n=7). **(D)** Drug ability to modify DOR-Luc/YFP-Rluc interaction was assessed in dose response curves. Results were normalized to the maximal effect observed for SNC-80 and correspond to mean \pm SEM of four experiments. Curves were compared by two way ANOVA which revealed an effect of drug ($p < 0.0001$) and concentration ($p < 0.0001$) as well as an interaction ($p < 0.0001$). Subsequent comparison by simultaneous curve fitting yielded the rank order of Emax values detailed in the text. Spontaneous net BRET for the DOR-Luc/YFP-Rluc pair: 0.106 ± 0.013 (n=4).

Figure 4. DOR stimulation induces BRET changes between $G\beta\gamma$ and channel subunits. HEK293 cells were transfected with the indicated BRET pairs and untagged signaling partners in order to evaluate $G\beta\gamma$ interactions with Kir3.1 (**A**) or Kir3.2 (**B**) channel subunits. BRET measures were taken in absence or presence of increasing concentrations of indicated DOR ligands, and ligand-induced BRET changes were normalized to the maximal effect observed for SNC-80. Results correspond to mean \pm SEM of 3-4 experiments. Curves generated by different ligands were compared by two way ANOVA, revealing an effect of drug ($p < 0.0001$), concentration ($p < 0.0001$) and an interaction ($p < 0.0001$) for each of the

interactions. Subsequent comparison by simultaneous curve fitting yielded rank order of Emax values as detailed in text **(C)** Correlation of Emax values for ligand-induced BRET changes at Kir3.1-Rluc/YFP-G γ 2 vs Kir3.2-Rluc/YFP-G γ 2. Correlation of EC50 **(D)** and Emax **(E)** values for ligand-induced BRET changes at pairs assessing G $\beta\gamma$ interaction with DOR (DOR-Luc/G γ 2-YFP) and Kir3.1 subunits (Kir3.1-Luc/G γ 2-YFP).

Figure 5. Agonist-evoked conformational rearrangements at the G $\beta\gamma$ -channel interface require the proximal portion of the C-terminal domain of Kir3.1 subunits.

(A) HEK293 cells were transfected with wild-type or mutant Kir3.1-Luc constructs together with Flag-DORs and G α A β 1 γ 2 subunits. Kir3.2 subunits were included or not in the transfection as indicated. On the day of the experiment, cells were incubated *in vivo* (30 min) with primary antibody to label surface Flag-DOR following which they were washed, fixed and permeabilized before exposing them to anti-Luc antibody to label Kir3.1-Luc constructs. Immunoreactivity was then revealed using secondary antibodies conjugated either to Alexa467 (red channel; Flag-DOR) or Alexa488 (green channel; Kir3.1-Luc). **(B)** HEK293 cells were transfected with the indicated Kir3 subunits together with YFP-G γ 2, G α A β 1 and DORs. On the day of the experiment, cells were exposed to vehicle, SNC-80 (left panel) or DPDPE (right panel) (2 min; 10 μ M). Results are expressed as the difference between BRET measures obtained in presence and absence of agonists and correspond to mean \pm SEM of 5-8 experiments. Statistical analyses for SNC-80 (left panel) effects on Kir3.1-LucWT/YFP-G γ 2 interaction were done on net BRET values by means of two-way ANOVA. Comparisons among cells expressing or not Kir3.2 subunits showed an effect of drug ($p < 0.05$; but no effect for presence/absence of Kir3.2 ($p = 0.6178$; $n = 5$). Analysis of net BRET values for the effect of

SNC-80 on Kir3.1-LucWT vs Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴² constructs, showed an effect of mutation ($p < 0.0001$; $n = 7$). Comparison of net BRET values for experiments carried out in presence or absence of DPDPE (right panel) revealed an effect of Kir3.2 ($p < 0.01$; $n = 7$) and analysis of net BRET values for Kir3.1-LucWT vs Kir3.1-RLuc¹⁸³⁻³⁴² constructs also showed an effect of mutation for this ligand ($p < 0.0001$; $n = 7$). BRET changes induced by the two agonists across different Kir3 constructs were compared by one way ANOVA with Bonferroni correction, and results are shown on the figure. *Inset*: shows basal net BRET values in cells transfected with different Kir3.1/3.2 combinations. Results correspond to mean \pm SEM of non-stimulated values from experiments described above ($n = 7-13$). Statistical comparisons were done using one-way ANOVA followed by Dunnet posthoc test.

Figure 6. DOR-induced conformational changes between G β and Kir3.1 channel subunits are associated with conformational rearrangements among GaoA/G β subunits.

(A) HEK293 cells were transfected with the indicated BRET pairs and untagged signaling partners in order to evaluate GaoA interaction with DOR and the G β dimer. BRET measures were taken in presence or absence of DPDPE or SNC-80 (10 μ M; 2 min). Results were expressed as the difference between measures obtained in presence and absence of ligand and correspond to mean \pm SEM of 5 experiments. Statistical comparisons for each BRET pair were carried out on net BRET values using repeated measures one-way ANOVA followed by Dunnett posthoc test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ as compared to untreated controls. (B) HEK293 cells were transfected as indicated, and BRET kinetics were obtained at room temperature using a Mitras plate reader with automatic injector. SNC-80 injection is indicated by a black arrow. Data are expressed as % of pre-injection values and correspond to mean \pm SEM of

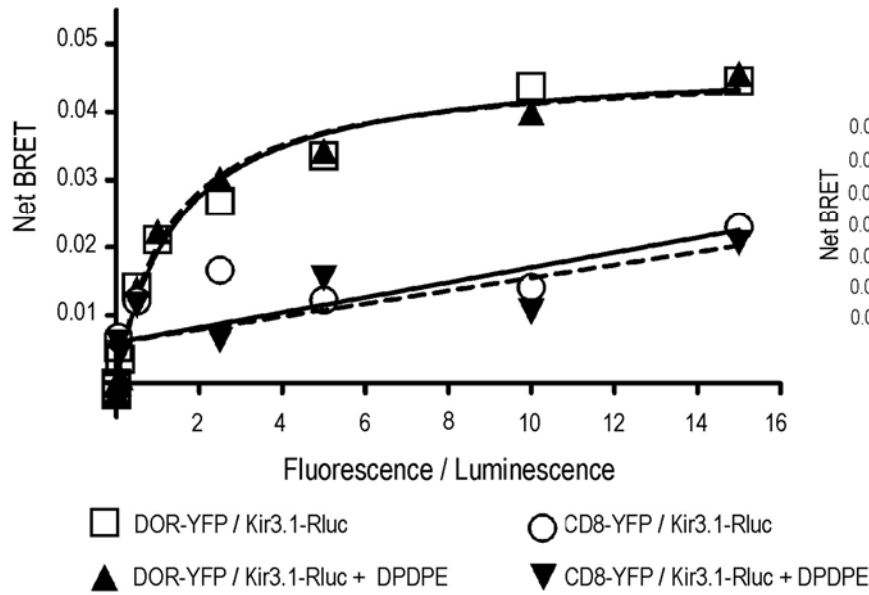
three experiments. Slow and fast $t_{1/2}$ values for each interaction were compared by non-paired t -test and appear in the inset. **(C)** HEK293 cells stably expressing Flag-DOR were exposed to the indicated ligands to determine [35 S]GTP γ S binding. *Left panel:* Results are expressed as fold change with respect to basal binding and correspond to mean \pm SEM of 2-3 experiments carried out in triplicate (naloxone $n=2$; rest $n=3$). Curves were compared by two way ANOVA, revealing an effect of drug ($p<0.0001$) and concentration ($p<0.0001$) as well as an interaction ($p<0.0001$). *Right panel:* Correlation of EC50 (above) and Emax (below) values for ligand-induced GTP γ S binding and BRET changes at the pairs assessing G $\beta\gamma$ interaction with Kir3.1 subunits (Kir3.1-Luc/G γ 2-YFP).

Figure 7. Ligands that induce conformational rearrangements at the biosensors monitoring G $\beta\gamma$ interaction with channel subunits also induce whole cell currents. HEK293 cells transfected with the Kir3.1-Luc/G γ 2-YFP pair DOR and Kir3.2 were studied using whole cell patch clamp voltage clamped at 100 mV. **(A)** The presence of a basal current was determined by incubating cells in a high K $^{+}$ solution (140 mM). Addition of the agonist DPDPE (1 μ M) evoked a current that returned to basal values upon removal of the agonist. Pre-incubation with the antagonist naltrindole (1 μ M) blocked currents induced by DPDPE. **(B)** Individual traces of whole cell currents induced by different agonists. DPDPE was used to determine functional channel current in each cell, and traces for all agonists were normalized to the maximum current produced by DPDPE. **(C)** Agonist-evoked whole cell currents (1 μ M) were normalized to DPDPE and results expressed as % of maximal response induced by this agonist. Values represent mean \pm SEM of 3 experiments. Statistical comparisons were done by one-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test for multiple comparisons.

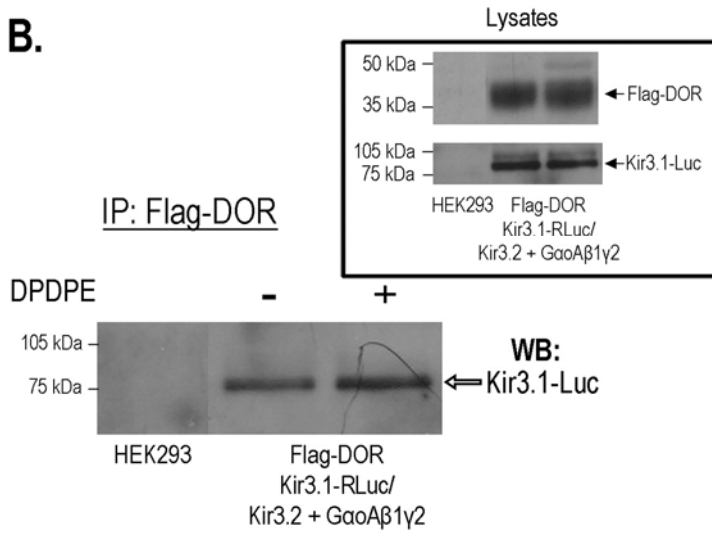
Figure 8. *The Kir3.1-Rluc/YFP-G γ 2 biosensor reliably discriminates signal from noise with a Z' value of 0.686.* HEK293 cells were transfected Kir3.1-Luc subunits together with YFP-G γ 2, G α β 1 and DORs. On the day of the experiment cells were exposed to SNC-80 (10 μ M) or vehicle (DMSO) and 48 alternate readings were obtained for each condition. Values for the Z' factor were calculated as described in experimental procedures. Full lines represent mean reading and broken lines represent the variability for basal and stimulated conditions.

Figure 9. *Schematic representation of conformational rearrangements undergone by different complex components upon DOR activation by an agonist.* Biosensors assessing interactions between DORs, G α A β 1 γ 2 and Kir3.1/3.2 subunits revealed the spontaneous association of these proteins within a multimeric array. In the non-stimulated complex the receptor C-terminus was within a distance of 100 Å of the C-terminal end of Kir3 subunits, the N-terminus of G γ 2 and position 99 in the α A- α B loop of G α A subunits. Upon stimulation by an agonist, DORs and Kir3 C-termini underwent minimal displacement with respect to one another, but the tag at the N-terminal domain of G γ 2 approached these two regions. This rearrangement was paralleled by G γ 2 separation from the helical domain of G α A which, in turn, moved closer to the C-terminal tag on the receptor. No basal or ligand induced transfer of energy was observed at the BRET pair assessing G α A and Kir3.1 interaction.

A. DOR-YFP/Kir3.1-Luc + Kir3.2 + GaoAβ1γ2



B.



C.

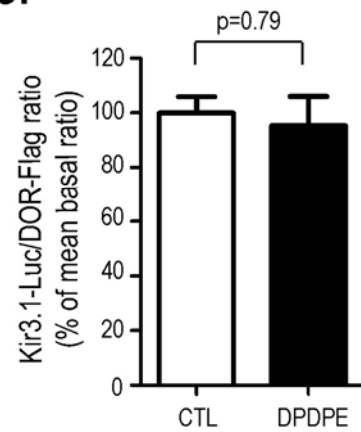


Figure 1

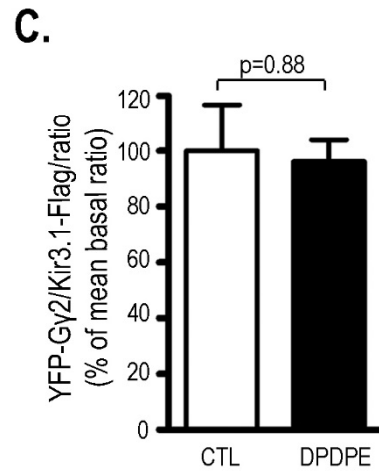
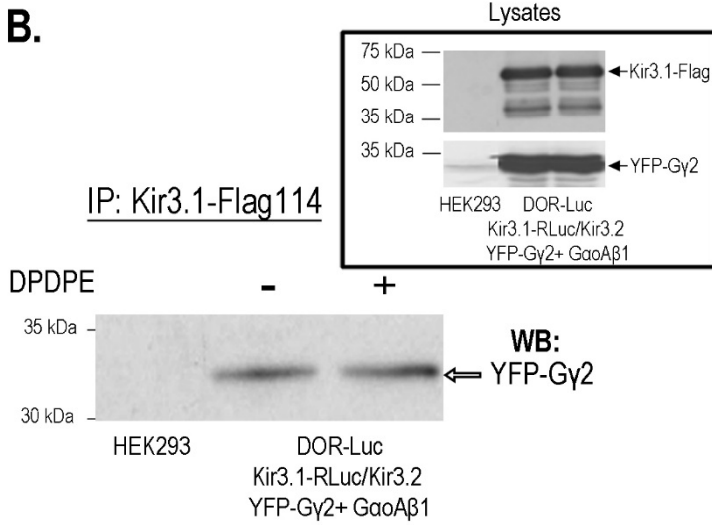
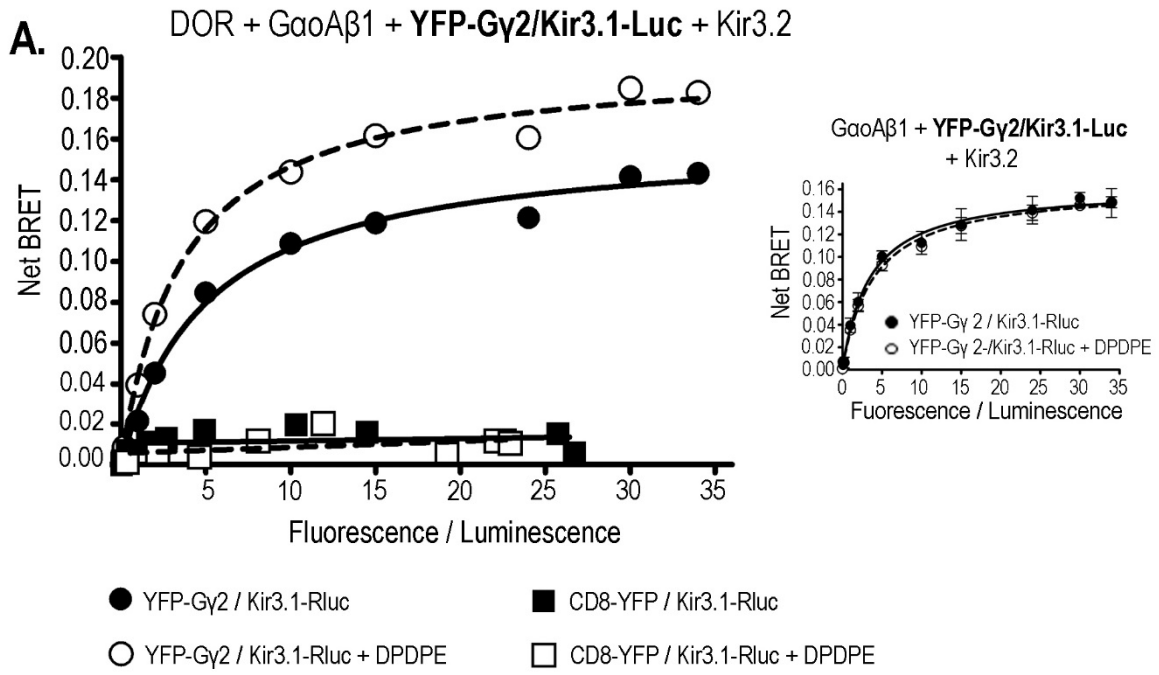


Figure 2

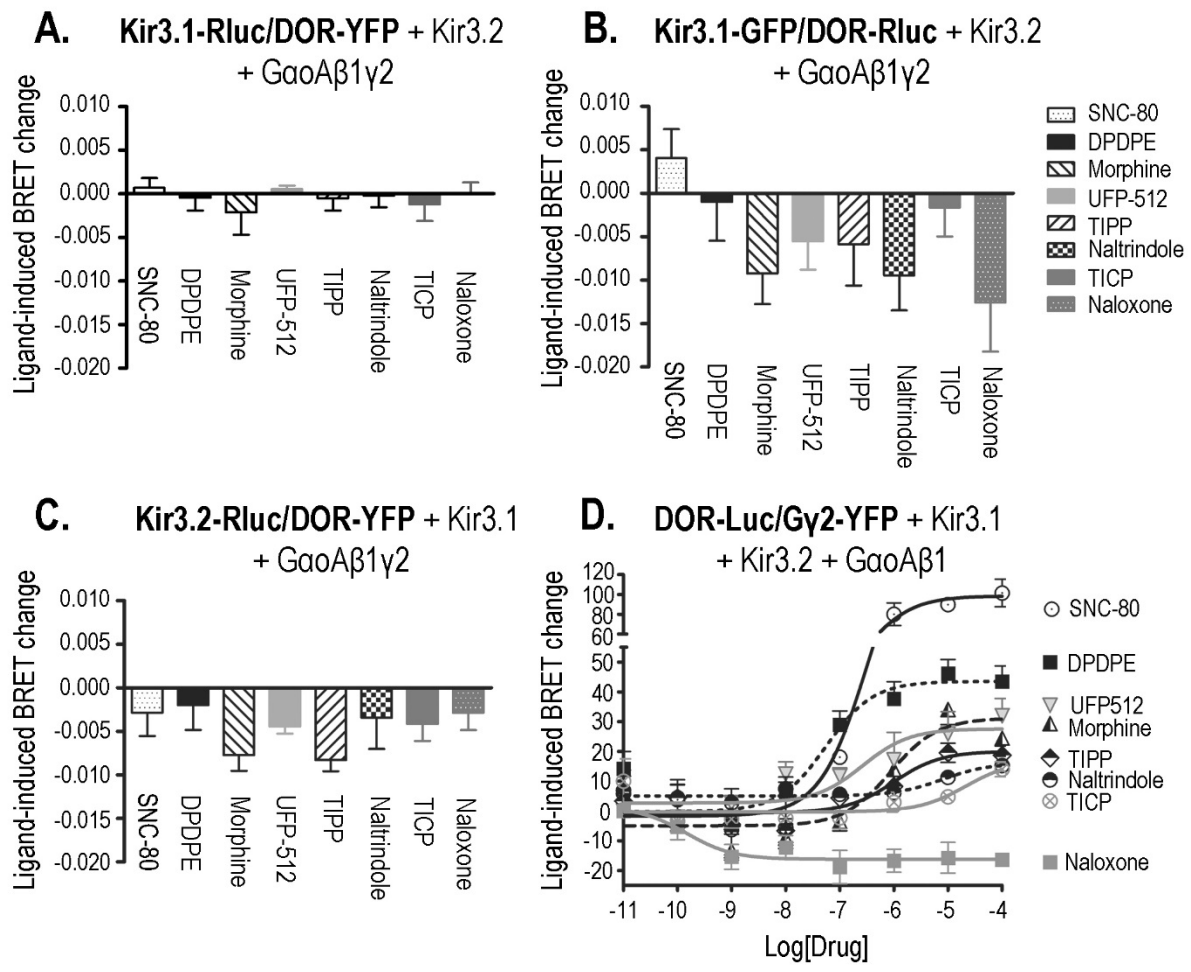


Figure 3

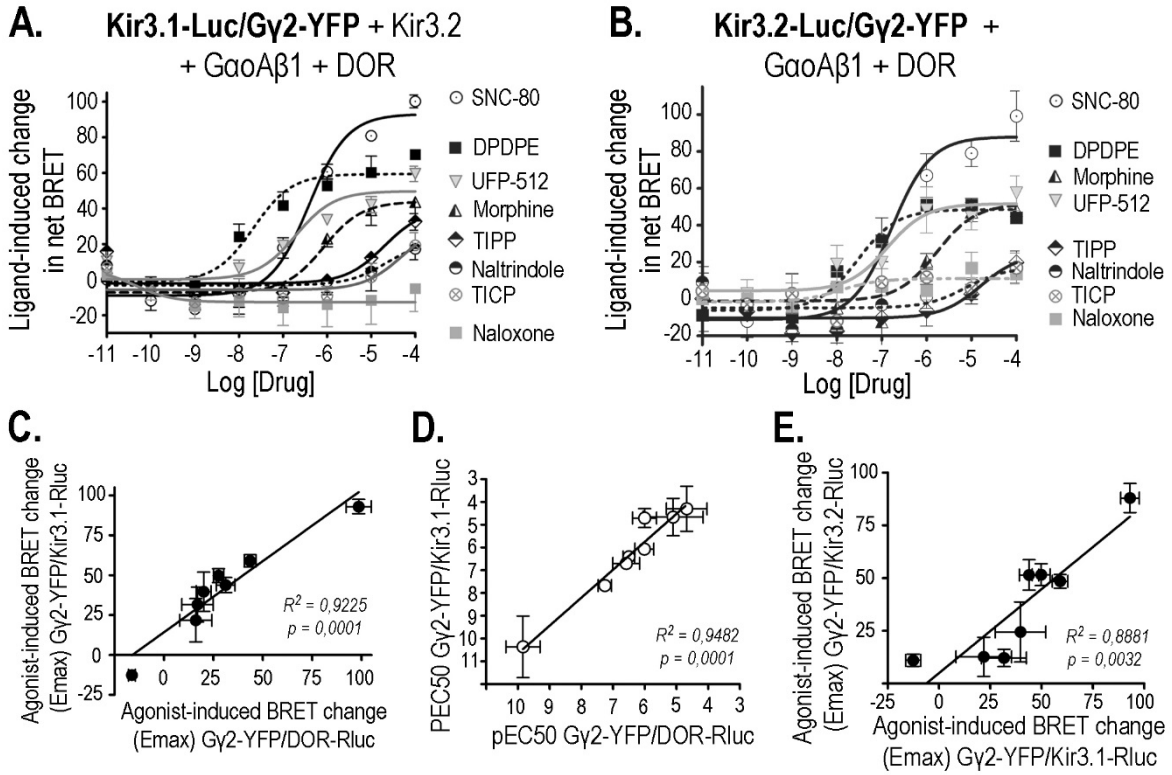
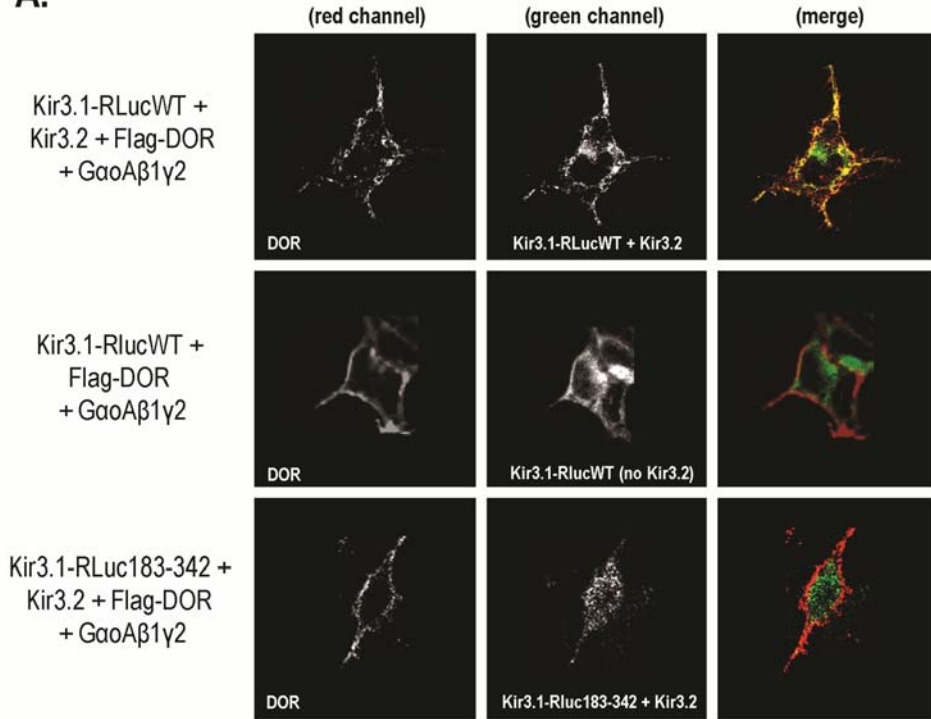


Figure 4

A.



B.

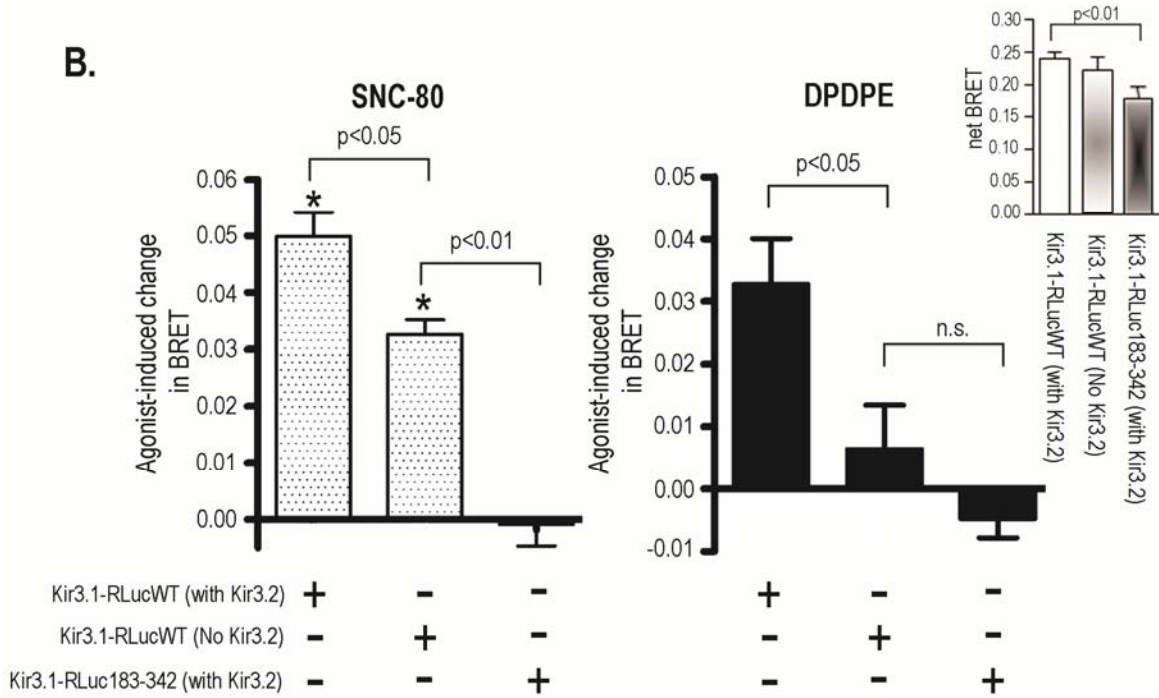


Figure 5

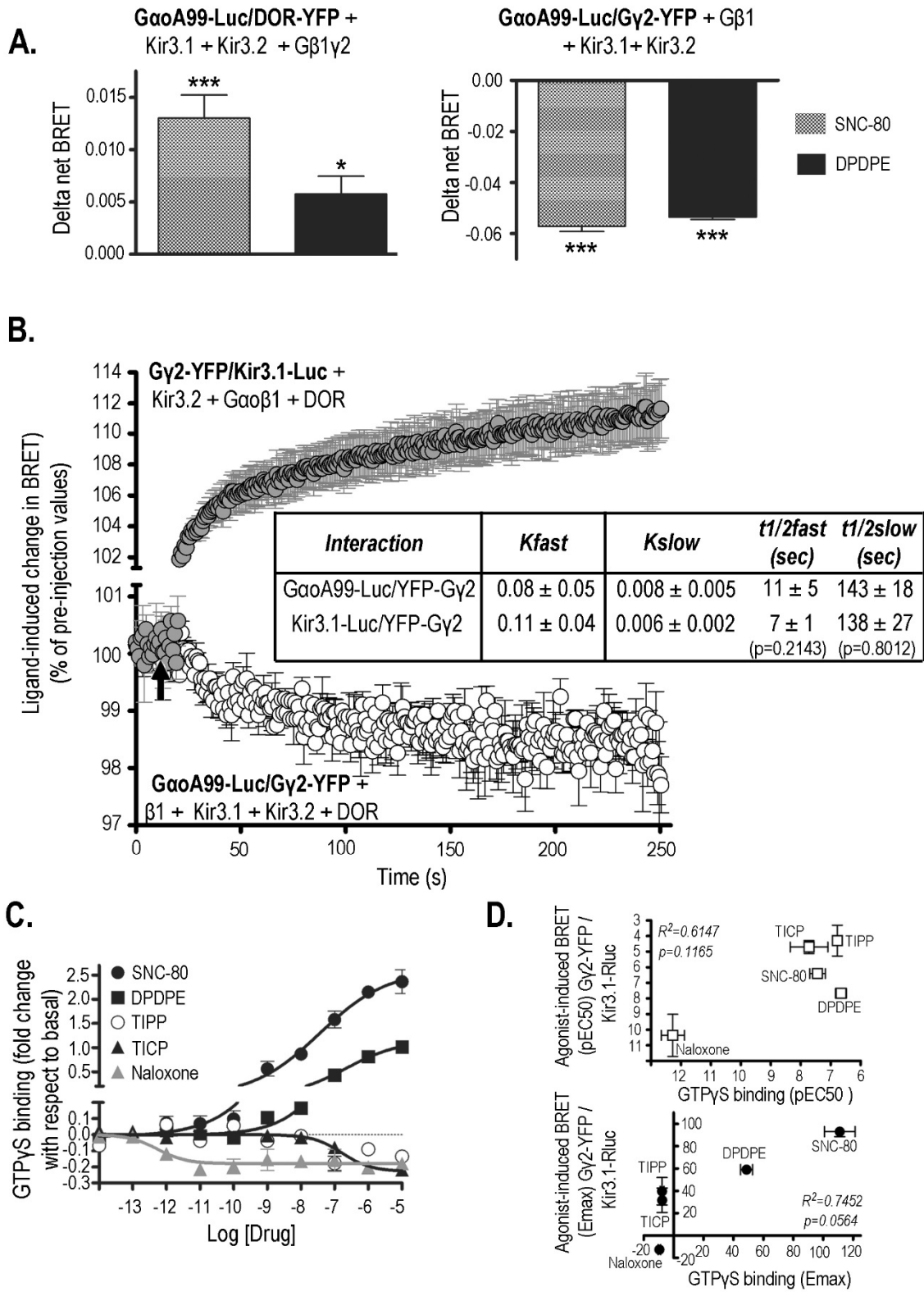


Figure 6

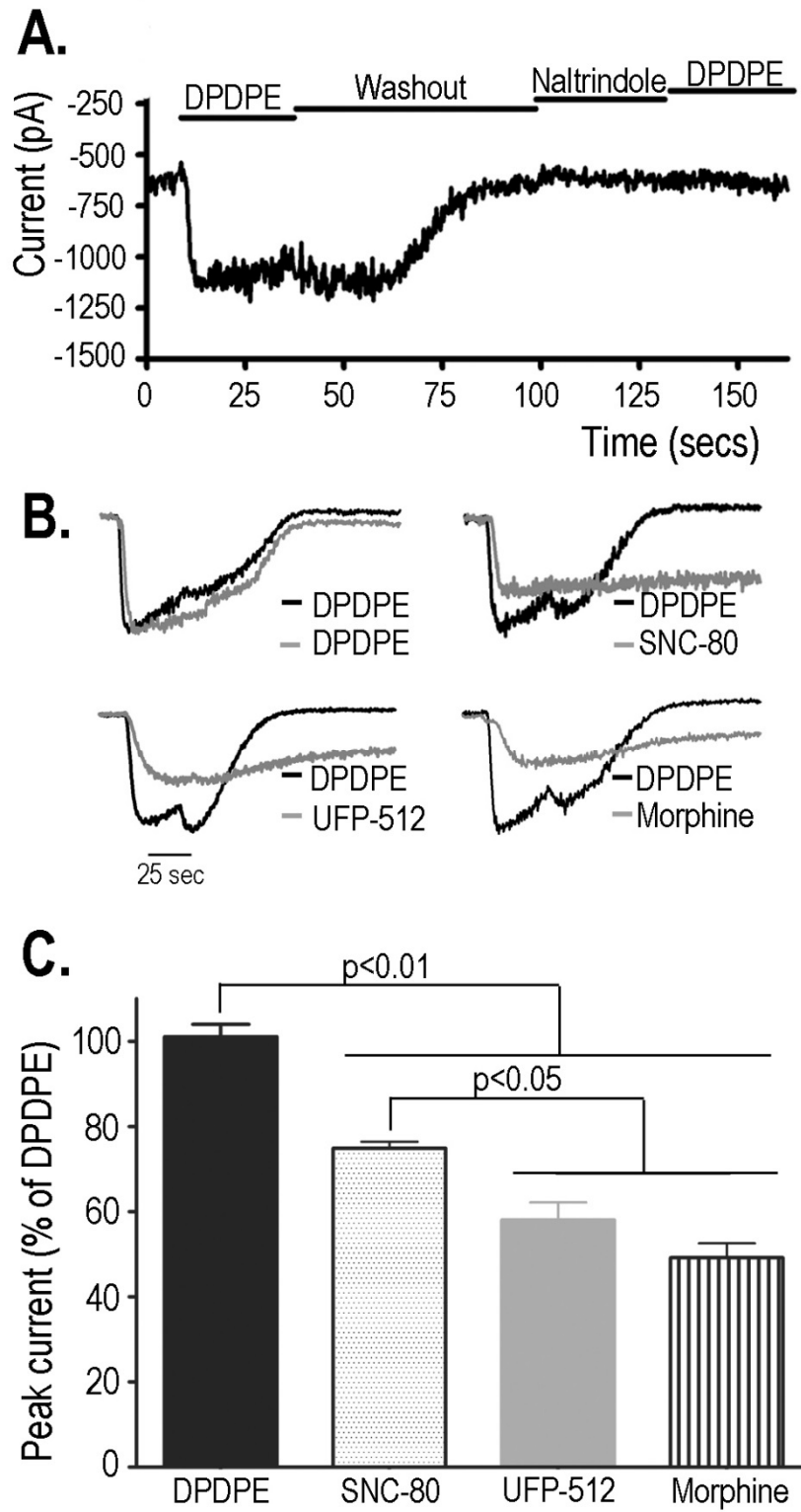


Figure 7

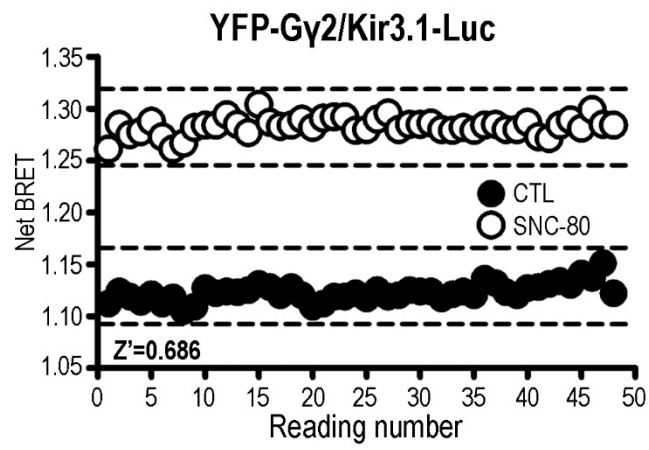


Figure 8

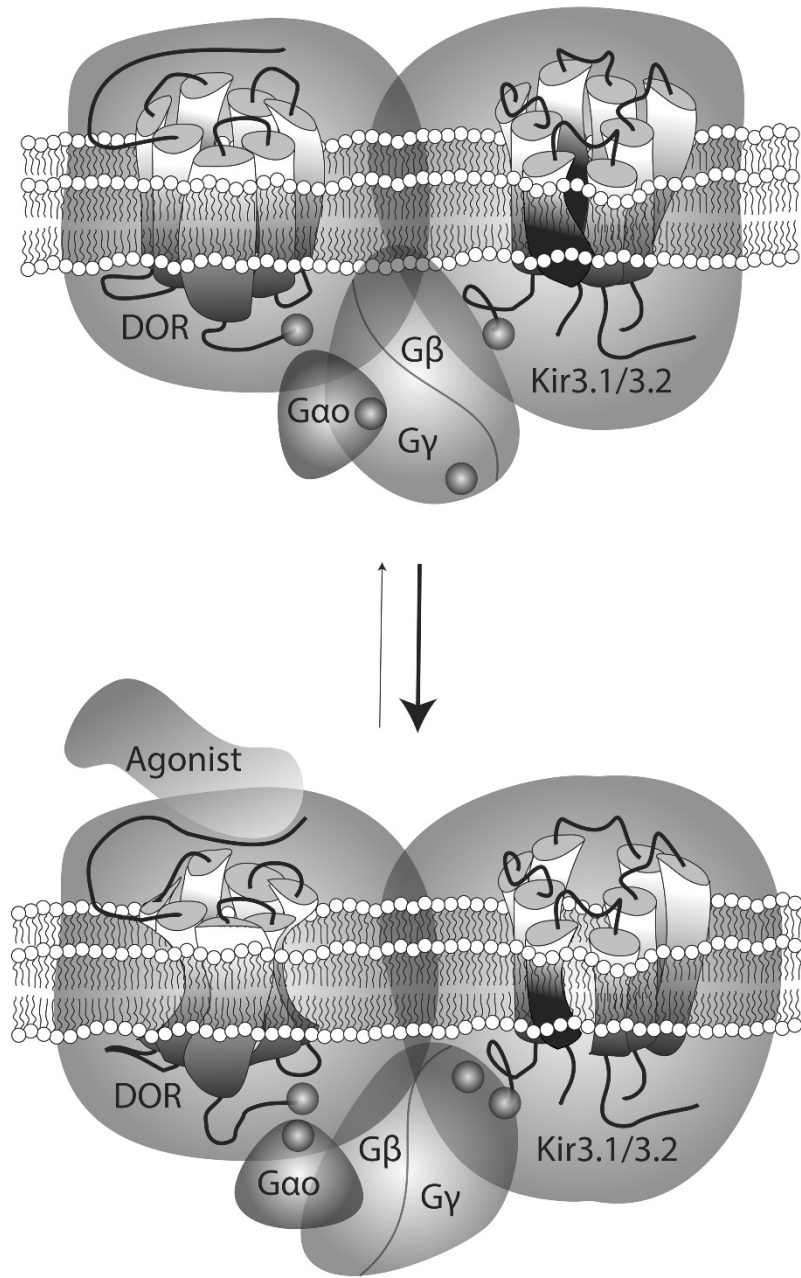


Figure 9

3.2 Deuxième publication

Kir3 Channels Undergo Arrestin-Dependant Internalization Following Delta Opioid Receptor Activation

Karim Nagi, Iness Charfi and Graciela Pineyro.

Cellular and Molecular Life Sciences, (2015). *In press*

3.2.1 Introduction et mise en contexte du deuxième article

Nous avons démontré dans l'article précédent que le récepteur DOR forme un complexe constitutif avec le dimère G $\beta\gamma$ et le canal Kir3.1/Kir3.2 à la membrane et que ce complexe ne se défait pas même après une stimulation aigue du récepteur par un agoniste complet. D'une manière intéressante, plusieurs données indiquent qu'une stimulation soutenue du DOR induit son internalisation [27, 278, 317]. Cela voudrait indiquer que si le canal Kir serait toujours capable de maintenir son interaction avec le récepteur stimulé d'une manière prolongée, on s'attendrait à ce que le canal Kir soit internalisé avec DOR.

Pour explorer toutes ces possibilités, le présent article s'intéressera plutôt à la régulation du complexe DOR/Kir et au destin de ses interactions protéine-protéine après une stimulation soutenue du récepteur avec les agonistes DOR. Après tout, il est largement admis que la régulation dynamique de la disponibilité des canaux Kir3 à la membrane offre un moyen puissant pour moduler leur activité [346]. Néanmoins, de nombreuses études ont caractérisé l'adressage des canaux Kir3 vers la membrane [125, 347, 348]. Cependant, l'identification des voies intracellulaires responsables de retirer les canaux à partir de la surface cellulaire reste une question ouverte qui nécessite d'être élaborée d'une manière plus approfondie. Nous avons commencé à répondre à ces questions en évaluant, par les techniques de BRET et co-ip utilisées dans l'article précédent, la stabilité des interactions protéine-protéine entre les composants du complexe DOR/Kir3 après 30 min de stimulation avec un agoniste complet du récepteur DOR. Les résultats montrent que le complexe adopte une certaine conformation après une stimulation aigue et que ce dernier maintient toujours son intégrité mais change pour une nouvelle conformation suite à une stimulation prolongée. Cette nouvelle conformation adoptée par le complexe DOR/Kir3 indique la présence de la β arr2 qui se trouve recrutée vers

les composants du complexe induisant ainsi l'internalisation simultanée du récepteur DOR et du canal Kir3 via un mécanisme clathrine et dynamine-dépendant. Cette étude permet d'identifier une nouvelle façon de moduler la disponibilité des canaux Kir3 à la membrane et attribue un nouveau rôle pour la β arr dans la régulation des effecteurs canoniques des RCPG, d'où sa pertinence.

Contribution: Dans cette étude, j'ai conçu et réalisé les expériences de toutes les figures sauf l'inset de la figure 5C (réalisé par Iness). De plus, j'ai analysé les résultats et rédigé le manuscrit avec ma directrice de thèse.

3.2.2 Article 2

KIR3 CHANNELS UNDERGO ARRESTIN-DEPENDANT INTERNALIZATION FOLLOWING DELTA OPIOID RECEPTOR ACTIVATION

Karim Nagi^{1,2}, Iness Charfi^{1,2} and Graciela Pineyro^{1,2,3}

¹Sainte-Justine Hospital Research Center, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada.

³Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada.

Corresponding author:

Graciela Pineyro
Centre de Recherche du CHU Ste-Justine,
3175, Cote Ste-Catherine, Bureau 2722
Montréal, (Québec), H3T 1C5

Abstract

Kir3 channels control excitability in the nervous system and the heart. Their surface expression is strictly regulated but mechanisms responsible for channel removal from the membrane remain incompletely understood. Using transfected cells, we show that Kir3.1/3.2 channels and delta opioid receptors (DORs) associate in a complex which persists during receptor activation, behaving as a scaffold that allows beta-arrestin (β arr) to interact with both signaling partners. This organization favored co-internalization of DORs and Kir3 channels in a β arr-dependent manner via a clathrin/dynamin-mediated endocytic path. Taken together, these findings identify a new way of modulating Kir3 channel availability at the membrane and assign a putatively novel role for β arrs in regulating canonical effectors for G protein-coupled receptors.

Keywords:

Kir channels, Trafficking, Signaling complexes, Arrestin, Endocytosis, Opioid.

Introduction

Kir3 channels control neuronal excitability in response to G-protein coupled receptor (GPCR) activation and their surface expression is strictly modulated both, constitutively and dynamically. Primary sequence determines the ability of Kir3 subunits to interact with sorting [1-3] or scaffolding proteins [4] that control channel export to the membrane, their presence at the synapse and their capacity to respond to G proteins. Kir3 subunits may also be dynamically regulated either via their own phosphorylation or that of the activating GPCR [5,6]. Thus, phosphorylation of Kir3 subunits was shown to influence activation kinetics [7] and channel export to the membrane [8] while GABAB receptor phosphorylation was associated with poor membrane recycling of associated channel subunits [5,6,9]. GABAB receptors do not internalize upon phosphorylation but most Kir3-activating receptors do [10,11], raising the question of whether Kir3 subunits could follow. To investigate this possibility, we monitored Kir3 channel trafficking upon delta opioid receptor (DOR) activation. Working with transfected cell lines and neurons we found that DORs and Kir3.1/3.2 subunits formed signaling complexes that maintained their integrity over prolonged receptor stimulation. Over this same period, β arr2 associated with receptors and channels driving their co-internalization in a clathrin/dynamin-dependent manner.

Materials and Methods

DNA constructs

Plasmids encoding murine DORs tagged with YFP at the C-terminus [11], human Kir3.1 subunits bearing Rluc or GFP at the C-terminus, DOR-Rluc constructs and $G_{\alpha A}$ subunits tagged with the donor (Rluc II) at position 99 of the helical domain have been previously described [12,13] as have constructs consisting of YFP fused at the N-terminus of human $G_{\gamma 2}$ and the C-terminus of CD8 or $\beta arr2$ tagged with Rluc at its C-terminal end [14]. Native human Kir3.1 and Kir3.2 subunits, Kir3.1 subunits bearing Flag at position 114 as well as HA-F prostanoid receptor were kindly provided by Dr Terence Hébert (McGill University). Murine DORs tagged with the Myc-epitope at the N-terminus was a generous gift of Dr Louis Gendron (University of Sherbrooke) and HA-CXCR4 was a generous gift of Dr Nikolaus Heveker (University of Montreal).

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 4.2 x 10⁶ cells in 100 mm Petri dishes, cultured for 24 h, and transfected with vectors encoding BRET constructs for Kir3, DORs, G-protein subunits, or $\beta arr2$ in combination with complementary signaling partners, as detailed below. Transfections were done with polyethylenimine (Polysciences) according to a previously published protocol [15].

Primary neuronal cultures.- Cultures were prepared from rat postnatal prefrontal cortex (P0-P2) using a previously described method [11] and transfected with indicated constructs by means of a modified calcium phosphate transfection protocol [14]. In experiments assessing DOR colocalization with Kir3 channels, cells were transfected with Flag-Kir3.1/Kir3.2 and myc-DOR constructs. In experiments in which siRNA was used, rat β arr2 or scrambled siRNA (Dharmacon) were transfected with lipofectamine 24 hs after the constructs at a concentration of 100 pmol/35mm dish. For visualization of channel or receptor colocalization with β arr2, cells were transfected either with Flag-Kir3.1/Kir3.2, untagged DORs and β arr2-Rluc (β arr2/Kir3 colocalization) or Flag-DOR, untagged Kir3.1/Kir3.2 and β arr2-Rluc (β arr2/DOR colocalization).

Experiments were performed two days after transfection using a protocol to specifically label proteins present at the membrane [11,14]. Flag-Kir3.1 subunits and Myc-DORs were simultaneously labeled using rabbit anti-Flag M1 (1:100; Sigma) and mouse anti-Myc antibodies (1:200; Covance) added to the incubation medium of live neurons at 37°C [11]. 30 min after their introduction, cells were exposed to the DMSO 0,01% (this condition was labeled “control”), SNC-80 (1 μ M) or morphine (1 μ M) as indicated in figures. Following treatment, neurons were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% PFA before being permeabilized (surface + intracellular labeling) or not (surface labeling) with in PBS/0.1%Triton. Nonspecific sites were blocked with PBS/BSA 1% (10 min at RT), and neurons were then exposed to second antibodies (Goat anti-Rabbit ALEXA 488; 1:1000; Invitrogen) and (Goat anti-Mouse ALEXA 594; 1:1000; Invitrogen), to respectively visualize channels and receptors. Images were acquired using Zeiss LSM-510

META confocal microscope. When clathrin (Pitstop 2, Abcam; 15 μ M) or dynamin (Dynasore, Sigma; 80 μ M) inhibitors were used, they were respectively introduced 10 or 20 min before agonists, and were washed away before the latter were added. In experiments assessing Flag-Kir3.1/3.2 channel colocalization with HA-CXCR4 or HA-PF receptors were labeled with mouse anti-HA antibody (1:300; Sigma) and second antibodies as above. Since permeabilization reduced membrane labeling as compared to non-permeabilized cells, receptor and channel removal from the cell surface was inferred by monitoring increases in their intracellular immunoreactivities. Mean cytosolic labeling intensity was quantified using ImageJ according to a previously described method [14]. Briefly, for each neuron soma in the slide, we established a perimeter delimited by the inner surface of membrane immunoreactivity and measured integrated fluorescence intensity present within this perimeter but outside the nucleus. Values resulting from this computation were divided by the area comprised between nuclear and inner membrane perimeters of the cell to yield mean cytosolic intensity. Nuclear fluorescence was considered as the background, and its mean intensity subtracted from the quotient described above.

In experiments assessing channel and receptor colocalization with β arr2-Rluc, cells expressing Flag-Kir3.1/Kir3.2 + DOR + β arr2-Rluc or Flag-DOR+ Kir3.1/Kir3.2 + β arr2-Rluc were incubated with rabbit anti-Flag antibody (1:100; 37°C; 30 min) to label receptors or channels and then treated with morphine or SNC-80 as described above. After treatment cells were fixed, permeabilized and blocked before introducing mouse anti-Rluc antibody (1:100; Millipore). Cells were then washed three times with PBS and incubated with PBS/BSA 1% (10 min at RT) before exposure to same second antibodies as above. In order to maintain a similar color code throughout the manuscript, ImageJ was used to assign red color to the

receptor, green to Kir3 subunits and blue for β arr2-Rluc. Finally, line scans were carried out using the ImageJ plot profile function.

BRET assays

All BRET assays were performed in HEK293 cells. To monitor interactions between DORs, Kir3 channel subunits and heterotrimeric G proteins ($G_{\alpha A\beta 1\gamma 2}$), we first completed titration assays which allowed to determine the specificity of association among different interaction partners [16-20]. To do so, a fixed amount of the donor-tagged (Rluc) construct was co-transfected with increasing amounts of the corresponding interaction partner bearing the acceptor (YFP or GFP). Untagged complementary signaling partners were also included in amounts to ensure that donor availability was the limiting factor for complex formation. Donor-acceptor levels were monitored by direct measurement of total fluorescence and luminescence on transfected cells as detailed elsewhere [21]. DNA ratios corresponding to the beginning of the saturation plateau were subsequently used for single point assays [12]. Amounts of DNA constructs transfected in the different experiments are shown in Supplementary Table 1. Two days after transfection, HEK293 cells expressing different BRET pairs and accessory subunits (as indicated in figures) were exposed to vehicle or SNC-80 (1 μ M) for 30 min at 37°C. Treatment was stopped by washing cells with ice-cold phosphate-buffered solution (PBS) following which they were transferred to 96 well plates at a protein concentration of 1.5 mg/ml (Optiplate; PerkinElmer Life Sciences). BRET1 measures were obtained in a Victor3 plate reader (PerkinElmer Life Sciences) 5 min after manual addition of coelenterazine h (Nanolight) and BRET ratios were determined by dividing the intensity of light emitted by YFP (520-550 nm) over the light emitted by Rluc (440-480 nm). BRET

values were then corrected by subtracting the background signal (detected when Rluc-tagged constructs were expressed without acceptor) from the BRET signal detected in cells coexpressing both donor and acceptor constructs (Net BRET).

For assessing β arr2-Rluc recruitment to DOR-YFP or Kir3.1-GFP, BRET assays were conducted using a protocol that we had previously optimized for this purpose [14]. Briefly, HEK293 cells were transfected as indicated in Supplementary Table 1 and two days after transfection, cells were exposed to vehicle or SNC-80 (1 μ M) for 30 min at 37°C. Treatment was stopped and BRET readings taken as above. BRET2 measures (β arr2-Rluc/Kir3.1-GFP) were obtained in a Envision plate reader (Perkin Elmer) 5 min after addition of coelenterazine DeepBlueC (Biotium) and BRET ratios were determined by dividing light emitted by GFP (500-530 nm) over the light emitted by Rluc (370-450 nm).

Co-immunopurification and western blot analysis

This procedure was adapted from a previously described method [21]. Cells were transfected with Kir3.1-Rluc, YFP-G γ ₂, G α oA together with Flag-DOR or cMyc-DOR as indicated. Two days after transfection cells were exposed to SNC-80 (1 μ M; 30 min), or vehicle at 37°C and at the end of treatment they were washed with ice-cold PBS and immediately used for membrane preparation. Resulting gels were transferred onto nitrocellulose (GE Healthcare) and G α o, YFP-G γ ₂ and Kir3.1-Rluc recovered with Flag-DORs were revealed using respectively rabbit anti-G α o (1:1000; Millipore), rabbit anti-GFP (1:10,000; Abcam), mouse anti-Rluc (1:1000; Millipore) 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 Flag-DOR/G α , Flag-DOR/YFP-G γ ₂ and Flag-DOR/Kir3.1-Rluc ratios for each condition.

Western blots were also completed to assess β arr knock-down in siRNA experiments. Neurons transfected with β arr2 or scrambled siRNA were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 1% triton X100, 0.25% deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml leupeptine, 5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, and 10 μ g/ml benzamidine, 1 mM Na₃VO₄ and 1 mM NaF) for 90 minutes. Following centrifugation at 20,000 x g for 30 minutes, the supernatant containing membranes and cytosol was recovered. β arrs were revealed using an antibody (1:1000) kindly provided by Dr Stéphane Laporte (McGill University). Secondary anti-rabbit horseradish-conjugated antibody was used at 1:20.000 dilution (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The first antibody recognizes β arr1/2 but a single band was visible which disappeared in cells transfected with siRNA for β arr2. Nonetheless, we have interpreted knock-down data in terms of general β arr function, avoiding speculation with respect to β arr1/2 subtype specificity.

ELISA-based assays

Measurement of surface-expressed Flag-tagged channels or receptors in HEK293 cells and quantification of their internalization was assessed using an ELISA based method adapted from a previously published protocol [22].

Colocalization analyses of confocal images

Analysis of β arr2-Rluc colocalization with DORs or with Kir3.1 subunits was performed using NIH ImageJ software (intensity correlation analysis plug-in) as previously described [23]. The product of differences from the mean PDM= (red intensity–mean red intensity)×(green intensity–mean green intensity) was calculated for each pixel after background removal. PDMs were then represented as pseudocolored images with a scale bar in which yellow and blue respectively indicate high and low co-localization. To aid visualization, surface plot profiles were created from PDM images, with higher peaks indicating stronger co-localization. The plug-in also provided Pearson's correlation coefficients ranging between 0 and 1, where 1 indicates perfect correlation and 0 represents perfect exclusion. These coefficients were used for statistical comparisons of the degree of colocalization induced by different DOR agonists.

Results

DOR activation promotes internalization of Kir3 channel subunits.

We first investigated whether DOR activation could cause Kir3 subunits to translocate to the intracellular compartment. For this purpose, primary cortical neuron cultures were co-transfected with extracellularly tagged myc-DORs and Flag-Kir3.1 channel subunits (+ Kir3.2) and both species were specifically labeled at the membrane. In the absence of receptor stimulation, some intracellular immunofluorescence was evident (Fig. 1A permeabilized neurons) indicating that the two membrane-labeled species could translocate to the cytosol in the absence of ligand. Following exposure to SNC-80, intracellular labeling intensity was increased in a time-dependent manner both for receptors and Kir3.1 subunits (Fig. 1A-C; quantification at 60 min: DOR_{BASAL}: 6.79 ± 0.37 , DOR_{SNC-80}: 31.73 ± 1.06 , Kir3.1_{BASAL}: 9.86 ± 0.24 , Kir3.1_{SNC-80}: 30.99 ± 1.09). Interestingly, despite translocation, receptors and channels remained co-localized indicating that they both trafficked to the same post-endocytic compartment(s) (Fig. 1A-B). Moreover, in cells in which DORs were not expressed, SNC-80 induced no channel translocation showing that channel trafficking was a DOR-mediated event (Fig. 1D and Supplementary Fig. 1).

To further establish whether channel internalization was triggered by receptor activation, we determined if Kir3 subunit sequestration displayed similar pharmacological properties as other DOR-mediated responses. SNC-80 was previously shown to produce greater DOR internalization than a similar dose of morphine or ARM100390 [11,24], and this internalization could be blocked by an antagonist [25]. Pre-incubation with the antagonist naltrindole (30 min, 10 μ M) abolished SNC-80-induced increases in DORs and Kir3 intracellular immunoreactivities (Fig. 1A-C), further consistent with the fact that DOR

activation drives Kir3 channel sequestration. DOR and Kir3 channel internalization by morphine ($\text{DOR}_{\text{MOR}}: 20.53 \pm 0.99$, $\text{Kir3.1}_{\text{MOR}}: 23.27 \pm 0.94$) and ARM100390 ($\text{DOR}_{\text{ARM}}: 21.95 \pm 1.15$, $\text{Kir3.1}_{\text{ARM}}: 21.33 \pm 0.96$) were also assessed (Fig. 2), and in both cases sequestration was less pronounced than for SNC-80 (Fig. 2B). Moreover, the proportion of receptors and channels that accumulated intracellularly was similar for all agonists ($\text{DOR/Kir3.1 ratios}_{\text{SNC-80}}: 1.7 \pm 0.3$; $\text{ratio}_{\text{morphine}}: 1.5 \pm 0.2$; $\text{ratio}_{\text{ARM}}: 1.9 \pm 0.1$; inset Fig. 2B), indicating that both membrane species internalized as a unit.

We then sought to establish the specificity of these observations by assessing if other GPCRs could induce Kir3 channel internalization. Like DORs, CXCR4 receptors couple to $\text{G}\alpha\text{i/o}$ [26], they internalize upon activation [10] and activate Kir3 currents in neurons [27]. We therefore assessed if CXCR4 and Kir3.1/3.2 channels co-internalized upon exposure to SDF-1 α (200 nM; 60 min). CXCR4 receptors and Kir3 subunits both displayed ligand-independent intracellular labeling (Fig. 3A). However, stimulation with SDF-1 α at a concentration (200 nM; 60 min) that produces maximal CXCR4 sequestration [10] failed to induce channel sequestration (Fig. 3A and 3C). Kir3.1/3.2 subunits were also co-expressed with F prostanoid receptors (FPR) which couple to $\text{G}\alpha\text{q}$ [28]. FPR stimulation by PGF2 α (1 μM ; 60 min) increased intracellular labeling of the receptor but did not modify channel labeling (Fig. 3B and 3D). Taken together, these data indicate that overexpression of receptors and channels cannot simply account for Kir3 channel internalization associated with DOR stimulation.

DORs and Kir3.1/3.2 channels remain associated over the time course of receptor internalization.

The previous section showed that DORs and Kir3 channels internalize as a unit. To evaluate if DORs and Kir3 subunits remained associated during this time lapse, we carried out Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assays, but first verified if Kir3.1/3.2 channels also underwent DOR-promoted internalization in the cellular background where BRET readings were obtained. We observed that in HEK293 cells, SNC-80 (1 μ M) produced time dependent decrease in membrane labeling of both species, each attaining maximal internalization with similar half-lives (Supplementary Fig. 2).

Then, to determine if channels and receptors remained associated within the time frame of sequestration we used BRET-based biosensors. The interactions that were monitored and donor-acceptor BRET pairs that were used for this purpose are shown in Fig. 4A. In a first approach, we used “titrations assays” in which a fixed amount of one of the protein of interest was tagged with the donor Rluc and was co-expressed with increasing amounts of the corresponding interaction partner labeled with the acceptor YFP (Fig. 4A). For the different pairs tested, increasing concentrations of the acceptor induced a progressive increase in spontaneous energy transfer until increments became minimal, corresponding to the theoretical situation in which all donor constructs are in close proximity of an acceptor [29]. This saturation behavior is typical of specific interactions as opposed to minimal and non-saturated bystander BRET curves [29] generated by proteins that have similar distribution as the signaling partners of interest but do not associate into specific complexes (Supplementary Fig. 3). Thus, titration curves carried out in non-stimulated cells confirmed that: a) DORs constitutively and specifically associate with GaoA subunits, with the G β 1 γ 2 dimer and with Kir3.1 subunits (Fig. 4A and Supplementary Fig 3A-C); b) the G β 1 γ 2 dimer associated with

Kir3.1 channel subunits (Fig. 4A and Supplementary Fig. 3D) and c) GαoAβ1γ2 formed the expected heterotrimer (Fig. 4A and Supplementary Fig. 3E).

HEK293 cells were then transfected with donor/acceptor pairs in amounts which produced maximal energy transfer in non-stimulated cells and were subsequently exposed to SNC-80 (1 μM) for 2 min or 30 min. Comparison of BRET values obtained in control cells and cells exposed to the agonist for 2 min indicated that during this short period, the transfer of energy between DOR and channel subunits was not significantly changed, it was reduced at the GαoA-Gβγ interface but increased at biosensors assessing DOR/GαoA, DOR/Gβγ and Gβγ/Kir3 channel interactions (Fig. 4B). From these changes and from the position of donor-acceptor tags in each construct, it is possible to infer that after 2 min receptor stimulation DORs, the GαoGβ1γ2 heterotrimer and Kir3 channel subunits reorganized among themselves, but remained within the complex. Conformational changes underlying these initial BRET changes are represented in Supplementary Fig. 4A-B and further described in supplementary information section. Beyond this initial activation point, we saw that following 30 min exposure to SNC-80 (1 μM), the initial BRET increase between receptors and channels was not reduced but rather moderately enhanced (Fig. 4B), implying that both signaling partners remained associated over sustained DOR activation. In contrast, BRET increases that were initially observed at Gβγ/Kir3 and Gβγ/DOR interfaces decreased, though the reduction did not go below values observed in non-stimulated cells (Fig. 4B), implying that Gβγ remained as integral part of the DOR-Kir3 complex. Observations for GαoA were quite different since the initial BRET increase at the GαoA/DOR interface was replaced by a significant reduction (Fig. 4B), arguing that the energy transfer between the C-terminal end of the receptor and the helical domain of GαoA was reduced beyond its initial resting position. Energy transfer at the interface of GαoA and Gβγ subunits remained as low as it was after 2 min stimulation and no

BRET signal was detected at the G α A/channel interface, making spectroscopic data insufficient to conclude whether G α A actually dissociated from the complex or not. Co-immunoprecipitation assays carried out in control cells and in cells pre-exposed to SNC-80 (1 μ M; 30 min) helped clarify this issue (Fig. 4C-D), indicating that the amount of G α A recovered with the receptor was higher following exposure to SNC-80 than in controls. Thus, taken together, biochemical and spectroscopic data indicate that complex components not only remained associated during sustained receptor activation, but that the stability of G α A association to other complex components was enhanced by conformational changes that took place over this time frame. Supplementary Fig. 4C and supplementary information describe putative conformational reorganizations that support BRET changes induced by sustained activation of the receptor with SNC-80.

β arr is recruited to Kir3.1/3.2 channel subunits and promotes their co-internalization with DORs.

Within the time frame of internalization DORs, G proteins and Kir3.1/3.2 subunits remained associated but reorganized within the complex. We therefore hypothesized that this rearrangement could represent the interaction of complex components with regulatory proteins. We recently showed that DOR activation may induce β arr interaction with G $\beta\gamma$ subunits as well as DORs [14] and given that here the dimer remained associated to the channel, we assessed whether Kir3 channel subunits could also interact with this regulatory protein. To do so, HEK293 cells were transfected with a fixed amount of donor-tagged β arr2 (β arr2-Rluc) and increasing amounts of either DOR-YFP or Kir3.1-GFP acceptors together with complementary Kir3.2 and G α A β 1 γ 2 subunits (Fig. 5A-B). Cells were then treated for 30 min with SNC-80 (1 μ M) and BRET measures were subsequently taken. No BRET signal

was detected in untreated cells but, in those exposed to SNC-80, there was a saturable increase in energy transfer both at DOR/ β arr2 and Kir3/ β arr2 interfaces, indicating that the regulatory protein was recruited to Kir3 channel subunits as well as receptors. Given this interaction, we then sought to verify if channel sequestration was also β arr-dependent. For this purpose cortical cultures were transfected with Myc-DOR and Flag-Kir3.1/3.2 subunits together with β arr siRNA or scrambled siRNA (Fig. 5C). We detected no difference in basal cytosolic immunoreactivities for receptors and channels in cells transfected with scrambled or active siRNA (Fig. 5D-E). On the other hand, internalization of the two signaling partners was significantly reduced in β arr-silenced cells exposed to SNC-80 (1 μ M; 60 min). When tested in heterologous systems, opioid receptor agonists differ considerably in their ability to recruit β arr and induce internalization of the receptor. For example, SNC-80 produces marked and stable DOR- β arr interaction while recruitment by morphine is minimal. These patterns of β arr recruitment are considered to respectively produce high or marginal receptor internalization [11,14]. Thus, we determined whether β arrs were distinctively involved in the internalization of DOR-Kir3 complexes by the two agonists (Fig. 5C-E). As for SNC-80, knock-down of the regulatory protein reduced morphine-induced accumulation of intracellular DOR and Kir3.1 immunoreactivities indicating that internalization of the complex by morphine was also dependent on β arr.

To further characterize β arr interaction with DORs and Kir3 channels and to ascertain possible ligand-specific differences in the way this regulatory protein associates with complex components, we monitored ligand-induced subcellular distribution of the two signaling partners. For this purpose, β arr2-Rluc was alternatively co-transfected with Flag-DORs and untagged channel subunits or with Flag-Kir3.1/3.2 subunits and untagged receptors. In non-stimulated cells, β arr2-Rluc was distributed throughout the cytosol while receptors and

channels were predominantly found at the membrane, where their interaction with β arr2 was minimal. In contrast, constitutively internalized complex components displayed some degree of colocalization with the regulatory protein (β arr2/DORs: Pearson's coefficient: 0.54 ± 0.04 ; β arr2/Kir3 channels (Pearson's coefficient: 0.55 ± 0.03 ; $n=3$) (Fig. 6). Sustained stimulation with SNC-80 (1 μ M; 60 min) induced redistribution and concentration of cytosolic β arr2 to the sites where receptor (arrow head, Fig. 6A) and channels (arrow head, Fig. 6B) had accumulated, significantly increasing its colocalization with either signaling partner (Fig. 6C-F). After 60 min stimulation with morphine, the situation was quite different, with no evidence of β arr2 redistribution and no significant increase in Pearson's coefficient (Supplementary Fig. 5). Thus, despite similarly relying on β arr function for DOR/Kir3 channel internalization, the stability of β arr2 interaction with the complex differed considerably for SNC-80 and morphine since only the former induced active accumulation of DORs, Kir3 subunits and β arr2.

DOR-Kir3.1/3.2 signaling complexes internalize via a clathrin/dynamin mediated mechanism.

β arrs cooperate with adaptor protein 2 (AP2) to promote the accumulation of membrane cargo in clathrin coated vesicles, and these are then pinched off to the cytosol by the action of dynamin [30]. To determine whether internalization of DOR-Kir3.1/3.2 channel complexes followed this path, we used pharmacological inhibitors that either stall clathrin pit dynamics [31] or block dynamin's GTPase activity [32]. We did not observe any significant effect of clathrin (Pitstop 2, 15 μ M) nor dynamin inhibitor (Dynasore, 10 μ M) on constitutive internalization of either membrane species, but both blockers reduced DOR (Fig. 7A and 7C) and Kir3 (Fig. 7B and 7D) internalization by morphine and SNC-80, indicating that the complex followed one common endocytic route independent of the agonist that activates the

receptor. Interestingly, neither Pitstop 2 nor Dynasore eliminated DOR internalization by morphine or SNC-80, but they both abolished Kir3 channel internalization (Fig. 7C-D). A similar observation was obtained with β arr silencing, though residual internalization of the receptor only attained significance following SNC-80 treatment (Fig. 5D). A plausible explanation for these observations is that a small subpopulation of receptors have internalized independent of the channel via a mechanism that relies neither on β arr, clathrin nor dynamin.

Discussion:

Dynamic regulation of Kir3 channel availability at the membrane affords powerful modulation of neuronal excitability and ultimately of behavior [5,6]. The number of channels present at the surface at any given time results from a fine equilibrium between their incorporation to and their removal from the plasma membrane. Considerable evidence has been gathered with respect to the way incorporation is driven and modulated establishing that primary sequence [1] and tyrosine phosphorylation [8] may regulate Kir3 subunit export to the membrane. Similarly, dephosphorylation of either the channel [33] or of associated GABA_B receptors [5,6] were shown to interfere with membrane re-insertion of channel subunits via the recycling path, but much less was known about mechanisms participating in surface removal of channel subunits. The observation that M2 muscarinic receptors (M2R) and Kir3 subunits accumulate in the cytosol of acetylcholine-releasing PC12 cells had led to the proposal that these receptors would internalize and drag the channel intracellularly [34]. Here, we have addressed this hypothesis and demonstrated that DOR activation by different agonists caused receptors and Kir3 channels to actually translocate from the membrane to the cytosol. The extent of translocation was distinct for SNC-80, morphine and ARM100390 but the proportion

of receptors and channels internalized by each ligand did not differ, indicating that both signaling partners trafficked as a unit.

Results also showed that Kir3 channel sequestration is not universally triggered by all receptors that regulate channel activity. Thus, although Gαq proteins modulate Kir3 channel activity via PIP2 depletion [35], activation of the Gαq-coupled FPR did not modify channel translocation to the cytosol. Similarly, despite their ability to generate Kir3 channel currents [27] and to undergo SDF-1α-dependent sequestration [10], exposure to the agonist caused CXCR4 receptors but not Kir3 subunits to internalize. Receptor-dependent differences have also been reported in the endocytic trafficking of N-type Ca²⁺ (Cav2.2) channels whose sequestration is triggered by opioid-like receptors (ORL1) but not MORs [36]. The distinct ability of ORL1 receptors to promote channel sequestration was conferred by direct physical association between the C-terminal end of the receptor and that of Cav2.2 alpha subunits [36]. Although this type of interaction has not been reported for Kir3 channels subunits, there is considerable evidence that Kir3 channels and GPCRs may organize into multimeric arrays. Studies carried out on native membranes indicate that Kir3 channel subunits may be recovered by immunoprecipitating striatal D2 receptors [37], cerebellar GABA_B receptors [38] or β₂-adrenergic receptors present in heart and whole brain lysates [37]. Spectroscopic studies have confirmed these observations [37,38] but have also shown that not all receptors display the same tendency to associate into multimeric arrays [39]. The tendency to form constitutive complexes may be influenced by the type of Gai/o subunit with which the receptor interacts [40], the level of constitutive activity of the receptors [39] as well as by scaffolding proteins that confine and concentrate Kir3 channels to specialized compartments together with receptors [41,4]. As would be expected from high levels of constitutive activity displayed by

DORs [42], these receptors, G α A β 1 γ 2 heterotrimers and Kir3.1/3.2 subunits spontaneously associate into a complex [12].

Here, we show that despite considerable rearrangements among interaction partners, the complex maintained its integrity from initial moments of receptor stimulation until maximal internalization was attained, providing a platform for persistent β arr2 interaction. We had recently shown that SNC-80 induces rapid β arr2 recruitment, not only to receptors but to the G $\beta\gamma$ dimer and supplied evidence that these interactions were maintained over prolonged exposure to the agonist [14]. Here, we show that canonical G $\beta\gamma$ effectors are also subject to direct and prolonged interaction with β arr2, and establish proof that endogenous β arr in cortical neuron cultures drives joint sequestration of DOR and Kir3 channels via the clathrin/dynamin endocytic route. This type of channel regulation is in contrast with the one described for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2), which takes place directly at the cell surface and rather than removing Kir3 subunits from the membrane involves conformational rearrangements that prevent G $\beta\gamma$ from effectively activating the channel [43]. Results obtained in neurons further suggest that β arrs, DORs and Kir3 channels remain persistently associated after exposure to SNC-80 but not morphine, since only the former caused β arr to colocalize with the two signaling partners that accumulated in the cytosol.

Distinct modes of opioid receptor association with β arrs have been proposed as possible contributors to ligand-specific potential for generating tolerance [44,45]. SNC-80 and morphine both induce analgesic tolerance that involves β arrs [46,24,14] but, in keeping with differences observed in the present study, their tolerance profiles are quite distinct. While a single injection of SNC-80 may abolish analgesic responsiveness for as long as four hours [24] it takes at least three days of continuous morphine administration for its analgesic actions to disappear [46]. Differential sequestration of receptors and channels within β arr-containing

complexes may contribute to these two distinct tolerance profiles, particularly the rapidity and persistence of SNC-80's tolerance profile. In this sense we have previously shown that the stable DOR- β arr2 association promoted by SNC-80 interfered with receptor recycling to membrane leading to receptor desensitization and marked development of acute analgesic tolerance. These are much less severe or absent with DPDPE, another DOR agonist which, similar to morphine, fails to promote sustained β arr2 association with the activated receptor [14].

In conclusion, this study shows that β arr recognizes DORs and Kir3 channels as a complex producing their joint internalization via a clathrin/dynamin-dependent mechanism.

Acknowledgments

This work was supported by grant [311997] from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to GP. KN holds a studentship from Ste-Justine Hospital Research Center and the Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies, University of Montreal. IC holds an FRQS fellowship.

Conflict of Interest: None.

References:

1. Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, Fried SR, Jan YN, Jan LY (2002) Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* 33 (5):715-729
2. Lunn ML, Nassirpour R, Arrabit C, Tan J, McLeod I, Arias CM, Sawchenko PE, Yates JR, 3rd, Slesinger PA (2007) A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. *Nature neuroscience* 10 (10):1249-1259. doi:10.1038/nn1953
3. Munoz MB, Slesinger PA (2014) Sorting nexin 27 regulation of G protein-gated inwardly rectifying K(+) channels attenuates in vivo cocaine response. *Neuron* 82 (3):659-669. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.011
4. Hibino H, Inanobe A, Tanemoto M, Fujita A, Doi K, Kubo T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (2000) Anchoring proteins confer G protein sensitivity to an inward-rectifier K(+) channel through the GK domain. *The EMBO journal* 19 (1):78-83. doi:10.1093/emboj/19.1.78
5. Hearing M, Kotecki L, Marron Fernandez de Velasco E, Fajardo-Serrano A, Chung HJ, Lujan R, Wickman K (2013) Repeated cocaine weakens GABA(B)-Girk signaling in layer 5/6 pyramidal neurons in the prelimbic cortex. *Neuron* 80 (1):159-170. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.019
6. Padgett CL, Lalive AL, Tan KR, Terunuma M, Munoz MB, Pangalos MN, Martinez-Hernandez J, Watanabe M, Moss SJ, Lujan R, Luscher C, Slesinger PA (2012) Methamphetamine-evoked depression of GABA(B) receptor signaling in GABA neurons of the VTA. *Neuron* 73 (5):978-989. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.031
7. Ippolito DL, Temkin PA, Rogalski SL, Chavkin C (2002) N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Galphai. *The Journal of biological chemistry* 277 (36):32692-32696. doi:10.1074/jbc.M204407200
8. Mora SI, Escobar LI (2005) Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett* 579 (14):3019-3023. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.056
9. Terunuma M, Pangalos MN, Moss SJ (2010) Functional modulation of GABAB receptors by protein kinases and receptor trafficking. *Advances in pharmacology* 58:113-122. doi:10.1016/S1054-3589(10)58005-0
10. Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu YL, Cen B, Wu GX, Pei G (2000) beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *The Journal of biological chemistry* 275 (4):2479-2485

11. Charfi I, Nagi K, Mnie-Filali O, Thibault D, Balboni G, Schiller PW, Trudeau LE, Pineyro G (2014) Ligand- and cell-dependent determinants of internalization and cAMP modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71 (8):1529-1546. doi:10.1007/s00018-013-1461-7
12. Richard-Lalonde M, Nagi K, Audet N, Sleno R, Amraei M, Hogue M, Balboni G, Schiller PW, Bouvier M, Hebert TE, Pineyro G (2013) Conformational dynamics of Kir3.1/Kir3.2 channel activation via delta-opioid receptors. *Molecular pharmacology* 83 (2):416-428. doi:10.1124/mol.112.081950
13. Dacres H, Michie M, Trowell SC (2012) Comparison of enhanced bioluminescence energy transfer donors for protease biosensors. *Analytical biochemistry* 424 (2):206-210. doi:10.1016/j.ab.2012.02.028
14. Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, Amraei M, Chabot-Dore AJ, Millecamps M, Stone LS, Pineyro G (2012) Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (14):4827-4840. doi:10.1523/JNEUROSCI.3734-11.2012
15. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16):7297-7301
16. Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2 (3):177-184. doi:10.1038/nmeth743
17. Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hebert TE (2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *Journal of cell science* 119 (Pt 13):2807-2818. doi:10.1242/jcs.03021
18. Ayoub MA, Maurel D, Binet V, Fink M, Prezeau L, Ansanay H, Pin JP (2007) Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galphai1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Molecular pharmacology* 71 (5):1329-1340. doi:10.1124/mol.106.030304
19. Audet N, Pineyro G (2011) Using BRET to detect ligand-specific conformational changes in preformed signalling complexes. *Methods Mol Biol* 756:149-163. doi:10.1007/978-1-61779-160-4_7
20. Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13 (9):778-786. doi:10.1038/nsmb1134

21. Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, Vallieres M, Schiller PW, Bouvier M, Pineyro G (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *The Journal of biological chemistry* 283 (22):15078-15088. doi:10.1074/jbc.M707941200
22. Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, Huard K, Paquin-Gobeil M, Pineyro G (2009) Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *J Cell Mol Med* 13 (1):147-163
23. Di Felice V, Cappello F, Montalbano A, Ardizzone NM, De Luca A, Macaluso F, Amelio D, Cerra MC, Zummo G (2007) HSP90 and eNOS partially co-localize and change cellular localization in relation to different ECM components in 2D and 3D cultures of adult rat cardiomyocytes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 99 (12):689-699. doi:10.1042/BC20070043
24. Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2009) In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PloS one* 4 (5):e5425. doi:10.1371/journal.pone.0005425
25. Ong EW, Xue L, Olmstead MC, Cahill CM (2014) Prolonged morphine treatment alters delta opioid receptor post-internalization trafficking. *British journal of pharmacology*. doi:10.1111/bph.12761
26. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Piccioli P, Costa A, Florio T, Schettini G (1999) Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *Journal of neurochemistry* 73 (6):2348-2357
27. Guyon A, Nahon JL (2007) Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha on neuronal activity. *Journal of molecular endocrinology* 38 (3):365-376. doi:10.1677/JME-06-0013
28. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological reviews* 46 (2):205-229
29. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* 277 (47):44925-44931. doi:10.1074/jbc.M205767200
30. Raimondi A, Ferguson SM, Lou X, Armbruster M, Paradise S, Giovedi S, Messa M, Kono N, Takasaki J, Cappello V, O'Toole E, Ryan TA, De Camilli P (2011) Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 70 (6):1100-1114. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.031

31. von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, Gromova K, Puchkov D, Robertson MJ, MacGregor KA, Tomilin N, Pechstein A, Chau N, Chircop M, Sakoff J, von Kries JP, Saenger W, Krausslich HG, Shupliakov O, Robinson PJ, McCluskey A, Haucke V (2011) Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 146 (3):471-484. doi:10.1016/j.cell.2011.06.025
32. Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM (2010) Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. *PLoS one* 5 (1):e7764. doi:10.1371/journal.pone.0007764
33. Chung HJ, Qian X, Ehlers M, Jan YN, Jan LY (2009) Neuronal activity regulates phosphorylation-dependent surface delivery of G protein-activated inwardly rectifying potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2):629-634. doi:10.1073/pnas.0811615106
34. Clancy SM, Boyer SB, Slesinger PA (2007) Coregulation of natively expressed pertussis toxin-sensitive muscarinic receptors with G-protein-activated potassium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (24):6388-6399. doi:10.1523/JNEUROSCI.1190-07.2007
35. Kobrinsky E, Mirshahi T, Zhang H, Jin T, Logothetis DE (2000) Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K⁺-current desensitization. *Nat Cell Biol* 2 (8):507-514. doi:10.1038/35019544
36. Altier C, Khosravani H, Evans RM, Hameed S, Peloquin JB, Vartian BA, Chen L, Beedle AM, Ferguson SS, Mezghrani A, Dubel SJ, Bourinet E, McRory JE, Zamponi GW (2006) ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nature neuroscience* 9 (1):31-40. doi:10.1038/nn1605
37. Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* 277 (48):46010-46019. doi:10.1074/jbc.M205035200
38. Ciruela F, Fernandez-Duenas V, Sahlholm K, Fernandez-Alacid L, Nicolau JC, Watanabe M, Lujan R (2010) Evidence for oligomerization between GABAB receptors and GIRK channels containing the GIRK1 and GIRK3 subunits. *The European journal of neuroscience* 32 (8):1265-1277. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07356.x
39. Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bunemann M (2005) Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *The EMBO journal* 24 (23):4106-4114. doi:10.1038/sj.emboj.7600870

40. Frank M, Thumer L, Lohse MJ, Bunemann M (2005) G Protein activation without subunit dissociation depends on a G α (i)-specific region. *The Journal of biological chemistry* 280 (26):24584-24590. doi:10.1074/jbc.M414630200
41. Nassirpour R, Bahima L, Lalive AL, Luscher C, Lujan R, Slesinger PA (2010) Morphine- and CaMKII-dependent enhancement of GIRK channel signaling in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (40):13419-13430. doi:10.1523/JNEUROSCI.2966-10.2010
42. Fenalti G, Giguere PM, Katritch V, Huang XP, Thompson AA, Cherezov V, Roth BL, Stevens RC (2014) Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature* 506 (7487):191-196. doi:10.1038/nature12944
43. Raveh A, Cooper A, Guy-David L, Reuveny E (2010) Nonenzymatic rapid control of GIRK channel function by a G protein-coupled receptor kinase. *Cell* 143 (5):750-760. doi:10.1016/j.cell.2010.10.018
44. Raehal KM, Schmid CL, Groer CE, Bohn LM (2011) Functional selectivity at the mu-opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacological reviews* 63 (4):1001-1019. doi:10.1124/pr.111.004598
45. Nagi K, Pineyro G (2011) Regulation of opioid receptor signalling: implications for the development of analgesic tolerance. *Mol Brain* 4:25. doi:1756-6606-4-25 [pii] 10.1186/1756-6606-4-25
46. 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 (6813):720-723. doi:10.1038/35047086

Figure legends:

Figure 1. DORs and Kir3.1/3.2 channels co-internalize upon receptor activation by an agonist. (A) Cortical neuron cultures transfected with myc-DOR and Flag-Kir3.1/3.2 subunits were treated as indicated. Neurons were all processed for intracellular and surface labeling (permeabilized) except as indicated in the figure for exclusive visualization of surface immunoreactivities (non-permeabilized). Scale bars, 5 μm . (B) Line scans correspond to traces shown in merged images (Kir3.1 = green, DOR = red). (C) Histograms correspond to mean intracellular fluorescence intensity and represent mean \pm SEM of 3-9 experiments with 39 to 59 neurons analyzed per condition. Changes in DOR and Kir3.1 immunoreactivities were analyzed separately using one-way ANOVA to compare the different treatments (*including those in next figure*). Posthoc comparisons were done using Bonferroni correction and are indicated in the figure. (D) Histograms correspond to mean intracellular fluorescence intensity of Flag-Kir3 subunits in cells that were transfected only with the channel and treated or not with SNC-80 (1 μM ; 60 min). Data represent mean \pm SEM of 3 experiments with 36 to 40 neurons analyzed per condition. Statistical comparisons were done using Student's *t*-test; (n=3), p= 0.4762.

Figure 2. DOR and Kir3 internalization display similar pharmacological profiles. (A) Cortical neuron cultures were exposed to morphine or ARM100390 (1 μM , 60 min) and permeabilized for visualization of membrane and intracellular labeling. Graphs below: line scans corresponding to traces shown in merged images (Kir3.1 = green, DOR = red). Scale bars, 5 μm . (B) Histograms correspond to mean \pm SEM of 3-9 experiments with 42 to 90 neurons analyzed per condition; SNC-80 was introduced for comparison. Data were analyzed

as in figure 1; ARM100390 vs CTL: $p < 0.0001$; morphine vs CTL: $p < 0.0001$. Additional comparisons are shown in the figure. ***Inset***: Ratios of ligand-induced changes in intracellular immunoreactivities for DOR and Kir3 ($p = 0.5162$; one way ANOVA; $n = 3-8$).

Figure 3. CXCR4 and F prostanoid (FP) receptor stimulation does not induce Kir3 internalization. Cortical neuron cultures transfected with **(A)** HA-CXCR4/Flag-Kir3.1/3.2 or **(B)** HA-FPR/Flag-Kir3.1/3.2 were respectively exposed to SDF-1 α or PGF2 α and then permeabilized for visualization of membrane and intracellular labeling. Scale bars, 5 μm . **(C)** Histograms correspond to intracellular labeling intensity for CXCR4 receptors and Kir3 subunits and correspond to mean \pm SEM of 3 experiments with 24 to 32 neurons analyzed per condition. Changes in DOR and Kir3.1 immunoreactivities were analyzed separately using Student's *t*-test, and significance is given in the figure, Comparison Kir $p = 0.6215$. **(D)** Histograms correspond to intracellular labeling intensity for FP receptors and Kir3 subunits, ($n=3$). Data represented and analyzed as in **(C)**. Comparison Kir $p = 0.5233$.

Figure 4. DORs, Ga $\beta\gamma$ subunits and Kir3.1/3.2 channels remain associated but undergo conformational rearrangements during sustained receptor stimulation. **(A)** Interactions among different complex components (*inset*) were studied in BRET titration assays. For this purpose, HEK293 cells were transfected with indicated BRET pairs and accessory signaling partners as described in text. Titration curves corresponding to a single experiment carried out in triplicate are shown. **(B)** HEK293 cells were transfected with a stable proportion of indicated BRET pairs, and exposed or not to SNC-80 (1 μM) for 2 or 30 min. Histograms represent agonist-induced changes in net BRET and correspond to 3-10

experiments carried out in triplicates. Significance of agonist-induced changes in energy transfer was established by one-way ANOVA comparing net BRET signals generated in controls to those generated in cells that were treated for 2 or 30 min $**p < 0.01$; $***p < 0.0001$ (actual net BRET values are shown in Supplementary information, Supplementary Table 1). Comparison of ligand-induced BRET changes at the two stimulation time points was done by Student's t test and appear in the figure. **(C)** HEK293 cells were transfected to express Flag-DOR (or Myc-DOR as indicated), GαoAβ1YFP-γ2 and Kir3.1-Rluc/3.2 channel subunits and were exposed or not to SNC-80 (1 μM; 30 min). A representative example of signaling partners recovered with Flag-DORs is shown. *Inset*: proteins present in lysate. **(D)** Immunoreactivity of different complex components recovered with the receptor was expressed as a ratio of FLAG-DORs in the corresponding sample. Results were expressed as percentage of basal ratios and represent mean ± SEM of 5 independent experiments. Statistical comparisons done using Student's t test; p values appear in the figure.

Figure 5. βarr is necessary for DOR and Kir3 channel internalization. HEK293 cells transfected with a fixed amount of βarr2-Rluc and increasing amounts of **(A)** DOR-YFP or **(B)** Kir3.1-GFP plus indicated complex components were incubated or not with SNC-80 (1 μM, 30 min). Results correspond to the mean of 4-5 independent experiments and are expressed as mean ± SEM of netBRET values. Curves were analyzed by two-way ANOVA revealing an: effect of drug ($p < 0.0001$), effect of donor/acceptor ratios ($p < 0.0001$) and interaction ($p < 0.0001$). **(C)** Cortical neuron cultures were transfected with myc-DOR and Flag-Kir3.1/3.2 channels together with scrambled or βarr2 siRNA, and then treated or not with SNC-80 or morphine (1μM; 30 min). Scale bars, 5 μm. *Inset*: illustrates effect of βarr2 siRNA

on expression of endogenous β arr using an antibody that recognizes β arr1/2. Histograms represent mean intracellular fluorescence intensity of **(D)** myc-DORs and **(E)** Flag-Kir3.1 subunits and correspond to mean \pm SEM of 3 experiments with 25 to 29 neurons analyzed per condition. DOR and Kir3 internalization were analyzed independently using two-way ANOVA. In both cases there was an effect of drug ($p < 0.0001$), of siRNA ($p < 0.0001$) and interaction ($p < 0.0001$). Post hoc comparisons indicated that both agonists significantly enhanced DOR and Kir3 immunoreactivities in cells transfected with scrambled controls (** $p < 0.0001$) while only SNC-80 specifically increased DOR immunoreactivity in β arr-silenced cells (* $p < 0.05$). Additional comparisons appear in the figure.

Figure 6. SNC-80 promoted β arr2 colocalization with receptors and channels.

Cortical neuron cultures expressing either β arr2-Rluc, Flag-DORs and untagged channel subunits **(A)** or β arr2-Rluc, Flag-Kir3.1/3.2 subunits and untagged DORs **(B)** were exposed to SNC-80 as indicated. Arrow heads show redistribution of β arr2-Rluc to the site where receptors or channels also accumulate. Scale bars, 5 μ m. Cells shown in **A (C)** and in **B (D)** were processed using ImageJ to display the product of the differences from mean labeling intensity (PDM) as pseudocolored panels. Yellow on the scale bar indicates a large PDM value and high degree of colocalization, while blue indicates no overlap. Note difference in scales in **(C)**. Histograms correspond to Pearson's correlation coefficient for colocalization of Flag-DOR and β arr2-Rluc **(E)** or Flag-Kir3.1 and β arr2-Rluc **(F)** in unstimulated cells and in cells exposed to SNC-80 (1 μ M; 60 min). They represent mean \pm SEM of 3-4 independent experiments with 18 to 26 neurons analyzed per condition. Statistical comparisons of

correlation coefficients was done by one ANOVA to compare SNC-80 and morphine (shown in Supplementary information and Supplementary Fig. 5) to non-treated controls.

Figure 7. Inhibition of clathrin and dynamin function interferes with DOR and Kir3 channel internalization. Cortical neuron cultures were pre-treated with clathrin inhibitor, Pitstop 2 or dynamin inhibitor, Dynasore and exposed to DOR agonists to then visualize internalization of **(A)** receptors and **(B)** channels. Scale bars, 5 μm . Histograms correspond to quantification of intracellular fluorescence for DORs **(C)** or channels **(D)** and represent mean \pm SEM of 3-5 experiments with 26 to 42 neurons analyzed per condition. Statistical significance for the effects of Pitstop 2 and Dynasore were established independently, using two-way ANOVA to determine the effect of each blocker on DORs and on Kir3 channel internalization. Both comparisons revealed an effect of agonist ($p < 0.0001$), of the internalization inhibitor ($p < 0.0001$), and interaction ($p < 0.0001$). Intracellular labeling of agonist-treated cells versus corresponding controls: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$. Additional posthoc comparisons are indicated in figure.

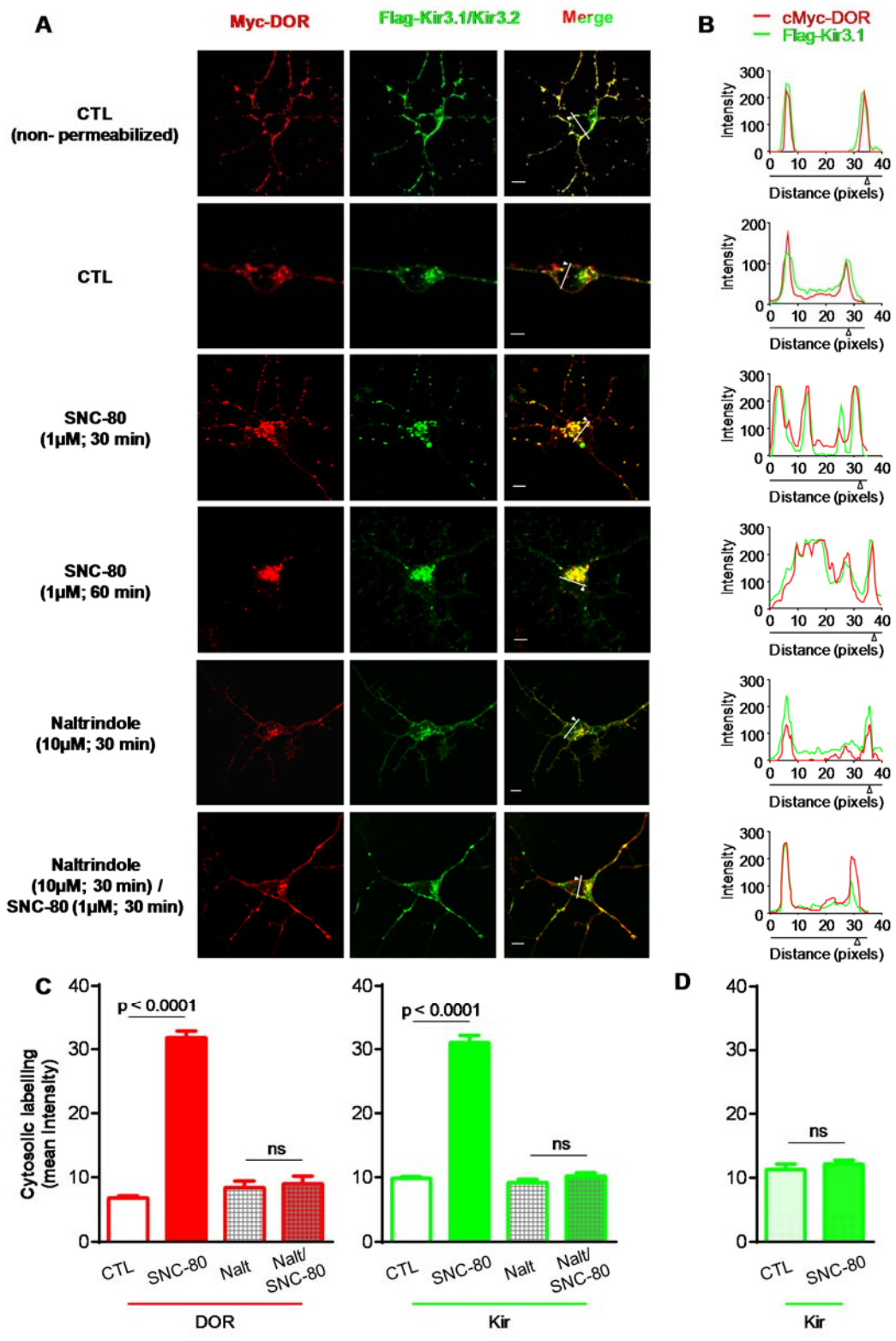


Figure 1

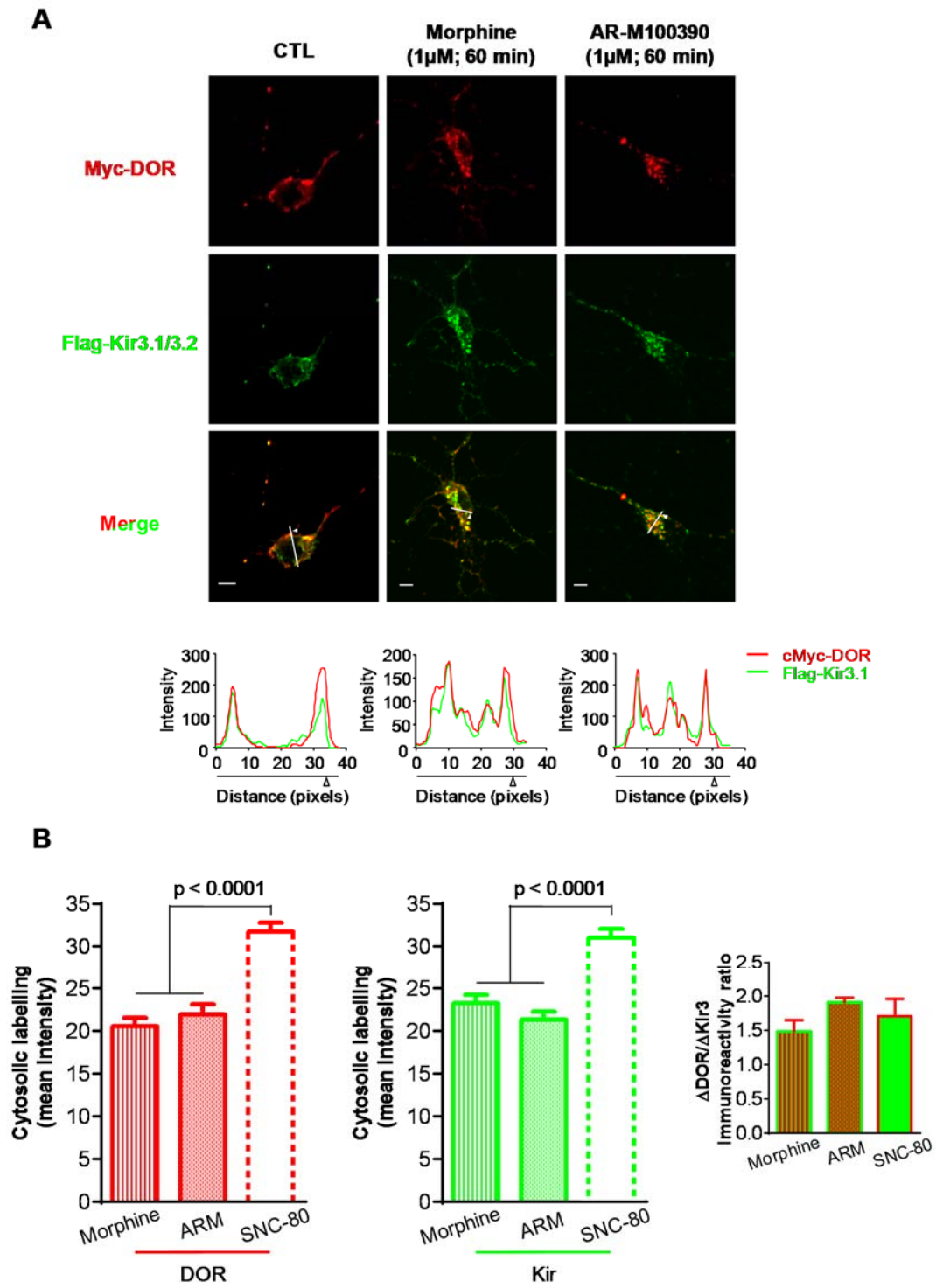


Figure 2

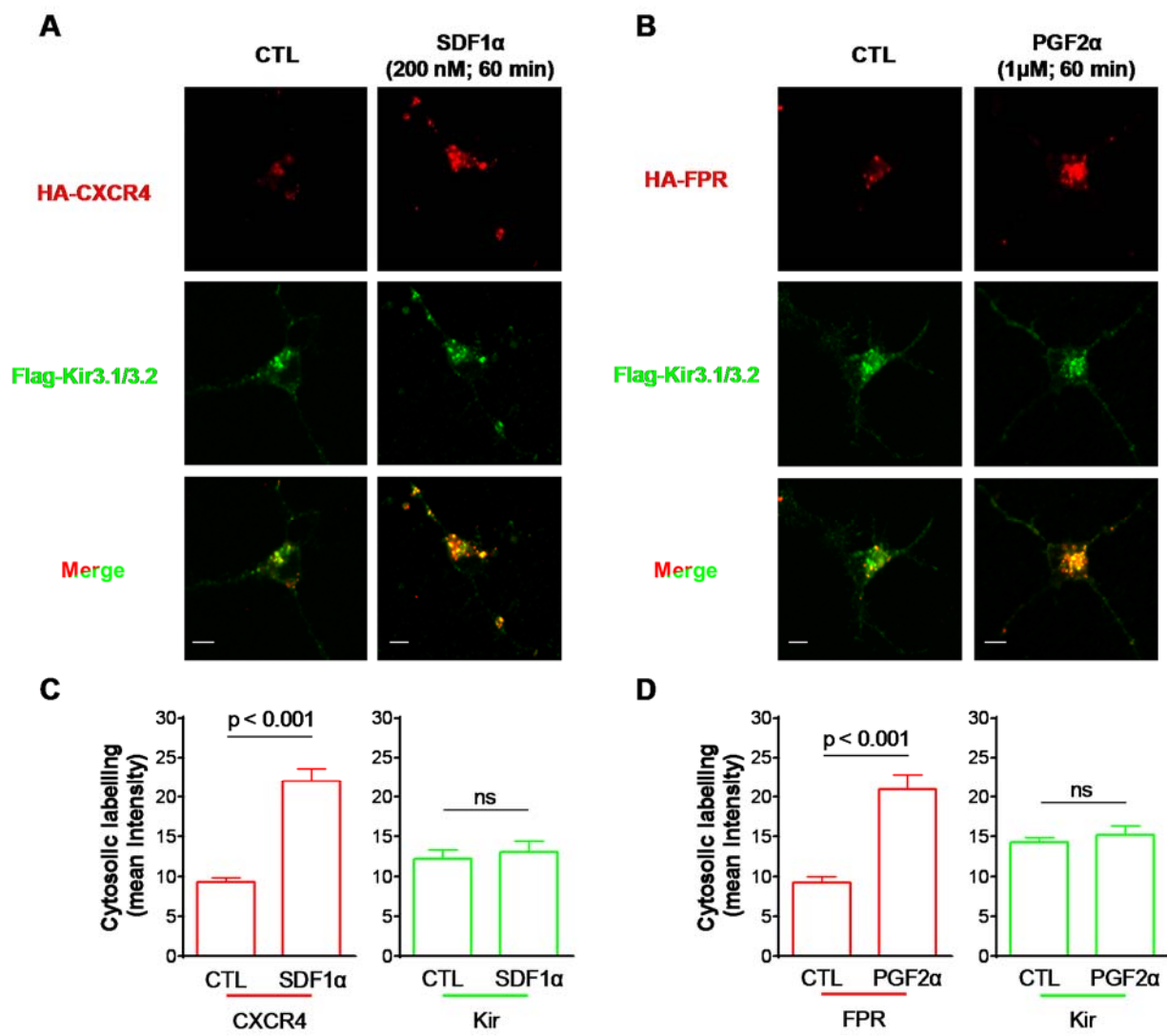


Figure 3

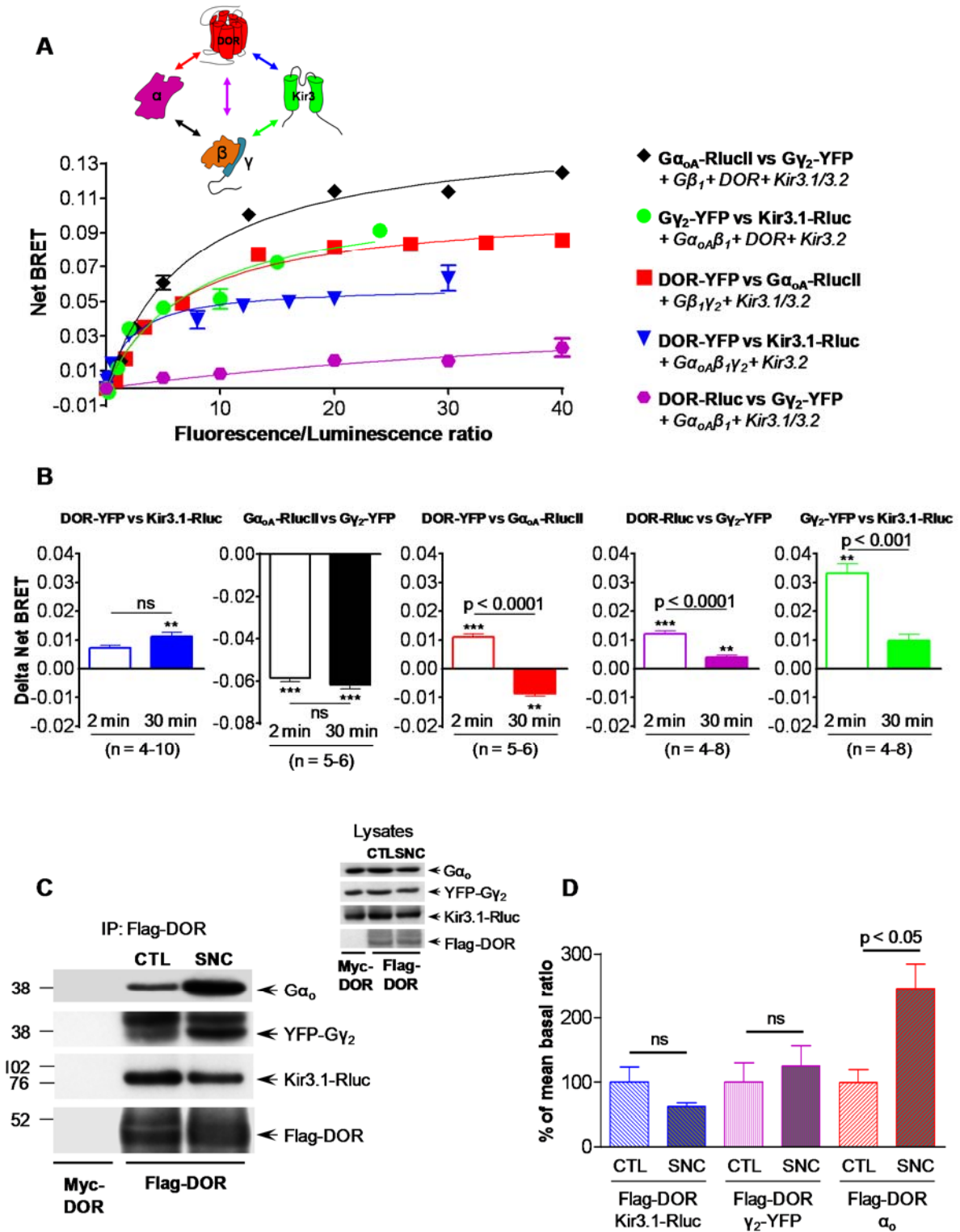


Figure 4

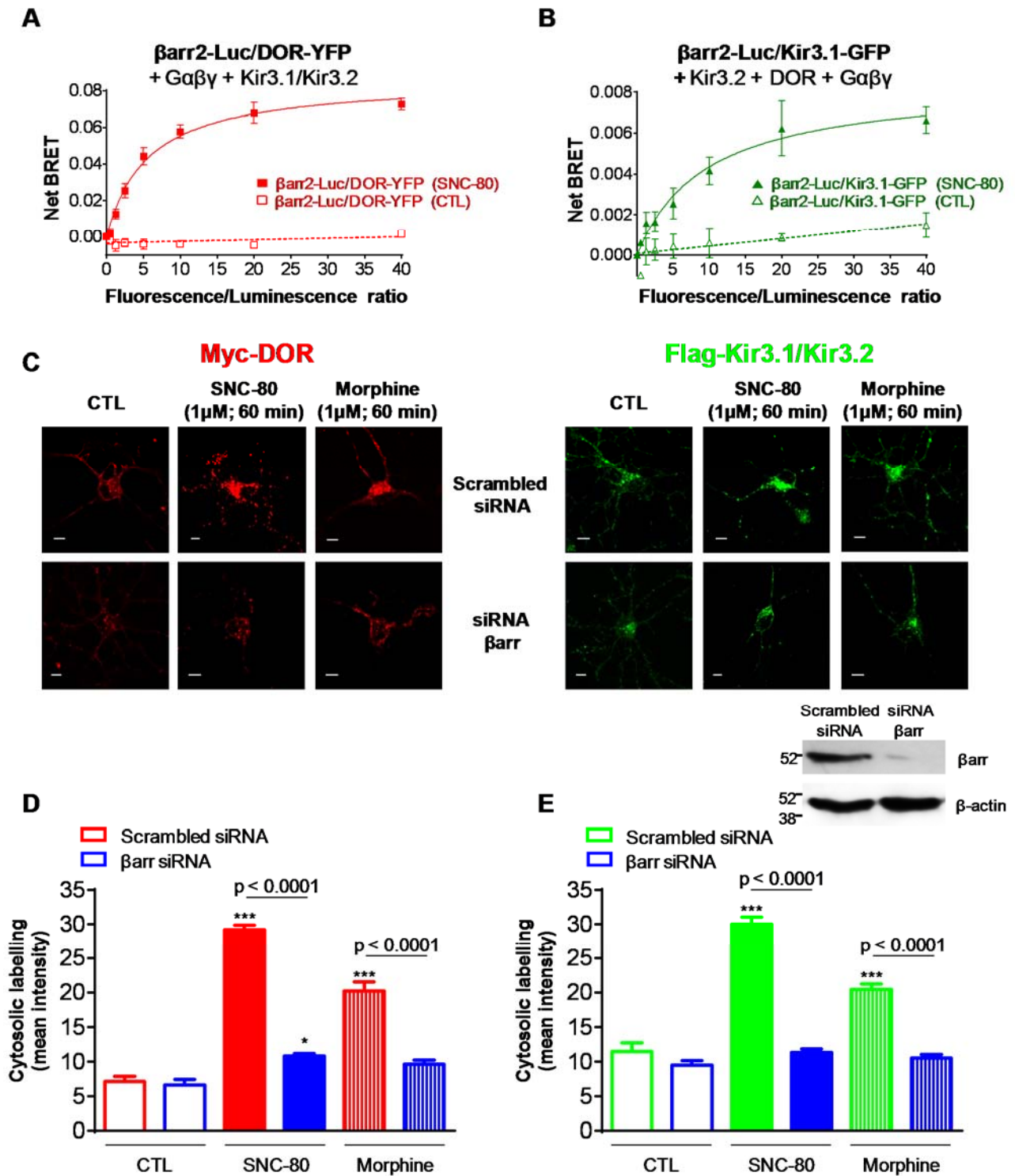


Figure 5

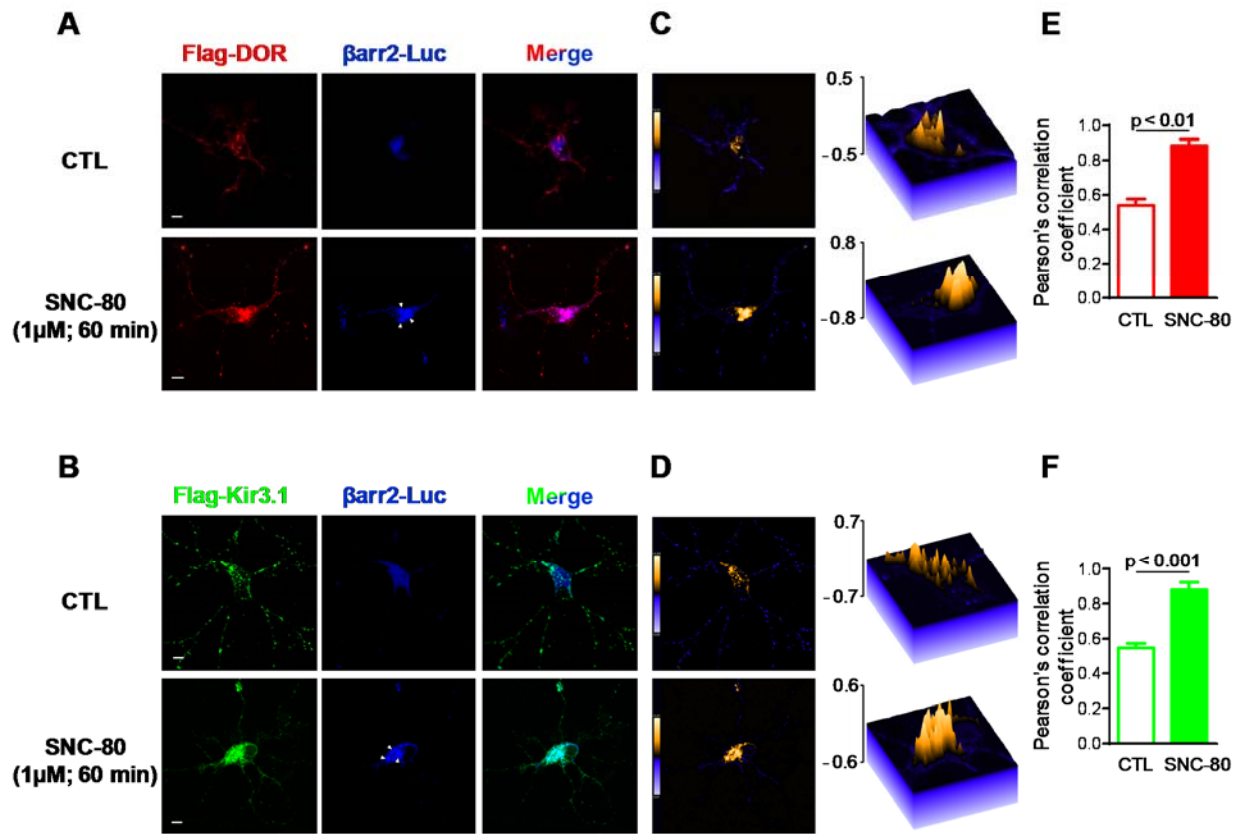


Figure 6

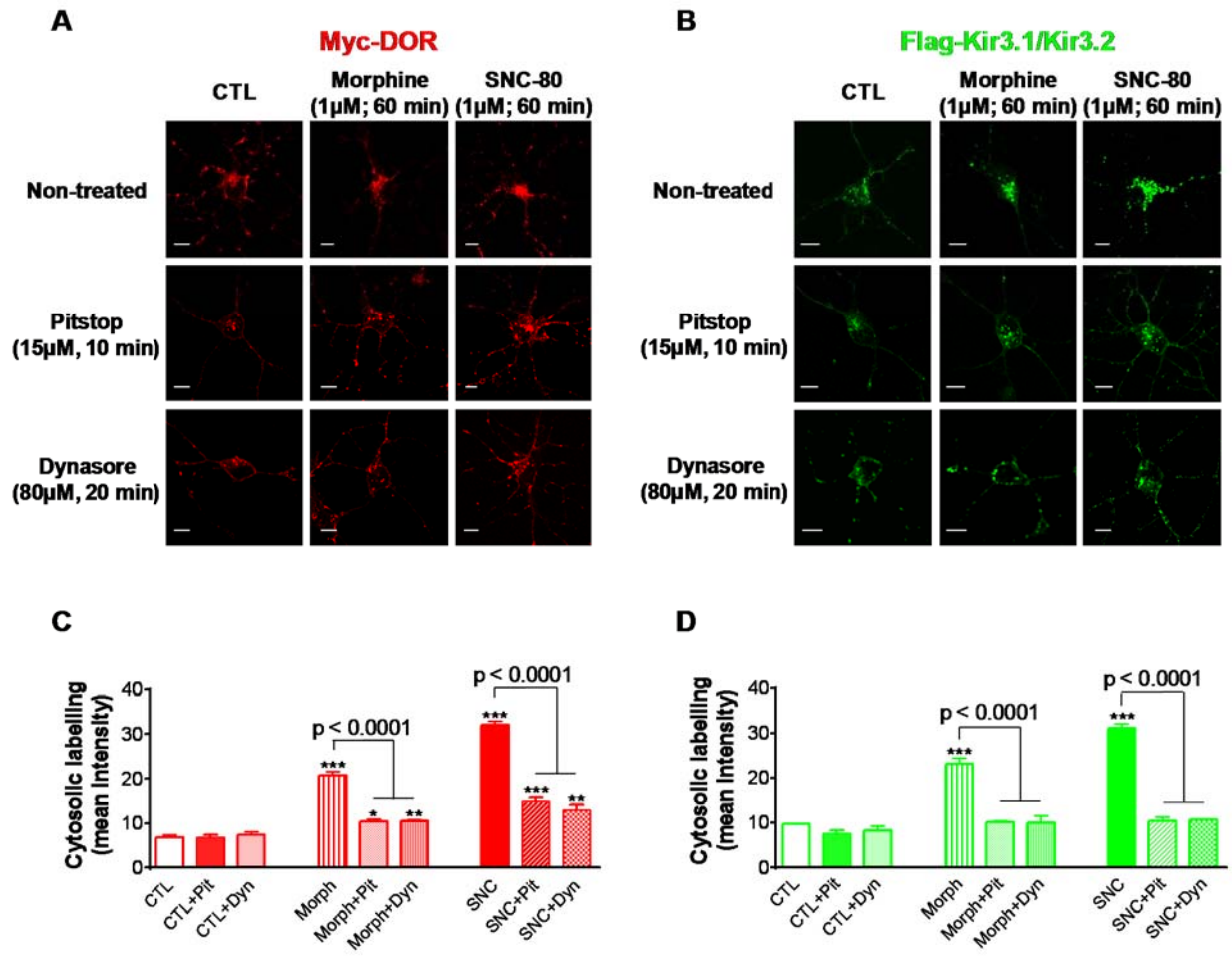


Figure 7

Electronic Supplementary Materials for

KIR3 CHANNELS UNDERGO ARRESTIN-DEPENDANT INTERNALIZATION FOLLOWING DELTA OPIOID RECEPTOR ACTIVATION

Karim Nagi^{1,2}, Iness Charfi^{1,2} and Graciela Pineyro^{1,2,3}

¹Sainte-Justine Hospital Research Center, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada.

³Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada.

Electronic Supplementary Materials contains:

• 5 Supplementary Figures:

Supplementary Fig. 1: *SNC-80 does not induce Kir3 subunit internalization if DORs are not co-transfected with the channel.*

Supplementary Fig. 2: *DOR stimulation induces Kir3.1/3.2 channel internalization in HEK cells.*

Supplementary Fig. 3: *Sustained DOR activation by SNC-80 induces conformational rearrangements among DORs, Gαβγ subunits and Kir3.1/3.2 channels.*

Supplementary Fig. 4: *Schematic representation of DOR- Gαβγ -Kir3.1/3.2 complexes summarizing putative displacement of BRET tags following DOR activation by SNC-80.*

Supplementary Fig. 5: *Morphine did not promote βarr2 colocalization with receptors and channels.*

• 2 Supplementary Tables:

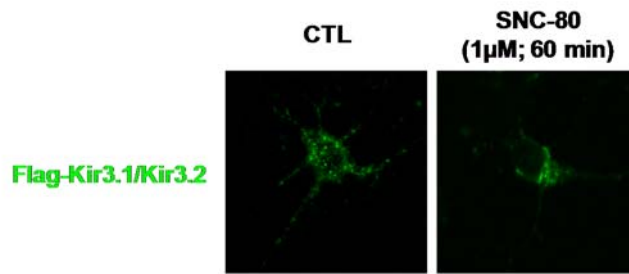
Supplementary Table 1: *Transfection of BRET constructs.*

Supplementary Table 2: *Conformational changes undergone with DOR- Gαβγ -Kir3 signaling complex upon receptor activation.*

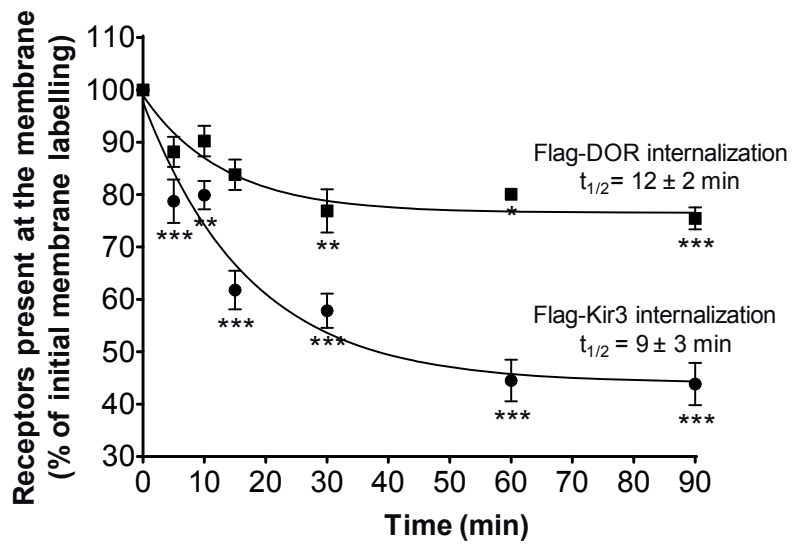
• Supplementary Legends.

• Supplementary Text: *Interpretation of BRET changes in terms of conformational rearrangements of complex components.*

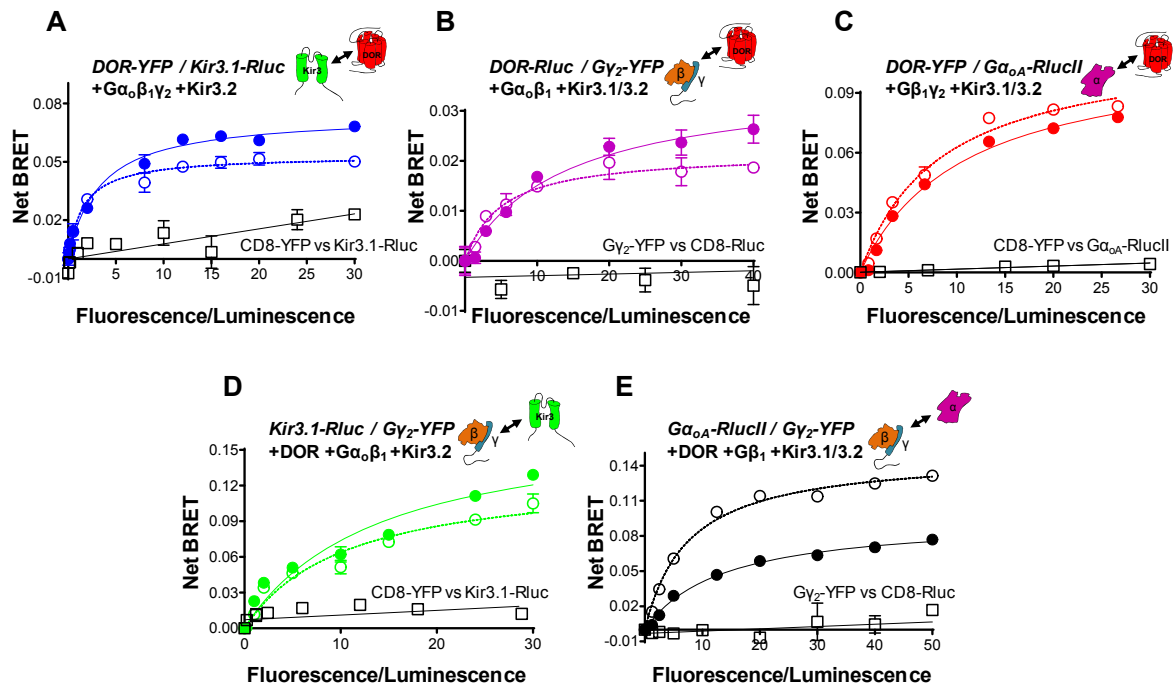
• Supplementary References.



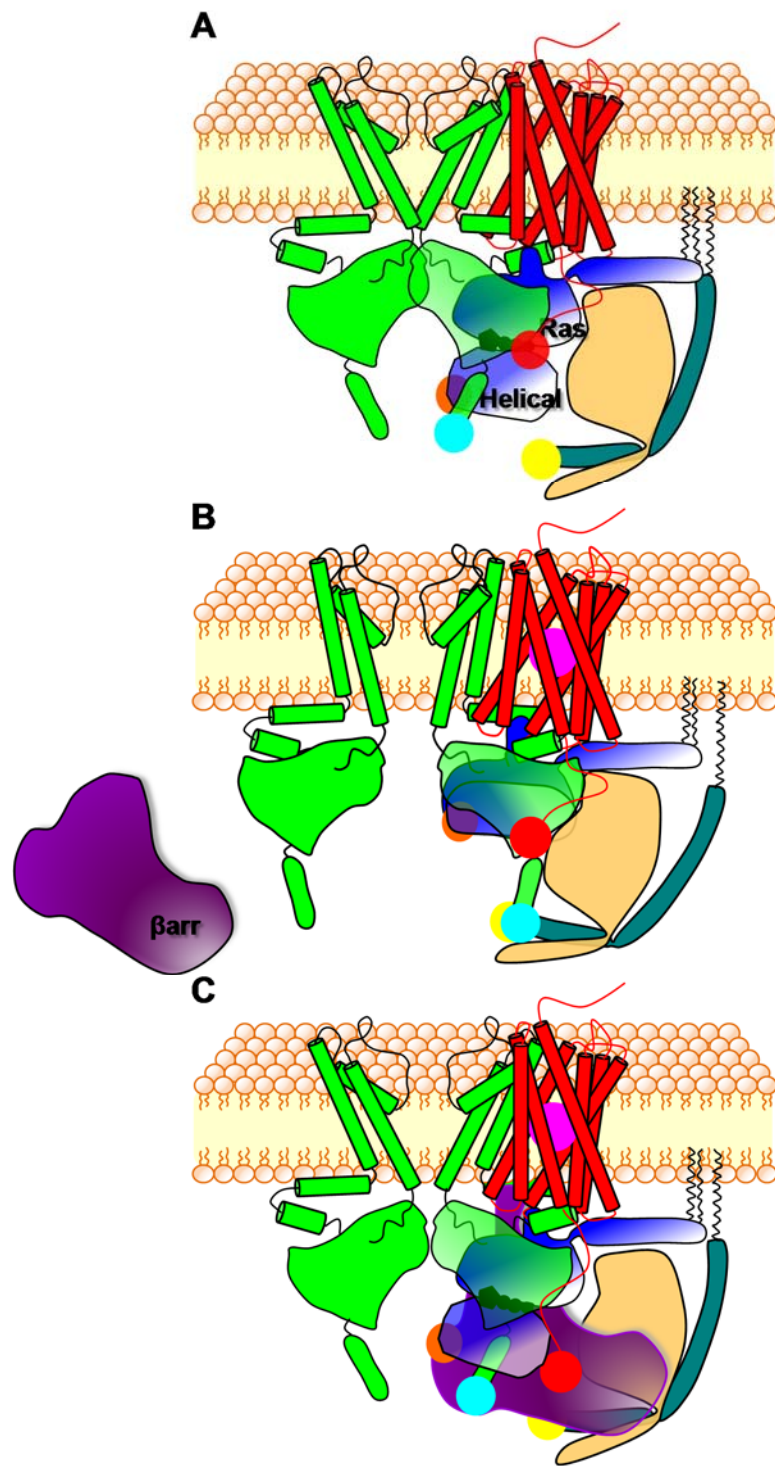
Supplementary Figure 1



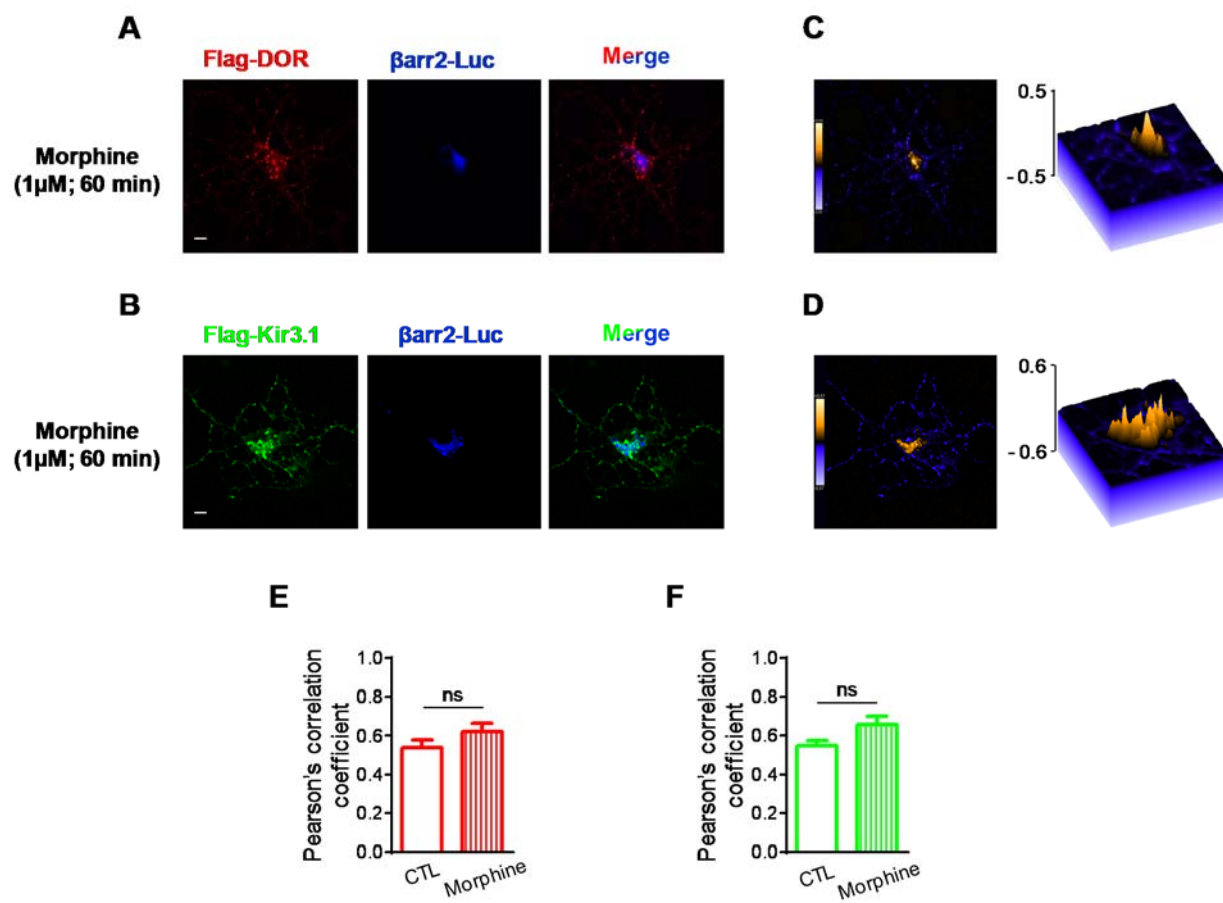
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

	Acceptor (Range for titration)	Acceptor (Single point)	Donor	Untagged complex components
DOR-YFP vs Kir3.1-Rluc	0 - 15	6	0.5	G α_{oA} (2), G β_1 (2), G γ_2 (2), Kir3.2 (0.5)
G α_{oA} -RlucII vs G γ_2 -YFP	0 - 10	8	0.2	G β_1 (3), DOR (5), Kir3.1 (3), Kir3.2 (3)
DOR-YFP vs G α_{oA} -RlucII	0 - 8	6	0.3	G β_1 (3), G γ_2 (3), Kir3.1 (3), Kir3.2 (3)
DOR-Rluc vs G γ_2 -YFP	0 - 10	6	0.5	G α_{oA} (4), G β_1 (4), Kir3.1 (3), Kir3.2 (3)
G γ_2 -YFP vs Kir3.1-Rluc	0 - 15	7.5	0.5	G α_{oA} (1.75), G β_1 (4), DOR (3), Kir3.2 (0.5)
DOR-YFP vs β arr2-Rluc	0 - 8	-	0.2	G α_{oA} (2), G β_1 (2), G γ_2 (2), Kir3.1 (3), Kir3.2 (3)
Kir3.1-GFP vs β arr2-Rluc	0 - 8	-	0.2	G α_{oA} (1), G β_1 (1), G γ_2 (1), DOR (6), Kir3.2 (0 - 8)

Supplementary Table 1

	CTL	2 min SNC Stimulation	p value	30 min SNC Stimulation	p value
DOR-YFP vs Kir3.1-Rluc	0.0476 \pm 0.0021	0.0564 \pm 0.0015	ns (n=4)	0.0588 \pm 0.0021	p < 0.01 (n=10)
G α_{oA} -RlucII vs G γ_2 -YFP	0.1362 \pm 0.0024	0.0775 \pm 0.0018	p < 0.0001 (n=4)	0.0727 \pm 0.0019	p < 0.0001 (n=5)
DOR-YFP vs G α_{oA} -RlucII	0.0865 \pm 0.0073	0.0975 \pm 0.0078	p < 0.0001 (n=4)	0.0779 \pm 0.0083	p < 0.001 (n=5)
DOR-Rluc vs G γ_2 -YFP	0.0264 \pm 0.0006	0.0386 \pm 0.0012	p < 0.0001 (n=4)	0.0305 \pm 0.0007	p < 0.01 (n=8)
G γ_2 -YFP vs Kir3.1-Rluc	0.1055 \pm 0.0057	0.1369 \pm 0.0033	p < 0.01 (n=4)	0.1152 \pm 0.0056	ns (n=8)

Supplementary Table 2

Supplementary Legends

Supplementary Fig. 1. SNC-80 does not induce Kir3 subunit internalization if DORs are not co-transfected with the channel. Cortical neuron cultures transfected with Flag-Kir3.1/Kir3.2 in the absence of DORs were exposed to SNC-80 (1 μ M, 60 min) and permeabilized for visualization of intracellular labeling.

Supplementary Fig. 2. DOR stimulation induces Kir3.1/3.2 channel internalization in HEK cells. HEK293 cells were transfected with Flag-DORs or HA-DOR and Flag-Kir3.1/3.2 subunits (6 μ g each/100 mm petri dish) to assess sequestration of receptors and channels following exposure to SNC-80 (1 μ M) for the indicated periods of time. Sequestration was represented as % of total receptors or channels present at the membrane following exposure to agonist for different time periods. Data correspond to mean \pm SEM of 6-9 independent experiments carried out in triplicate. Statistical analysis by two-way ANOVA revealed an effect of membrane species ($p < 0.0001$), an effect of time ($p < 0.0001$) and an interaction ($p < 0.0001$). Post-hoc comparisons indicated a significant effect of time for each species as indicated in the figure.

Supplementary Fig. 3. Sustained DOR activation by SNC-80 induces conformational rearrangements among DORs, $G\alpha\beta\gamma$ subunits and Kir3.1/3.2 channels. HEK293 cells were transiently transfected with a fixed amount of Rluc-tagged constructs and increasing amounts of corresponding acceptors, together with accessory signaling partners as indicated. Cells were stimulated (filled circles) or not (open circles) with SNC-80 (1 μ M) for 30 min. Each of the interactions was assessed in a single experiment carried out in triplicate. Open squares correspond to by-stander BRET obtained with pairs in which one of the interaction partners of interest was replaced by a BRET construct with similar distribution but with no known association to any other protein in the complex.

Supplementary Fig. 4. Schematic representation of DOR- $G\alpha\beta\gamma$ -Kir3.1/3.2 complexes summarizing putative displacement of BRET tags following DOR activation by SNC-80. The position of different components in the DOR- $G\alpha\beta\gamma$ -Kir3 complex is based on

published crystal structures corresponding to the DOR crystal (PDB: 4EJ4) and the Kir3.2 tetramer in association with corresponding G β 1 γ 2 subunits (PDB: 4KFM). The latter was then replaced with the G β γ structure present in the nucleotide-free G α β 1 γ 2 trimer that co-crystallized with the active β 2 adrenergic receptor (which was omitted) (PDB: 3sn6). (A) Representation of the complex in controls corresponds to GDP-bound state of the G α subunit in which its helical and GTPase domains are visible and in contact with G β γ . (B) Corresponds to 2 min stimulation with SNC-80. The receptor is occupied by the ligand (pink circle) and the G α subunit is in its nucleotide-free conformation where the C-terminus insinuates itself between intracellular loops 2 and 3 of the receptor and the helical domain is displaced away from G β γ allowing its interaction with the channel effector. Cytosolic β arr is shown in its inactive conformation. (C) Complex following 30 min activation with SNC-80. β arr has now been recruited to DOR interacting both with its C-tail and displacing G α C-terminus from the groove between intracellular loops 2 and 3. By interfering with the latter, β arr prevents G protein stabilization in its active state and this is represented as the G α -helical domain regaining its non-active position. Circles represent BRET tags (red DOR C-terminus; cyan: Kir3.1 C-terminus; yellow: N-terminus of G γ 2; orange: helical domain of G α oA).

Supplementary Fig. 5. Morphine did not promote β arr2 colocalization with receptors and channels. Cortical neuron cultures expressing either β arr2-Rluc, Flag-DORs and untagged channel subunits (A) or β arr2-Rluc, Flag-Kir3.1/3.2 subunits and untagged DORs (B) were exposed to morphine as indicated. Note that unlike SNC-80 there was no major redistribution of β arr towards spots containing DORs and Kir3 channels. Cells shown in A (C) and in B (D) were processed using ImageJ to display the product of the differences from mean labeling intensity (PDM) as pseudocolored panels. Histograms correspond to Pearson's correlation coefficient for colocalization of Flag- DOR and β arr2-Rluc (E) or Flag-Kir3.1 and β arr2-Rluc (F) in unstimulated cells and in cells exposed to morphine (1 μ M; 60 min). They represent mean \pm SEM of 3-6 independent experiments with 21 to 44 neurons analyzed per condition. Statistical comparisons of correlation coefficients were done by one ANOVA to compare morphine and SNC-80 (shown in Fig 6 of the article) to non-treated controls. DORSNC-80 vs DORMorphine $p < 0.01$; KirSNC-80 vs KirMorphine $p < 0.05$.

Supplementary Table 1. Transfection of BRET constructs. DNA constructs and untagged complex components were used in the indicated amounts (μg of DNA/100 mm petri dish) to carry out titration curves or single point BRET experiments.

Supplementary Table 2. Conformational changes undergone with DOR- $\text{G}\alpha\beta\gamma$ - Kir3 signaling complex upon receptor activation. Data correspond to Net BRET values obtained with different biosensors in basal conditions or following incubation with SNC-80 (1 μM) for indicated time periods. Statistical analysis by one way ANOVA.

Supplementary Text (related to Supplementary Fig. 4)

Interpretation of BRET changes in terms of conformational rearrangements of complex components.

Comparison of BRET values obtained in control (*A*) and 2 min-treated cells (*B*) indicated no significant BRET change between DOR and channel subunits, but BRET at the $\text{G}\alpha\text{oA}/\text{G}\beta\gamma$ interface was reduced while the signal generated by DOR/ $\text{G}\alpha\text{oA}$, DOR/ $\text{G}\beta\gamma$ and $\text{G}\beta\gamma/\text{Kir3}$ channel interactions was increased. The BRET decrease at $\text{G}\alpha\text{oA}/\text{G}\beta\gamma$ interface informs us of a separation of the BRET tag contained in the helical domain of $\text{G}\alpha\text{oA}$ from the tag localized at the free end of the $\text{G}\beta\gamma$ dimer, an observation that is consistent with crystallographic data showing a repositioning of the helical portion of $\text{G}\alpha$ towards the membrane during G protein activation (1). The concomitant BRET increase observed between $\text{G}\beta\gamma$ and the C-terminal end of Kir3.1 subunits is also in keeping with previous reports assessing Kir3 channel activation by spectroscopic methods (2), and can be interpreted as the $\text{G}\beta\gamma$ dimer and the channel's cytosolic domain coming closer to one another. Repositioning of $\text{G}\alpha\text{oA}$'s helical domain away from $\text{G}\beta\gamma$ may have contributed to BRET increases between $\text{G}\beta\gamma$ and DOR tags, simply by removal of physical interference to energy transfer between the receptor and the dimer.

Comparison of BRET values obtained following 2 min- (*B*) and 30-min (*C*) exposure to SNC-80 indicated no significant change in BRET for tags monitoring DOR interaction with the channel and revealed a decrease that did not go below basal energy transfer for $\text{G}\beta\gamma/\text{Kir3}$ and $\text{G}\beta\gamma/\text{DOR}$. This was not the case for energy transfer between $\text{G}\alpha\text{oA}/\text{DOR}$ and $\text{G}\alpha\text{oA}/\text{G}\beta\gamma$ whose BRET signals were reduced beyond basal. Since co-immunopurification assays

indicated integrity of the DOR-G $\alpha\beta\gamma$ -Kir3 complex the observed BRET changes were interpreted as a conformational rearrangement within the complex driven, at least in part, by the recruitment of β arr. By removing G α C-terminus from the groove defined between the receptor's second and third intracellular loop, β arr de-stabilizes the active state of the G protein, and the tag on G α falls back to its initial position. At the same time, in the process of attaining its location within the complex, β arr insinuates itself between the tags in G α and G $\beta\gamma$. This would explain why despite regaining its initial position, that tag in G α displays reduced BRET with the G $\beta\gamma$ dimer. Steric hindrance by β arr can also account for BRET reduction at the DOR/G $\beta\gamma$ interface while stabilization of the channel in a closed position may explain why the BRET signal between Kir3 and G $\beta\gamma$ subunits goes back to pre-stimulation values.

Supplementary References:

1. Rasmussen SG, *et al.* (2011) Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477(7366):549-555.
2. Raveh A, Riven I, & Reuveny E (2009) Elucidation of the gating of the GIRK channel using a spectroscopic approach. *The Journal of physiology* 587(Pt 22):5331-5335.

4. Discussion

4.1 Étude des interactions réalisées entre le récepteur DOR, la protéine G et le canal Kir3

Les RCPG jouent un rôle essentiel dans la communication cellulaire. Une fois activés, les récepteurs interagissent avec les protéines G, qui, à leurs tours, activent les différents effecteurs [229, 375]. Cette dernière voie de signalisation peut paraître évidente pour la plupart d'entre nous, cependant, on doit savoir qu'elle fait sujet d'un énorme débat qui persiste jusqu'à nos jours. Au début, il a été proposé que les récepteurs et les protéine G se comportaient comme des protéines mobiles et que suite à l'ajout de l'agoniste, le récepteur augmentait son affinité pour la protéine G, qui s'active suite à sa collision avec un récepteur occupé par un agoniste [64, 205, 216]. Aussi, des données ont montré que la cinétique d'activation des effecteurs dépendaient fortement du niveau d'expression des récepteurs [376, 377] suggérant ainsi qu'au moins une étape dans la cascade de transduction du signal serait médiée par une collision entre les partenaires signalétiques. Toutefois, plusieurs études sont venues contester le modèle existant au profit d'un nouveau modèle qui suppose que le récepteur et sa protéine G sont précouplés en des complexes protéiques constitutifs [208, 210-212, 226].

4.1.1 Le récepteur DOR forme un complexe constitutif avec les sous-unités de la protéine G et du canal Kir3

Ce sont les immenses efforts qui ont été fournis durant les dernières décennies pour développer les différents modèles signalétiques, présentés dans le paragraphe précédent, qui ont permis de faire naître l'idée de ce projet. Notre étude s'est intéressée à caractériser le modèle qu'utilise le récepteur DOR non seulement pour interagir avec sa protéine G mais aussi pour communiquer avec un de ses effecteurs, le canal Kir3, dont la régulation est impliquée dans l'effet analgésique des opioïdes [131, 141]. Nos données ont aussi eu la chance de prendre avantage de la technologie de transfert d'énergie (BRET) qui permet de surveiller, en temps réel et dans des *cellules vivantes*, les interactions établies entre nos protéines d'intérêt.

Pour savoir lequel des deux modèles de signalisation suivait le récepteur DOR, nous avons décidé d'évaluer la présence d'une proximité stérique entre le récepteur, sa protéine G et l'effecteur Kir3 à l'état basal. Étant donné que le modèle de collision estime que les protéines se comportent comme des unités mobiles et qu'une stimulation est nécessaire pour augmenter l'affinité entre les partenaires signalétiques, aucune interaction entre nos protéines d'intérêt n'était estimée se réaliser à l'état basal. Au contraire, le modèle de précouplage, estime que les différents partenaires signalétiques maintiennent une interaction entre eux même avant l'activation du récepteur. Pour ce faire, des courbes de titration BRET entre chacune des composantes de notre complexe ont été réalisées. La courbe de titration BRET est utilisée pour déterminer la spécificité de l'interaction entre deux protéines espacées de moins que 10 nm. Cette dernière consiste à augmenter graduellement l'expression de l'accepteur (protéine fluorescente) tout en maintenant constant celle du donneur (protéine luminescente). Nos résultats BRET ont montré des courbes saturables pour toutes les interactions testées. Par contre, des titrations BRET entre les composants du complexe et la protéine CD8, de même distribution membranaire que le récepteur DOR, montrent un signal BRET minimal et une insaturation au niveau des courbes de titration. Ensemble, ces résultats indiquent la présence d'une spécificité dans l'interaction et d'une proximité stérique entre le récepteur DOR, la sous-unité $G\alpha_oA$, le dimère $G\beta_1\gamma_2$ ainsi que les sous-unités du canal Kir3.1/Kir3.2 en absence de toute stimulation du récepteur. Cependant, il faut noter que la technique de BRET nécessite la surexpression des protéines d'intérêt. Cette surexpression peut, dans certains cas, forcer les protéines à produire des collisions aléatoires, par encombrement stérique, ce qui limite la spécificité des signaux détectés. Ce problème est toutefois rendu d'une moindre importance puisque nos courbes de titration montrent que nos paramètres de transfection ont été ajustés pour générer des interactions BRET spécifiques. Ensuite, nous avons corroboré nos résultats BRET en évaluant la présence d'une interaction physique entre nos protéines d'intérêt à l'état basal. Pour ce faire, une co-immunopurification du récepteur DOR a été réalisée. Les résultats de co-ip ont permis de confirmer des observations antérieures qui montraient que le récepteur DOR s'associe spontanément à la protéine $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ [230]. De plus, ces derniers résultats nous ont permis d'étendre nos observations en montrant que le récepteur DOR s'associe de façon constitutive non seulement avec la protéine $G\alpha_oA\beta_1\gamma_2$, mais aussi, avec les sous-unités du canal Kir3.

Dans leur ensemble, ces données nous mènent à conclure que le récepteur DOR adopte le modèle de précouplage pour communiquer avec sa protéine G et son effecteur Kir3.

4.1.2 Le complexe constitutif ne se défait pas mais change sa conformation suite à l'activation du récepteur

Notre étude ainsi que plusieurs autres études parues durant les dernières années, confirment maintenant que les canaux Kir3, les sous-unités $G\alpha_{i/o}$ et certains RCPG peuvent interagir de manière constitutive [144, 259, 263, 344]. Une fois le complexe constitutif établi, nous avons examiné si ce dernier maintenait son intégrité suite à la stimulation du récepteur. Pour ce faire, les interactions entre chacun de nos partenaires signalétiques ont été évaluées en BRET en comparant nos signaux obtenus à l'état basal avec ceux générés suite à une stimulation avec des agonistes complets du récepteur DOR. Nos résultats ont montré qu'on était toujours capable de détecter des changements dans le signal BRET suite à une stimulation aigue (2 min) ou prolongée (30 min) avec des agonistes DOR indiquant ainsi que les partenaires BRET étaient toujours espacés de moins que 10 nm. Cependant, on devrait savoir que malgré que les techniques de transfert d'énergie permettent de surveiller, la proximité stérique entre les différentes protéines d'intérêt, l'analyse des changements dans le transfert d'énergie induit par l'ajout de l'agoniste a souvent été controversée. En effet, bien que certains auteurs interprètent les changements de transfert d'énergie observés entre certains GPCR et leurs protéines G comme indicateur de l'association/dissociation des protéines [225], d'autres, à l'inverse, suggèrent que les données obtenues ne reflètent qu'un réarrangement conformationnel au sein d'un complexe préformé et composé par le récepteur et sa protéine G [212, 226, 378]. De même, pour l'interaction entre la sous-unité $G\alpha$ et le dimère $G\beta\gamma$, certaines études estiment la dissociation de ces sous-unités [379-381] pour former des entités libres capables d'interagir avec l'effecteur, tandis que d'autres proposent qu'aucune dissociation moléculaire ne se déroule entre les sous-unités de la protéine G après l'activation du récepteur [210, 226]. Donc, encore une fois, on a eu recours à la technique de co-ip pour démontrer si les changements observés en BRET suivaient le modèle d'association/dissociation ou représentaient simplement un changement conformationnel au sein de notre complexe

préformé. Nos résultats de co-ip ont attesté que nous avons toujours été capables d'immunoprécipiter les sous-unités de la protéine G et ceux du canal potassique Kir3.1/Kir3.2 avec le récepteur DOR stimulé pendant 2 min ou 30 min avec ses agonistes complets indiquant ainsi que le complexe ne conservait pas son intégrité mais changeait sa conformation.

4.1.3 Le récepteur DOR transmet l'information conformationnelle à son effecteur Kir3 via les sous-unités de la protéine G

Nos données BRET et co-ip présentées dans les sections précédentes indiquent que le récepteur DOR, la sous-unité $G\alpha_{oA}$, le dimère $G\beta_1\gamma_2$ ainsi que le canal Kir3.1/Kir3.2 interagissent ensemble à l'état basal et que ces interactions restent maintenues même suite à la stimulation du récepteur avec des agonistes DOR. Cependant, les modifications qui affectent les interactions entre les différents partenaires signalétiques et comment la transmission de l'information conformationnelle navigue du récepteur vers l'effecteur, au cours de la transduction du signal, restent encore mal connues. Dans ce qui suit, on présentera les différentes étapes qui nous ont menés à répondre à ces questions.

Dans une première série d'expériences, on a débuté par évaluer la plus simple voie de transmission d'information entre deux protéines, étant la voie directe DOR-Kir3. Ayant déjà obtenu une courbe saturable en BRET, à l'état basal, pour l'interaction entre le récepteur DOR et le canal Kir3 comme indiqué précédemment, on a voulu identifier si une stimulation aigue avec différents ligands, connus pour avoir différentes efficacités à activer le récepteur DOR, était capable de modifier le signal BRET basal observé. Ces derniers incluent des ligands classifiés comme étant des agonistes complets (SNC-80 et DPDPE), agonistes partiels (morphine, UFP512 et TIPP), agonistes inverses (TICP) et finalement des antagonistes (naloxone et naltrindole) pour le récepteur DOR [40, 51, 335]. Nos résultats ont montré qu'aucun ligand n'était capable de modifier significativement le signal BRET basal. Cela montre qu'aucune information conformationnelle n'est transférée à l'effecteur via l'interface DOR/Kir.

Puisque la voie directe n'a montré aucun transfert conformationnel, on a essayé de chercher des voies alternatives. Alors, on s'est demandé s'il était possible que le récepteur DOR serait capable d'utiliser les sous-unités de la protéine G comme unités intermédiaires pour transférer son signal à l'effecteur Kir3. On a commencé à répondre à cette question en établissant si les mêmes ligands DOR qui étaient sans effet à l'interface DOR/Kir3 pourraient modifier le transfert d'énergie entre le récepteur DOR et le dimère $G\beta\gamma$ et entre cette dernière et le canal Kir3. Pour ce faire, des courbes doses réponses BRET caractérisant les interfaces DOR/ $G\beta\gamma$ et $G\beta\gamma$ /Kir3 ont été réalisées. D'une manière intéressante, les changements BRET pour chacune des deux interactions ont été positivement corrélés. Ceci indique que l'information conformationnelle transmise du récepteur DOR au dimère $G\beta\gamma$ a été suivie par une transmission identique du dimère $G\beta\gamma$ aux sous-unités du canal Kir3.1/Kir3.2. Ensemble, ces données indiquent l'implication de la protéine G dans la transmission de l'information conformationnelle du récepteur DOR au canal Kir3.

Bien que nous ayons regardé les changements BRET au sein de notre complexe préformé suite à des stimulations avec différents agonistes DOR, on s'est intéressé à caractériser l'effet de ces stimulations sur l'activité du canal Kir3. Nos données ont permis de montrer que les ligands qui affichaient la plus forte puissance et efficacité à modifier le signal BRET à l'interface $G\beta\gamma$ /Kir3 ont également été capables d'augmenter la perméabilité des canaux Kir3 suite à l'activation des récepteurs DOR.

Finalement, on a voulu identifier si la transmission de l'information conformationnelle, suite à l'activation du récepteur DOR, entre le dimère $G\beta\gamma$ et le canal Kir3 se réalisait par voie directe. Pour ce faire, on a généré un canal Kir3 dont les brins $\beta D-\beta E$ et $\beta L-\beta M$, au niveau du domaine C-terminal, ont été supprimés. Ces brins sont reconnus pour être un site de liaison du dimère $G\beta\gamma$ [382] et pour leur rôle critique dans l'activation du canal Kir3 à travers ce même dimère [383, 384]. On a ainsi prédit que si le réarrangement conformationnel était transmis du dimère $G\beta\gamma$ au canal Kir3 par voie directe, alors l'élimination du site de liaison entre ces deux partenaires devrait interférer avec les réarrangements structuraux observés à l'interface $G\beta\gamma$ /Kir3. En utilisant la technique de BRET, nos données ont montré une abolition de l'effet des ligands ayant préalablement eu un impact sur la conformation $G\beta\gamma$ /Kir3. Donc, pour résumer la première partie de notre étude de conformation, on pourrait dire que nos résultats

montrent et supportent le fait que l'information conformationnelle est transmise du récepteur DOR au canal Kir via le dimère $G\beta\gamma$.

Tous les résultats présentés dans cette première partie de l'étude conformationnelle étaient concentrés sur le rôle que joue le dimère $G\beta\gamma$ dans la transmission de l'information conformationnelle. Mais, quel rôle joue alors la sous-unité $G\alpha$ dans cette même transmission ? Malgré que certains données indiquent la présence d'une interaction directe entre le GPCR et le dimère $G\beta\gamma$ [385], d'autres, basées sur des études de cristallisation, ont signalé l'absence d'une interaction directe au niveau de cette même interface [7, 316]. De plus, des études antérieures, réalisées en absence de toute expression du canal Kir3, indiquent que la sous-unité $G\alpha$ interagit avec le récepteur et les sous-unités $G\beta\gamma$ [212, 230] et qu'elle intervient dans la transmission du signal conformationnel du récepteur DOR au dimère $G\beta\gamma$ [230]. Ensemble, ces données visent vers le rôle important que pourrait jouer la sous-unité $G\alpha$ dans la navigation de l'information conformationnelle émise par un RCPG. Alors, on s'est intéressé à identifier le rôle de la sous-unité $G\alpha$ dans la transmission conformationnelle du signal au canal Kir3. Nos données montrent que les changements BRET observés aux interfaces $G\alpha/G\beta\gamma$ et $G\beta\gamma/Kir3$ suivaient la même cinétique permettant ainsi de vérifier, en partie, les études antérieures et indiquant la possible implication de $G\alpha$ dans la navigation de l'information au canal Kir3 via le dimère $G\beta\gamma$.

Dans une dernière série d'expériences, on s'est intéressé à savoir si $G\alpha$ était capable de transmettre l'information conformationnelle au canal Kir par voie directe. Des études parues récemment ont rapportées le fait que $G\alpha$ inactif ne montre aucune interaction directe avec les sous-unités Kir3.1/Kir3.2 [324, 344] et ont proposé que cette sous-unité s'associe avec les canaux Kir3 via le dimère $G\beta\gamma$ [324]. Pourtant, certaines données de résonance magnétique nucléaire ont révélé la présence d'une interaction directe entre $G\alpha_{i3}$ -GTP et l'hélice αA de la sous-unité Kir3.1 [326], ce qui suggère que $G\alpha$ et le canal peuvent entrer en contact direct suite à l'activation de la protéine G. On est allé alors vérifier en BRET la présence d'une interaction entre la sous-unité $G\alpha_{oA}$ et la sous-unité Kir3.1 du canal suite à l'activation du récepteur avec un agoniste DOR. Nos données montrent qu'aucun signal BRET n'a pu être détecté à l'interface $G\alpha_{oA}/Kir3.1$ à l'état basal ni suite à l'activation du récepteur DOR par un de ses agonistes complets, le SNC-80. Cependant, depuis qu'il a été démontré que l'étiquetage de la sous-unité $G\alpha$ pourrait interférer avec l'activation de l'effecteur Kir3 [324], nous ne

pouvons pas exclure le fait qu'un défaut dans la transduction du signal vers le canal Kir3 pourrait empêcher la formation d'un changement de conformation entre $G\alpha_A$ et les sous-unités du canal.

Le problème d'étiquetage constitue une limitation majeure pour la technique de BRET. Cette dernière se définit par la grosseur des étiquettes utilisées pour marquer les paires de BRET à caractériser. Les étiquettes fréquemment utilisées sont la protéine fluorescente GFP et l'enzyme luciférase. Ayant chacune un poids moléculaire d'environ 35 kDa, semblable (37 kDa pour $G\alpha_o$) ou parfois nettement supérieur (7 kDa pour $G\gamma$) à certaines des protéines d'intérêt, les étiquettes BRET pourraient influencer, dans certains cas, l'interaction entre les différents composants du complexe. Très récemment, des solutions pour cette limitation commencent à apparaître. Ces dernières consistent à générer des étiquettes beaucoup moins volumineuses que celles fréquemment utilisées. Parmi ces étiquettes, on pourrait mentionner la NanoLuc, de 19 kDa, qui peut remplacer la luciférase [386] et le FlAsH (pour fluoresceïn arsenical hairpin binder), un petit dérivé de la fluoresceïne, qui se lie à une étiquette de six acides aminés (CCPGCC) lui permettant d'émettre une fluorescence et qui pourrait être utilisé pour remplacer la protéine GFP [387].

Somme toute, nos données présentées dans l'étude conformationnelle de notre complexe préformé montrent que l'information conformationnelle est transmise du récepteur DOR au canal Kir via le dimère $G\beta\gamma$. Durant cette transmission, l'interaction entre le récepteur DOR et le dimère $G\beta\gamma$ est estimée se réaliser par voie directe ou via la sous-unité $G\alpha$. Nos estimations pourraient cependant être vérifiées en identifiant tous les sites d'interaction entre le récepteur DOR et les sous-unités de la protéine $G\alpha\beta\gamma$. Ainsi, on pense que la cristallisation du récepteur DOR avec la protéine G hétérotrimérique serait le meilleur moyen pour que cette vérification soit envisageable. Finalement, la transmission de l'information conformationnelle de la sous-unité $G\alpha$ au canal Kir3 serait aussi probable, cependant, l'impossibilité de surveiller cette interaction ne nous permet pas d'exclure que cette transmission pourrait avoir lieu.

4.2 Étude de la régulation du complexe constitutif DOR/Kir3 suite à une stimulation prolongée avec un agoniste DOR

L'utilisation d'approches spectroscopiques et biochimiques indiquent que le canal Kir3 et certains GPCR peuvent s'organiser en des structures multimériques [259, 367] et considèrent la protéine G comme une partie intégrante de ces mêmes complexes signalétiques [321]. De manière importante, malgré que la majorité des études acceptent le fait que les récepteurs activés pourraient s'associer à des protéines G et des effecteurs au cours de la signalisation [225, 226], pas tous les récepteurs semblent afficher la même tendance à s'associer constitutivement en complexes [225]. La tendance à former spontanément des complexes fonctionnels peut être influencée par le niveau d'activité constitutive du récepteur [225] et le type de la sous-unité $G\alpha_{i/o}$ qui interagit avec le récepteur [211]. En accord avec ces études et comme on s'y attendait de son activité constitutive élevée [369], on a montré que le récepteur DOR s'associe spontanément à l'hétérotrimère $G\alpha_A\beta_1\gamma_2$ et aux sous-unités Kir3.1/Kir3.2. Le BRET ainsi que les essais de co-ip montrent que cette association reste stable même après 30 min de stimulation du récepteur avec le SNC-80. Dans ce qui suit, on s'intéressera à caractériser la régulation de ce même complexe suite à une stimulation avec différents agonistes DOR.

4.2.1 La β arr est recrutée vers le complexe DOR/Kir3 suite à l'activation du récepteur

La stimulation soutenue du récepteur opioïde déclenche des mécanismes de désensibilisation. Le modèle classique de la désensibilisation est décrit pour le récepteur isolé et comprend différentes étapes. Tel qu'expliqué précédemment, ces étapes débutent par la phosphorylation du récepteur activé. Cette étape est suivie par le recrutement de la β arr au récepteur phosphorylé [285, 286] provoquant ainsi son découplage fonctionnel de la protéine G (240) et l'arrêt de sa signalisation. Dans ce contexte et sachant que notre complexe maintient son intégrité suite à l'activation du récepteur, nous avons estimé que les protéines régulatrices du récepteur DOR, comme la β arr seront probablement recrutées aux complexes plutôt qu'aux

récepteurs isolés. Pour ce faire, nous avons évalué le recrutement de la β arr2, étiquetée en N-terminale avec une luciférase, vers le récepteur DOR ou l'effecteur Kir3, étiquetés en C-terminale par une protéine fluorescente. À l'état basal, aucun signal BRET n'a été détecté entre la β arr cytoplasmique et les composants membranaires de notre complexe. Cependant, suite à une stimulation avec le SNC-80 (1 μ M; 30 min), un signal BRET saturable au niveau des courbes de titration pour chacune des interactions β arr2/DOR et β arr2/Kir a été observé. Ces résultats vont de pair avec l'étude de cristallisation qui a récemment montré l'interaction directe entre le domaine N-terminal de la β arr1 et la queue C-terminale du récepteur β_2 AR [289]. Ensemble, nos données ont permis de montrer que la β arr2 peut non seulement être recrutée au récepteur isolé mais aussi au complexe DOR/Kir suite à l'activation du récepteur avec un agoniste complet.

4.2.2 Le recrutement de la β arr va de pair avec l'internalisation concomitante du récepteur DOR et du canal Kir3

En plus de son rôle dans la désensibilisation, la β arr intervient dans l'internalisation du récepteur DOR suite à sa stimulation prolongée [27, 285, 288, 388-390]. Or, étant donné que ce récepteur reste en complexe avec le canal Kir3, on s'était intéressé à savoir si l'activation du récepteur DOR était aussi capable d'induire la translocation du canal Kir3 vers le compartiment intracellulaire. L'internalisation concomitante du récepteur et du canal Kir3 a toutefois été proposée comme un moyen de contrôler la localisation membranaire des canaux Kir3 [365, 391]. En effet, les cellules PC12 différenciées expriment naturellement les récepteurs muscariniques M2 (M2R) et les canaux Kir3. Cependant, ces deux familles de protéines se trouvent pratiquement absents à la membrane des cellules PC12 et accumulées dans le compartiment intracellulaire. En effet, les études ont montré que ces cellules synthétisent et libèrent de l'acétylcholine, de telle sorte que la libération de ce neurotransmetteur dans le compartiment extracellulaire conduit à l'internalisation du récepteur et du canal expliquant ainsi leur absence au niveau de la membrane cellulaire. Cependant, puisque les antagonistes muscariniques étaient également capables de récupérer l'expression des sous-unités Kir3 à la surface, il a été proposé que les récepteurs M2R et les canaux Kir3

internalisent en complexe par le même mécanisme qui régule l'internalisation du récepteur [365]. Pour cela, on s'était intéressé à vérifier si les récepteurs DOR étaient capables d'induire l'internalisation des canaux Kir3.

Dans une première série d'expériences, on a évalué l'internalisation du canal Kir3 suite à l'activation du récepteur DOR par le SNC-80 (1 μ M). Pour ce faire, des cinétiques d'internalisation dans des cellules HEK293 transfectées avec le récepteur DOR et le canal Kir3 étiquetés au niveau de leurs régions extracellulaires ont été réalisées. Les données montrent que le récepteur et le canal internalisent suivant une même cinétique, suggérant ainsi leurs internalisations en complexe. Ensuite, on a voulu savoir si nos résultats d'internalisation pourraient aussi être observés dans des cultures neuronales où les opioïdes produisent naturellement leur effet analgésique. Nos résultats témoignent de la présence d'une colocalisation membranaire du récepteur DOR et du canal Kir3 à l'état basal. Cependant, une fois stimulés avec le SNC-80 (1 μ M), ces deux partenaires internalisent et colocalisent dans le compartiment intracellulaire indiquant ainsi leur translocation aux mêmes compartiments post-endocytiques.

Dans une deuxième série d'expériences, on a vérifié que l'internalisation du canal était déclenchée par l'activation du récepteur en évaluant si la séquestration de Kir3 était capable d'afficher des propriétés pharmacologiques similaires à d'autres réponses médiées par le récepteur DOR. Il a déjà été démontré que l'agoniste SNC-80 produit plus d'internalisation du récepteur DOR qu'une dose similaire de morphine ou AR-M100390 [278, 317] et que cette internalisation pourrait être bloquée par un antagoniste [358]. Nos données affirment que la redistribution du canal Kir3 était similaire à celle du récepteur DOR stimulé par ces différents ligands. De plus, la proportion des récepteurs et des canaux accumulés dans le compartiment intracellulaire était similaire pour tous les agonistes testés indiquant ainsi que le récepteur DOR et le canal Kir3 se comportent comme une seule unité signalétique.

Dans une dernière série d'expériences, on a montré que l'internalisation du canal Kir3 n'a pas été observée suite à la stimulation des récepteurs CXCR4, qui utilisent également les canaux Kir3 comme effecteurs [360]. Cette internalisation récepteur-dépendante que nous montrons dans notre étude pour les sous-unités Kir3, a déjà été signalée pour la séquestration des canaux Cav2 qui également était capable d'être induite par les récepteurs ORL1 mais pas

par les récepteurs MOR [102]. Ces données indiquent la spécificité de la séquestration de l'effecteur Kir3 pour le récepteur DOR en montrant que cette dernière n'est pas universellement médiée par tous les récepteurs qui activent le canal.

4.2.3 L'internalisation du récepteur DOR et du canal Kir3 par la β arr se réalise via un mécanisme clathrine et dynamine-dépendant

Les résultats présentés dans les sections précédentes indiquent que la stimulation prolongée avec le SNC-80 (1 μ M) induit le recrutement de la β arr et l'internalisation simultanée du récepteur DOR et du canal Kir3. Alors, on a voulu vérifier si ces deux derniers phénomènes étaient reliés en identifiant si la β arr serait elle-même responsable de l'internalisation de DOR et Kir3. Pour ce faire, on a commencé par identifier la localisation stérique de la β arr et des composants membranaires du complexe DOR/Kir dans les cultures neuronales. Nos résultats montrent que suite à une stimulation prolongée aux agonistes DOR, la β arr2 colocalise avec le récepteur DOR et le canal Kir3 dans le compartiment intracellulaire. De plus, la transfection de petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre la β arr empêche l'internalisation de ces deux partenaires membranaires. Prises ensemble, ces données indiquent que la β arr2 reconnaît le récepteur DOR et le canal Kir3 comme une seule unité induisant ainsi leur internalisation simultanée.

Ensuite, on s'était intéressé à identifier le mécanisme qu'adopte la β arr pour internaliser DOR et Kir3. Or, sachant que la majorité des RO sont internalisés par la voie des vésicules de clathrine [298], des inhibiteurs pharmacologiques qui interviennent pour bloquer la dynamique de la clathrine [363] ou qui interfèrent avec la scission des vésicules membranaires en bloquant l'activité de la dynamine [364] ont été utilisés. Nos résultats montrent que ces derniers empêchent significativement la translocation intracellulaire de nos partenaires membranaires. En même temps, il faudrait noter que pas toute la population de récepteurs DOR semble être transportée de la même manière. En effet, les inhibiteurs de clathrine et de dynamine ont pu bloquer totalement l'internalisation des canaux, mais partiellement celle du récepteur. Une tendance similaire a été observée après transfection de siRNA dirigés contre la β arr. Cela montre qu'une fraction des récepteurs activés par le ligand était transportée via une

voie indépendante de celle adoptée par le complexe DOR/Kir. Prises ensemble, ces résultats suggèrent que les récepteurs DOR et les canaux Kir3 en interaction internalisent via un mécanisme clathrine et dynamine-dépendant. De plus, ces données plaident en faveur de l'hypothèse qui suggère que le récepteur DOR et le canal Kir internalisent comme une seule unité de signalisation.

Ces conclusions nous mènent à estimer que si l'internalisation du récepteur DOR induit une diminution du taux de canaux Kir3 à la membrane, alors cette même internalisation pourrait influencer la désensibilisation des courants Kir membranaires. Il faudrait signaler que l'élimination conjointe des récepteurs et des sous-unités Kir3 de la membrane était prévue pour interférer avec la capacité de signalisation d'autres récepteurs qui partagent les effecteurs Kir dans la même cellule [391]. Alternativement, en absence d'une telle influence on pourrait attendre à ce que la signalisation de la voie Kir3 soit compartimentée, avec chaque type de récepteur ayant accès à sa propre population de canaux.

Les études dans les neurones du locus coeruleus de rats immatures montrent que la signalisation des canaux Kir3 médiée par les récepteurs MOR est non compartimentée [392]. Chez ces animaux, l'agoniste DAMGO des récepteurs MOR induit une désensibilisation hétérologue des courants Kir3 induits par la noradrénaline [392]. Cette situation est différente chez les animaux matures où la désensibilisation de MOR est aussi non compartimentée mais n'affecte pas les courants Kir3 générés par d'autres récepteurs. Une différence importante entre les animaux matures et immatures peut être expliquée par un niveau d'expression de GRK2 plus élevé dans ces derniers [392]. Cependant, des données ont montré que bloquer l'internalisation des récepteurs MOR, avec un inhibiteur de la dynamine, n'affecte pas la désensibilisation induite par DAMGO considérant ainsi que l'internalisation des récepteurs MOR et la désensibilisation des courants Kir comme deux phénomènes indépendants [393]. En ce sens, les récepteurs DOR sont connus pour être plus susceptibles à une désensibilisation médiée par GRK2 et β arr que les récepteurs MOR [394]. Donc, est-ce que la désensibilisation robuste que possède le récepteur DOR et sa capacité à internaliser les canaux Kir pourrait influencer la désensibilisation des courants Kir ? Cela reste une question de recherche ouverte qui attend d'être investiguée.

4.3 Perspectives et directions futures

Dans la section 3.1, nous avons montré que l'activation du canal Kir3 par le récepteur DOR nécessite un changement conformationnel qui se transmet via le dimère $G\beta\gamma$ (mécanisme qui contribue à l'effet analgésique des opioïdes). Alors que dans la section 3.2, nous avons présenté des indices qui montrent que l'activation soutenue du DOR induit son internalisation ainsi que celle du canal Kir3 via un mécanisme β arr, clathrine et dynamine dépendant (mécanisme qui induit la tolérance à l'effet analgésique). Dans cette section, nous nous sommes intéressés à utiliser les mécanismes caractérisés dans les sections 3.1 et 3.2 comme outils pour identifier la présence d'une signalisation différentielle pour les ligands du récepteur DOR suite à une stimulation aigue. De plus, on a voulu savoir si ces outils étaient capables de prédire l'efficacité d'un ligand à produire de l'analgésie ou de la tolérance à l'effet analgésique.

4.3.1 Les ligands DOR stabilisent différemment l'interaction entre le récepteur DOR, le canal Kir3 et la β arr2

Maintenant que nous avons déterminé que la β arr2 est recrutée vers le complexe DOR/Kir3 et qu'elle intervenait dans son internalisation, il était intéressant de savoir si on aurait été capable, au moins en utilisant des données antérieures, de prédire le devenir post-endocytaire de notre complexe signalétique. Les études antérieures montrent que malgré ses actions analgésiques, une seule injection systémique de l'agoniste SNC-80, sélectif pour le récepteur DOR, est connue pour produire une perte prolongée de la capacité du récepteur à induire des réponses antinociceptives [26, 395]. Cette capacité n'est récupérée que 24 heures post-injection. Puisqu'une perte de réponses analgésiques va de pair avec l'internalisation de DOR et que la récupération est concomitante avec la réapparition du récepteur à la membrane [278], la séquestration du récepteur a été proposée comme un facteur déterminant de la tolérance analgésique aigue à cet agoniste [396]. Ce ne fut toutefois pas le cas pour d'autres agonistes DOR, comme le DPDPE qui, malgré sa capacité à induire le même niveau d'internalisation du récepteur que le SNC-80, ne produit pas le même niveau de tolérance [27]. La différence principale entre ces deux agonistes se concentre dans leur capacité à recycler, soutenue par le DPDPE mais pas pour le SNC-80. Ces profils de recyclage distincts sont

engendrés par différents réarrangements conformationnels entre le dimère $G\beta\gamma$ et le récepteur DOR, qui une fois activé par le SNC-80, devient susceptible à interagir avec la β arr2 produisant ainsi une interaction stable avec cette dernière. Cette interaction induit l'internalisation du récepteur mais l'empêche aussi de recycler [27]. Par contre, le récepteur activé par le DPDPE interagit d'une manière transitoire avec la β arr2 et préserve sa capacité de recycler. Donc, en se basant sur ces observations, on pourrait conclure que l'interaction du récepteur DOR avec la β arr2 pourrait être utilisée comme un outil pharmacologique pour prédire la capacité de ce récepteur à recycler et induire une tolérance analgésique.

En ce qui concerne notre complexe DOR/Kir3, nos données montrent que le dimère $G\beta\gamma$ et les sous-unités Kir3 sont récupérés avec le récepteur DOR immunopurifié et stimulé d'une manière soutenue avec le SNC-80. De plus, nos données obtenus dans les cultures neuronales indiquent que suite à une stimulation par le SNC-80, les récepteurs DOR et les canaux Kir3 colocalisent avec la β arr2 dans le compartiment intracellulaire et que cette colocalisation reste stable même après 60 min de stimulation avec ce même agoniste. Ensemble, ces observations estiment que suite à une stimulation avec le SNC-80, les canaux Kir3 pourraient former une partie du même complexe qui reste associé d'une manière stable à la β arr2 et qui subit une séquestration vers le compartiment intracellulaire sans être capable de recycler.

Peut-on alors, en évaluant la susceptibilité de chaque agoniste à induire l'interaction DOR/ β arr2, prédire sa capacité à induire une tolérance analgésique aux opioïdes ? Il ne faut pas ignorer que la β arr est impliquée dans l'internalisation du récepteur DOR, un phénomène proposé pour induire une tolérance analgésique aigue [396] et que cette même protéine régulatrice a montré un rôle essentiel dans l'internalisation de notre complexe DOR/Kir3. De plus, la stabilité de l'interaction DOR/ β arr2, comme on vient de le mentionner, permet de prédire la capacité du récepteur DOR à recycler et induire une tolérance analgésique [27]. Ensemble, ces données indiquent l'importance que pourrait offrir cette interaction lors de la recherche de nouveaux analgésiques opioïdes qui préservent leurs effets analgésiques suite à une stimulation prolongée. Cependant, il faudrait signaler que nos données montrent aussi que la morphine induit l'internalisation du récepteur DOR (Annexe 3) et celle de notre complexe DOR/Kir3 dans les cultures neuronales. De plus, malgré la capacité de cette dernière à induire,

comme le DPDPE, une interaction transitoire du récepteur DOR avec la β arr2, la morphine induit une tolérance aiguë à l'analgésie [270, 397]. Cela suggère que la morphine est capable d'activer une nouvelle voie de signalisation qui serait impliquée dans la formation de la tolérance analgésique observée. Cette nouvelle voie pourrait impliquer d'autres récepteurs (MOR par exemple) ou même peut-être d'autres effecteurs.

Les données pharmacologiques actuelles montrent que chaque ligand opioïde produit plusieurs effets autres que l'effet thérapeutique recherché [18, 20, 21, 26, 27, 33, 34]. Ces effets sont définis par la capacité relative de chaque agoniste à activer différentes voies de signalisation cellulaire [398]. Ceci implique que l'identification des meilleurs analgésiques opioïdes doit se faire en identifiant la capacité de chacun des agonistes à activer les voies de signalisation impliquées dans les effets thérapeutiques et ceux induisant le développement des effets secondaires. Une fois le profil signalétique de chaque agoniste identifié, une préférence serait donnée pour les agonistes capables d'activer les voies de l'analgésie sans être capables d'activer les voies de tolérance lors de l'administration d'analgésiques opioïdes pour soulager les douleurs chroniques. Différentes voies de signalisation impliquées dans la formation d'une réponse analgésique et le développement d'une tolérance à l'analgésie seront explorées dans le prochain chapitre.

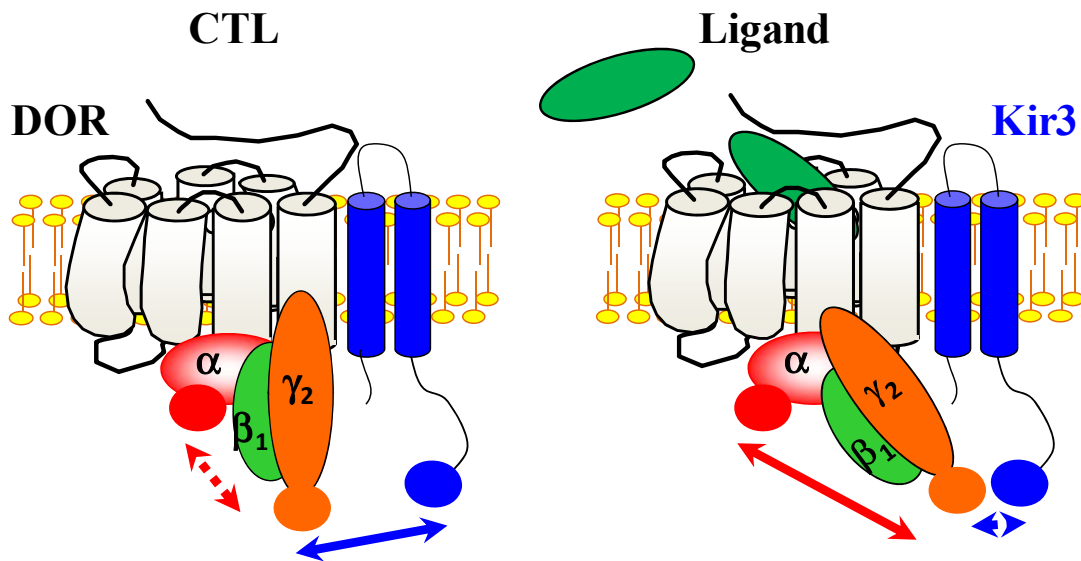
4.3.2 La différence dans la signalisation des ligands DOR comme outil pour identifier de meilleurs analgésiques opioïdes

Il est maintenant bien connu que les ligands peuvent initier plusieurs cascades de signalisation par l'activation d'un même récepteur. Ces dernières incluent des canaux ioniques, des enzymes et même des protéines régulatrices dont l'identité est déterminée par le type cellulaire et le compartiment dans lequel sont exprimés les récepteurs [399]. En effet, cette diversité de signalisation pourrait être un avantage si on serait capable de diriger les stimuli pharmacologiques vers les effecteurs spécifiquement impliqués dans les réponses analgésiques tout en rendant, ces mêmes stimuli, plus résistants au déclin progressif de l'efficacité à signaler. Chaque ligand opioïde transmet un signal complexe en se fixant au niveau du site de liaison de son récepteur cible. Cela entraîne des changements de

conformation distincts du récepteur et en résulte par une modification au niveau de l'efficacité de ce dernier à activer préférentiellement une cascade de signalisation plutôt qu'une autre, un phénomène maintenant connu sous le nom de sélectivité fonctionnelle d'un ligand. Ainsi, le but de cette partie de la thèse consiste à utiliser les données présentées durant notre étude (articles 1 et 2) ainsi que d'autres antérieures publiées pour identifier des outils pharmacologiques (biosenseurs) qui seront utilisés pour construire un profil signalétique pour une variété de ligands opioïdes. Ces profils seront finalement utilisés pour catégoriser les ligands opioïdes en groupes distincts qui seront prédictifs des résultats cliniques attendus. En d'autres termes, le projet consiste à identifier les agonistes capables de stabiliser le récepteur à une conformation lui permettant d'activer les voies de l'analgésie sans être capable d'activer les voies de la tolérance aux effets analgésiques. L'identification de tel agonistes et l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la tolérance à l'analgésie serait une étape importante pour améliorer la durée d'action des analgésiques opioïdes administrés aux patients.

Les biosenseurs identifiés pour notre projet sont basés sur la technologie BRET (tel qu'expliqué dans la mise en contexte de l'article 1). Chaque'un de ces derniers jouerait le rôle d'un indicateur qui permettrait de mettre en évidence la capacité d'un ligand à activer une voie de signalisation spécifique. Les différents biosenseurs choisis peuvent être présentés comme suit:

Mise en évidence des mécanismes de l'analgésie: Les études ont montré que les opioïdes produisent leurs effets analgésiques en modulant les canaux potassiques de la famille Kir3 [131, 138, 140]. De plus, nos données (article 1) montrent que cette modulation ne se transmet pas directement du récepteur à l'effecteur mais du récepteur vers la protéine G et de cette dernière vers l'effecteur Kir3. Le premier évènement de transmission (récepteur/protéine G) sera estimé par les biosenseurs de la protéine G (interaction $G\alpha$ vs $G\beta\gamma$) qui permettront de caractériser la capacité de chaque ligand à activer la protéine G (Figure 16). Alors que le deuxième évènement (protéine G/effecteur) sera estimé par le biosenseur Kir (interaction $G\beta\gamma$ vs Kir3) qui a fait l'objectif de l'article 1 (Figure 16).



Diminution du signal BRET:

$G\alpha$ & $G\gamma$ N-term

Biosenseurs de protéine G:

- α_{i1} VS γ_2
- α_{oA} VS γ_2
- α_z VS γ_2

Augmentation du signal BRET:

$G\gamma$ N-term & Kir3 C-term

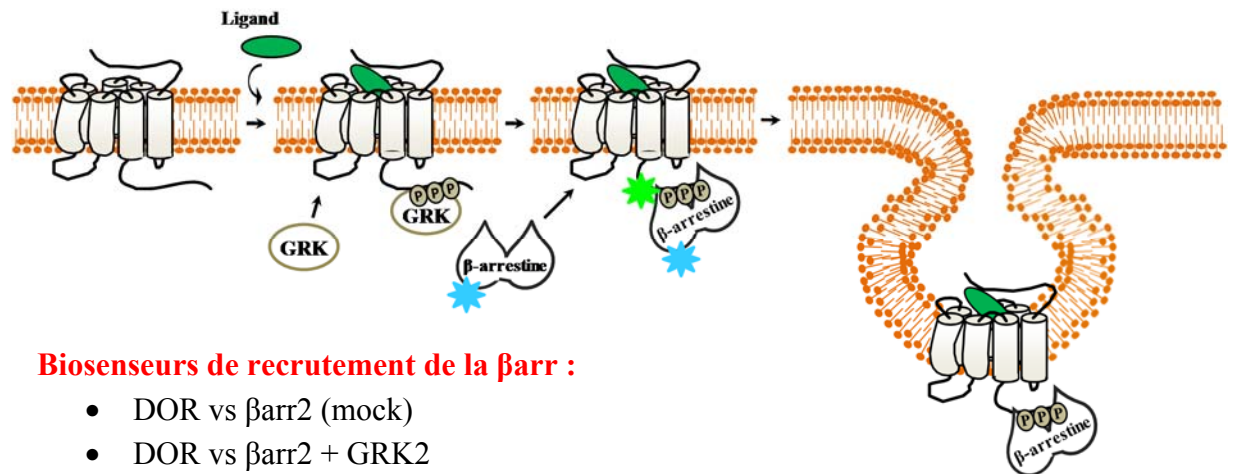
Biosenseur Kir:

- Kir3.2 vs γ_2

Figure 17. Les biosenseurs de protéine G et Kir comme outils pour mesurer l'efficacité d'une drogue à produire un effet analgésique. Suite à l'activation aigue du récepteur DOR, la sous-unité $G\gamma_2$ s'éloigne de la sous-unité $G\alpha$ (flèches rouges) et s'approche du domaine C-term du canal Kir3 (flèches bleues). Le concept d'éloignement de la sous-unité $G\alpha$ et de rapprochement du domaine C-term active le canal Kir3 d'où la pertinence d'utiliser ces deux biosenseurs comme indicateurs pour estimer la production d'un effet analgésique.

Mise en évidence des mécanismes de tolérance: Pour ce type d'effets non désirés, deux types d'adaptations peuvent se mesurer (moléculaires et cellulaires). Concernant les adaptations moléculaires, on sait que la stimulation soutenue du récepteur déclenche le phénomène de désensibilisation homologue qui se caractérise comme étant un des mécanismes de la tolérance moléculaire aux opioïdes [278, 373, 400]. De plus, comme présentée dans la section précédente, l'interaction DOR/ β arr2 joue un rôle essentiel pour prédire la capacité de certains ligands DOR à induire une tolérance moléculaire. De ce fait et sachant que distinctes conformations du récepteur opioïde médiées par différents ligands pourraient rendre ce dernier plus susceptible à interagir avec des protéines régulatrices comme la GRK et la β arr [281,

401], le recrutement de la β arr vers le récepteur, mesuré en présence de différentes GRK, sera utilisé comme notre biosenseur pour déterminer l'efficacité d'une drogue à activer les adaptations moléculaires de la tolérance analgésique (Figure 17).



Biosenseurs de recrutement de la β arr :

- DOR vs β arr2 (mock)
- DOR vs β arr2 + GRK2
- DOR vs β arr2 + GRK5
- DOR vs β arr2 + GRK6

Figure 18. Le biosenseur de recrutement de la β arr.

De plus, les études montrent que la modulation de la voie d'adénylate cyclase serait à la base des mécanismes de tolérance cellulaire [402-404]. Donc, le biosenseur EPAC, déjà validé pour sa capacité à caractériser le niveau de production de molécules d'AMPc [405, 406], sera utilisé pour mesurer la capacité d'une drogue à moduler l'activité de l'AC (Figure 18).

Pour résumer, notre hypothèse suggère qu'un agoniste capable d'activer très efficacement les biosenseurs de protéine G et Kir et peu efficacement les biosenseurs de recrutement de β arr et EPAC serait un agoniste capable de produire de l'analgésie avec peu de tolérance (ligand de préférence). Les différents biosenseurs décrits dans cette section seront utilisés pour identifier les profils signalétiques des ligands du récepteur DOR de rat (rDOR). Finalement, une simple comparaison par extrapolation sera réalisée entre ce dernier profil et celui du récepteur DOR humain (hDOR).

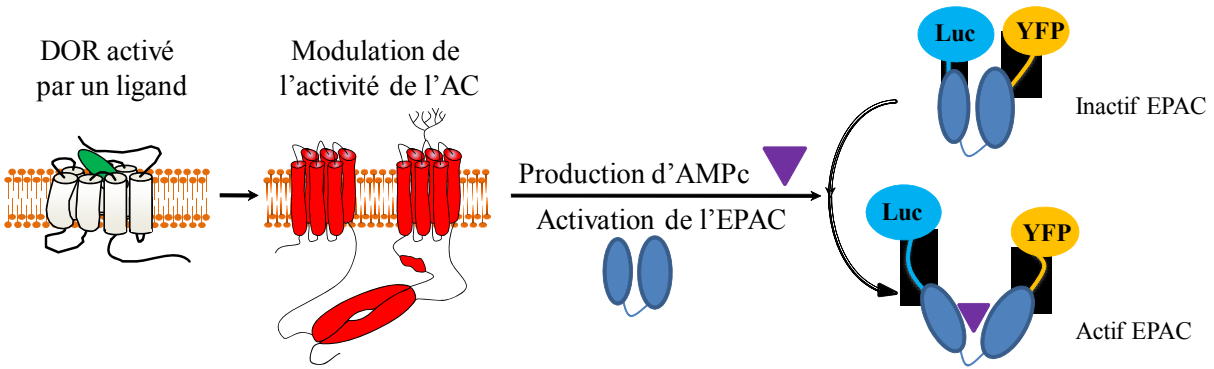


Figure 19. Le biosenseur EPAC.

Sachant que les différents biosenseurs de cette étude sont basés sur la technologie BRET, des courbes dose-réponse de chaque biosenseur et pour chaque ligand testé seront réalisées et analysées en utilisant le modèle opérationnel. Ce modèle proposé en 1983 par Black & Leff [407] et amélioré, récemment, par Kenakin & Christopoulos [408, 409] est considéré, de nos jours, un des meilleurs modèles pour quantifier l'efficacité d'un ligand à générer une réponse biologique. Le postulat fondamental de ce modèle repose sur sa capacité de contourner le besoin de décrire l'efficacité d'un ligand par une constante [407] mais plutôt par un paramètre de la courbe qui dépend de la relation saturable entre la stimulation du récepteur et la réponse observée. Le modèle opérationnel tel qu'utilisé par Kenakin & Christopoulos tient en considération la présence de plusieurs conformations actives d'un même récepteur (Figure 19) et utilise ainsi deux paramètres liés au ligand pour mesurer l'efficacité de ce dernier à activer une réponse spécifique. Ces deux paramètres sont : 1) **l'efficacité (τ)** qui fait référence aux changements conformationnels qui se réalisent une fois le récepteur devient activé par la drogue et 2) **l'affinité fonctionnelle (K_A)** qui fait référence à la capacité de la drogue à reconnaître la forme active du récepteur produisant ainsi la réponse d'intérêt [410, 411]. En d'autres termes, l'affinité pour les ligands efficaces est déterminée, au moins en partie, par les partenaires de signalisation avec lesquels s'associe le récepteur.

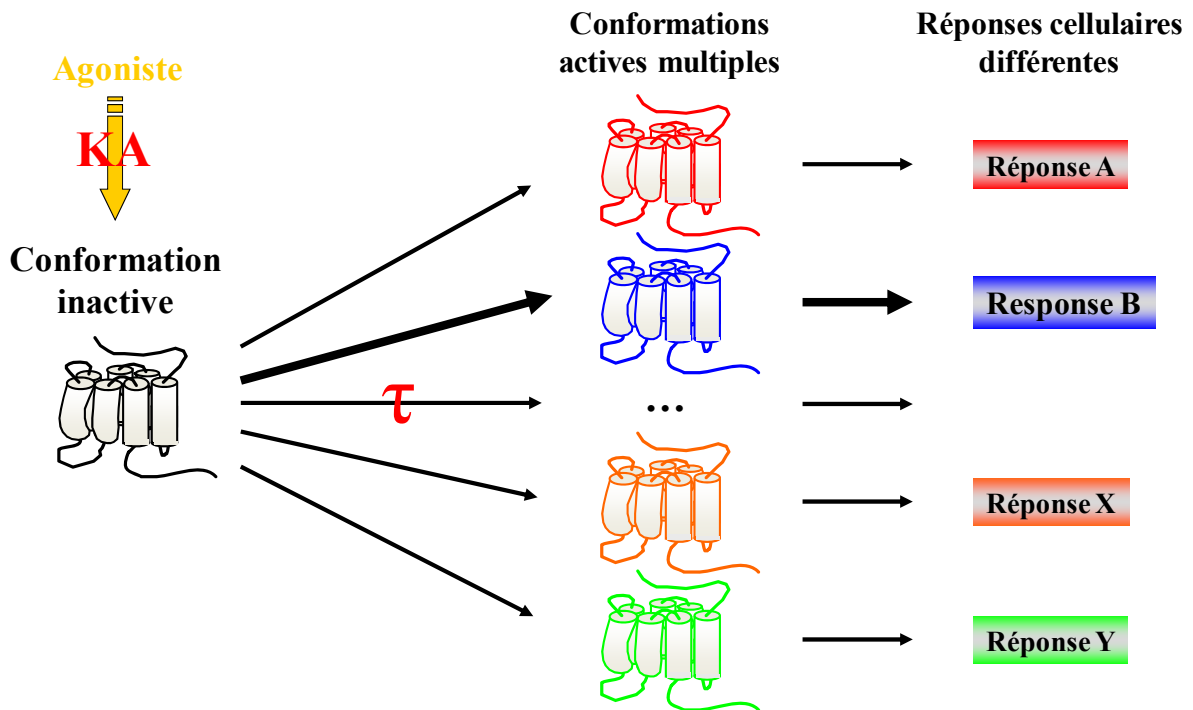


Figure 20. Modèle «multi-états»: plusieurs conformations actives d'un même récepteur.

Somme toute, l'efficacité relative que peut adopter une drogue pour différentes voies de signalisation ainsi qu'une affinité différentielle de cette dernière pour l'état actif du récepteur induisant la réponse voulue pourraient identifier la présence de comportements "biaisés" pour les ligands à tester. La procédure d'analyse des courbes dose-réponse (utilisée dans l'Annexe 3 et détaillée dans l'Annexe 4) pourrait expliquer la transition de la phase "courbe dose-réponse" à la phase " $\Delta \log (\tau / KA)$ " représentée dans la Figure 20.

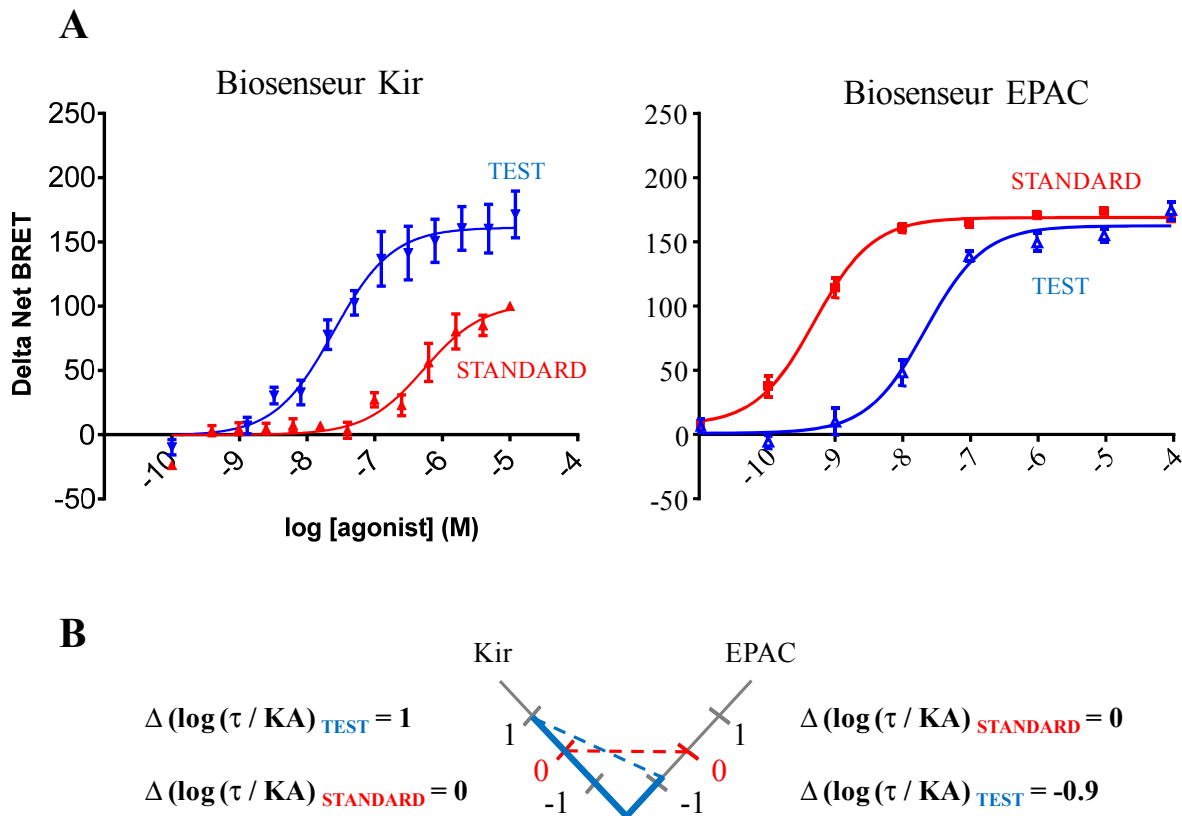


Figure 21. Transition de la phase "courbe dose-réponse" à la phase " $\Delta \log(\tau / KA)$ ".

Résultats préliminaires:

Les valeurs de $\Delta \log(\tau / KA)$, calculées à partir de nos courbes dose-réponse, ont été représentées sous la forme d'un polygone. Chaque polygone comprend différents axes dont chacun correspond à un biosenseur différent et au niveau duquel la Met-Enképhaline a été utilisée comme "drogue standard" (représentée en rouge). Nos résultats, réalisés en utilisant le rDOR (Figure 21), montrent que AR-M100390, Buprénorphine, TIPP et DPDPE produisent une forte activation des biosenseurs de protéine G et Kir sans activer efficacement les biosenseurs EPAC et de recrutement de β arr. Par contre, Deltorphine et SNC-80 produisent non seulement une forte activation des biosenseurs de l'analgésie, mais activent aussi très efficacement les biosenseurs de tolérance. Aussi, en comparant les profils signalétiques du récepteur DOR humain et de rat (Figure 22), nos résultats montrent que ces derniers

présentent, en majorité, la même structure polygonale (même préférence de la drogue pour activer certains biosenseurs que d'autres), pourtant, l'efficacité des drogues à activer les différents biosenseurs a été plus élevée chez le hDOR que celle du rDOR. Ainsi, on pourrait estimer que le récepteur humain présente une meilleure capacité à activer les voies signalétiques d'analgésie et de tolérance que son partenaire de rat. Une analyse statistique devrait être réalisée pour valider toutes nos observations.

Prises ensemble, ces données indiquent que AR-M100390, Buprénorphine, TIPP et DPDPE seraient des drogues de préférence puisqu'elles montrent une préférence pour activer les biosenseurs de l'analgésie sur ceux de la tolérance. D'autre part, on s'attend à ce que Deltorphine et SNC-80 produisent une forte tolérance à l'analgésie suite à leur administration prolongée car malgré leurs fortes capacités d'activer les voies de la protéine G et Kir, ces ligands activent très efficacement les voies d'AC et de recrutement de β arr. Donc, ces résultats estiment que Deltorphine et SNC-80 auront plus tendance à développer une tolérance analgésique que AR-M100390, Buprénorphine, TIPP et DPDPE et indiquent que le profil signalétique de la majorité des ligands testés reste raisonnablement maintenu entre l'humain et le rat.

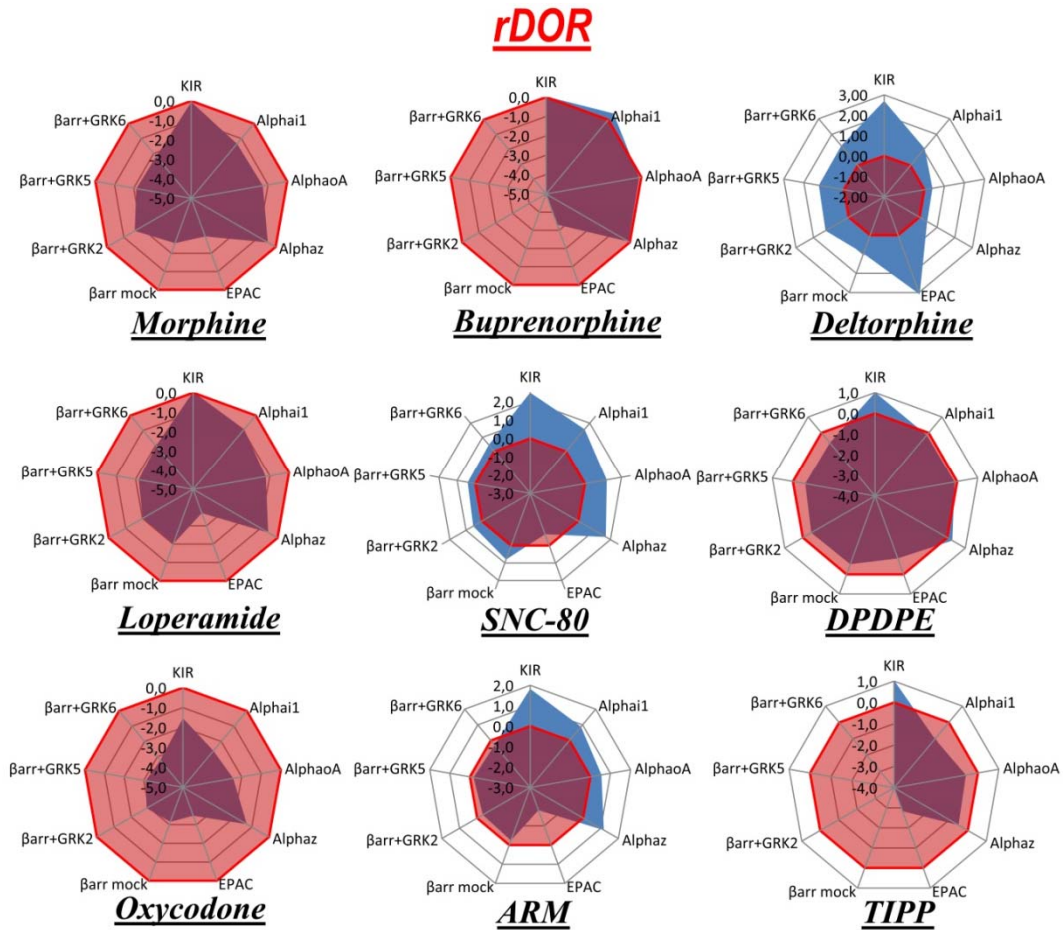
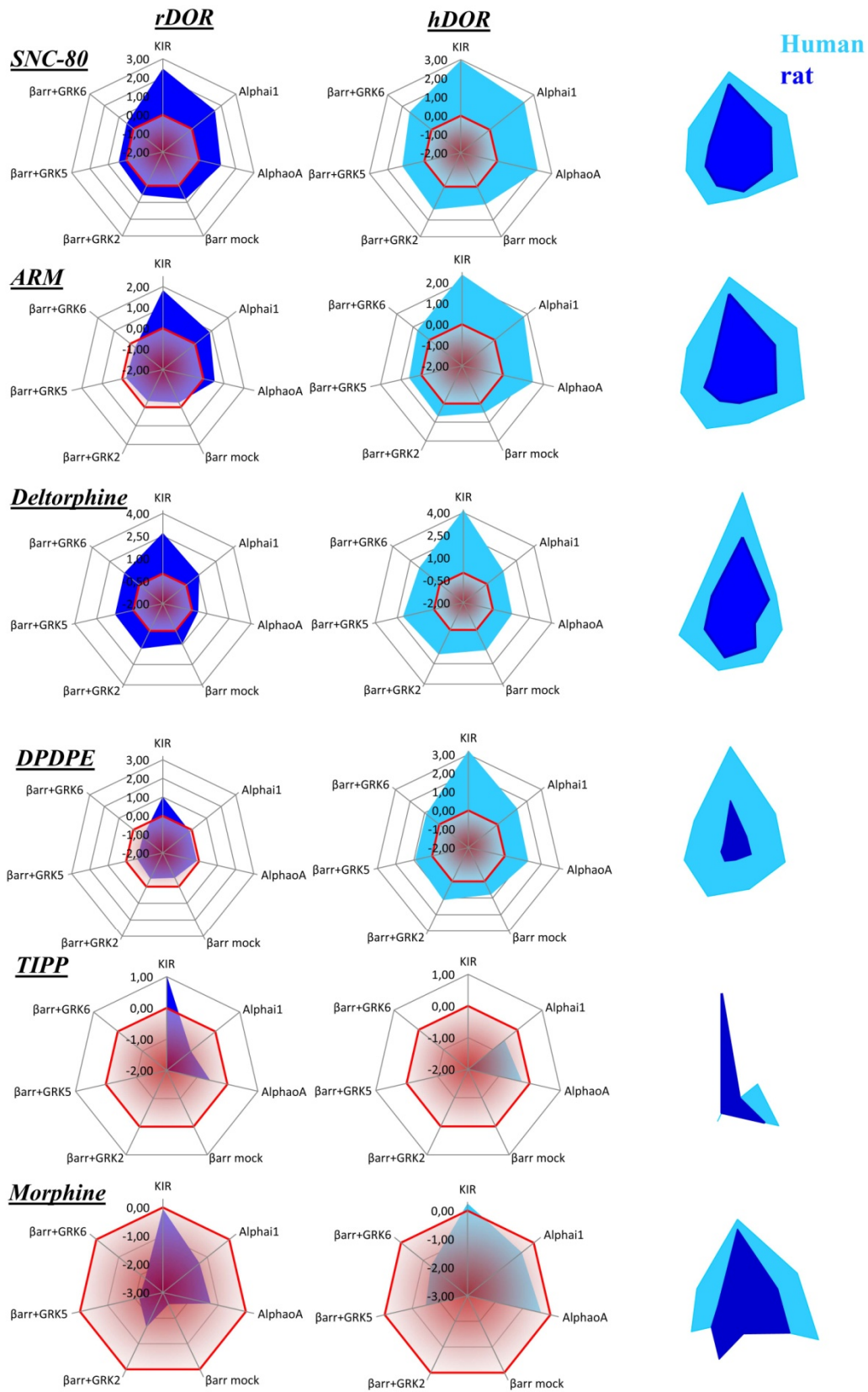


Figure 22. Les ligands du récepteur rDOR présentent des profils signalétiques différents.

Le profil signalétique de chaque ligand, indiquant les valeurs de $\Delta \log (\tau / K_A)$, ont été représentés sous la forme d'un polygone. Chaque polygone comprend différents axes dont chacun correspond à un biosenseur différent et au niveau duquel la Met-Enképhaline, utilisée comme "drogue standard", a été représentée sous la forme d'un enneagone rouge alors que la drogue à tester a été représentée sous la forme d'un enneagone bleu. L'enneagone rouge est commun à tous les polygones (valeurs de $\Delta \log (\tau / K_A)$ toujours ajustées à zéro), cependant, l'échelle de chaque polygone a été modifiée pour mieux visualiser les différences entre l'enneagone rouge et bleu.



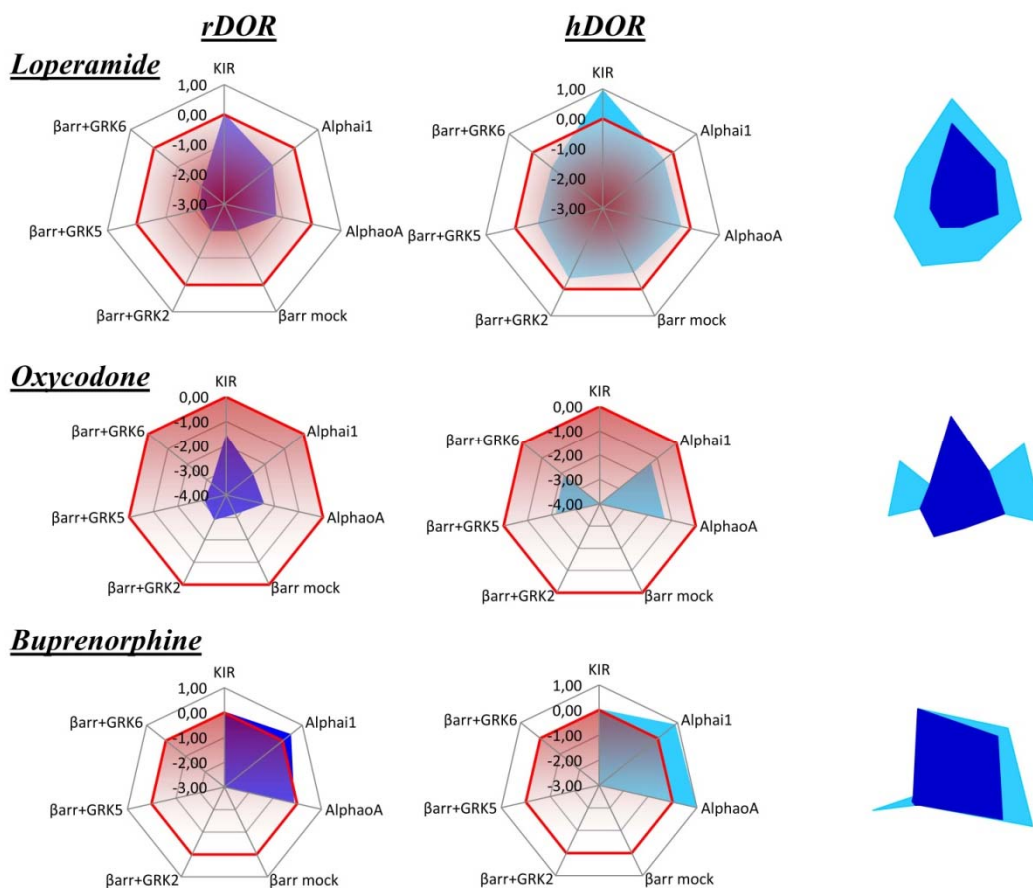


Figure 23. Comparaison par extrapolation des profils signalétiques de ligands opioïdes chez rDOR et hDOR.

Comme indiqué dans la légende de la Figure 21, le profil signalétique de chaque ligand, indiquant les valeurs de $\Delta \log (\tau / KA)$, ont été représentés sous la forme d'un polygone. Dans chaque polygone, la Met-Enképhaline, utilisée comme "drogue standard", a été représentée sous la forme d'un heptagone rouge alors que la drogue à tester a été représentée sous la forme d'un heptagone bleu foncé (rDOR - première colonne) ou cyan (hDOR - deuxième colonne). Pour mieux visualiser les différences entre les profils signalétiques des ligands opioïdes chez rDOR et hDOR, une extrapolation des heptagones a été représentée au niveau de la troisième colonne.

4.3.3 Y a-t-il un intérêt à exploiter la régulation différentielle des complexes préformés afin d'identifier un meilleur analgésique opioïde ?

Dans la section précédente, on a évalué la préférence de plusieurs ligands à activer certaines voies signalétiques plus que d'autres. Cette caractéristique, propre pour chaque ligand, pourrait cependant être influencée par différents facteurs dont la présence du récepteur

dans des complexes de compositions différentes. Autrement dit, si les drogues à tester se trouvent affrontées d'une manière similaire à des complexes préformés (comme celui DOR/Kir), les drogues auront le choix de préférer activer un complexe sur un autre. Ce concept serait d'un grand intérêt à exploiter surtout si on serait capable d'identifier des ligands susceptibles 1) d'activer préférentiellement les récepteurs en association avec des effecteurs impliqués dans la production de l'effet analgésique (comme les canaux Kir ou Cav) et/ou 2) de désensibiliser et même internaliser les récepteurs en complexe avec des effecteurs impliqués dans les voies de la tolérance (comme l'AC) (Figure 23). L'idée que le récepteur peut se comporter d'une manière différente dépendamment de ses partenaires signalétiques est supportée par des études qui montrent que les propriétés pharmacologiques d'un récepteur peuvent changer lorsqu'il se trouve en homo- ou hétéro-dimère [412, 413].

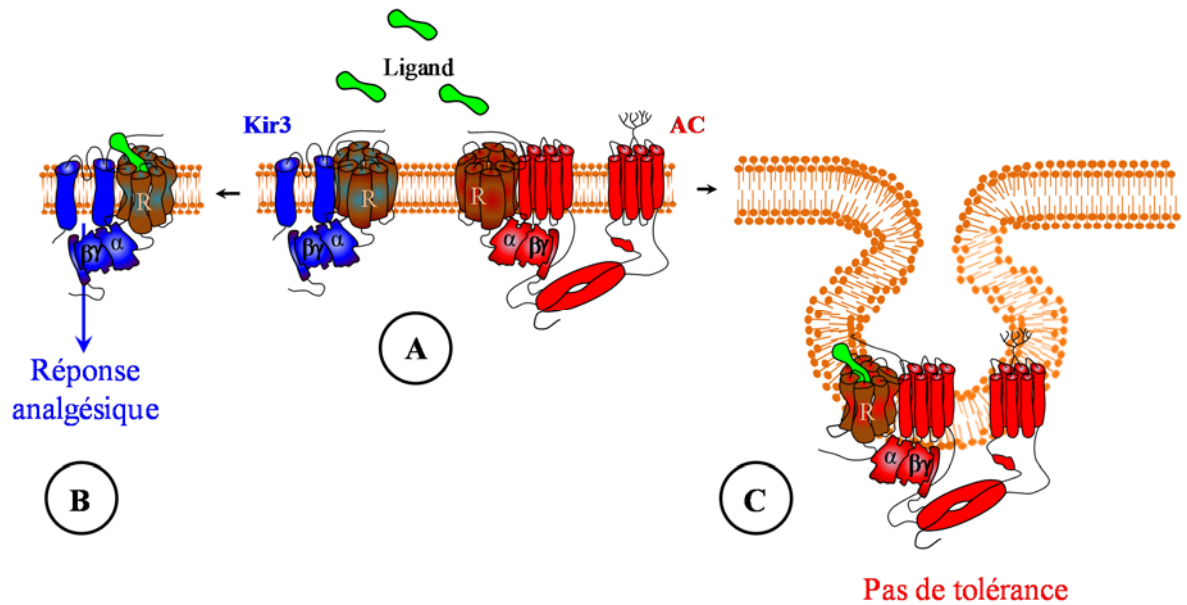


Figure 24. La régulation des complexes préformés comme outil pour identifier de meilleurs analgésiques opioïdes. (A) Les complexes préformés DOR/Kir3 (bleu) et DOR/AC (rouge) se trouvent affrontés à des ligands opioïdes. Un ligand de préférence serait celui capable de reconnaître et activer le récepteur DOR en association avec le canal Kir3 produisant ainsi un effet analgésique (B) et/ou capable de reconnaître et internaliser le récepteur DOR associé à l'AC impliquée dans les voies de la tolérance aux analgésiques opioïdes (C).

5. Conclusion

Durant ces dernières années, les études de pharmacologie moléculaires valorisent le fait que les RCPG n'existent pas seuls à la membrane plasmique. Les résultats rapportés dans cette thèse montrent des preuves qui s'opposent au modèle généralement accepté, qui suppose que les récepteurs et les protéines G sont tous deux mobiles et qu'une collision entre eux est nécessaire pour l'activation de la protéine hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$ [205-207]. Ces résultats supportent plutôt le modèle de précouplage et montrent que le récepteur DOR forme un complexe constitutif avec sa protéine G et un de ces effecteurs impliqué dans la génération de l'effet analgésique, le canal Kir3. Ce complexe maintient son intégrité suite à l'activation du récepteur et subit de multiples réarrangements conformationnels permettant ainsi la transmission de l'information du récepteur DOR actif à l'effecteur Kir3 via une voie spécifique qui implique les sous-unités de la protéine G, induisant ainsi l'activation du canal.

Malheureusement, l'activation de certains mécanismes de tolérance provoquent l'internalisation du récepteur DOR et du canal Kir3 par la β arr via une voie clathrine et dynamine-dépendante. Donc, on pourrait toutefois supposer qu'un ligand capable de produire un effet analgésique sans activer les mécanismes de tolérance serait privilégié dans le traitement des douleurs chroniques. Cette thèse s'est basée sur ses propres résultats ainsi que d'autres antérieurs pour identifier des outils permettant d'augmenter nos connaissances sur la capacité de certains agonistes DOR à activer préférentiellement les voies responsables des effets thérapeutiques ou ceux de la tolérance (résultats préliminaires présentés dans la section "Perspectives et directions futures"). Voilà pourquoi les données présentées dans cette thèse représentent un outil intéressant pour l'identification des ligands qui préservent leur capacité à signaler.

6. Bibliographie

1. Bonica JJ. The need of a taxonomy. *Pain* 1979; 6 : 247-8.
2. Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5 : 565-75.
3. Pasero C. Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain management nursing : official journal of the American Society of Pain Management Nurses* 2004; 5 : 3-8.
4. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139 : 267-84.
5. Quock RM, Burkey TH, Varga E, *et al.* The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacological reviews* 1999; 51 : 503-32.
6. Siddall PJ, Cousins MJ. Spinal pain mechanisms. *Spine* 1997; 22 : 98-104.
7. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, *et al.* Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 2011; 477 : 549-55.
8. Granier S, Manglik A, Kruse AC, *et al.* Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 2012; 485 : 400-4.
9. Wall MA, Coleman DE, Lee E, *et al.* The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* 1995; 83 : 1047-58.
10. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, *et al.* Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 2012; 485 : 321-6.
11. Granier S. [Structure of mu and delta opioid receptors]. *Medecine sciences : M/S* 2012; 28 : 870-5.
12. Bals-Kubik R, Shippenberg TS, Herz A. Involvement of central mu and delta opioid receptors in mediating the reinforcing effects of beta-endorphin in the rat. *Eur J Pharmacol* 1990; 175 : 63-9.
13. Bowdle TA. Adverse effects of opioid agonists and agonist-antagonists in anaesthesia. *Drug safety* 1998; 19 : 173-89.
14. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 2008; 11 : S133-53.
15. Ballantyne JC, Shin NS. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. *Clin J Pain* 2008; 24 : 469-78.

16. Morgan MM, Christie MJ. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *British journal of pharmacology* 2011; 164 : 1322-34.
17. Inturrisi CE. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain* 2002; 18 : S3-13.
18. Gallantine EL, Meert TF. A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97 : 39-51.
19. Cheng PY, Wu D, Soong Y, *et al.* Role of mu 1- and delta-opioid receptors in modulation of fetal EEG and respiratory activity. *The American journal of physiology* 1993; 265 : R433-8.
20. Tavani A, Petrillo P, La Regina A, Sbacchi M. Role of peripheral mu, delta and kappa opioid receptors in opioid-induced inhibition of gastrointestinal transit in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1990; 254 : 91-7.
21. Feng P, Rahim RT, Cowan A, *et al.* Effects of mu, kappa or delta opioids administered by pellet or pump on oral Salmonella infection and gastrointestinal transit. *Eur J Pharmacol* 2006; 534 : 250-7.
22. Codd EE, Carson JR, Colburn RW, *et al.* JNJ-20788560 [9-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ylidene)-9H-xanthene-3-carboxylic acid diethylamide], a selective delta opioid receptor agonist, is a potent and efficacious antihyperalgesic agent that does not produce respiratory depression, pharmacologic tolerance, or physical dependence. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2009; 329 : 241-51.
23. Cowan A, Zhu XZ, Mosberg HI, *et al.* Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1988; 246 : 950-5.
24. Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, *et al.* Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *Journal of neurochemistry* 2006; 97 : 1494-505.
25. Gendron L, Esdaile MJ, Mennicken F, *et al.* Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience* 2007; 144 : 263-74.
26. Pradhan AA, Walwyn W, Nozaki C, *et al.* Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010; 30 : 16459-68.
27. Audet N, Charfi I, Mnie-Filali O, *et al.* Differential association of receptor-Gbetagamma complexes with beta-arrestin2 determines recycling bias and potential for tolerance of delta opioid receptor agonists. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012; 32 : 4827-40.

28. Jutkiewicz EM, Rice KC, Traynor JR, Woods JH. Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 182 : 588-96.
29. Broom DC, Nitsche JF, Pintar JE, *et al.* Comparison of receptor mechanisms and efficacy requirements for delta-agonist-induced convulsive activity and antinociception in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2002; 303 : 723-9.
30. De Sarro GB, Marra R, Spagnolo C, Nistico G. Delta opioid receptors mediate seizures produced by intrahippocampal injection of ala-deltorphan in rats. *Functional neurology* 1992; 7 : 235-8.
31. Drake CT, Chavkin C, Milner TA. Opioid systems in the dentate gyrus. *Progress in brain research* 2007; 163 : 245-63.
32. Jutkiewicz EM, Baladi MG, Folk JE, *et al.* The convulsive and electroencephalographic changes produced by nonpeptidic delta-opioid agonists in rats: comparison with pentylentetrazol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2006; 317 : 1337-48.
33. Le Bourdonnec B, Windh RT, Ajello CW, *et al.* Potent, orally bioavailable delta opioid receptor agonists for the treatment of pain: discovery of N,N-diethyl-4-(5-hydroxyspiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide (ADL5859). *J Med Chem* 2008; 51 : 5893-6.
34. Saitoh A, Sugiyama A, Nemoto T, *et al.* The novel delta opioid receptor agonist KNT-127 produces antidepressant-like and antinociceptive effects in mice without producing convulsions. *Behav Brain Res* 2011; 223 : 271-9.
35. Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol* 2011; 22 : 405-14.
36. Mathieu-Kia AM, Fan LQ, Kreek MJ, *et al.* Mu-, delta- and kappa-opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Brain research* 2001; 893 : 121-34.
37. Teng L, Zhao J, Wang F, *et al.* A GPCR/secretase complex regulates beta- and gamma-secretase specificity for Aβ production and contributes to AD pathogenesis. *Cell Res* 2010; 20 : 138-53.
38. Hallett PJ, Brotchie JM. Striatal delta opioid receptor binding in experimental models of Parkinson's disease and dyskinesia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 2007; 22 : 28-40.

39. Broom DC, Jutkiewicz EM, Rice KC, *et al.* Behavioral effects of delta-opioid receptor agonists: potential antidepressants? *Japanese journal of pharmacology* 2002; 90 : 1-6.
40. Vergura R, Balboni G, Spagnolo B, *et al.* Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist. *Peptides* 2008; 29 : 93-103.
41. Chu Sin Chung P, Kieffer BL. Delta opioid receptors in brain function and diseases. *Pharmacol Ther* 2013; 140 : 112-20.
42. Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv* 2003; 3 : 90-105, 51.
43. Ose A, Kusuhara H, Endo C, *et al.* Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2010; 38 : 168-76.
44. Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in neurobiology* 2002; 66 : 285-306.
45. Bilsky EJ, Calderon SN, Wang T, *et al.* SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1995; 273 : 359-66.
46. Calderon SN, Rothman RB, Porreca F, *et al.* 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* 1994; 37 : 2125-8.
47. Portoghese PS, Sultana M, Takemori AE. Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1988; 146 : 185-6.
48. Schiller PW, Nguyen TM, Weltrowska G, *et al.* Differential stereochemical requirements of mu vs. delta opioid receptors for ligand binding and signal transduction: development of a class of potent and highly delta-selective peptide antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89 : 11871-5.
49. Schiller PW, Weltrowska G, Nguyen TM, *et al.* Conformationally restricted deltorphin analogues. *J Med Chem* 1992; 35 : 3956-61.
50. Szatmari I, Toth G, Kertesz I, *et al.* Synthesis and binding characteristics of [3H] H-Tyr-Ticpsi[CH₂-NH] Cha-Phe-OH, a highly specific and stable delta-opioid antagonist. *Peptides* 1999; 20 : 1079-83.

51. Schiller PW, Weltrowska G, Berezowska I, *et al.* The TIPP opioid peptide family: development of delta antagonists, delta agonists, and mixed mu agonist/delta antagonists. *Biopolymers* 1999; 51 : 411-25.
52. Mosberg HI, Hurst R, Hraby VJ, *et al.* Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983; 80 : 5871-4.
53. Tryoen-Toth P, Decaillet FM, Filliol D, *et al.* Inverse agonism and neutral antagonism at wild-type and constitutively active mutant delta opioid receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005; 313 : 410-21.
54. Hudzik TJ, Maciag C, Smith MA, *et al.* Preclinical pharmacology of AZD2327: a highly selective agonist of the delta-opioid receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2011; 338 : 195-204.
55. Aguila B, Coulbault L, Boulouard M, *et al.* In vitro and in vivo pharmacological profile of UFP-512, a novel selective delta-opioid receptor agonist; correlations between desensitization and tolerance. *British journal of pharmacology* 2007; 152 : 1312-24.
56. Birnbaumer L, Brown AM. G proteins and the mechanism of action of hormones, neurotransmitters, and autocrine and paracrine regulatory factors. *The American review of respiratory disease* 1990; 141 : S106-14.
57. Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, *et al.* Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 2000; 7 : 111-20.
58. Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* 1993; 366 : 654-63.
59. Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, *et al.* Structures of active conformations of Gi α 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 1994; 265 : 1405-12.
60. Lambright DG, Sondek J, Bohm A, *et al.* The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 1996; 379 : 311-9.
61. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9 : 60-71.
62. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the α -subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature* 1994; 369 : 621-8.
63. Ford CE, Skiba NP, Bae H, *et al.* Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 1998; 280 : 1271-4.

64. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995; 80 : 249-57.
65. Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987; 56 : 615-49.
66. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, *et al.* The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 1987; 325 : 321-6.
67. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 1991; 252 : 802-8.
68. Strathmann MP, Simon MI. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88 : 5582-6.
69. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, *et al.* Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine reviews* 2003; 24 : 765-81.
70. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 1994; 371 : 297-300.
71. Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA, Neer EJ. Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267 : 13807-10.
72. Pronin AN, Gautam N. Interaction between G-protein beta and gamma subunit types is selective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89 : 6220-4.
73. Yan K, Kalyanaraman V, Gautam N. Differential ability to form the G protein betagamma complex among members of the beta and gamma subunit families. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271 : 7141-6.
74. Spring DJ, Neer EJ. A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269 : 22882-6.
75. Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37 : 167-203.
76. Neer EJ. G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1994; 3 : 3-14.
77. Graf R, Mattera R, Codina J, *et al.* Studies on the interaction of alpha subunits of GTP-binding proteins with beta gamma dimers. *European journal of biochemistry / FEBS* 1992; 210 : 609-19.

78. McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception. *Annual review of physiology* 1999; 61 : 835-56.
79. Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, *et al.* Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev* 1999; 79 : 1019-88.
80. Dolphin AC. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews* 2003; 55 : 607-27.
81. Ikeda SR, Dunlap K. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Advances in second messenger and phosphoprotein research* 1999; 33 : 131-51.
82. Tedford HW, Zamponi GW. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacological reviews* 2006; 58 : 837-62.
83. Catterall WA, Few AP. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 2008; 59 : 882-901.
84. Stephens GJ. G-protein-coupled-receptor-mediated presynaptic inhibition in the cerebellum. *Trends in pharmacological sciences* 2009; 30 : 421-30.
85. Chaudhuri D, Chang SY, DeMaria CD, *et al.* Alternative splicing as a molecular switch for Ca²⁺/calmodulin-dependent facilitation of P/Q-type Ca²⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004; 24 : 6334-42.
86. Liao P, Yong TF, Liang MC, *et al.* Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles. *Cardiovascular research* 2005; 68 : 197-203.
87. Lipscombe D. Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Current opinion in neurobiology* 2005; 15 : 358-63.
88. Lipscombe D, Andrade A, Allen SE. Alternative splicing: functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1828 : 1522-9.
89. Tan BZ, Jiang F, Tan MY, *et al.* Functional characterization of alternative splicing in the C terminus of L-type CaV1.3 channels. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286 : 42725-35.
90. Tan GM, Yu D, Wang J, Soong TW. Alternative splicing at C terminus of Ca(V)1.4 calcium channel modulates calcium-dependent inactivation, activation potential, and current density. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287 : 832-47.

91. Curtis BM, Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 1984; 23 : 2113-8.
92. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews* 2005; 57 : 411-25.
93. Catterall WA. Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neurosci Lett* 2010; 486 : 107-16.
94. Ellinor PT, Yang J, Sather WA, *et al.* Ca²⁺ channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron* 1995; 15 : 1121-32.
95. Yang J, Ellinor PT, Sather WA, *et al.* Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* 1993; 366 : 158-61.
96. Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, Rosenberg RL. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 1987; 16 : 265-90.
97. Bourinet E, Zamponi GW, Stea A, *et al.* The alpha 1E calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1996; 16 : 4983-93.
98. Lansman JB, Hess P, Tsien RW. Blockade of current through single calcium channels by Cd²⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *The Journal of general physiology* 1986; 88 : 321-47.
99. Mintz IM, Bean BP. GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 1993; 10 : 889-98.
100. Holz GGt, Shefner SA, Anderson EG. Serotonin decreases the duration of action potentials recorded from tetraethylammonium-treated bullfrog dorsal root ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1986; 6 : 620-6.
101. Lipscombe D, Kongsamut S, Tsien RW. Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 1989; 340 : 639-42.
102. Altier C, Khosravani H, Evans RM, *et al.* ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nature neuroscience* 2006; 9 : 31-40.
103. Ikeda SR. Prostaglandin modulation of Ca²⁺ channels in rat sympathetic neurones is mediated by guanine nucleotide binding proteins. *The Journal of physiology* 1992; 458 : 339-59.

104. Ikeda SR, Schofield GG. Somatostatin blocks a calcium current in rat sympathetic ganglion neurones. *The Journal of physiology* 1989; 409 : 221-40.
105. Shapiro MS, Hille B. Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron* 1993; 10 : 11-20.
106. Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, *et al.* Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 1997; 385 : 442-6.
107. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual review of cell and developmental biology* 2000; 16 : 521-55.
108. Schiff ML, Siderovski DP, Jordan JD, *et al.* Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. *Nature* 2000; 408 : 723-7.
109. Dunlap K, Fischbach GD. Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature* 1978; 276 : 837-9.
110. Dunlap K, Fischbach GD. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *The Journal of physiology* 1981; 317 : 519-35.
111. Seward E, Hammond C, Henderson G. Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 1991; 244 : 129-35.
112. De Waard M, Liu H, Walker D, *et al.* Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 1997; 385 : 446-50.
113. Bichet D, Cornet V, Geib S, *et al.* The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 2000; 25 : 177-90.
114. Herlitz S, Hockerman GH, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94 : 1512-6.
115. Chen Z, Nield HS, Sun H, *et al.* Expression of type V adenylyl cyclase is required for epidermal growth factor-mediated stimulation of cAMP accumulation. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270 : 27525-30.
116. Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, *et al.* G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998; 18 : 9163-70.

117. Zhou JY, Siderovski DP, Miller RJ. Selective regulation of N-type Ca channels by different combinations of G-protein beta/gamma subunits and RGS proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000; 20 : 7143-8.
118. Blake BL, Wing MR, Zhou JY, *et al.* G beta association and effector interaction selectivities of the divergent G gamma subunit G gamma(13). *The Journal of biological chemistry* 2001; 276 : 49267-74.
119. Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, *et al.* Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274 : 6195-202.
120. Cooper CB, Arnot MI, Feng ZP, *et al.* Cross-talk between G-protein and protein kinase C modulation of N-type calcium channels is dependent on the G-protein beta subunit isoform. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275 : 40777-81.
121. Weiss N, Sandoval A, Felix R, *et al.* The S218L familial hemiplegic migraine mutation promotes deinhibition of Ca(v)2.1 calcium channels during direct G-protein regulation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2008; 457 : 315-26.
122. Melliti K, Grabner M, Seabrook GR. The familial hemiplegic migraine mutation R192Q reduces G-protein-mediated inhibition of P/Q-type (Ca(V)2.1) calcium channels expressed in human embryonic kidney cells. *The Journal of physiology* 2003; 546 : 337-47.
123. Serra SA, Fernandez-Castillo N, Macaya A, *et al.* The hemiplegic migraine-associated Y1245C mutation in CACNA1A results in a gain of channel function due to its effect on the voltage sensor and G-protein-mediated inhibition. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2009; 458 : 489-502.
124. Dascal N. Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cellular signalling* 1997; 9 : 551-73.
125. Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, *et al.* Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron* 2002; 33 : 715-29.
126. Gao XF, Zhang HL, You ZD, *et al.* G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in dorsal root ganglion neurons. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28 : 185-90.
127. Wickman K, Karschin C, Karschin A, *et al.* Brain localization and behavioral impact of the G-protein-gated K⁺ channel subunit GIRK4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2000; 20 : 5608-15.

128. Saenz del Burgo L, Cortes R, Mengod G, *et al.* Distribution and neurochemical characterization of neurons expressing GIRK channels in the rat brain. *J Comp Neurol* 2008; 510 : 581-606.
129. Fernandez-Alacid L, Watanabe M, Molnar E, *et al.* Developmental regulation of G protein-gated inwardly-rectifying K⁺ (GIRK/Kir3) channel subunits in the brain. *The European journal of neuroscience* 2011; 34 : 1724-36.
130. Liao YJ, Jan YN, Jan LY. Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1996; 16 : 7137-50.
131. Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K. Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005; 25 : 3551-9.
132. Robitaille M, Ramakrishnan N, Baragli A, Hebert TE. Intracellular trafficking and assembly of specific Kir3 channel/G protein complexes. *Cellular signalling* 2009; 21 : 488-501.
133. Rebois RV, Robitaille M, Gales C, *et al.* Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *Journal of cell science* 2006; 119 : 2807-18.
134. Lei Q, Jones MB, Talley EM, *et al.* Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein beta gamma subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97 : 9771-6.
135. Mennicken F, Zhang J, Hoffert C, *et al.* Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 2003; 465 : 349-60.
136. Patil N, Cox DR, Bhat D, *et al.* A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet* 1995; 11 : 126-9.
137. Navarro B, Kennedy ME, Velimirovic B, *et al.* Nonselective and G betagamma-insensitive weaver K⁺ channels. *Science* 1996; 272 : 1950-3.
138. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, *et al.* Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K (GIRK) channels in opioid-induced analgesia. *Neurosci Res* 2000; 38 : 113-6.
139. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, *et al.* Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neurosci Res* 2002; 44 : 121-31.

140. Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bader S, *et al.* Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100 : 271-6.
141. Marker CL, Stoffel M, Wickman K. Spinal G-protein-gated K⁺ channels formed by GIRK1 and GIRK2 subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004; 24 : 2806-12.
142. Marker CL, Cintora SC, Roman MI, *et al.* Hyperalgesia and blunted morphine analgesia in G protein-gated potassium channel subunit knockout mice. *Neuroreport* 2002; 13 : 2509-13.
143. Marker CL, Lujan R, Colon J, Wickman K. Distinct populations of spinal cord lamina II interneurons expressing G-protein-gated potassium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26 : 12251-9.
144. Luscher C, Slesinger PA. Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11 : 301-15.
145. Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, *et al.* Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26 : 953-62.
146. Li JL, Ding YQ, Li YQ, *et al.* Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain research* 1998; 794 : 347-52.
147. Wang HB, Zhao B, Zhong YQ, *et al.* Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107 : 13117-22.
148. Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. Distinct inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channels by delta-opioid agonists in dorsal root ganglion neurons devoid of functional T-type Ca²⁺ currents. *Neuroscience* 2008; 153 : 1256-67.
149. Hassan AH, Ableitner A, Stein C, Herz A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 1993; 55 : 185-95.
150. Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, *et al.* Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 2009; 141 : 283-91.

151. Vadivelu N, Mitra S, Hines RL. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review. *J Opioid Manag* 2011; 7 : 55-68.
152. Nockemann D, Rouault M, Labuz D, *et al.* The K(+) channel GIRK2 is both necessary and sufficient for peripheral opioid-mediated analgesia. *EMBO Mol Med* 2013; 5 : 1263-77.
153. Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, *et al.* Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1989; 248 : 1269-75.
154. Chung MK, Cho YS, Bae YC, *et al.* Peripheral G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are involved in delta-opioid receptor-mediated anti-hyperalgesia in rat masseter muscle. *Eur J Pain* 2013.
155. Kalso E, Edwards JE, Moore RA, McQuay HJ. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. *Pain* 2004; 112 : 372-80.
156. Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *The Journal of biological chemistry* 1958; 232 : 1077-91.
157. Hakonarson H, Grunstein MM. Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998; 158 : S115-22.
158. Gros R, Ding Q, Chorazyczewski J, *et al.* Adenylyl cyclase isoform-selective regulation of vascular smooth muscle proliferation and cytoskeletal reorganization. *Circulation research* 2006; 99 : 845-52.
159. Muller G, Wied S, Over S, Frick W. Inhibition of lipolysis by palmitate, H₂O₂ and the sulfonylurea drug, glimepiride, in rat adipocytes depends on cAMP degradation by lipid droplets. *Biochemistry* 2008; 47 : 1259-73.
160. Shah RS, Lee HG, Xiongwei Z, *et al.* Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2008; 62 : 199-207.
161. Rosenberg D, Groussin L, Bertagna X, Bertherat J. cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors. *Endocrine research* 2002; 28 : 765-75.
162. Feldman AM. Adenylyl cyclase: a new target for heart failure therapeutics. *Circulation* 2002; 105 : 1876-8.
163. Efendiev R, Dessauer CW. A kinase-anchoring proteins and adenylyl cyclase in cardiovascular physiology and pathology. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2011; 58 : 339-44.

164. Mons N, Yoshimura M, Cooper DM. Discrete expression of Ca²⁺/calmodulin-sensitive and Ca²⁺-insensitive adenylyl cyclases in the rat brain. *Synapse* 1993; 14 : 51-9.
165. Mons N, Cooper DM. Selective expression of one Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase in dopaminergically innervated rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 22 : 236-44.
166. Cali JJ, Zwaagstra JC, Mons N, *et al.* Type VIII adenylyl cyclase. A Ca²⁺/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269 : 12190-5.
167. Liu FC, Wu GC, Hsieh ST, *et al.* Expression of type VI adenylyl cyclase in the central nervous system: implication for a potential regulator of multiple signals in different neurotransmitter systems. *FEBS Lett* 1998; 436 : 92-8.
168. Mons N, Decorte L, Jaffard R, Cooper DM. Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sci* 1998; 62 : 1647-52.
169. Yan SZ, Hahn D, Huang ZH, Tang WJ. Two cytoplasmic domains of mammalian adenylyl cyclase form a Gs alpha- and forskolin-activated enzyme in vitro. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271 : 10941-5.
170. Dessauer CW, Scully TT, Gilman AG. Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272 : 22272-7.
171. Scholich K, Wittpoth C, Barbier AJ, *et al.* Identification of an intramolecular interaction between small regions in type V adenylyl cyclase that influences stimulation of enzyme activity by G_salpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94 : 9602-7.
172. Tesmer JJ, Sunahara RK, Gilman AG, Sprang SR. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G_salpha.GTPgammaS. *Science* 1997; 278 : 1907-16.
173. Tang WJ, Hurley JH. Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Molecular pharmacology* 1998; 54 : 231-40.
174. Hurley JH. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274 : 7599-602.
175. Tesmer JJ, Sprang SR. The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Current opinion in structural biology* 1998; 8 : 713-9.
176. Harry A, Chen Y, Magnusson R, *et al.* Differential regulation of adenylyl cyclases by G_salpha. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272 : 19017-21.

177. Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269 : 6093-100.
178. Baker LP, Nielsen MD, Impey S, *et al.* Regulation and immunohistochemical localization of betagamma-stimulated adenylyl cyclases in mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999; 19 : 180-92.
179. Taussig R, Iniguez-Lluhi JA, Gilman AG. Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* 1993; 261 : 218-21.
180. Simonds WF. G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends in pharmacological sciences* 1999; 20 : 66-73.
181. Scholich K, Mullenix JB, Wittpoth C, *et al.* Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. *Science* 1999; 283 : 1328-31.
182. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1992; 12 : 2439-50.
183. Sharma SK, Nirenberg M, Klee WA. Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975; 72 : 590-4.
184. Izenwasser S, Buzas B, Cox BM. Differential regulation of adenylyl cyclase activity by mu and delta opioids in rat caudate putamen and nucleus accumbens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1993; 267 : 145-52.
185. Unterwald EM, Cox BM, Kreek MJ, *et al.* Chronic repeated cocaine administration alters basal and opioid-regulated adenylyl cyclase activity. *Synapse* 1993; 15 : 33-8.
186. Heijna MH, Hogenboom F, Portoghese PS, *et al.* Mu- and delta-opioid receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase activity stimulated by released endogenous dopamine in rat neostriatal slices; demonstration of potent delta-agonist activity of bremazocine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1989; 249 : 864-8.
187. Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, *et al.* Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 1996; 273 : 657-9.
188. Duman RS, Tallman JF, Nestler EJ. Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1988; 246 : 1033-9.
189. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, *et al.* Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 1996; 383 : 819-23.

190. Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Sevarino KA, *et al.* A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain research* 1991; 548 : 100-10.
191. Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 2009; 89 : 1379-412.
192. Kim KS, Lee KW, Lee KW, *et al.* Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103 : 3908-13.
193. Avidor-Reiss T, Nevo I, Saya D, *et al.* Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272 : 5040-7.
194. Gintzler AR, Chakrabarti S. Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules. *Life Sci* 2006; 79 : 717-22.
195. Heck M, Hofmann KP. Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276 : 10000-9.
196. Ernst OP, Gramse V, Kolbe M, *et al.* Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104 : 10859-64.
197. Lohse MJ, Klotz KN, Schwabe U. Mechanism of A2 adenosine receptor activation. I. Blockade of A2 adenosine receptors by photoaffinity labeling. *Molecular pharmacology* 1991; 39 : 517-23.
198. Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, Khorana HG. Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Advances in protein chemistry* 2003; 63 : 243-90.
199. Janz JM, Farrens DL. Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279 : 29767-73.
200. Choe HW, Kim YJ, Park JH, *et al.* Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* 2011; 471 : 651-5.
201. Choe HW, Park JH, Kim YJ, Ernst OP. Transmembrane signaling by GPCRs: insight from rhodopsin and opsin structures. *Neuropharmacology* 2011; 60 : 52-7.
202. Onrust R, Herzmark P, Chi P, *et al.* Receptor and betagamma binding sites in the alpha subunit of the retinal G protein transducin. *Science* 1997; 275 : 381-4.

203. Bae H, Cabrera-Vera TM, Depree KM, *et al.* Two amino acids within the alpha4 helix of Galphai1 mediate coupling with 5-hydroxytryptamine1B receptors. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274 : 14963-71.
204. Cai K, Itoh Y, Khorana HG. Mapping of contact sites in complex formation between transducin and light-activated rhodopsin by covalent crosslinking: use of a photoactivatable reagent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98 : 4877-82.
205. Orly J, Schramm M. Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylate cyclase from another cell by cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1976; 73 : 4410-4.
206. Tolkovsky AM, Levitzki A. Coupling of a single adenylate cyclase to two receptors: adenosine and catecholamine. *Biochemistry* 1978; 17 : 3811-7.
207. Tolkovsky AM, Levitzki A. Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* 1978; 17 : 3795.
208. Rebois RV, Warner DR, Basi NS. Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins? *Cellular signalling* 1997; 9 : 141-51.
209. Klein S, Reuveni H, Levitzki A. Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97 : 3219-23.
210. Bunemann M, Frank M, Lohse MJ. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100 : 16077-82.
211. Frank M, Thumer L, Lohse MJ, Bunemann M. G Protein activation without subunit dissociation depends on a G{alpha}(i)-specific region. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 : 24584-90.
212. Gales C, Rebois RV, Hogue M, *et al.* Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2005; 2 : 177-84.
213. Wreggett KA, De Lean A. The ternary complex model. Its properties and application to ligand interactions with the D2-dopamine receptor of the anterior pituitary gland. *Molecular pharmacology* 1984; 26 : 214-27.
214. Neubig RR, Gantz RD, Thomsen WJ. Mechanism of agonist and antagonist binding to alpha 2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. *Biochemistry* 1988; 27 : 2374-84.

215. Tian WN, Duzic E, Lanier SM, Deth RC. Determinants of alpha 2-adrenergic receptor activation of G proteins: evidence for a precoupled receptor/G protein state. *Molecular pharmacology* 1994; 45 : 524-31.
216. Neubig RR. Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1994; 8 : 939-46.
217. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 2007; 450 : 383-7.
218. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009; 459 : 356-63.
219. Rosenbaum DM, Zhang C, Lyons JA, *et al.* Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* 2011; 469 : 236-40.
220. Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, *et al.* Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 2008; 454 : 183-7.
221. Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, *et al.* Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 2008; 455 : 497-502.
222. Pflieger KD, Eidne KA. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* 2005; 385 : 625-37.
223. Tateyama M, Abe H, Nakata H, *et al.* Ligand-induced rearrangement of the dimeric metabotropic glutamate receptor 1alpha. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11 : 637-42.
224. Schaufele F, Carbonell X, Guerbodot M, *et al.* The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102 : 9802-7.
225. Hein P, Frank M, Hoffmann C, *et al.* Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *The EMBO journal* 2005; 24 : 4106-14.
226. Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, *et al.* Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13 : 778-86.
227. Hein P, Rochais F, Hoffmann C, *et al.* Gs activation is time-limiting in initiating receptor-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 : 33345-51.
228. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends in biochemical sciences* 1992; 17 : 383-7.

229. Bourne HR. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9 : 134-42.
230. Audet N, Gales C, Archer-Lahlou E, *et al.* Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283 : 15078-88.
231. Rebois RV, Maki K, Meeks JA, *et al.* D2-like dopamine and beta-adrenergic receptors form a signaling complex that integrates Gs- and Gi-mediated regulation of adenylyl cyclase. *Cellular signalling* 2012; 24 : 2051-60.
232. Sprang SR. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 1997; 66 : 639-78.
233. Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, *et al.* GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 2007; 318 : 1266-73.
234. Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 2011; 469 : 175-80.
235. Sondek J, Lambright DG, Noel JP, *et al.* GTPase mechanism of Gproteins from the 1.7-A crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF-4. *Nature* 1994; 372 : 276-9.
236. Skiba NP, Bae H, Hamm HE. Mapping of effector binding sites of transducin alpha-subunit using G alpha t/G alpha i1 chimeras. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271 : 413-24.
237. Wensel TG, Stryer L. Activation mechanism of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase probed by fluorescein-labeled inhibitory subunit. *Biochemistry* 1990; 29 : 2155-61.
238. Deterre P, Bigay J, Robert M, *et al.* Activation of retinal rod cyclic GMP-phosphodiesterase by transducin: characterization of the complex formed by phosphodiesterase inhibitor and transducin alpha-subunit. *Proteins* 1986; 1 : 188-93.
239. Venkatakrisnan G, Exton JH. Identification of determinants in the alpha-subunit of Gq required for phospholipase C activation. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271 : 5066-72.
240. Burant CF. Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes care* 2013; 36 Suppl 2 : S175-9.
241. Li L, Zhang X. Differential inhibition of the TRPM8 ion channel by Galphaq and Galpha 11. *Channels* 2013; 7 : 115-8.

242. Mathie A. Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *The Journal of physiology* 2007; 578 : 377-85.
243. Simen AA, Lee CC, Simen BB, *et al.* The C terminus of the Ca channel alpha1B subunit mediates selective inhibition by G-protein-coupled receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001; 21 : 7587-97.
244. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3 : 639-50.
245. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, *et al.* G-protein signaling: back to the future. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2005; 62 : 551-77.
246. Berlot CH, Bourne HR. Identification of effector-activating residues of Gs alpha. *Cell* 1992; 68 : 911-22.
247. Itoh H, Gilman AG. Expression and analysis of Gs alpha mutants with decreased ability to activate adenylylcyclase. *The Journal of biological chemistry* 1991; 266 : 16226-31.
248. Rarick HM, Artemyev NO, Hamm HE. A site on rod G protein alpha subunit that mediates effector activation. *Science* 1992; 256 : 1031-3.
249. Rens-Domiano S, Hamm HE. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995; 9 : 1059-66.
250. Mixon MB, Lee E, Coleman DE, *et al.* Tertiary and quaternary structural changes in Gi alpha 1 induced by GTP hydrolysis. *Science* 1995; 270 : 954-60.
251. Hepler JR, Biddlecome GH, Kleuss C, *et al.* Functional importance of the amino terminus of Gq alpha. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271 : 496-504.
252. Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, *et al.* Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 1996; 380 : 258-62.
253. Hummer A, Delzeith O, Gomez SR, *et al.* Competitive and synergistic interactions of G protein beta(2) and Ca(2+) channel beta(1b) subunits with Ca(v)2.1 channels, revealed by mammalian two-hybrid and fluorescence resonance energy transfer measurements. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278 : 49386-400.
254. Tang WJ, Gilman AG. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* 1991; 254 : 1500-3.
255. Sternweis PC. The active role of beta gamma in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6 : 198-203.

256. Reuveny E, Slesinger PA, Inglese J, *et al.* Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* 1994; 370 : 143-6.
257. Rebois RV, Hebert TE. Protein complexes involved in heptahelical receptor-mediated signal transduction. *Receptors Channels* 2003; 9 : 169-94.
258. Chidiac P. Rethinking receptor-G protein-effector interactions. *Biochemical pharmacology* 1998; 55 : 549-56.
259. Lavine N, Ethier N, Oak JN, *et al.* G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277 : 46010-9.
260. Dupre DJ, Baragli A, Rebois RV, *et al.* Signalling complexes associated with adenylyl cyclase II are assembled during their biosynthesis. *Cellular signalling* 2007; 19 : 481-9.
261. Kisilevsky AE, Mulligan SJ, Altier C, *et al.* D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron* 2008; 58 : 557-70.
262. Fernandez-Alacid L, Aguado C, Ciruela F, *et al.* Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. *Journal of neurochemistry* 2009; 110 : 1363-76.
263. David M, Richer M, Mamarbachi AM, *et al.* Interactions between GABA-B1 receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels. *Cellular signalling* 2006; 18 : 2172-81.
264. Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, *et al.* ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 1994; 341 : 33-8.
265. Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, *et al.* Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 27 : 37-44.
266. Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, *et al.* Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 1994; 347 : 284-8.
267. Beedle AM, McRory JE, Poirot O, *et al.* Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nature neuroscience* 2004; 7 : 118-25.
268. Dumas EO. World Health Organization. Cancer Pain Relief, Second Edition, World Health Organization: Geneva, Switzerland. 1996 : pp. 1-69.

269. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, *et al.* Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27 : 107-44.
270. Martini L, Whistler JL. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Current opinion in neurobiology* 2007; 17 : 556-64.
271. Ko SW, Wu LJ, Shum F, *et al.* Cingulate NMDA NR2B receptors contribute to morphine-induced analgesic tolerance. *Mol Brain* 2008; 1 : 2.
272. Pineyro G, Archer-Lahlou E. Ligand-specific receptor states: implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cellular signalling* 2007; 19 : 8-19.
273. Haberstock-Debic H, Kim KA, Yu YJ, von Zastrow M. Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2005; 25 : 7847-57.
274. Arttamangkul S, Torrecilla M, Kobayashi K, *et al.* Separation of mu-opioid receptor desensitization and internalization: endogenous receptors in primary neuronal cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2006; 26 : 4118-25.
275. Walwyn WM, Wei W, Xie CW, *et al.* Mu opioid receptor-effector coupling and trafficking in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience* 2006; 142 : 493-503.
276. Trafton JA, Basbaum AI. [d-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin-induced internalization of the micro opioid receptor in the spinal cord of morphine tolerant rats. *Neuroscience* 2004; 125 : 541-3.
277. Petraschka M, Li S, Gilbert TL, *et al.* The absence of endogenous beta-endorphin selectively blocks phosphorylation and desensitization of mu opioid receptors following partial sciatic nerve ligation. *Neuroscience* 2007; 146 : 1795-807.
278. Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, *et al.* In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PloS one* 2009; 4 : e5425.
279. Gupta A, Decailot FM, Gomes I, *et al.* Conformation state-sensitive antibodies to G-protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 : 5116-24.
280. Dang VC, Christie MJ. Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *British journal of pharmacology* 2012; 165 : 1704-16.
281. Whistler JL, von Zastrow M. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95 : 9914-9.

282. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1990; 4 : 2881-9.
283. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science* 2002; 115 : 455-65.
284. Ferguson SS, Zhang J, Barak LS, Caron MG. G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration. *Biochemical Society transactions* 1996; 24 : 953-9.
285. Zhang X, Wang F, Chen X, *et al.* Beta-arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors. *Journal of neurochemistry* 2005; 95 : 169-78.
286. Groer CE, Tidgewell K, Moyer RA, *et al.* An opioid agonist that does not induce micro-opioid receptor--arrestin interactions or receptor internalization. *Molecular pharmacology* 2007; 71 : 549-57.
287. Cen B, Yu Q, Guo J, *et al.* Direct binding of beta-arrestins to two distinct intracellular domains of the delta opioid receptor. *Journal of neurochemistry* 2001; 76 : 1887-94.
288. Xiang B, Yu GH, Guo J, *et al.* Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276 : 4709-16.
289. Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, *et al.* Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2014; 512 : 218-22.
290. Law PY, Erickson LJ, El-Kouhen R, *et al.* Receptor density and recycling affect the rate of agonist-induced desensitization of mu-opioid receptor. *Molecular pharmacology* 2000; 58 : 388-98.
291. Trapaidze N, Gomes I, Bansinath M, Devi LA. Recycling and resensitization of delta opioid receptors. *DNA Cell Biol* 2000; 19 : 195-204.
292. Koch T, Widera A, Bartsch K, *et al.* Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular pharmacology* 2005; 67 : 280-7.
293. Hasbi A, Allouche S, Sichel F, *et al.* Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2000; 293 : 237-47.
294. Lecoq I, Marie N, Jauzac P, Allouche S. Different regulation of human delta-opioid receptors by SNC-80 [(+)-4-[(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-

methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide] and endogenous enkephalins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2004; 310 : 666-77.

295. Archer-Lahlou E, Audet N, Amraei MG, *et al.* Src promotes delta opioid receptor (DOR) desensitization by interfering with receptor recycling. *J Cell Mol Med* 2009; 13 : 147-63.

296. Whistler JL, Enquist J, Marley A, *et al.* Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science* 2002; 297 : 615-20.

297. Hislop JN, Henry AG, Marchese A, von Zastrow M. Ubiquitination regulates proteolytic processing of G protein-coupled receptors after their sorting to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284 : 19361-70.

298. Keith DE, Murray SR, Zaki PA, *et al.* Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271 : 19021-4.

299. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, *et al.* The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96 : 3712-7.

300. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, *et al.* Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 1996; 383 : 447-50.

301. Minnis JG, Patierno S, Kohlmeier SE, *et al.* Ligand-induced mu opioid receptor endocytosis and recycling in enteric neurons. *Neuroscience* 2003; 119 : 33-42.

302. Patierno S, Anselmi L, Jaramillo I, *et al.* Morphine induces mu opioid receptor endocytosis in guinea pig enteric neurons following prolonged receptor activation. *Gastroenterology* 2011; 140 : 618-26.

303. Arttamangkul S, Quillinan N, Low MJ, *et al.* Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices. *Molecular pharmacology* 2008; 74 : 972-9.

304. Bradbury FA, Zelnik JC, Traynor JR. G protein independent phosphorylation and internalization of the delta-opioid receptor. *Journal of neurochemistry* 2009; 109 : 1526-35.

305. Beaudry H, Proteau-Gagne A, Li S, *et al.* Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience* 2009; 161 : 381-91.

306. Marie N, Lecoq I, Jauzac P, Allouche S. Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278 : 22795-804.

307. Audet N, Paquin-Gobeil M, Landry-Paquet O, *et al.* Internalization and Src activity regulate the time course of ERK activation by delta opioid receptor ligands. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280 : 7808-16.

308. Hong MH, Xu C, Wang YJ, *et al.* Role of Src in ligand-specific regulation of delta-opioid receptor desensitization and internalization. *Journal of neurochemistry* 2009; 108 : 102-14.
309. Yu YJ, Arttamangkul S, Evans CJ, *et al.* Neurokinin 1 receptors regulate morphine-induced endocytosis and desensitization of mu-opioid receptors in CNS neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009; 29 : 222-33.
310. Walwyn W, Evans CJ, Hales TG. Beta-arrestin2 and c-Src regulate the constitutive activity and recycling of mu opioid receptors in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007; 27 : 5092-104.
311. Nomura K, Reuveny E, Narahashi T. Opioid inhibition and desensitization of calcium channel currents in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1994; 270 : 466-74.
312. Dang VC, Napier IA, Christie MJ. Two distinct mechanisms mediate acute mu-opioid receptor desensitization in native neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009; 29 : 3322-7.
313. Van Vliet BJ, De Vries TJ, Wardeh G, *et al.* mu-Opioid receptor-regulated adenylate cyclase activity in primary cultures of rat striatal neurons upon chronic morphine exposure. *Eur J Pharmacol* 1991; 208 : 105-11.
314. Ayoub MA, Maurel D, Binet V, *et al.* Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galpha1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Molecular pharmacology* 2007; 71 : 1329-40.
315. Dupre DJ, Robitaille M, Ethier N, *et al.* Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281 : 34561-73.
316. Westfield GH, Rasmussen SG, Su M, *et al.* Structural flexibility of the G alpha s alpha-helical domain in the beta2-adrenoceptor Gs complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108 : 16086-91.
317. Charfi I, Nagi K, Mnie-Filali O, *et al.* Ligand- and cell-dependent determinants of internalization and cAMP modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2014; 71 : 1529-46.
318. Alves ID, Salamon Z, Varga E, *et al.* Direct observation of G-protein binding to the human delta-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278 : 48890-7.

319. Alves ID, Ciano KA, Boguslavski V, *et al.* Selectivity, cooperativity, and reciprocity in the interactions between the delta-opioid receptor, its ligands, and G-proteins. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279 : 44673-82.
320. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, *et al.* Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological reviews* 2010; 90 : 291-366.
321. Riven I, Iwanir S, Reuveny E. GIRK channel activation involves a local rearrangement of a preformed G protein channel complex. *Neuron* 2006; 51 : 561-73.
322. Pineyro G. Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cellular signalling* 2009; 21 : 179-85.
323. Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, *et al.* Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* 1995; 15 : 1133-43.
324. Berlin S, Tsemakhovich VA, Castel R, *et al.* Two distinct aspects of coupling between Galpha(i) protein and G protein-activated K⁺ channel (GIRK) revealed by fluorescently labeled Galpha(i3) protein subunits. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286 : 33223-35.
325. Berlin S, Keren-Raifman T, Castel R, *et al.* G alpha(i) and G betagamma jointly regulate the conformations of a G betagamma effector, the neuronal G protein-activated K⁺ channel (GIRK). *The Journal of biological chemistry* 2010; 285 : 6179-85.
326. Mase Y, Yokogawa M, Osawa M, Shimada I. Structural basis for modulation of gating property of G protein-gated inwardly rectifying potassium ion channel (GIRK) by i/o-family G protein alpha subunit (Galphai/o). *The Journal of biological chemistry* 2012; 287 : 19537-49.
327. Clancy SM, Fowler CE, Finley M, *et al.* Pertussis-toxin-sensitive Galpha subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex. *Mol Cell Neurosci* 2005; 28 : 375-89.
328. Breit A, Gagnidze K, Devi LA, *et al.* 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. *Molecular pharmacology* 2006; 70 : 686-96.
329. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92 : 7297-301.
330. Audet N, Pineyro G. Using BRET to detect ligand-specific conformational changes in preformed signalling complexes. *Methods Mol Biol* 2011; 756 : 149-63.

331. Pineyro G, Azzi M, De Lean A, *et al.* Short-term inverse-agonist treatment induces reciprocal changes in delta-opioid agonist and inverse-agonist binding capacity. *Molecular pharmacology* 2001; 60 : 816-27.
332. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, *et al.* Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277 : 44925-31.
333. Berchiche YA, Gravel S, Pelletier ME, *et al.* Different effects of the different natural CC chemokine receptor 2b ligands on beta-arrestin recruitment, Galphai signaling, and receptor internalization. *Molecular pharmacology* 2011; 79 : 488-98.
334. Rubinstein M, Peleg S, Berlin S, *et al.* Divergent regulation of GIRK1 and GIRK2 subunits of the neuronal G protein gated K⁺ channel by GalphaiGDP and Gbetagamma. *The Journal of physiology* 2009; 587 : 3473-91.
335. Pineyro G, Azzi M, deLean A, *et al.* Reciprocal regulation of agonist and inverse agonist signaling efficacy upon short-term treatment of the human delta-opioid receptor with an inverse agonist. *Molecular pharmacology* 2005; 67 : 336-48.
336. Huang CL, Jan YN, Jan LY. Binding of the G protein betagamma subunit to multiple regions of G protein-gated inward-rectifying K⁺ channels. *FEBS Lett* 1997; 405 : 291-8.
337. Ivanina T, Rishal I, Varon D, *et al.* Mapping the Gbetagamma-binding sites in GIRK1 and GIRK2 subunits of the G protein-activated K⁺ channel. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278 : 29174-83.
338. He C, Zhang H, Mirshahi T, Logothetis DE. Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274 : 12517-24.
339. He C, Yan X, Zhang H, *et al.* Identification of critical residues controlling G protein-gated inwardly rectifying K(+) channel activity through interactions with the beta gamma subunits of G proteins. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277 : 6088-96.
340. Peleg S, Varon D, Ivanina T, *et al.* G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron* 2002; 33 : 87-99.
341. Yokogawa M, Osawa M, Takeuchi K, *et al.* NMR analyses of the Gbetagamma binding and conformational rearrangements of the cytoplasmic pore of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). *The Journal of biological chemistry* 2011; 286 : 2215-23.

342. Smrcka AV, Lehmann DM, Dessal AL. G protein betagamma subunits as targets for small molecule therapeutic development. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008; 11 : 382-95.
343. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 1999; 4 : 67-73.
344. Fowler CE, Aryal P, Suen KF, Slesinger PA. Evidence for association of GABA(B) receptors with Kir3 channels and regulators of G protein signalling (RGS4) proteins. *The Journal of physiology* 2007; 580 : 51-65.
345. Finley M, Arrabit C, Fowler C, *et al.* betaL-betaM loop in the C-terminal domain of G protein-activated inwardly rectifying K(+) channels is important for G(betagamma) subunit activation. *The Journal of physiology* 2004; 555 : 643-57.
346. Chung HJ, Qian X, Ehlers M, *et al.* Neuronal activity regulates phosphorylation-dependent surface delivery of G protein-activated inwardly rectifying potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106 : 629-34.
347. Lunn ML, Nassirpour R, Arrabit C, *et al.* A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. *Nature neuroscience* 2007; 10 : 1249-59.
348. Munoz MB, Slesinger PA. Sorting nexin 27 regulation of G protein-gated inwardly rectifying K(+) channels attenuates in vivo cocaine response. *Neuron* 2014; 82 : 659-69.
349. Hibino H, Inanobe A, Tanemoto M, *et al.* Anchoring proteins confer G protein sensitivity to an inward-rectifier K(+) channel through the GK domain. *The EMBO journal* 2000; 19 : 78-83.
350. Hearing M, Kotecki L, Marron Fernandez de Velasco E, *et al.* Repeated cocaine weakens GABA(B)-Girk signaling in layer 5/6 pyramidal neurons in the prelimbic cortex. *Neuron* 2013; 80 : 159-70.
351. Padgett CL, Lalive AL, Tan KR, *et al.* Methamphetamine-evoked depression of GABA(B) receptor signaling in GABA neurons of the VTA. *Neuron* 2012; 73 : 978-89.
352. Ippolito DL, Temkin PA, Rogalski SL, Chavkin C. N-terminal tyrosine residues within the potassium channel Kir3 modulate GTPase activity of Galphai. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277 : 32692-6.
353. Mora SI, Escobar LI. Phosphorylation of a tyrosine at the N-terminus regulates the surface expression of GIRK5 homomultimers. *FEBS Lett* 2005; 579 : 3019-23.

354. Terunuma M, Pangalos MN, Moss SJ. Functional modulation of GABAB receptors by protein kinases and receptor trafficking. *Advances in pharmacology* 2010; 58 : 113-22.
355. Cheng ZJ, Zhao J, Sun Y, *et al.* beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275 : 2479-85.
356. Richard-Lalonde M, Nagi K, Audet N, *et al.* Conformational dynamics of Kir3.1/Kir3.2 channel activation via delta-opioid receptors. *Molecular pharmacology* 2013; 83 : 416-28.
357. Di Felice V, Cappello F, Montalbano A, *et al.* HSP90 and eNOS partially co-localize and change cellular localization in relation to different ECM components in 2D and 3D cultures of adult rat cardiomyocytes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2007; 99 : 689-99.
358. Ong EW, Xue L, Olmstead MC, Cahill CM. Prolonged morphine treatment alters delta opioid receptor post-internalization trafficking. *British journal of pharmacology* 2014.
359. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, *et al.* Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *Journal of neurochemistry* 1999; 73 : 2348-57.
360. Guyon A, Nahon JL. Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha on neuronal activity. *Journal of molecular endocrinology* 2007; 38 : 365-76.
361. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological reviews* 1994; 46 : 205-29.
362. Raimondi A, Ferguson SM, Lou X, *et al.* Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 2011; 70 : 1100-14.
363. von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, *et al.* Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 2011; 146 : 471-84.
364. Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. *PloS one* 2010; 5 : e7764.
365. Clancy SM, Boyer SB, Slesinger PA. Coregulation of natively expressed pertussis toxin-sensitive muscarinic receptors with G-protein-activated potassium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007; 27 : 6388-99.
366. Kobrinsky E, Mirshahi T, Zhang H, *et al.* Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K⁺-current desensitization. *Nat Cell Biol* 2000; 2 : 507-14.

367. Ciruela F, Fernandez-Duenas V, Sahlholm K, *et al.* Evidence for oligomerization between GABAB receptors and GIRK channels containing the GIRK1 and GIRK3 subunits. *The European journal of neuroscience* 2010; 32 : 1265-77.
368. Nassirpour R, Bahima L, Lalive AL, *et al.* Morphine- and CaMKII-dependent enhancement of GIRK channel signaling in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2010; 30 : 13419-30.
369. Fenalti G, Giguere PM, Katritch V, *et al.* Molecular control of delta-opioid receptor signalling. *Nature* 2014; 506 : 191-6.
370. Raveh A, Cooper A, Guy-David L, Reuveny E. Nonenzymatic rapid control of GIRK channel function by a G protein-coupled receptor kinase. *Cell* 2010; 143 : 750-60.
371. Raehal KM, Schmid CL, Groer CE, Bohn LM. Functional selectivity at the mu-opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacological reviews* 2011; 63 : 1001-19.
372. Nagi K, Pineyro G. Regulation of opioid receptor signalling: implications for the development of analgesic tolerance. *Mol Brain* 2011; 4 : 25.
373. Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, *et al.* Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 2000; 408 : 720-3.
374. Raveh A, Riven I, Reuveny E. Elucidation of the gating of the GIRK channel using a spectroscopic approach. *The Journal of physiology* 2009; 587 : 5331-5.
375. Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273 : 669-72.
376. Bunemann M, Brandts B, Pott L. In vivo downregulation of M2 receptors revealed by measurement of muscarinic K⁺ current in cultured guinea-pig atrial myocytes. *The Journal of physiology* 1997; 501 (Pt 3) : 549-54.
377. Bunemann M, Bucheler MM, Philipp M, *et al.* Activation and deactivation kinetics of alpha 2A- and alpha 2C-adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel currents. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276 : 47512-7.
378. Nobles M, Benians A, Tinker A. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102 : 18706-11.
379. Janetopoulos C, Jin T, Devreotes P. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* 2001; 291 : 2408-11.

380. Yi TM, Kitano H, Simon MI. A quantitative characterization of the yeast heterotrimeric G protein cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100 : 10764-9.
381. Azpiazu I, Gautam N. A fluorescence resonance energy transfer-based sensor indicates that receptor access to a G protein is unrestricted in a living mammalian cell. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279 : 27709-18.
382. Yokogawa M, Osawa M, Takeuchi K, *et al.* NMR analyses of the Gbetagamma binding and conformational rearrangements of the cytoplasmic pore of G protein-activated inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1). *The Journal of biological chemistry* 2011; 286 : 2215-23.
383. He C, Zhang HL, Mirshahi T, Logothetis DE. Identification of a potassium channel site that interacts with G protein beta gamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274 : 12517-24.
384. He C, Yan XX, Zhang HL, *et al.* Identification of critical residues controlling G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel activity through interactions with the beta gamma subunits of G proteins. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277 : 6088-96.
385. Mahon MJ, Bonacci TM, Divieti P, Smrcka AV. A docking site for G protein betagamma subunits on the parathyroid hormone 1 receptor supports signaling through multiple pathways. *Molecular endocrinology* 2006; 20 : 136-46.
386. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, *et al.* Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS chemical biology* 2012; 7 : 1848-57.
387. Hoffmann C, Gaietta G, Bunemann M, *et al.* A FLAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods* 2005; 2 : 171-6.
388. Zhang X, Wang F, Chen X, *et al.* Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms. *Journal of neurochemistry* 2008; 106 : 781-92.
389. Qiu Y, Loh HH, Law PY. Phosphorylation of the delta-opioid receptor regulates its beta-arrestins selectivity and subsequent receptor internalization and adenylyl cyclase desensitization. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 : 22315-23.
390. Eisinger DA, Schulz R. Mechanism and consequences of delta-opioid receptor internalization. *Critical reviews in neurobiology* 2005; 17 : 1-26.
391. Boyer SB, Clancy SM, Terunuma M, *et al.* Direct interaction of GABAB receptors with M2 muscarinic receptors enhances muscarinic signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009; 29 : 15796-809.

392. Llorente J, Lowe JD, Sanderson HS, *et al.* mu-Opioid receptor desensitization: homologous or heterologous? *The European journal of neuroscience* 2012; 36 : 3636-42.
393. Blanchet C, Sollini M, Luscher C. Two distinct forms of desensitization of G-protein coupled inwardly rectifying potassium currents evoked by alkaloid and peptide mu-opioid receptor agonists. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24 : 517-23.
394. Lowe JD, Celver JP, Gurevich VV, Chavkin C. mu-Opioid receptors desensitize less rapidly than delta-opioid receptors due to less efficient activation of arrestin. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277 : 15729-35.
395. Jutkiewicz EM, Kaminsky ST, Rice KC, *et al.* Differential behavioral tolerance to the delta-opioid agonist SNC80 ([(+)-4-[(alphaR)-alpha-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]-(3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide) in Sprague-Dawley rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005; 315 : 414-22.
396. Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, *et al.* The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in pharmacological sciences* 2011; 32 : 581-90.
397. Fairbanks CA, Wilcox GL. Acute tolerance to spinally administered morphine compares mechanistically with chronically induced morphine tolerance. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997; 282 : 1408-17.
398. Galandrin S, Oligny-Longpre G, Bouvier M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends in pharmacological sciences* 2007; 28 : 423-30.
399. Ostrom RS, Insel PA. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *British journal of pharmacology* 2004; 143 : 235-45.
400. Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, *et al.* Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 1999; 286 : 2495-8.
401. Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, *et al.* Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95 : 7157-62.
402. Bobeck EN, Chen Q, Morgan MM, Ingram SL. Contribution of Adenylyl Cyclase Modulation of Pre- and Postsynaptic GABA Neurotransmission to Morphine Antinociception and Tolerance. *Neuropsychopharmacology* 2014.
403. He L, Whistler JL. The biochemical analysis of methadone modulation on morphine-induced tolerance and dependence in the rat brain. *Pharmacology* 2007; 79 : 193-202.

404. Javed RR, Dewey WL, Smith PA, Smith FL. PKC and PKA inhibitors reverse tolerance to morphine-induced hypothermia and supraspinal analgesia in mice. *Eur J Pharmacol* 2004; 492 : 149-57.
405. Jiang LI, Collins J, Davis R, *et al.* Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *The Journal of biological chemistry* 2007; 282 : 10576-84.
406. Barak LS, Salahpour A, Zhang X, *et al.* Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor. *Molecular pharmacology* 2008; 74 : 585-94.
407. Black JW, Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 1983; 220 : 141-62.
408. Kenakin T, Christopoulos A. Measurements of ligand bias and functional affinity. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12 : 483.
409. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, *et al.* A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS chemical neuroscience* 2012; 3 : 193-203.
410. Kenakin TP. Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *British journal of pharmacology* 2012; 165 : 1659-69.
411. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12 : 205-16.
412. Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 1999; 399 : 697-700.
413. Waldhoer M, Fong J, Jones RM, *et al.* A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102 : 9050-5.

7. Annexes

7.1 Annexe 1

Regulation of Opioid Receptor Signalling: Implications for the Development of Analgesic Tolerance

Karim Nagi and Graciela Piñeyro

Molecular Brain, 4(1):25, (2011).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21663702>

Abstract

Opiate drugs are the most effective analgesics available but their clinical use is restricted by severe side effects. Some of these undesired actions appear after repeated administration and are related to adaptive changes directed at counteracting the consequences of sustained opioid receptor activation. Here we will discuss adaptations that contribute to the development of tolerance. The focus of the first part of the review is set on molecular mechanisms involved in the regulation of opioid receptor signalling in heterologous expression systems and neurons. In the second part we assess how adaptations that take place in vivo may contribute to analgesic tolerance developed during repeated opioid administration.

7.2 Annexe 2

Kir3 Channel Signaling Complexes: Focus on Opioid Receptor Signaling

Karim Nagi and Graciela Pineyro

Frontiers in Cellular Neuroscience, **8**(8):186, (2014).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071446>

Abstract

Opioids are among the most effective drugs to treat severe pain. They produce their analgesic actions by specifically activating opioid receptors located along the pain perception pathway where they inhibit the flow of nociceptive information. This inhibition is partly accomplished by activation of hyperpolarizing G protein-coupled inwardly-rectifying potassium (GIRK or Kir3) channels. Kir3 channels control cellular excitability in the central nervous system and in the heart and, because of their ubiquitous distribution, they mediate the effects of a large range of hormones and neurotransmitters which, upon activation of corresponding G protein-coupled receptors (GPCRs) lead to channel opening. Here we analyze GPCR signaling via these effectors in reference to precoupling and collision models. Existing knowledge on signaling bias is discussed in relation to these models as a means of developing strategies to produce novel opioid analgesics with an improved side effects profile.

7.3 Annexe 3

Ligand- and Cell-dependent Determinants of Internalization and cAMP Modulation by Delta Opioid Receptor (DOR) Agonists

Iness Charfi, **Karim Nagi**, Ouissame Mnie-Filali, Dominic Thibault, Louis-Eric Trudeau and Graciela Pineyro

Cellular and Molecular Life Sciences, **71**(8):1529-46, (2014).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022593>

Abstract

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

7.4 Annexe 4

Procédure d'analyse des courbes dose-réponse en utilisant le modèle opérationnel

Comme expliqué dans partie discussion - section 3, des courbes doses-réponses de chaque biosenseur et pour chaque ligand ont été réalisées en utilisant la technique de BRET. Les courbes sont ainsi générées par le logiciel GraphPad 6 en ajustant les valeurs BRET avec le modèle opérationnel tel qu'utilisé par Kenakin & Christopoulos [408, 409]. Une fois les courbes ajustées, le logiciel nous permettra ainsi de calculer les paramètres τ et KA de chaque courbe. On procèdera ensuite à identifier le coefficient de transduction ($\log(\tau / KA)$), qui décrit l'efficacité d'un ligand à évoquer un effet particulier. Ce coefficient peut finalement être utilisé pour comparer les différents ligands opioïdes. Cependant, il faudrait noter que cette dernière comparaison ne pourrait se réaliser qu'à l'intérieur d'une voie signalétique spécifique (un seul biosenseur). Cela est dû à la présence de différentes variables (ex: la quantité d'ADN à transférer, la présence de partenaires BRET spécifiques pour chaque voie, etc.) qu'on devrait prendre en considération en comparant différentes voies signalétiques [407]. Pour ce faire, une normalisation pour la valeur de notre coefficient de transduction serait nécessaire. Cette normalisation consiste à soustraire la valeur du coefficient de transduction d'une drogue standard de celle d'une drogue à tester en utilisant la formule suivante:

$$\Delta \log(\tau / KA) = (\log(\tau / KA)_{\text{TEST}}) - (\log(\tau / KA)_{\text{STANDARD}}).$$

$\Delta \log(\tau / KA)$ serait ainsi utilisé pour comparer l'efficacité de signalisation des différents ligands de notre étude et dans différentes voies de signalisation.