

Université de Sherbrooke

**CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX ANALOGUES  
ENKÉPHALINÉRGÉIQUES**

Par

**Véronique Bournival**

Département de physiologie et biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de  
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc) en physiologie

30 avril 2010

Évaluateurs : Prs Louis Gendron et Marcel-Daniel Payet, directeurs de recherche

Pr Éric Rousseau, département de physiologie et biophysique

Pr Éric Marsault, département de pharmacologie



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-65620-4  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-65620-4

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

# CARACTÉRISATION DE NOUVEAUX ANALOGUES ENKÉPHALINÉRIQUES

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc) en physiologie

Par Véronique Bournival, Université de Sherbrooke, avril 2010

---

## RÉSUMÉ

Au Canada, on estime que près du tiers de la population souffrira de douleur chronique au cours de sa vie. Présentement, les agonistes des récepteurs opioïdériques mu, telle la morphine, sont parmi les médicaments les plus efficaces et les plus utilisés pour le traitement de la douleur d'intensité modérée à sévère. Cependant, l'effet analgésique de ces composés s'accompagne souvent d'effets secondaires importants (nausée, constipation, tolérance). Il est maintenant reconnu que l'activation des récepteurs opioïdériques delta (DOPR) s'accompagne d'effets analgésiques importants. Des résultats récents de notre laboratoire indiquent en plus que l'activation de DOPR n'entraîne pas de tolérance analgésique. Puisque les enképhalines, ligands peptidiques endogènes, possèdent une bonne sélectivité envers DOPR (versus les autres récepteurs opioïdériques), notre laboratoire, en collaboration avec celui du Pr Dory du département de chimie de l'Université de Sherbrooke, s'intéresse à la conception et à la synthèse de peptidomimétiques, analogues des enképhalines, afin d'en améliorer les propriétés pharmacologiques. Nous avons donc procédé au remplacement systématique de chacun des liens amides (CO-NH) de la leu-enképhaline (LE) par un alcène (double lien C=C), ce dernier étant plus lipophile et plus difficilement dégradé par les peptidases que ne l'est le lien amide. Cependant, contrairement aux liens amides, les groupements alcènes ne permettent pas la formation de liaisons faibles non covalentes de type pont hydrogène qui pourraient être essentielles à la liaison de la LE sur DOPR (liaisons intermoléculaires), ou encore, à l'adoption de la conformation biologiquement active de la LE (liaisons intramoléculaires). Le but de mon projet de maîtrise était de procéder à la caractérisation *in vitro* de ces nouveaux analogues enképhalinérgiques et ainsi, de définir l'importance de chacun des liens amides de la LE pour sa liaison à DOPR et sa capacité d'activation du récepteur. Les mesures de leur affinité pour DOPR, ainsi que de leur capacité d'activation du récepteur au moyen de différents essais *in vitro* indiquent que les 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> liens amides semblent importants pour conserver la liaison et l'activité de la LE sur DOPR. En effet, seul l'analogue substitué au niveau du 1<sup>er</sup> lien amide présente une affinité et des activités similaires à celles de la LE. De plus, un essai *in vivo* dans un modèle animal de douleur inflammatoire avec ce ligand a confirmé son potentiel antihyperalgésique. En plus de nous informer sur la conformation biologiquement active des enképhalines, les données que nous avons recueillies jusqu'à présent pourraient mener au développement d'un ligand assez lipophile pour passer la barrière hématoencéphalique et suffisamment stable pour permettre un profil pharmacocinétique adéquat pour une utilisation clinique.

**Mots clés :** douleur, récepteur opioïdérique delta, enképhaline, peptidomimétiques, pharmacologie des récepteurs

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLES DES MATIÈRES .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....</b>	<b>X</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La douleur.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Définition .....	1
1.1.2 Perception de la douleur.....	1
1.1.3 Modulation de la douleur .....	8
1.1.4 La douleur chronique .....	9
<b>1.2 Les opiacés .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Les opiacés endogènes et les récepteurs opioïdergiques.....	11
1.2.2 La morphine et ses dérivés.....	12
1.2.3 Les alternatives.....	14
<b>1.3 Le récepteur opioïdergique delta.....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Mise en évidence.....	17
1.3.2 Fonctionnalité.....	19

<b>1.4 Les ligands de DOPR.....</b>	<b>26</b>
1.4.1 Les ligands peptidiques .....	26
1.4.2 Les ligands non peptidiques .....	30
<b>1.5 Conception et synthèse de nouveaux analogues enképhalinerigiques.....</b>	<b>33</b>
<b>2 BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....</b>	<b>39</b>
<b>3 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Matériel.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Culture cellulaire.....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Lignée cellulaire GH3/DOPR .....	41
3.2.2 Lignée cellulaire DRGF11/DOPR-GFP .....	42
<b>3.3 Mesure de l'affinité pour DOPR.....</b>	<b>43</b>
3.3.1 Extraction membranaire .....	43
3.3.2 Essai de liaison par compétition.....	43
3.3.3 Détermination du $K_i$ .....	44
<b>3.4 Mesure de l'induction de l'internalisation de DOPR-GFP .....</b>	<b>45</b>
<b>3.5 Mesure de l'activation de la voie des MAP kinases ERK1/2.....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Stimulation des cellules et extraction des protéines cytosoliques.....	46
3.5.2 Électrophorèse et immunobuvardage de type Western .....	47
3.5.3 Analyse densitométrique .....	48

<b>3.6 Mesure de l'effet sur un courant potassique .....</b>	<b>49</b>
3.6.1 Enregistrement voltage clamp en configuration cellule entière.....	49
<b>3.7 Mesure de l'inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc.....</b>	<b>51</b>
3.7.1 Incubation, stimulation et lyse des cellules.....	51
3.7.2 Séparation de l'ATP et de l'AMPc .....	51
3.7.3 Détermination de l'IC <sub>50</sub> .....	52
<b>3.8 Mesure de l'effet antihyperalgésique .....</b>	<b>53</b>
3.8.1 Déroulement de l'expérimentation comportementale.....	53
3.8.2 Analyses statistiques .....	54
<b>4 RÉSULTATS .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Affinité pour DOPR.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2 Induction de l'internalisation de DOPR-GFP .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3 Activation de la voie des MAP kinases ERK1/2.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 Effet sur un courant potassique.....</b>	<b>72</b>
<b>4.5 Inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc.....</b>	<b>76</b>
<b>4.6 Effet antihyperalgésique.....</b>	<b>78</b>
<b>5 DISCUSSION.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1 Affinités pour DOPR et hypothèses émises.....</b>	<b>82</b>
<b>5.2 Évaluations de l'activité <i>in vitro</i>.....</b>	<b>88</b>

5.2.1 Internalisation de DOPR-GFP.....	88
5.2.2 Activation de la voie des MAP kinases ERK1/2 .....	90
5.2.3 Effets sur un courant potassique .....	92
5.2.4 Inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc.....	94
<b>5.3 Évaluations de l'activité <i>in vivo</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>5.4 Discussion générale et conclusion .....</b>	<b>96</b>
<b>6 REMERCIEMENTS.....</b>	<b>99</b>
<b>7 RÉFÉRENCES .....</b>	<b>102</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Figure 1</b> Schéma de la perception de la douleur .....	2
<b>Tableau 1</b> Les 3 principaux types de fibres nerveuses .....	3
<b>Figure 2</b> Principales voies de transmission du signal nociceptif .....	6
<b>Tableau 2</b> Affinités relatives des opiacés endogènes envers chacun des types de récepteurs opioïdurgiques .....	12
<b>Figure 3</b> Séquence des acides aminés composant le récepteur opioïdurgique delta .....	18
<b>Figure 4</b> Activation d'une protéine G par la liaison d'un agoniste sur le récepteur .....	20
<b>Figure 5</b> Principales voies de signalisation de DOPR .....	21
<b>Figure 6</b> Structure moléculaire de la leu-enképhaline .....	27
<b>Figure 7</b> Structure moléculaire des analogues enképhalinergiques DADLE et DPDPE, ligands sélectifs de DOPR .....	28
<b>Figure 8</b> Ligands non peptidiques sélectifs pour DOPR dont la structure s'apparente à celle de la morphine .....	31
<b>Figure 9</b> Structure générale des ligands sélectifs pour DOPR de type pipérazine .....	32
<b>Figure 10</b> Remplacement systématique de chacun des liens amides de la LE par un alcène .....	35
<b>Figure 11</b> Structure cristalline de la LE montrant la possibilité de la conformation en tournant $\beta$ .....	37
<b>Figure 12</b> Schéma représentant le protocole de stimulation utilisé dans la technique de voltage clamp .....	50



<b>Figure 13</b> Mesure de l'affinité des analogues pour DOPR.....	56
<b>Tableau 3</b> Valeurs de $K_i$ des ligands testés en essais de liaison.....	57
<b>Figure 14</b> Mesure de la capacité des analogues, à une concentration de 100 nM, d'induire l'internalisation de DOPR-GFP.....	59
<b>Figure 15</b> Mesure de la capacité de certains analogues, à une concentration de 10 $\mu$ M, d'induire l'internalisation de DOPR-GFP.....	61
<b>Figure 16</b> Analyse du niveau de phosphorylation des protéines kinases ERK1/2.....	64
<b>Figure 17</b> Mesure de l'augmentation du taux de phosphorylation des ERK1/2 en fonction de la concentration des analogues.....	66
<b>Figure 18</b> Mesure de l'augmentation du taux de phosphorylation des ERK1/2 en fonction de la durée du traitement avec 100 nM des analogues.....	67
<b>Figure 19</b> Mesure de l'augmentation du taux de phosphorylation des ERK1/2 en fonction de la durée du traitement avec 10 $\mu$ M de certains analogues.....	69
<b>Figure 20</b> Effet de l'antagoniste de DOPR, le NTI, sur la phosphorylation des ERK1/2 par l'analogue Tyr//GlyLE et la dlt II.....	70
<b>Figure 21</b> Effet d'un prétraitement avec certains analogues à 10 $\mu$ M sur la phosphorylation des ERK1/2 par la dlt II (100 nM).....	71
<b>Figure 22</b> Modulation d'un courant potassique sortant global activé par dépolarisation (-80 mV à +60 mV) par l'application de dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE.....	74

<b>Tableau 4</b> Ensemble des effets de la dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE sur un courant potassique sortant global .....	75
<b>Figure 23</b> Mesure de l'inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc de la dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE .....	77
<b>Figure 24</b> Mesure de l'effet antihyperalgésique de la dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE. Graphique montrant le temps de retrait de la patte ipsilatérale en fonction du temps suivant l'injection intrathécale.....	79
<b>Figure 25</b> Schéma des hypothèses concernant les ponts hydrogènes intra- et intermoléculaire, découlant des valeurs de Ki obtenues avec les analogues .....	83
<b>Figure 26</b> Analyse du niveau de phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 dans des cellules GH3/DOPR, suivant une stimulation avec 100 nM de dlt II.....	93

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

DRG	« Dorsal root ganglion », ganglion rachidien
DOPR	« Delta opioid peptide receptor », récepteur opioïdérique delta
MOPR	« Mu opioid peptide receptor », récepteur opioïdérique mu
KOPR	« Kappa opioid peptide receptor », récepteur opioïdérique kappa
GPCR	« G protein-coupled receptor », récepteur couplé aux protéines G
PTX	« Pertussis toxin », toxine de pertussis
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphate
K <sub>IR</sub>	Courant potassique rectifiant entrant
I <sub>K</sub>	Courant potassique sortant
I <sub>h</sub>	« Hyperpolarization-activated current », courant cationique entrant activé par hyperpolarisation
MAP	« Mitogen activated protein »
ERK	« Extracellular related kinase »
PKC	Protéine kinase C
GRK	« GPCR related kinase », kinase spécifique aux GPCRs
LE	Leu-enképhaline
Dlt II	Deltorphine II
K <sub>i</sub>	Constante d'inhibition
NTI	Naltrindole

# 1 INTRODUCTION

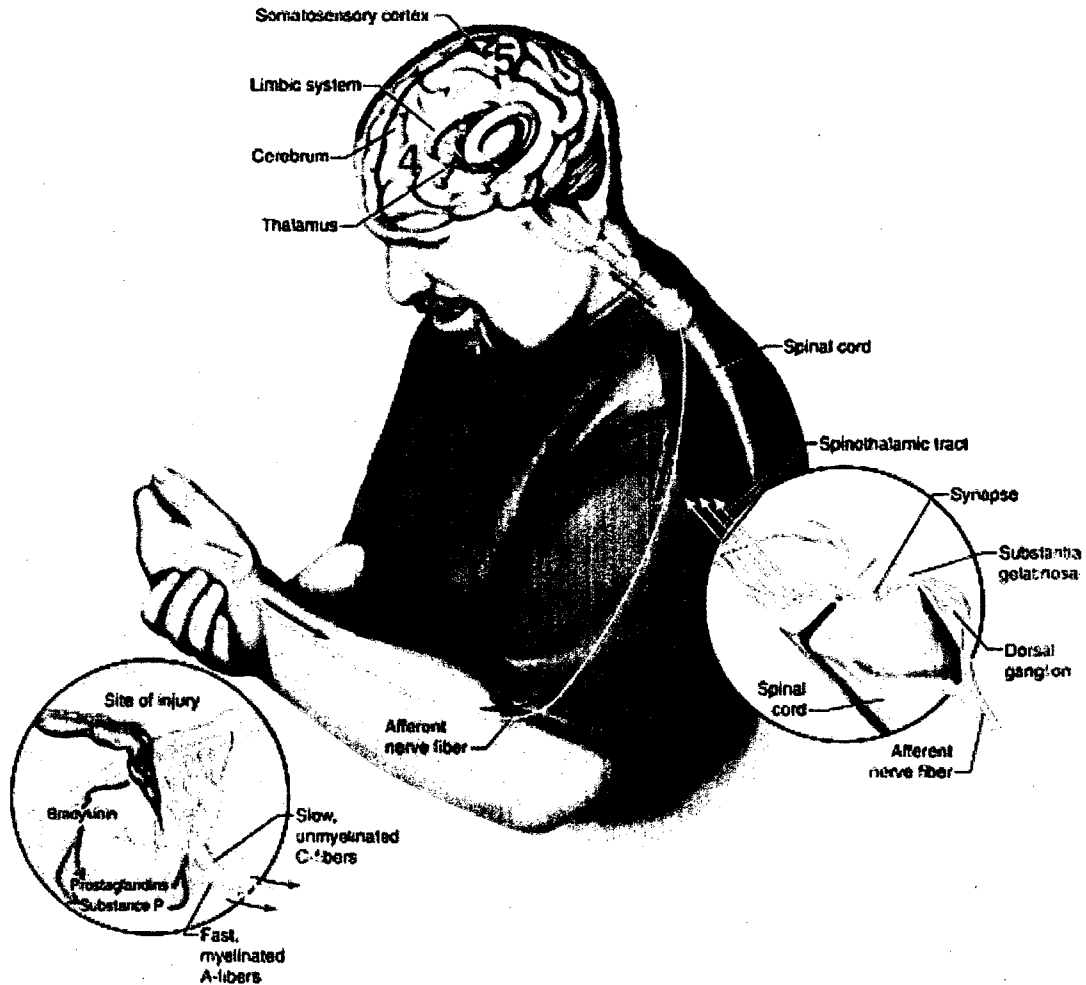
## 1.1 La douleur

### 1.1.1 Définition

Selon l'Association internationale pour l'étude de la douleur, la douleur se définit comme étant une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en termes d'une telle lésion. Bien que désagréable, il est important de garder en tête que la douleur est en fait un mécanisme de survie essentiel à l'organisme. Effectivement, la douleur sert de signal d'alerte visant à nous protéger, comme dans le cas du réflexe de retrait produit lorsque l'on se pique le doigt avec une aiguille. La douleur favorise aussi le processus de guérison suivant une lésion tissulaire, par exemple, en nous rappelant d'éviter de marcher sur une cheville cassée. Ainsi, la douleur représente généralement une réponse physiologique tout à fait normale.

### 1.1.2 Perception de la douleur

Un peu comme pour nos 5 sens, c'est un système de perception bien distinct qui nous permet de ressentir la douleur. La figure 1 illustre le processus de perception de la douleur.



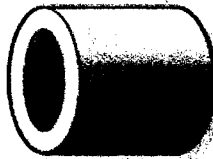


**Figure 1. Schéma de la perception de la douleur.** Un stimulus douloureux est d'abord détecté en périphérie. Il est ensuite transformé en un influx nerveux qui est transmis jusqu'au système nerveux central. C'est au cerveau que se fait l'intégration de l'information douloureuse.

Source : <http://relievetpain.wordpress.com/2009/08/09/pathways-4-pain/>.

Tout processus de perception de la douleur débute par la présence d'un stimulus douloureux au niveau de la périphérie, c'est-à-dire au niveau de la peau, des muscles ou des viscères, par exemple. Ce stimulus peut être de différentes natures, soit

thermique (brûlure), mécanique (coupure) ou chimique (facteurs inflammatoires présents au site d'une lésion) (JULIUS et BASBAUM, 2001).

La **première étape**, celle qui permet la perception du stimulus, implique l'activation des fibres nerveuses dont les terminaisons libres se trouvent en périphérie. Il existe 3 principaux types de fibres nerveuses qui se distinguent par des caractéristiques qui influencent leur vitesse de conduction. Le tableau 1 présente les 3 types de fibres et leurs caractéristiques.

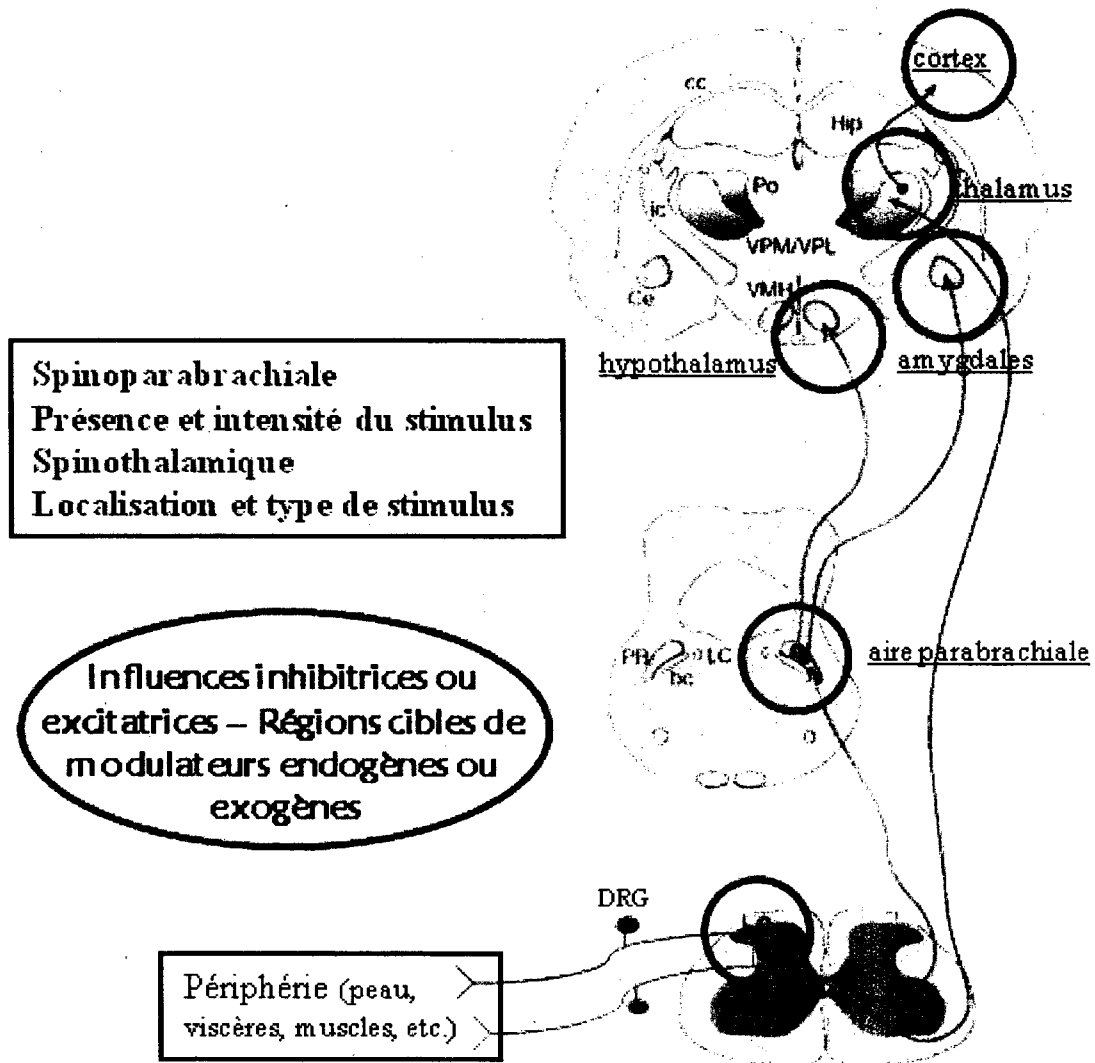
Type de fibre	Diamètre	Présence d'une gaine de myéline	Vitesse de conduction
 Fibre A $\beta$	6 à 12 $\mu\text{m}$	Oui	35 à 75 m/s
 Fibre A $\delta$	1 à 5 $\mu\text{m}$	Oui	5 à 30 m/s
 Fibre C	0,2 à 1,5 $\mu\text{m}$	Non	0,5 à 2 m/s

**Tableau 1. Les 3 principaux types de fibres nerveuses.** Parce qu'elles sont isolées d'une gaine de myéline et qu'elles ont le plus grand diamètre, les fibres A $\beta$  sont celles qui conduisent l'influx nerveux le plus rapidement (habituellement non nociceptives), suivies des fibres nociceptives A $\delta$ , qui contiennent aussi une gaine de myéline, mais ont un plus petit diamètre. Enfin, les fibres C, encore plus petites, sont non myélinisées et sont donc celles qui conduisent le plus lentement l'influx. Source : (MARCHAND, 2009).

D'abord, les fibres A $\beta$  sont celles possédant le plus grand diamètre et sont entourées d'une gaine de myéline, des caractéristiques qui favorisent une conduction électrique très rapide. La gaine de myéline, produite par les cellules gliales, est formée de plusieurs enroulements de membrane et constitue une couche isolante autour des fibres. Cette gaine n'est cependant pas continue sur toute la longueur de la fibre et les interruptions d'isolation, appelées nœuds de Ranvier, permettent une conduction plus rapide du courant, les potentiels d'action se propageant d'un nœud de Ranvier à l'autre. On parle alors d'une conduction de type saltatoire. Les fibres A $\delta$  ont un plus petit diamètre que les A $\beta$ . Bien qu'elles possèdent aussi une gaine de myéline, elles permettent une conduction légèrement plus lente. Enfin, les fibres C sont les fibres ayant le plus petit calibre. Elles ne possèdent pas de gaine de myéline et conduisent donc l'influx nerveux plus lentement. Il est maintenant reconnu que ce sont généralement les fibres A $\delta$  et C qui conduisent l'information nociceptive, tandis que les fibres A $\beta$  conduisent plutôt l'information provenant des stimuli mécaniques non douloureux (ex. le toucher). Les terminaisons des fibres A $\delta$  et C contiennent des récepteurs préférentiellement sensibles aux stimulations douloureuses, appelés nocicepteurs (LOESER et TREEDE, 2008). En plus de les détecter, les nocicepteurs transforment les stimuli perçus en activité chimio-électrique, phénomène appelé transduction. La nociception est le terme le plus souvent employé pour nommer l'activité des nocicepteurs. De la même façon, un signal nociceptif constitue un influx nerveux déclenché par une stimulation douloureuse.

La **deuxième étape** de la perception de la douleur passe par la conduction de cette activité chimio-électrique par les neurones. D'abord, les neurones de la périphérie, dont les corps cellulaires sont rassemblés au niveau des ganglions de la racine dorsale (DRG), conduisent le signal chimio-électrique de la périphérie au système nerveux central. En effet, c'est au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière qu'il y a un premier contact synaptique entre ces neurones et une deuxième série de neurones. Ces derniers croisent ensuite au niveau de l'épendyme, au centre de la moelle épinière, pour sortir au niveau ventrolatéral et conduire le signal jusqu'à différentes régions du cerveau, où il y aura un ou d'autres contacts synaptiques. En fait, il est maintenant connu que le message douloureux est transmis par deux principales voies présentées à la figure 2: les voies spinoparabrachiale (en rouge) et spinothalamique (en bleu) (HUNT et MANTYH, 2001).





**Figure 2. Principales voies de transmission du signal nociceptif.** L'influx nerveux déclenché par un stimulus douloureux en périphérie est d'abord conduit dans la corne dorsale de la moelle épinière d'où la conduction vers le cerveau se fait selon 2 principales voies. L'intégration du signal nociceptif se fait au cerveau aux endroits des synapses et c'est aussi à ces endroits qu'il y a modulation de l'information douloureuse. Figure adaptée de (HUNT et MANTYH, 2001).

Les neurones qui suivent la voie spinoparabrachiale sortent de la moelle épinière et font d'abord synapse au tronc cérébral, au niveau de l'aire parabrachiale avec des

neurones qui transmettront ensuite le signal jusqu'à l'hypothalamus et l'amygdale. Quant aux neurones qui suivent la voie spinothalamique, ils font directement le lien entre la moelle épinière et le thalamus avec des neurones qui iront ensuite faire synapse au niveau du cortex.

La **troisième étape** dans le processus de perception de la douleur consiste en l'intégration du signal. D'une part, chacun des neurones participant à la conduction de l'information nociceptive peut être considéré comme un centre intégrateur en soi, car possédant toute la capacité de recevoir en un moment donné des milliers d'informations synaptiques, ils doivent en faire l'intégration, l'analyse, menant ou non à la génération d'un potentiel d'action. D'autre part, on parle aussi d'intégration lorsqu'il est question de l'interprétation que font les groupes de neurones suite à la réception du stimulus provenant de la périphérie et maintenant traité par différentes régions du système nerveux central.

Enfin, la **quatrième et dernière étape** de la perception de la douleur constitue la réponse commandée par cette analyse, réponse comportant souvent plusieurs composantes. Par exemple, l'intégration par différentes structures du cerveau, selon la voie de conduction employée, résulte entre autres en notre capacité de définir le stimulus douloureux ressenti (nature, intensité, emplacement). La voie spinoparabrachiale est responsable de nous donner les informations concernant la présence et l'intensité du stimulus douloureux. Par l'intégration au niveau de l'hypothalamus et de l'amygdale, deux structures du système limbique, cette voie

participe aussi à la composante émotive de l'expérience douloureuse (BERNARD *et al.*, 1996). De son côté, la voie spinothalamique est plutôt responsable de nous informer sur la localisation et la nature du stimulus perçu. Enfin, plusieurs autres réponses commandées par le cerveau ont lieu suivant la perception d'un stimulus douloureux, par exemple, une réponse du système nerveux autonome sympathique qui peut se traduire par une augmentation du rythme cardiaque.

### 1.1.3 Modulation de la douleur

Comme pour toute stimulation, le transfert de l'information nociceptive entre les neurones se fait au moyen de contacts synaptiques et donc, au moyen de libération et réception de neurotransmetteurs. Or, c'est aussi au niveau de ces synapses que se fait la modulation de l'information douloureuse, et ce, par la libération de modulateurs chimiques. Les cercles verts de la figure 2 mettent en évidence ces zones de modulation. Ainsi, à ces endroits, une multitude de neurotransmetteurs et neuromodulateurs sont maintenant identifiés comme participant à des mécanismes endogènes excitateurs ou inhibiteurs du signal nociceptif (MILLAN, 2002). Ceux-ci sont emmagasinés à l'intérieur de neurones avoisinant ou faisant partie du système de conduction de la perception de la douleur. Une fois relâchés dans la fente synaptique, ces substances chimiques lient leurs récepteurs respectifs au niveau pré- ou post-synaptique afin de produire leurs effets modulateurs sur le signal nociceptif. Par exemple, les endorphines, les enképhalines et les dynorphines sont des opiacés endogènes qui se lient sur les récepteurs opioïdiques ( $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$ ) pour

atténuer le signal nociceptif (modulation négative) (BODNAR, 2007; TRESCOT *et al.*, 2008).

#### 1.1.4 La douleur chronique

Dans certains cas, une douleur d'abord utile persiste, même s'il n'y a plus de blessure, ou apparaît et persiste sans que l'on puisse en identifier l'origine. On peut alors parler de douleur mal adaptée, mais en général, puisqu'elle est persistante, on parlera de douleur chronique. Aujourd'hui, on considère la douleur chronique comme une pathologie en soi. D'un point de vue clinique, pour que l'on puisse parler de douleur chronique, celle-ci doit être persistante pendant au moins 6 mois ou au-delà de la période normale de guérison. Aussi, une douleur associée à un problème chronique ou à une maladie dégénérative ou évolutive est aussi considérée comme étant une douleur chronique. C'est le cas des douleurs reliées à l'arthrite ou au cancer, par exemple. Il existe principalement 3 différents types de douleurs chroniques, classées selon leur origine apparente. D'abord, il y a la douleur inflammatoire qui est alimentée par la présence de médiateurs de l'inflammation. Par exemple, l'arthrite est une maladie qui s'accompagne de ce type de douleur (ALMARESTANI *et al.*, 2009; SHARIF NAEINI *et al.*, 2005; WOOLF *et al.*, 2004). Ensuite, il y a la douleur neuropathique qui peut découler d'une lésion au niveau du système nerveux (central ou périphérique), ou peut être le résultat d'une dysfonction du système nerveux central, soit par une hyperactivation des voies nociceptives ou encore, par une perte d'inhibition de celles-ci. La fibromyalgie est maintenant considérée comme une

douleur neuropathique (MARTINEZ-LAVIN, 2004; WU *et al.*, 2007). Enfin, il y a la douleur cancéreuse, encore mal comprise, dont la caractérisation neurochimique a permis de constater qu'elle est bien distincte des 2 autres (HONORE *et al.*, 2000). Dans ces cas de douleurs chroniques, il y a atteinte à la physiologie normale de la perception de la douleur. Ainsi, ces personnes atteintes de douleur chronique souffrent souvent d'hypersensibilité, c'est-à-dire que leur seuil de perception de la douleur est diminué. Cette hypersensibilité peut donner lieu à de l'hyperalgésie, qui se définit comme étant une réponse exagérée à une stimulation normalement douloureuse, ainsi qu'à de l'allodynie, qui est une douleur produite par une stimulation habituellement non douloureuse (LOESER et TREEDE, 2008). À ce propos, il a d'ailleurs été proposé que dans le cas d'allodynie, ce sont les fibres A $\beta$  qui se mettent à conduire de l'information douloureuse (OSSIPOV *et al.*, 2000). En plus des conséquences sur la physiologie de la douleur, il n'est pas surprenant de constater que la douleur chronique peut entraîner une diminution de la qualité de vie, les personnes atteintes ayant souvent de la difficulté à mener à bien leurs activités quotidiennes. D'ailleurs, il est maintenant reconnu que la douleur chronique entraîne des facteurs de comorbidités telles que l'anxiété et la dépression (KATON, 1987; KEEFE *et al.*, 2004; MCCRACKEN *et al.*, 1992; PRICE, 2000; ROMANO et TURNER, 1985; VON KORFF et SIMON, 1996). En effet, parmi des personnes atteintes de douleur chronique, jusqu'à 55 % vont souffrir d'anxiété, et jusqu'à 75 % développeront de la dépression (MEYER-ROSBURG *et al.*, 2001). Ainsi, étant l'une des maladies les plus invalidantes, la douleur chronique représente un fardeau

économique important, d'une part à cause des soins médicaux nécessaires et, d'autre part, à cause de l'absentéisme au travail des gens atteints. De plus, les statistiques montrent que près du tiers de la population canadienne souffrira, au cours de sa vie, de douleur chronique (MOULIN *et al.*, 2002). Enfin, dû au vieillissement de la population, une augmentation de 70 % de l'incidence de douleur ou de malaise chronique est prévu au cours des 25 prochaines années, selon l'Association québécoise de la douleur chronique. Étant un déterminant important de la qualité de vie des patients et atteignant beaucoup de gens, il semble évident que la douleur est un problème auquel il faut accorder une attention particulière afin de pouvoir mieux la traiter et en réduire les nombreuses conséquences.

## **1.2 Les opiacés**

### **1.2.1 Les opiacés endogènes et les récepteurs opioïdiques**

Comme mentionné plus tôt, nous possédons un système de modulation de la douleur, certains neuromodulateurs pouvant augmenter le signal nociceptif et d'autres pouvant le diminuer. Parmi les neuromodulateurs inhibiteurs, nous retrouvons les endorphines, enképhalines et dynorphines, aussi appelés opiacés endogènes. Ces peptides ont pour cibles des récepteurs que l'on appelle maintenant les récepteurs opioïdiques. En fait, cela fait 36 ans que 3 groupes indépendants de chercheurs prouvaient l'existence de récepteurs opioïdiques spécifiques, et ce, grâce au fait

que des ligands stéréosélectifs radio-marqués étaient depuis peu devenus disponibles (PERT et SNYDER, 1973; SIMON *et al.*, 1973; TERENIUS, 1973). Cependant, ce n'est qu'environ 20 ans plus tard que les techniques de clonage ont permis l'identification des 3 principaux types de récepteurs opioïdiques, soit les récepteurs opioïdiques mu (MOPR) (CHEN *et al.*, 1993), delta (DOPR) (EVANS *et al.*, 1992; KIEFFER *et al.*, 1992) et kappa (KOPR) (MENG *et al.*, 1993). Comme le montre le tableau 2, les opiacés endogènes possèdent des affinités plus ou moins grandes envers les différents types de récepteurs opioïdiques.

Type de récepteur opioïdique	Affinité relative des opiacés endogènes
MOPR	Endorphines > enképhalines > dynorphines
DOPR	Enképhalines >> endorphines et dynorphines
KOPR	Dynorphines >> endorphines et enképhalines

**Tableau 2. Affinités relatives des opiacés endogènes envers chacun des types de récepteurs opioïdiques.** Les endorphines sont les opiacés ayant le plus d'affinité pour MOPR, les enképhalines ont plus d'affinité pour DOPR et les dynorphines ont plus d'affinité pour KOPR. Source : (KATZUNG, 2004).

Ainsi, les endorphines se lieront davantage à MOPR, les enképhalines à DOPR et les dynorphines à KOPR.

### 1.2.2 La morphine et ses dérivés

Depuis plusieurs milliers d'années, des substances médicinales opiacées, ligands exogènes des récepteurs opioïdiques, sont utilisées pour le traitement de la

douleur. Nous savons par d'anciens écrits papyrus que les égyptiens faisaient l'extraction d'opium à partir des graines de pavot et l'utilisaient déjà pour ses propriétés analgésiques (TRESCOT *et al.*, 2008). Encore aujourd'hui, la morphine, alcaloïde extrait de l'opium, et ses dérivés représentent les analgésiques les plus puissants et les plus utilisés pour le traitement des douleurs modérées à sévères. Ces composés agissent principalement au système nerveux central en se liant majoritairement sur MOPR. Ainsi, tout comme les opiacés endogènes, ils agissent en tant que neuromodulateurs inhibiteurs du signal nociceptif autant au niveau de la moelle épinière qu'au niveau du cerveau afin de diminuer notre perception de la douleur.

Malheureusement, en plus de leur effet analgésique, ces composés entraînent souvent plusieurs autres effets physiologiques étant donné la présence de MOPR à bien d'autres endroits que dans le système de perception de la douleur (MANSOUR *et al.*, 1995). Plusieurs revues font l'objet de ces nombreux effets secondaires entraînés par les narcotiques opiacés utilisés en clinique (BENYAMIN *et al.*, 2008; KREEK, 1996; MCQUAY, 1999; TRESCOT *et al.*, 2008). Entre autres, la présence du récepteur au niveau du tractus gastro-intestinal ainsi qu'au niveau du contrôle central (aire postrema, hypothalamus) de cette activité gastro-intestinale, donne lieu à des effets secondaires importants tels que des nausées, de la constipation et des vomissements (DE LUCA et COUPAR, 1996). De plus, d'autres effets secondaires dont la sédation (activité anticholinergique) (BYAS-SMITH *et al.*, 2005) et la dépression respiratoire (bulbe rachidien, pont) (MARTIN, 1983) sont aussi



rencontrés, et ce, via les contrôles centraux respectifs de ces fonctions. D'autre part, il n'est pas rare que l'utilisation d'opiacés à plus long terme mène au développement de tolérance, caractérisée par la nécessité d'utiliser de plus grandes doses d'un composé pharmacologique afin d'obtenir un même effet. Malheureusement, le développement de tolérance ne semble pas s'appliquer pour tous les effets des opiacés (KATZUNG, 2004), certains effets secondaires, comme la constipation, devenant alors plus importants que l'effet analgésique recherché. Enfin, l'apparition de syndrome de sevrage suivant l'arrêt subit de la prise d'opiacés confirme le développement de dépendance physique (COWAN *et al.*, 1988). L'apparition de ces effets secondaires est non négligeable et pousse plusieurs patients à cesser leur médication, au risque de devoir endurer la douleur. À eux seuls, la constipation et la sédation sont responsables de l'arrêt de la médication dans le tiers des cas (DEVULDER *et al.*, 2005). De par sa localisation, MOPR n'est peut-être pas la meilleure cible à exploiter pour le traitement de la douleur chronique. Malgré cela, la grande majorité des analgésiques opiacés présentement utilisés en clinique activent justement ce récepteur. Il y a fort à parier, donc, que certaines thérapies alternatives pourraient permettre d'améliorer le traitement de la douleur chronique tout en diminuant les effets secondaires associés à la prise de médication.

### 1.2.3 Les alternatives

Bien que non exploités en clinique, nous savons que l'activation de DOPR et KOPR s'accompagne d'effets analgésiques importants. Au niveau du système

nerveux central, une distribution différente caractérise chacun des 3 types de récepteurs opioïdiques (MANSOUR *et al.*, 1988; MANSOUR *et al.*, 1995; MCLEAN *et al.*, 1986). Des effets secondaires rencontrés avec des agonistes de MOPR peuvent donc ne pas survenir avec des agonistes DOPR ou KOPR.

Dans le but d'obtenir un traitement antidouleur entraînant moins d'effets secondaires, des agonistes KOPR, qui possèdent aussi une affinité pour MOPR ont déjà été développés et utilisés en clinique. Cependant, d'autres effets secondaires importants tels des effets psychotomimétiques (hallucinogènes) et dysphoriques ont été observés (BEAVER *et al.*, 1966), limitant leur utilisation. Il a en effet été déterminé que l'activation de KOPR, contrairement à celle de MOPR ou DOPR, entraîne une diminution de la libération de dopamine (DI CHIARA et IMPERATO, 1988; MULDER *et al.*, 1984). De plus, il a été observé que l'efficacité analgésique de ces composés était significativement plus faible chez les hommes que chez les femmes, produisant même un effet anti-analgésique dans certains cas (FILLINGIM et GEAR, 2004). Pour sa part, aucun ligand sélectif pour DOPR n'est actuellement disponible en clinique, mais certains sont actuellement en essais (LE BOURDONNEC *et al.*, 2008; LE BOURDONNEC *et al.*, 2009). Par le passé, quelques études cliniques chez de petites cohortes de patients souffrant de cancer avancé (cancer des os ou avec métastases aux os), ont démontré l'efficacité analgésique de composés peptidiques sélectifs pour DOPR (KRAMES *et al.*, 1986; MOULIN *et al.*, 1985; ONOFRIO et YAKSH, 1983). Bien que ces études ne se soient déroulées qu'à court terme, il est à noter que très peu d'effets secondaires

avaient été rapportés. De plus, il a aussi été montré que les agonistes sélectifs pour DOPR exercent des effets analgésiques importants dans des modèles animaux de douleur chronique d'autres étiologies, soit neuropathique (HOLDRIDGE et CAHILL, 2007; KABLI et CAHILL, 2007; MIKA *et al.*, 2001; MORINVILLE *et al.*, 2004; NADAL *et al.*, 2006; PETRILLO *et al.*, 2003) et inflammatoire (DESMEULES *et al.*, 1993; FRASER *et al.*, 2000a; GALLANTINE et MEERT, 2005; GENDRON *et al.*, 2007; HURLEY et HAMMOND, 2000; PETRILLO *et al.*, 2003; STEWART et HAMMOND, 1994). Par ailleurs, plusieurs études précliniques ont confirmé l'absence d'effet gastro-intestinal, habituellement rencontré avec les narcotiques communément utilisés en clinique, avec l'administration de ligands peptidiques et non peptidiques sélectifs pour DOPR (GALLANTINE et MEERT, 2005; GALLIGAN *et al.*, 1984; PETRILLO *et al.*, 2003; PORRECA *et al.*, 1984). D'autres études ont montré que l'administration de ligands sélectifs pour DOPR n'entraîne pas de dépression respiratoire (GALLANTINE et MEERT, 2005; MAY *et al.*, 1989; SZETO *et al.*, 1999) et ne comporte que des risques limités de développement de dépendance (BRANDT *et al.*, 2001; COWAN *et al.*, 1988). Aussi, tout récemment notre laboratoire a montré l'absence de développement de tolérance analgésique suite à l'administration répétée d'un agoniste DOPR dans le traitement de la douleur inflammatoire (BEAUDRY *et al.*, 2009). Cette absence de développement de tolérance avait aussi été montrée dans des modèles animaux de douleur neuropathique (MIKA *et al.*, 2001; PETRILLO *et al.*, 2003). Enfin, en plus de l'effet analgésique, de plus en plus d'études suggèrent que l'activation de DOPR aurait aussi des effets

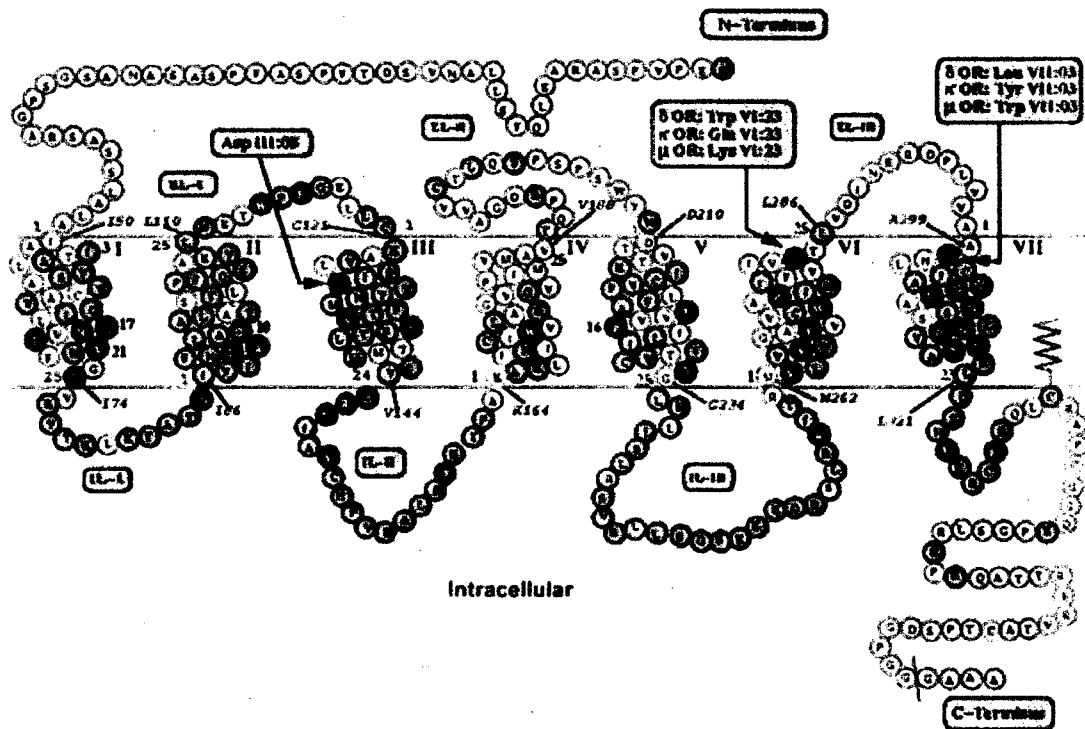
anxiolytiques et antidépresseurs (JUTKIEWICZ, 2006; PERRINE *et al.*, 2006; VERGURA *et al.*, 2008).

### **1.3 Le récepteur opioïdergique delta**

#### **1.3.1 Mise en évidence**

Même avant la venue de ligands stéréosélectifs radio-marqués, l'existence d'au moins 2 types de récepteurs opioïdergiques avait été suggérée vu les différents degrés d'efficacité des enképhalines (ligands opioïdergiques endogènes) et des opiacés alcaloïdes dans 2 essais biologiques *ex vivo* : celui de la contraction de l'iléon isolé du cobaye (GPI : Guinea Pig Ileum), ainsi que celui de la contraction du canal déférent isolé de la souris (MVD : Mouse Vas Deferens). Effectivement, il avait alors été constaté que les enképhalines pouvaient diminuer des contractions induites électriquement plus efficacement au niveau du MVD qu'au niveau du GPI, tandis que les opiacés alcaloïdes étaient plus efficaces pour diminuer les contractions du GPI que celles du MVD (WATERFIELD *et al.*, 1977). C'est d'ailleurs pour cette raison que ce nouveau type de récepteur opioïdergique avait été nommé delta, « d » pour déférent, les récepteurs jusqu'alors connus pour être activés par les opiacés alcaloïdes ayant été nommés mu, « m » pour morphine.

C'est suite au clonage de DOPR qu'il a ensuite été possible de déterminer que ce récepteur, tout comme MOPR et KOPR, fait parti des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). La séquence d'acides aminés composants DOPR est montrée à la figure 3, les résidus en gris et noir étant ceux qui sont conservés d'un type de récepteur opioïdérique à l'autre.



**Figure 3. Séquence des acides aminés composant le récepteur opioïdérique delta.** Ce récepteur fait partie de la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les résidus en gris et noir sont conservés entre les 3 types de récepteur opioïdérique. (KANE *et al.*, 2006).

Ainsi, le degré d'homologie entre chacun des types, MOPR, DOPR et KOPR est d'environ 70 % pour les segments transmembranaires et d'environ 60 % pour les

boucles intra- et extracellulaires (KNAPP *et al.*, 1995). Cette différence de séquence importante entre les 3 types de récepteurs opioïdiques permet l'existence de ligands très sélectifs pour chacun d'entre eux, d'autant plus que le segment N-terminal ainsi que les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> boucles extracellulaires partagent très peu ou pas d'homologie.

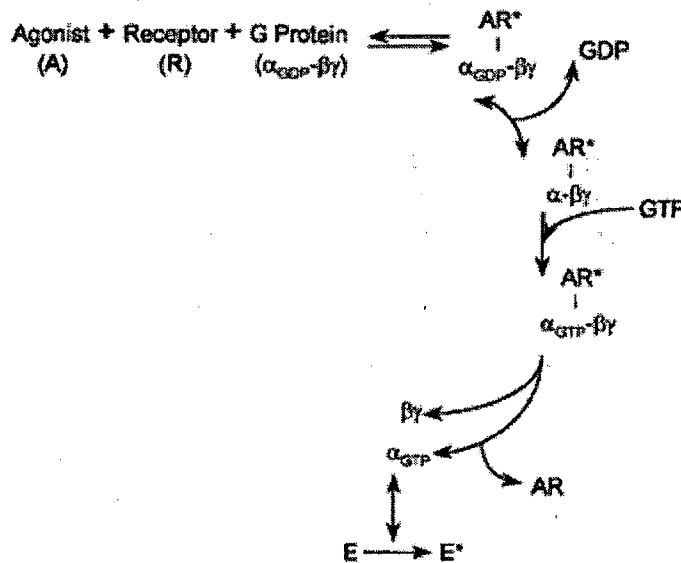
Enfin, il a aussi été possible de déterminer que DOPR, tout comme MOPR et KOPR, est un GPCR couplé à la protéine Gi. L'activation des récepteurs opioïdiques entraîne l'inhibition de l'adénylyl cyclase, un effet bloqué par la toxine de pertussis (PTX) (LAW *et al.*, 1985). Cette toxine est connue pour inactiver la sous-unité  $\alpha$ , par ADP-ribosylation, de ce type de protéine G (HSIA *et al.*, 1984). Plus spécifiquement, il a été déterminé que c'est une protéine Gi2 qui est couplée à DOPR (MCKENZIE et MILLIGAN, 1990).

### 1.3.2 Fonctionnalité

Suite au clonage de DOPR, il a aussi été possible de transférer le gène codant pour ce récepteur de façon stable dans différents modèles cellulaires et c'est alors que plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur la compréhension des effets de l'activation de DOPR au niveau cellulaire et moléculaire.

Tout d'abord, comme tous les autres GPCR, son activité est dépendante du GTP (BLUME, 1978). En effet, la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G est associée à une molécule de GDP en plus d'être attachée aux 2 autres sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Comme le

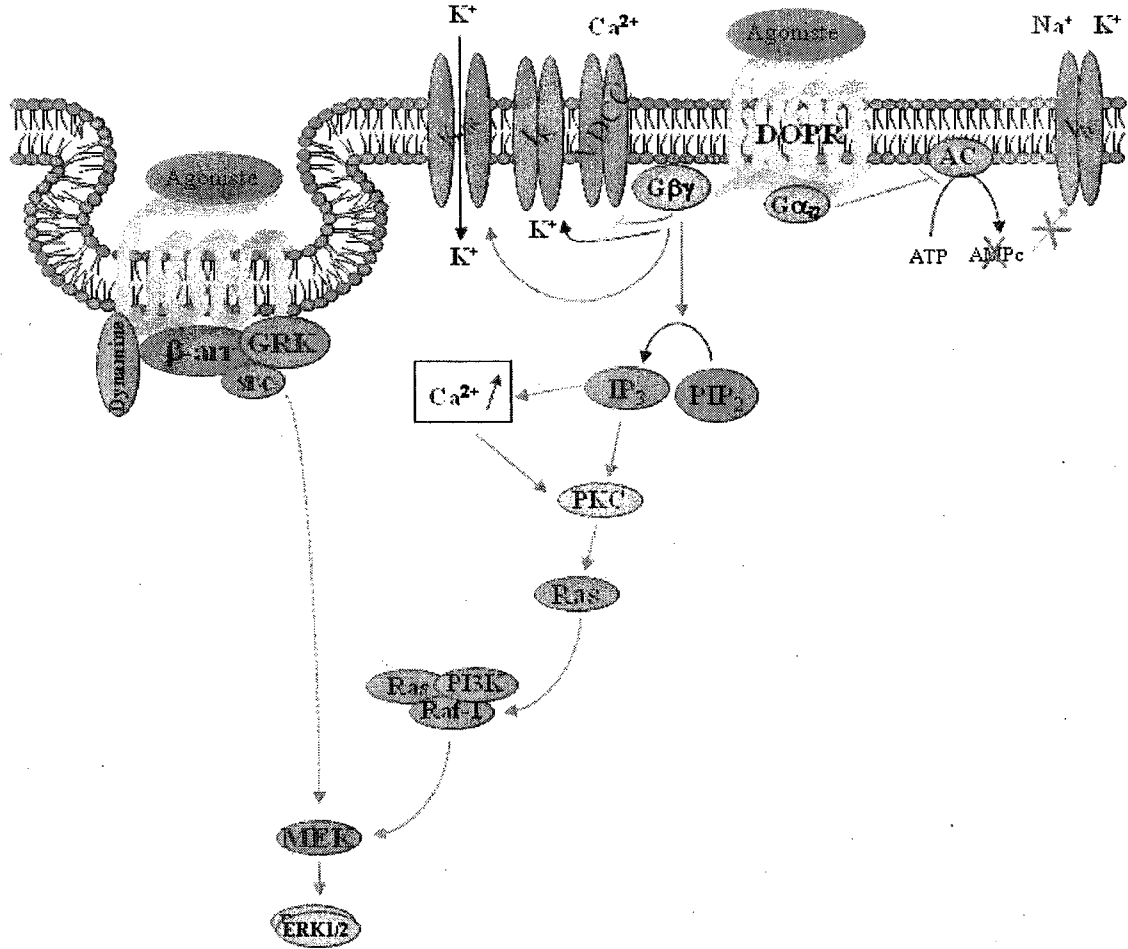
montre la figure 4, lorsque le récepteur est activé par son agoniste, la molécule de GDP est dissociée de la sous-unité  $\alpha$  à laquelle une molécule de GTP peut alors s'associer.



**Figure 4. Activation d'une protéine G par la liaison d'un agoniste sur le récepteur.** Le remplacement du GDP par un GTP induit un changement de conformation de la sous-unité  $\alpha$ , elle se dissocie alors des sous-unités  $\beta\gamma$ . Ces 2 complexes modulent ensuite l'activité de différents effecteurs de la cellule. Figure adaptée de (QUOCK *et al.*, 1999).

Cette association induit un changement de conformation de la sous-unité  $\alpha$  qui se dissocie alors des sous-unités  $\beta\gamma$ . Les 2 complexes ainsi formés,  $\alpha_{GTP}$  et  $\beta\gamma$ , participent à la modulation de l'activité de différents effecteurs (E), traduisant ainsi l'activation du récepteur en des réponses cellulaires.

La figure 5 est un schéma qui regroupe les canaux, les enzymes et les principales voies de signalisation modulés suite à l'activation de DOPR par un agoniste.



**Figure 5. Principales voies de signalisation de DOPR.** L'activation de DOPR par un agoniste mène à une diminution des niveaux d'AMP cyclique via l'inhibition de l'adénylate cyclase. L'activation du récepteur module l'activité de différents canaux ioniques. En plus de mener à son internalisation, l'activation de DOPR active entre autres les protéines kinases PKC, ERK1/2 et GRK, ainsi que des tyrosines kinase comme Src. Les effets activateurs sont représentés par les flèches vertes alors que les effets inhibiteurs par les flèches rouges. Les flèches pleines indiquent un mécanisme d'activation direct alors que les flèches pointillées impliquent un mécanisme indirect.



### *Modulation de l'adénylyl cyclase*

Premièrement, parmi les enzymes modulés par l'activation de DOPR on retrouve l'adénylyl cyclase qui est responsable de la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Effectivement, comme pour tous les récepteurs couplés à Gi, l'activation de DOPR mène à l'inhibition de l'adénylyl cyclase. L'inhibition de cet enzyme se traduit par une baisse des niveaux d'AMPc intracellulaire. En utilisant la lignée cellulaire neuronale NG108-15, l'équipe de Costa a démontré que l'application d'un agoniste sélectif pour DOPR inhibait la production d'AMPc, un effet qui pouvait être renversé par le naloxone, un antagoniste non sélectif des récepteurs opioïdiques (COSTA *et al.*, 1985). La preuve de cet effet cellulaire a aussi été faite *in vivo* par l'observation des effets antinociceptifs induits par l'administration d'un agoniste sélectif pour DOPR, qui pouvaient être renversés par l'injection d'AMPc (WANG *et al.*, 1993). Enfin, il est maintenant connu que c'est via la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G que cette inhibition de l'adénylyl cyclase se fait.

### *Modulation du courant $I_h$*

D'autres effets cellulaires de l'activation de DOPR sont conséquents à cette baisse des taux d'AMPc intracellulaire. En effet, il est reconnu que l'AMPc participe à la régulation d'un courant entrant cationique non sélectif, dépendant du voltage, le courant  $I_h$  (INGRAM et WILLIAMS, 1996). Celui-ci est activé par une hyperpolarisation membranaire et plus facilement lorsque les taux d'AMPc

intracellulaires sont élevés. L'entrée de cations qui s'ensuit crée alors une dépolarisation membranaire qui ramène le potentiel de membrane plus près du seuil nécessaire pour la production d'un potentiel d'action. Lors de l'activation de DOPR par un agoniste, l'amplitude du courant  $I_h$  est diminuée (INGRAM et WILLIAMS, 1994). Ce courant étant diminué, il est alors plus difficile pour le neurone d'atteindre le seuil requis pour le déclenchement du potentiel d'action, inhibant par le fait même la transmission neuronale.

#### *Modulation des canaux calciques*

L'activité d'autres canaux ioniques peut aussi être modulée par l'activation de DOPR, et ce, via les sous-unités  $\beta\gamma$ . Tout d'abord, c'est au moyen de divers types cellulaires qu'il a été démontré que l'activation des récepteurs opioïdiques induit l'inhibition des canaux calciques de types L, N, P et Q, conduisant tous des courants calciques entrants dépendants du voltage (ACOSTA et LOPEZ, 1999; HESCHELER *et al.*, 1987; PIROS *et al.*, 1995). Cette diminution du calcium intracellulaire mène à une diminution de la libération de neurotransmetteurs se traduisant par une diminution de la transmission nerveuse, effet biologique reconnu des opiacés. Cependant, certaines études ont montré que des ligands sélectifs pour DOPR pouvaient aussi mener à une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire, et ce, par la libération des réserves de calcium contenues dans le réticulum endoplasmique lisse, mécanisme dépendant de la présence d'inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) (JIN *et al.*, 1994).

### *Modulation des canaux potassiques*

D'autre part, les récepteurs opioïdiques sont aussi connus pour réguler les courants potassiques rectifiants entrants ( $K_{IR}$ ). Ces courants qu'on disait « anormaux » lors de leur découverte (étant entrants plutôt que sortants comme les autres courants potassiques), ont été reconnus pour jouer un rôle dans la régulation de l'activité neuronale en aidant à établir le potentiel membranaire de repos. Des études ont démontré que l'activation de DOPR par un ligand sélectif activait ces courants potassiques (NORTH *et al.*, 1987; PIROS *et al.*, 2000). L'activation de ce courant, créant une entrée d'ions  $K^+$ , produit alors une légère hyperpolarisation, ce qui a pour effet physiologique global de prévenir la propagation du potentiel d'action. D'un autre côté, il a aussi été montré que DOPR peut réguler un courant potassique sortant ( $I_K$ ) dépendant du voltage (activé par une dépolarisation membranaire). En effet, il a été montré que l'activation de DOPR a un effet biphasique sur cette conductance potassique, de faibles concentrations d'agoniste de DOPR (< 1 nM) produisant une inhibition du courant, tandis que de plus grandes concentrations pouvant l'augmenter. Des essais de blocage avec les toxines PTX (inhibe  $G_i$ ) et CTX (inhibe  $G_s$ ), ont permis aux auteurs de conclure que cet effet biphasique est dû au fait que DOPR puisse être couplé à plus d'un type de protéines G (FAN et CRAIN, 1995).

### *Modulation de la voie des MAP kinases ERK1/2*

Plusieurs GPCR sont connus pour activer les cascades MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases et ainsi participer à la modulation de différents événements tels la croissance et la différenciation cellulaire. Plus spécifiquement, la plupart des GPCR transmettent ces signaux mitogéniques via la voie des ERKs (Extracellular-signal-Regulated Kinases) et DOPR n'y fait pas exception. En effet, plusieurs études ont concerné les mécanismes de l'augmentation de la phosphorylation des ERK1 et 2, aussi nommés respectivement p44 et p42MAP kinases, par l'activation de DOPR (BURT *et al.*, 1996; FUKUDA *et al.*, 1996). L'activation de cette voie MAP kinase serait dépendante des sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine G, ainsi que de la protéine Ras (BELCHEVA *et al.*, 1998). Une étude a aussi montré que l'internalisation de DOPR serait d'abord requise pour la stimulation de la voie MAP kinase (IGNATOVA *et al.*, 1999).

### *Modulation de la protéine kinase C*

Comme il est possible de l'observer dans la figure 5, l'activation de DOPR peut mener à l'activation d'autres kinases. Effectivement, l'activation de DOPR par un de ses agonistes a été démontrée pour stimuler la PKC dans des cellules NG108-15 (LOU et PEI, 1997). Une fois activée, la PKC modulera l'activité d'autres protéines en les phosphorylant, dans notre cas, elle est partie intégrante de la cascade de signalisation menant à la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 (BURT *et*

*al.*, 1996; FUKUDA *et al.*, 1996). Enfin, la PKC contribuerait même à la désensibilisation de DOPR en participant à sa phosphorylation (CAI *et al.*, 1996).

#### *Induction de l'internalisation,*

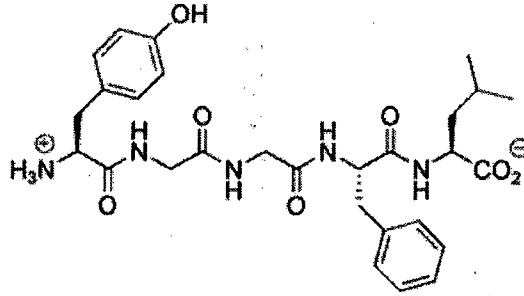
Enfin, l'activation de DOPR par un agoniste mène généralement à l'internalisation du récepteur à l'intérieur d'un endosome qui mènera à son recyclage ou à sa dégradation. Suite au changement de conformation du récepteur activé par son agoniste, il y a recrutement d'une kinase spécifique aux GPCRs (GRK) (PEI *et al.*, 1995) qui phosphoryle le récepteur. La phosphorylation d'un GPCR par une GRK mène au recrutement de protéines chaperonnes, les  $\beta$ -arrestines (KOVOR *et al.*, 1999), qui favorisent l'internalisation du complexe ligand-récepteur à l'intérieur de vésicules de clathrine par un mécanisme qui est dépendant de la dynamine (CHU *et al.*, 1997).

## **1.4 Les ligands de DOPR**

### **1.4.1 Les ligands peptidiques**

Isolées pour la première fois dans le cerveau de porc, les enképhalines ont d'abord été décrites comme neuromodulateurs possédant une activité hautement transitoire et une inactivation rapide (HUGHES *et al.*, 1975). Comme mentionné précédemment, la leu-enképhaline et la met-enképhaline ont d'abord été proposées et sont encore

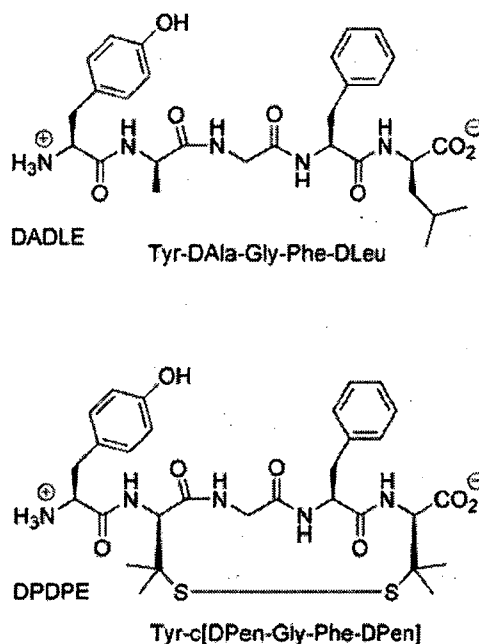
considérées comme étant les ligands endogènes de DOPR. La figure 6 présente la structure moléculaire de la leu-enképhaline dont la séquence en acides aminés est Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. Il est à noter que dans le cas de la met-enképhaline le dernier résidu (i.e. Leu) est remplacé par une méthionine (Met).



**Figure 6. Structure moléculaire de la leu-enképhaline.** La leu-enképhaline est un ligand endogène de DOPR, ce pentapeptide est formé de la séquence d'acides aminés Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. La met-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) est un autre pentapeptide, ligand endogène de DOPR.

Les enképhalines sont des pentapeptides rapidement dégradés par différentes peptidases endogènes. Un temps de demi-vie *in vivo* d'environ 2 minutes explique l'activité transitoire de ces peptides. L'aminopeptidase M (EC 3.4.11.2) (HAMBROOK *et al.*, 1976), qui dégrade les acides aminés d'un peptide à partir de l'extrémité amino-terminale, et l'enképhalinase (EC 3.4.24.11) (CHILDERS *et al.*, 1979; MALFROY *et al.*, 1978), endopeptidase connue pour cliver préférentiellement les liens peptidiques se trouvant entre des résidus hydrophobiques, sont les principaux enzymes responsables de l'inactivation des enképhalines.

Pour diminuer la sensibilité vis-à-vis des peptidases endogènes, des analogues peptidiques des enképhalines ont été conçus et synthétisés au cours des dernières années. Les 2 peptides les mieux connus et les plus étudiés sont présentés à la figure 7. La présence d'acides aminés en conformation D, d'acides aminés non naturels, ainsi que de cyclisation (contraintes structurelles) constituent des modifications qui contribuent à une meilleure stabilité de la molécule face à la dégradation par les peptidases.



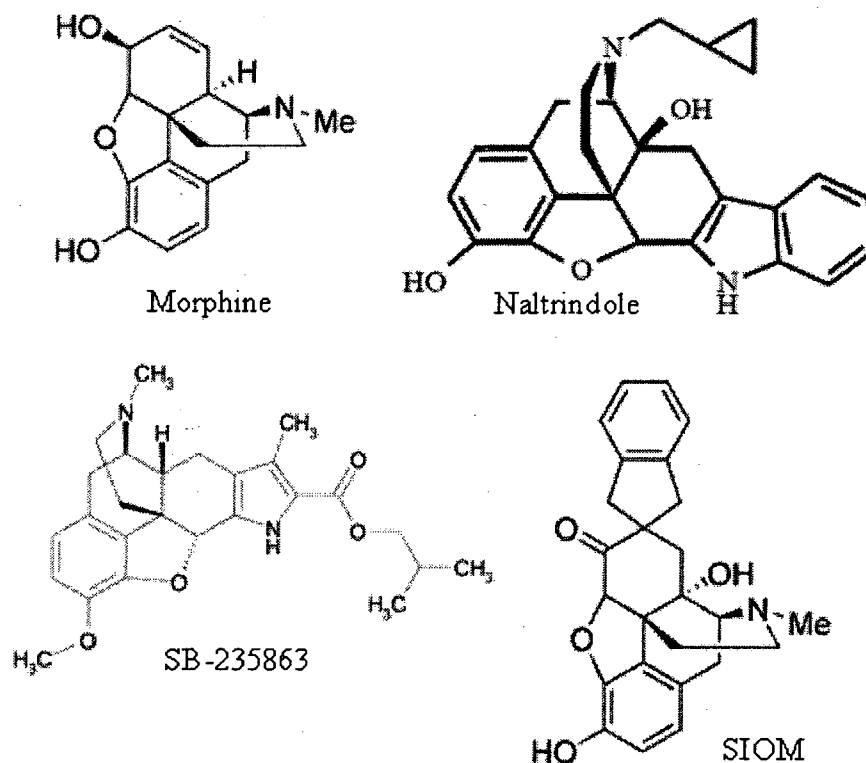
**Figure 7. Structure moléculaire des analogues enképhalinergiques DADLE et DPDPE, ligands sélectifs de DOPR.** La présence d'acides aminés en conformation D, d'acides aminés non naturels, ainsi que de cyclisation augmentent la stabilité des ligands face à la dégradation par les peptidases.

Ainsi, ces 2 peptides présentent une meilleure stabilité que les enképhalines naturelles en plus de posséder de meilleurs niveaux de sélectivité envers DOPR (MOSBERG *et al.*, 1983). En effet, les enképhalines naturelles possèdent des affinités de 2 à 5 fois meilleures pour DOPR versus MOPR alors que le DADLE et le DPDPE possèdent des affinités respectives de 9 (GILLAN *et al.*, 1980) et de 600 (AKIYAMA *et al.*, 1985) fois meilleures pour DOPR versus MOPR. Une autre classe de peptides, découverte en 1987 (RICHTER *et al.*, 1987), sont reconnues pour leur grande sélectivité pour DOPR. En effet, les deltorphines sont à ce jour parmi les ligands les plus utilisés pour l'étude de DOPR (pour une revue, voir (LAZARUS *et al.*, 1999). Extraites de la peau de grenouilles amazoniennes (*Phyllomedusa sauvagei* et *Phyllomedusa bicolor*), les deltorphines sont des heptapeptides ayant la séquence d'acides aminés suivante : Tyr-D-Ala-Phe-Asp/Glu-Val-Val-Gly-NH<sub>2</sub>, respectivement pour la deltorphine I et la deltorphine II. Comme pour les ligands précédents, puisqu'ils possèdent un acide aminé D, la D-alanine, ils présentent une meilleure stabilité face à la dégradation par les peptidases. Par contre, autant pour les analogues enképhalinerigiques que pour les deltorphines, leur utilité en clinique demeure limitée car, de par leur nature peptidique, ils ne peuvent pénétrer la barrière hématoencéphalique afin d'agir au niveau central. Ils doivent donc généralement être administrés directement au niveau du système nerveux central (ex. par injection intrathécale) si l'on veut espérer pouvoir inhiber la douleur.



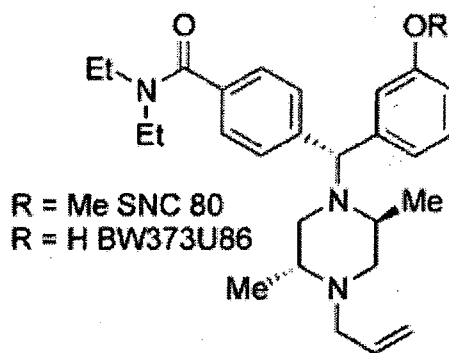
#### 1.4.2 Les ligands non peptidiques

Considérant que les ligands sélectifs pour DOPR possèdent un net avantage du point de vue des effets secondaires en comparaison avec les ligands sélectifs pour MOPR disponibles en clinique, plusieurs équipes de recherche (dont l'industrie pharmaceutique) s'intéressent à concevoir et à synthétiser des ligands non peptidiques qui seraient sélectifs pour DOPR. Ceux-ci se divisent principalement en 2 catégories selon leur structure : ceux ayant une structure apparentée à celle de la morphine (figure 8) et les pipérazines (figure 9). La première catégorie comprend entre autres les composés SIOM et SB-235863 qui ont en fait été conçus selon la structure du naltrindole (NTI), premier antagoniste non peptidique sélectif pour DOPR, synthétisé en 1990 (PORTOGHESE *et al.*, 1990).



**Figure 8. Ligands non peptidiques sélectifs pour DOPR dont la structure s'apparente à celle de la morphine. Le NTI est l'antagoniste sélectif pour DOPR le plus utilisé. Les ligands SB-235863 et SIOM sont des agonistes de DOPR.**

En ce qui concerne la deuxième catégorie, c'est en 1993 que le premier composé pipérazine sélectif pour DOPR a été développé, le ligand BW373U86 (CHANG *et al.*, 1993), duquel le développement du ligand SNC80 s'est inspiré (CALDERON *et al.*, 1994).



**Figure 9. Structure générale des ligands sélectifs pour DOPR de type pipérazine.** Le premier composé de cette classe à avoir été synthétisé a été le ligand BW373U86. Le ligand SNC80 a ensuite été synthétisé.

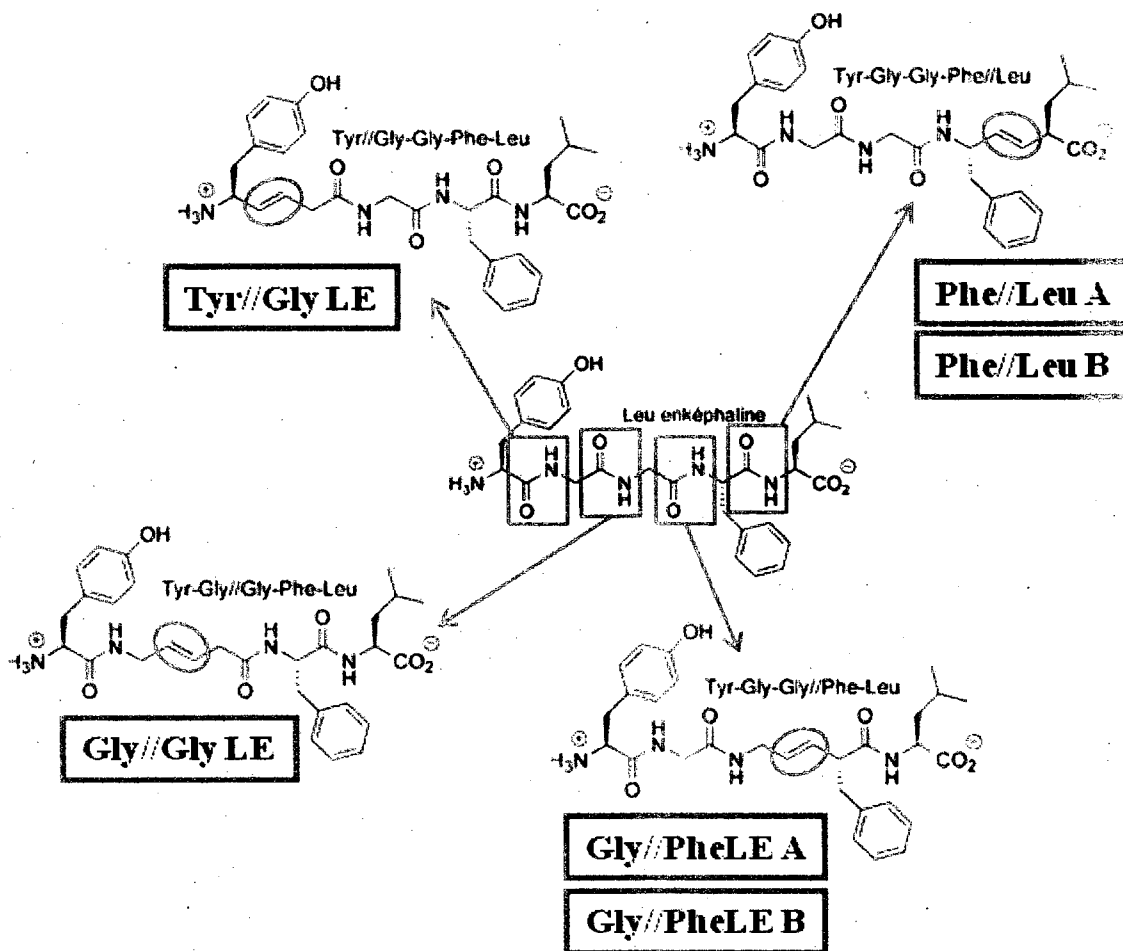
Malgré leur grande sélectivité pour DOPR ainsi que leur bon profil pharmacocinétique, aucun des ligands mentionnés n'a atteint les essais cliniques. En effet, lors d'études menées chez les rongeurs, mais aussi chez le singe, il a été constaté que ces composés entraînent des convulsions (COMER *et al.*, 1993; NEGUS *et al.*, 1994) ainsi qu'une stimulation (BROOM *et al.*, 2002; FRASER *et al.*, 2000b; JUTKIEWICZ *et al.*, 2004; SPINA *et al.*, 1998) ou une inhibition (FRASER *et al.*, 2000b; JUTKIEWICZ *et al.*, 2004; MIASKOWSKI *et al.*, 1991; SPINA *et al.*, 1998) des fonctions motrices.

Récemment, une nouvelle série d'agonistes non peptidiques sélectifs pour DOPR a fait son entrée dans l'industrie pharmaceutique comme traitement prometteur de la douleur. Il s'agit des composés ADL5859 et ADL5747 qui sont présentement en étude clinique (phase II et I, respectivement) (LE BOURDONNEC *et al.*, 2008; LE BOURDONNEC *et al.*, 2009).

## 1.5 Conception et synthèse de nouveaux analogues enképhalinerigiques

Comme décrit précédemment, DOPR semble constituer une cible pharmacologique prometteuse pour le soulagement des douleurs persistantes puisque son activation induit de l'analgésie tout en entraînant moins d'effets secondaires que les agonistes de MOPR présentement utilisés en clinique. Les ligands peptidiques sélectifs pour DOPR qui ont été développés présentent une meilleure stabilité que les enképhalines naturelles mais sont dotés d'un mauvais profil pharmacocinétique qui empêche leur utilisation en clinique. Le développement de ligands non peptidiques sélectifs pour DOPR a mené à des composés qui possèdent un meilleur profil pharmacologique mais qui s'accompagnent d'effets secondaires importants. Pour cette raison, nous avons opté pour la conception et la synthèse de ligands peptidiques modifiés (peptidomimétiques). Puisqu'ils consistent en de petites molécules dotées d'une bonne sélectivité envers DOPR (versus MOPR et KOPR), nous nous sommes particulièrement intéressés aux analogues enképhalinerigiques. Nous avons pour objectif de modifier chimiquement les enképhalines afin d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques. Dans un premier temps, nous voulions conserver l'affinité et l'activité des peptidomimétiques pour DOPR. Ensuite, les modifications devaient pouvoir augmenter la stabilité des peptides face à la dégradation par les peptidases endogènes mais aussi d'augmenter leur lipophilicité afin de leur permettre, possiblement, de passer la barrière hémato-encéphalique.

Les peptides, dont les enképhalines, sont constitués d'une chaîne d'acides aminés retenus ensemble au moyen de liens peptidiques. Les liens peptidiques sont des liens amides (CO-NH) qui confère un caractère polaire et hydrosoluble qui rendent les peptides sensibles aux peptidases et les empêchent de traverser la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, en substituant ces liens amides avec une entité chimique possédant un caractère plus lipophile, il pourrait s'avérer possible de rendre la molécule moins soluble dans l'eau et donc, plus soluble dans les lipides. L'alcène, c'est-à-dire la liaison double carbone-carbone (C=C), nous est d'abord apparu un candidat de choix afin d'augmenter la stabilité (l'alcène est insensible aux peptidases) et la liposolubilité tout en conservant cette simplicité de structure que possèdent les enképhalines. Effectivement, en plus d'être lipophiles, les alcènes ne créent pas d'encombrement stérique susceptible de modifier l'interaction avec le récepteur. Le fait de remplacer le lien amide par un double lien n'altère pratiquement pas la structure 3D globale des peptidomimétiques par rapport aux peptides originaux, les 2 groupements  $R_1$  et  $R_2$  portés par les liens CO-NH et C=C occupent pratiquement les mêmes positions relatives (HANN et AND SAMMES, 1980). D'ailleurs, cette stratégie a déjà fait l'objet d'autres études sur les enképhalines par le passé (COX *et al.*, 1980; HANN *et al.*, 1982). Ainsi, nous avons décidé de procéder au remplacement systématique de chacun des 4 liens peptidiques de la leu-enképhaline (LE) par un alcène trans (voir le schéma de la figure 10).



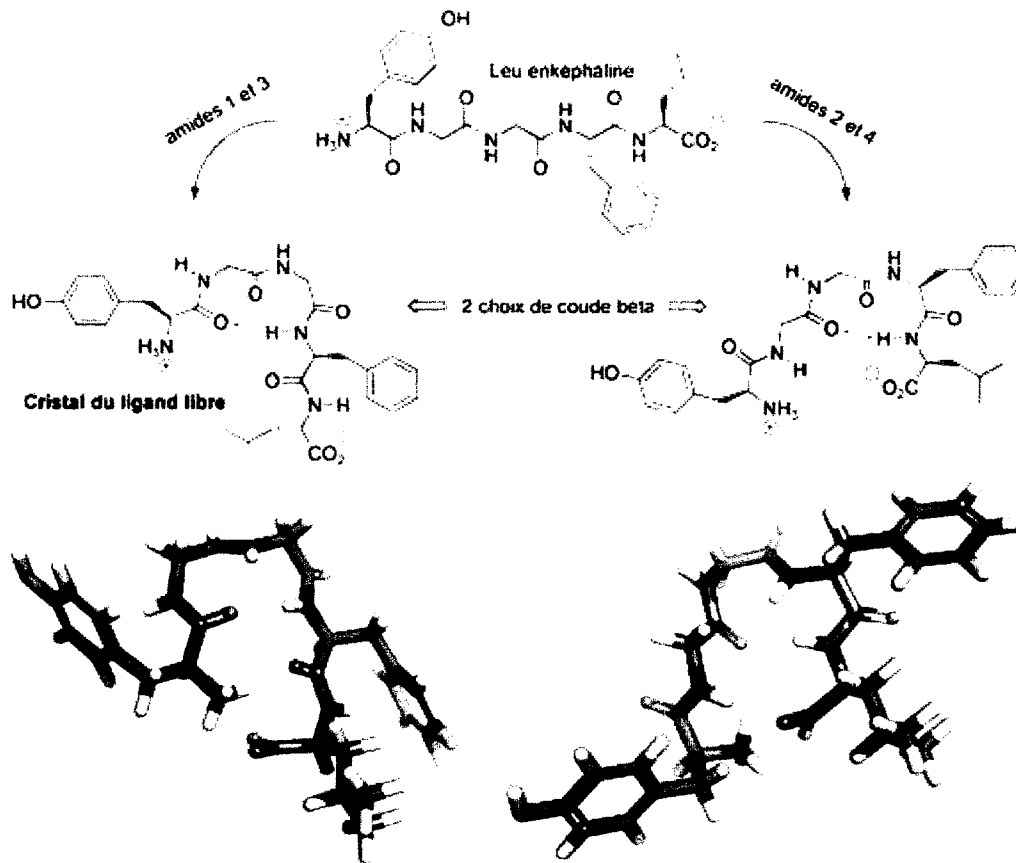
**Figure 10. Remplacement systématique de chacun des liens amides de la LE par un alcène.** Des analogues enképhalinerigiques susceptibles de lier DOPR et de posséder de meilleures stabilité et lipophilicité que la leu-enképhaline naturelle ont été conçus et synthétisés.

En ce qui concerne les analogues Gly//Phe et Phe//Leu, leur synthèse a résulté en la formation des 2 diastéréoisomères possibles, c'est-à-dire de chiralités différentes (D et L). En effet, dans le cas de l'analogue Gly//PheLE, le groupement benzyle du résidu phénylalanine peut se retrouver devant ou derrière le plan et, de la même manière, le

groupement isobutyle du résidu leucine peut se retrouver devant ou derrière le plan dans le cas de l'analogue Phe//Leu. Ainsi, les 2 diastéréoisomères de chacun des analogues ont pu être séparés et nommés A et B en attendant de pouvoir résoudre leur chiralité respective par la cristallographie.

Puisque les liens amides des peptides possèdent la capacité de participer à des liaisons non covalentes de type ponts hydrogènes, il faut mentionner la possibilité que la liaison des enképhalines à DOPR soit stabilisée par ce type de liens (interaction intermoléculaire). Les 4 liens amides que les enképhalines contiennent leur permettent de former 8 liens de type ponts hydrogènes avec le récepteur : 4 en tant qu'accepteurs par les carbonyles CO et 4 en tant que donneurs par les groupes NH. Les liens amides sont en plus souvent impliqués dans des ponts hydrogène intramoléculaires qui ont pour rôle de favoriser une conformation biologiquement active. La structure cristalline des enképhalines libres est présentée à la figure 11, à gauche. L'état cristallin d'une molécule se caractérise par une périodicité et un ordre à l'échelle atomique de cette molécule à l'état solide. L'analyse rayons X du cristal suggère l'existence d'un pont hydrogène intramoléculaire (entre l'atome d'oxygène du carbonyle du résidu Tyr et l'hydrogène de l'amide du résidu Phe) stabilisant la structure flexible de la LE en une conformation secondaire de type  $\beta$  coudé (1-3), que l'on nommera tournant  $\beta$  (SMITH et GRIFFIN, 1978). Il existe une 2<sup>e</sup> possibilité pour la formation d'un coude bêta (figure 11, à droite). À ce jour, le rôle de ces ponts hydrogènes pour le maintien de l'activité biologique des enképhalines demeure controversé, mais il est aussi possible

que la structure active des enképhalines soit celle impliquant un pont hydrogène entre les amides 2 et 4 (BLOMBERG *et al.*, 2006).



**Figure 11. Structure cristalline de la LE montrant la possibilité de la conformation en tournant  $\beta$ . 2 choix de formation d'un pont hydrogène intramoléculeire sont montrés, entre les amides 1 et 3, et entre les amides 2 et 4 de la leu-enképhaline. Source : (PATRICK, 2002).**

Les liaisons doubles C=C ne permettant pas la formation de ponts hydrogènes, ces remplacements avaient pour objectif premier d'identifier précisément les liens amides indispensables au maintien de l'activité des enképhalines afin de pouvoir ensuite



concevoir des peptidomimétiques, analogues enképhalinerigiques, de moins en moins « peptidiques ». Les autres liens amides, c'est-à-dire ceux qui ne dirigent pas le repliement des enképhalines, peuvent soit interagir avec DOPR par des liens faibles ou bien ne former aucun lien, auquel cas, ils ont pour seule fonction de maintenir les carbones  $\alpha$  situés de part et d'autre dans leurs positions relatives.

C'est au moyen de diverses techniques d'évaluation de la liaison et de l'activité biologique *in vitro* et d'une technique d'évaluation de l'activité analgésique *in vivo* que la caractérisation de cette série d'analogues enképhalinerigiques conçus et synthétisés a été réalisée. Cette caractérisation aura permis l'évaluation de l'importance de chacun des 4 liens peptidiques dans le maintien de l'activité des enképhalines sur DOPR.

## 2 BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Présentement, on estime que près du tiers de la population souffrira au cours de sa vie de douleur chronique. Or, tous les spécialistes s'entendent pour dire que les narcotiques analgésiques utilisés en clinique ne permettent pas un soulagement adéquat de cette pathologie. En effet, de nombreux effets secondaires accompagnent la prise d'analgésiques opiacés. MOPR étant la cible principale des analgésiques utilisés en clinique, plusieurs équipes de recherche se tournent maintenant vers d'autres cibles pharmacologiques plus prometteuses, dont DOPR. D'ailleurs, notre laboratoire, en collaboration avec celui du Pr Dory du département de chimie de l'Université de Sherbrooke, s'intéresse au développement de peptidomimétiques, analogues des enképhalines qui sont des ligands endogènes de DOPR. Les premiers pas de ce projet collaboratif ont mené à la conception et la synthèse d'une nouvelle famille de 6 analogues enképhalinerigiques. Ainsi, **le but général de mon projet de maîtrise consistait à caractériser ces analogues enképhalinerigiques.**

D'abord, une **caractérisation *in vitro*** comportait les objectifs spécifiques suivants :

- Mesurer l'affinité des analogues pour DOPR.
- Évaluer l'activité des analogues via DOPR par la mesure de leur capacité :
  - o d'internalisation de DOPR;
  - o d'activation de la voie des MAP kinases ERK1/2;
  - o de modulation d'un courant potassique et;

- d'inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc.

Finalelement, une première **caractérisation *in vivo*** avait pour objectif spécifique de mesurer l'effet antihyperalgésique des analogues ayant montré les meilleurs résultats dans les essais *in vitro*.

### 3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 3.1 Matériel

Les produits utilisés dans le cadre de ce projet provenaient des fournisseurs suivants : L'anticorps anti-rabbit conjugué à une peroxydase de raifort (HRP) de Amersham Pharmacia Biotech (Oakville, ON, Canada). L'albumine de sérum de bovin (BSA) de BioShop (Burlington, ON, Canada). L'adjuvant complet de Freund (CFA) de Calbiochem (Gibbstown, NJ, USA). Le naltrindole (NTI) de Tocris (Ellisville, MO, USA). Le milieu « Dulbecco's modified Eagle's » (DMEM), le sérum de bovin fœtal (FBS) et la Généticine de Gibco BRL (Burlington, ON, Canada). Les anticorps anti-phospho p42/p44<sup>mapk</sup> et anti p42/p44<sup>mapk</sup> de Cell Signaling (Boston, MA, USA). La <sup>3</sup>H-adénine et la <sup>3</sup>H-deltorphine II (<sup>3</sup>H-dlt II) de PerkinElmer (Boston, MA, USA). L'Hygromycine, l'inhibiteur de protéases mini-Complete<sup>TM</sup>, les membranes de PVDF et le système de détection Enhanced Chemiluminescence (ECL) de Roche (Montréal, QC, Canada). La Gentamicine de Sandoz (Boucherville, QC, Canada). La dlt II, la forskoline, le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), la leu-enképhaline et la poly-L-lysine de Sigma (St. Louis, MO, USA).

#### 3.2 Culture cellulaire

##### 3.2.1 Lignée cellulaire GH3/DOPR

Les cellules GH3-DOPR, lignée immortalisée de cellules hypophysaires de rat dans lesquels DOPR a été transfecté de façon stable, nous ont généreusement été fournies par le Dr Paul L. Prather (University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA). Les cellules étaient mises en culture dans des boîtes de Pétri enduits avec de la poly-L-lysine (25 mg/ml), dans un milieu DMEM contenant 10 % de FBS et 50 µg/ml de Gentamicine. 100 µg/ml d'Hygromycine (antibiotique de sélection du gène transfecté) était aussi ajouté aux boîtes de Pétri de passage.

### 3.2.2 Lignée cellulaire DRGF11/DOPR-GFP

La lignée cellulaire DRGF11 est un hybride entre un neurone de ganglion de la racine dorsale (DRG) de rat fœtale et un neuroblastome de souris. Ainsi cette lignée constitue un bon modèle de cellules neuronales tout en ayant l'avantage d'être facile à cultiver. Des études par PCR faites antérieurement dans le laboratoire ont permis de constater que ces cellules ne contiennent que le récepteur opioïdérique delta, c'est-à-dire qu'elles n'expriment pas les récepteurs opioïdériques mu et kappa de façon endogène. Par la transfection de ces cellules avec un gène codant pour DOPR auquel est couplée une protéine fluorescente GFP (green fluorescent protein), notre équipe a créé une lignée cellulaire DRGF11/DOPR-GFP permettant d'observer le déplacement de DOPR par microscopie en fluorescence. Le gène codant pour DOPR-GFP nous a été généreusement donné par le Dr Rüdiger Schulz (University of Munich, Germany). Les cellules étaient cultivées dans un milieu DMEM contenant 10 % de FBS et 50 µg/ml de Gentamicine. 1 mg/ml de Généticine (antibiotique de sélection du gène transfecté) était aussi ajouté aux boîtes de Pétri lors des passages.

### 3.3 Mesure de l'affinité pour DOPR

#### 3.3.1 Extraction membranaire

Lorsque confluentes, les cellules GH3/DOPR étaient décollées mécaniquement, centrifugées (culottées) et remises en suspension dans un tampon potassium phosphate 10 mM à pH 7,2. Une première centrifugation de 10 minutes à 40000 g permettait l'éclatement des cellules, tous les constituants cellulaires insolubles se retrouvant dans le culot. Le surnageant (contenant surtout le cytoplasme, les ribosomes et des microsomes) était jeté et le culot resuspendu dans le même tampon et, suite à une incubation de 20 minutes sur glace, trois centrifugations successives de 5 minutes chacune à 800 g permettaient de séparer les noyaux des autres constituants cellulaires restants, les membranes se retrouvant donc dans le surnageant. Le culot étant resuspendu dans le tampon entre chaque centrifugation. Tous les surnageants étaient ensuite mis ensemble et centrifugés à 40000 g. Le culot était finalement resuspendu dans le tampon auquel 0,32 M de sucrose (cryoprotecteur) et 5 mM d'EDTA (inhibiteur de métalloprotéinases) avaient été ajoutés, et la suspension finale était conservée à -80 °C. Toutes les étapes de cette extraction étaient faites à 4 °C. Avant la congélation, un dosage protéique était effectué selon la méthode de Lowry.

#### 3.3.2 Essai de liaison par compétition

Un tampon Tris 50 mM (pH 7,4) était utilisé pour cette expérimentation, ainsi, les ligands et les membranes y étaient dilués. Des concentrations croissantes de ligand froid à tester (de  $10^{-11}$  à  $10^{-4}$  M) étaient d'abord ajoutées à une concentration fixe de ligand radioactif, dans ce cas la  $^3\text{H}$ -dlt II. Une quantité fixe de membrane était ensuite

ajoutée (50 µg) à chaque condition, suivi d'une incubation de 60 minutes à 37 °C. La réaction était ensuite arrêtée par filtration sur des filtres GF/C, filtres en microfibrilles de verre (Whatman®), à l'aide de trois lavages avec le tampon Tris froid. La quantité de radioactivité contenue dans les filtres était alors comptée dans un compteur bêta Beckman LS6500. Les filtres avaient alors retenu « toute radioactivité » (<sup>3</sup>H-dlt II) étant liée aux membranes (récepteur opioïdérique delta), ainsi, il était possible de quantifier la compétition du ligand froid avec la <sup>3</sup>H-dlt II et d'obtenir une valeur d'IC<sub>50</sub>, concentration à laquelle le ligand froid aura déplacé la moitié du ligand radioactif.

### 3.3.3 Détermination du Ki

Un graphique du pourcentage de liaison de <sup>3</sup>H-dlt II en fonction de la concentration du ligand froid testé permettait la détermination de cette valeur de IC<sub>50</sub>, 100 % de liaison étant le compte obtenu où aucun ligand froid était ajouté et 0 % de liaison étant celui où de la dlt II froide en excès était ajoutée. Enfin, puisque l'on connaissait la concentration de <sup>3</sup>H-dlt II présente dans la réaction (selon le compte total), représentée par [S], ainsi que l'affinité de la dlt II pour DOPR, représentée par K<sub>d</sub> (constante de dissociation), il est possible de définir expérimentalement l'affinité, ou, dans ce cas, la constante d'inhibition (K<sub>i</sub>), du ligand froid testé à l'aide de l'équation (1) Cheng-Prusoff :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_d}} \quad (1)$$

Cette analyse était faite directement avec le logiciel SigmaPlot.

### 3.4 Mesure de l'induction de l'internalisation de DOPR-GFP

D'abord, il est à noter que pour chacune des mesures d'activité des analogues sur DOPR (point 3.4 à 3.7) ainsi que dans le cas de l'évaluation de l'activité *in vivo* (point 3.8), la dlt II était utilisé comme ligand de référence, et ce, parce qu'elle constitue le ligand de DOPR de prédilection dans notre laboratoire. En effet, la plupart des essais avaient déjà été faits avec ce ligand au laboratoire et donc la dlt II nous paraissait un bon contrôle positif pour chacun de nos essais.

Puisqu'il est connu que la plupart des agonistes activant DOPR induisent son internalisation à l'intérieur de vésicules, des enregistrements en temps réel nous ont permis de tester les ligands dans leur capacité d'internaliser DOPR. Étant plutôt de nature qualitative, ce test *in vitro* est bien sûr complémentaire aux autres tests permettant de déterminer la capacité d'activation de DOPR par les ligands à tester. Les essais d'induction de l'internalisation étaient faits de 48 à 72 heures après la mise en culture sur des cellules DRGF11/DOPR-GFP ayant une confluence d'environ 50 %. Le milieu de culture était alors remplacé par du tampon Earle's (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES, 0,2 % BSA et 0,09 % Glucose). Les ligands à tester étaient préparés dans le tampon afin d'obtenir la concentration finale voulue. Trois (3) sites différents étaient visualisés en temps réel à l'aide d'un microscope IX81 d'Olympus, équipé d'une platine motorisée multi-site ProScanII de Prior et d'une unité confocale CSU-XI à technologie spinning disk de Yokogawa, et à l'aide d'une caméra QuantEM:512SC de Photometrics. Les acquisitions (1 à toutes les 30 secondes) étaient prises à un objectif de 60X et à



température de la pièce, à l'aide du logiciel MetaMorph de Molecular Devices. Un enregistrement de l'état basal d'environ 3 minutes (6 acquisitions) précédait l'ajout du ligand à tester pour une période d'acquisitions totale de 70 minutes. Pour chacun des ligands à tester ainsi que pour la dlt II, une concentration de 100 nM était d'abord testée. Dans le cas où aucune internalisation n'était observée, une concentration de 10 µM était alors testée, suivi de l'ajout de dlt II 100 nM pour une période de 70 minutes supplémentaire. Cette approche permettait de vérifier une possible activité antagoniste.

### **3.5 Mesure de l'activation de la voie des MAP kinases ERK1/2**

#### **3.5.1 Stimulation des cellules et extraction des protéines cytosoliques**

Des cellules DRGF11/DOPR-GFP étaient mises en culture dans des plaques de 6 puits tel que décrit précédemment. Après 72 heures de culture, des cinétiques d'activation (0, 5, 10, 15, 30 et 60 minutes), ainsi que des activations dépendantes de la concentration (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) ont été effectuées. En général, une concentration de 100 nM (essais à 10 µM pour quelques ligands) était utilisée dans les cinétiques et un temps d'incubation de 5 minutes dans les concentration-réponses. Des essais comprenant un pré traitement de 15 minutes avec les ligands ne présentant pas d'activité agoniste à une concentration de 10 µM suivi du traitement à la dlt II (100 nM) ont aussi été effectués, encore une fois dans le but de vérifier une possible activité antagoniste. Toutes les incubations se faisaient dans un l'incubateur à 37 °C

(5 % CO<sub>2</sub>). L'aspiration du milieu et l'ajout de HBS (130 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,93 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 0,5 mM EGTA, pH7.4) froid servait à l'arrêt de la stimulation. Toutes les étapes suivantes étaient effectuées sur glace (4 °C). Le HBS était ensuite remplacé par un tampon de stabilisation (HBS contenant 0.1 µM de staurosporine, 1 mM d'orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) et des inhibiteurs de protéases) pour 10 minutes. Ce tampon était ensuite remplacé par un tampon de lyse [50 mM HEPES, pH 7.8, 1 % Triton X-100, 0.1 µM staurosporine, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (inhibiteurs de phosphatases) et des inhibiteurs de protéases] pour une incubation de 30 minutes. Les cellules lysées étaient ensuite grattées, récoltées et centrifugées à 8000 g pour 15 minutes suite à quoi le surnageant, contenant les composants cytosoliques solubles, dont les protéines ERK1/2, est récupéré et gardé à -20 °C jusqu'à l'utilisation.

### 3.5.2 Électrophorèse et immunobuvardage de type Western

Un dosage protéique par la méthode de Lowry était d'abord effectué et une même quantité (15 µg) pour chacun des lysats cellulaires était préparée dans un tampon de Laemmli (Tris 6.25 mM pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glycérol, 0.025 % bleu de bromophénol, et 10 % β-mercaptoéthanol). Les protéines contenues dans les échantillons étaient bouillis 5 minutes avant d'être déposées et séparées, selon leur taille, sur un gel SDS-polyacrylamide 10 % par une tension de 150 V pour environ 1 heure 30 minutes. Les protéines du gel étaient ensuite transférées sur une membrane PVDF par une tension de 10 V pour la nuit, à 4 °C. Après un bref lavage dans un tampon TBS-T (500 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 0.05 % Tween20), un blocage

des sites non spécifiques était effectué en utilisant une solution 1 % gélatine dans le TBS-T, pour 1 heure. Par la suite, une première incubation avec un anticorps primaire anti-phospho p42/p44<sup>mapk</sup> ou anti p42/p44<sup>mapk</sup>, dilué 1 :1000 dans la solution de blocage, était suivie de 3 lavages dans le TBS-T et d'une incubation de 1 heure avec un anticorps secondaire anti-rabbit conjugué à une HRP (peroxydase de raifort) dilué 1 : 2000 dans la solution de blocage. Enfin, suite à plusieurs lavages dans le TBS-T, la révélation du signal était faite à l'aide du système de détection ECL (enhanced chemiluminescence). Entre les deux détections (phosphorylées et totales), le retrait des anticorps de la première amplification des membranes se faisait par 2 incubations de 1 heure dans une solution 0,2 M glycine et 0.05 % Tween20 à pH 2,5 et à 70 °C, suivi de plusieurs lavages et d'un blocage.

### 3.5.3 Analyse densitométrique

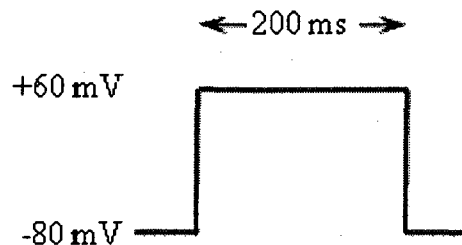
Une quantification des immunobuvardages était faite à l'aide du logiciel ImageJ par le calcul de l'intensité des bandes (densitométrie). Le ratio de la densitométrie des bandes obtenues suite à l'immunobuvardage avec l'anti-phospho p42/p44<sup>mapk</sup> sur la densitométrie des bandes obtenues suite à l'immunobuvardage avec l'anti p42/p44<sup>mapk</sup> déterminait le niveau de phosphorylation des ERK1/2 obtenus. Par la suite, ce ratio pour chacune des conditions de stimulation était reporté sur le ratio obtenu pour le contrôle (sans stimulation) propre à chacun des immunobuvardages, ainsi, une quantification du taux d'augmentation par rapport au contrôle permettait une comparaison entre les différentes expérimentations. La signification statistique était ensuite évaluée à l'aide du logiciel GraphPad Prism par un test ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de Dunnett.

### 3.6 Mesure de l'effet sur un courant potassique

#### 3.6.1 Enregistrement de voltage clamp en configuration cellule entière

Les cellules DRGF11/DOPR-GFP étaient d'abord mises en culture dans des boîtes de Pétri de 35 mm pour 1 à 4 jours tel que décrit précédemment. Le milieu de culture était alors remplacé par un milieu extracellulaire (140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7,4) contenant 2 mg/ml de glucose. Les expérimentations étaient effectuées à température de la pièce. Les cellules étaient observées à l'aide d'un microscope inversé (Nikon) à une amplification de 100 X. Une pipette de borosilicate (Warner Instruments) ayant une résistance de 3 à 5 megaohms et préalablement remplie avec un milieu dit intracellulaire (115 mM KCl, 20 mM NaCl, 11 mM EGTA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 3 mM ATP, 0,4 mM GTP, pH 7,2) était approchée d'une cellule bien adhérente afin de créer un joint étanche entre la membrane cellulaire et la pipette de verre à l'aide d'un système de succion. L'approche de la cellule ainsi que la formation du joint étanche étaient aidées par l'observation des variations de résistance à l'aide d'un oscilloscope Kenwood, une tension de 20 mV étant appliquée à l'électrode se trouvant à l'intérieur de la pipette de borosilicate. Après l'obtention d'un joint étanche ayant une résistance de l'ordre du gigaohm, une plus forte pression négative (succion) était appliquée afin de rompre la membrane contenue dans la pipette de verre. Dans le cas où la rupture était plus difficile à faire, un « zap » (impulsion de tension hyperpolarisante importante d'environ 1,5 V) d'une durée de 0,1 à 10 ms était appliqué. On dit alors que la cellule est ouverte, « empalée », et ce

lien serré entre la pipette et la cellule permet l'enregistrement des courants globaux de la cellule entière par l'électrode de la pipette et le système d'acquisition Axopatch-1D (Axon Instruments) et du logiciel Clampex. L'enregistrement de type « voltage clamp » consiste à imposer une tension (voltage) de base à la cellule par l'électrode d'enregistrement, de faire varier ce voltage et d'enregistrer le courant obtenu par cette variation. Selon les différentes composantes du protocole d'imposition du voltage ainsi que la composition des milieux extra et intracellulaire, il est alors possible de sélectionner un type de courant particulier. Dans notre cas, un potentiel de repos de -80 mV était imposé et une dépolarisation de 200 ms jusqu'à +60 mV permettait l'enregistrement d'un courant potassique sortant, la composition des solutions extra et intracellulaire permettant la sélection des courants potassiques (versus sodiques). Le schéma de la figure 12 montre le protocole de stimulation. Un enregistrement continu comprenant plusieurs acquisitions (dépolarisations) à intervalle de 20 s permettait d'observer le courant avant (contrôle) et après l'ajout des ligands dans la solution extracellulaire. L'analyse des données était faite à l'aide d'un logiciel d'analyse programmé par le Pr Marcel-Daniel Payet.



**Figure 12. Schéma représentant le protocole de stimulation utilisé dans la technique de voltage clamp.** L'induction d'une dépolarisation membranaire permettait l'enregistrement d'un courant potassique sortant. Le potentiel de maintien était à -80 mV et le potentiel test à +60 mV.

### 3.7 Mesure de l'inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc

#### 3.7.1 Incubation, stimulation et lyse des cellules

Les cellules GH3/DOPR étaient mises en culture dans des boîtes de Pétri de 35 mm pour 48 à 72 heures tel que décrit précédemment. Le milieu de culture était alors remplacé par 1 ml de milieu auquel avait été ajouté 2  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^3\text{H}$ -adénine et les cellules incubées pour un maximum de 1 heure (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ). L'aspiration de ce milieu suivie de 2 lavages avec une solution froide (sur glace) de HBS (130 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2,3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,98 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, 0,5 mM EGTA) contenant 0,1 % de glucose précédaient l'ajout de 1 mM d'IBMX (3-Isobutyl-1-méthylxanthine, inhibiteur de phosphodiésterases) dans du HBS contenant 0,1 % de glucose et 0,1 % de BSA, pour une période d'incubation de 15 minutes, dans un bain à 37 °C. La forskoline 10  $\mu\text{M}$  ainsi que le ligand à tester (concentrations de  $10^{-11}$  à  $10^{-4}$  M) étaient ensuite ajoutés à chaque boîte de Pétri pour un temps d'incubation de 15 minutes (37 °C). L'incubation était ensuite arrêtée par l'aspiration du milieu, le dépôt sur glace des boîtes de Pétri et l'ajout (1 ml / boîte) d'une solution de TCA (acide trichloroacétique) 5 % froid. La solution de TCA sert à la lyse des cellules, le tout étant ensuite récolté, additionné d'une solution d'ATP 5 mM et d'AMPc 5mM (100  $\mu\text{l/ml}$ ), mélangé et centrifugé à 800 g pendant 15 minutes, à 4 °C.

#### 3.7.2 Séparation de l'ATP ( $^3\text{H}$ -ATP) et de l'AMPc ( $^3\text{H}$ -AMPc)

Afin de pouvoir déterminer la conversion de  $^3\text{H}$ -ATP en  $^3\text{H}$ -AMPc par un comptage de la radioactivité, il est d'abord essentiel de séparer l'ATP tritiée de l'AMPc tritiée et cela a été fait par chromatographie sur des colonnes séquentielles de

DOWEX et d'alumine. La colonne de DOWEX, qui est une résine échangeuse d'ions, retient l'<sup>3</sup>H-AMPc et laisse élué l'<sup>3</sup>H-ATP non convertie. La colonne de DOWEX est ensuite superposée à la colonne d'alumine, qui absorbe les nucléotides, et de l'eau est ajoutée à la colonne de DOWEX afin d'élué l'<sup>3</sup>H-AMPc qui se retrouve alors accrochée à la colonne d'alumine. L'<sup>3</sup>H-AMPc est enfin éluée de la colonne d'alumine à l'aide d'imidazole. Les quantités de radioactivité (<sup>3</sup>H-ATP ou <sup>3</sup>H-AMPc) étaient mesurées à l'aide d'un compteur à scintillation bêta.

### 3.7.3 Détermination de l'IC<sub>50</sub>

Un pourcentage de conversion de l'ATP en AMPc était calculé par l'équation (2) suivante :

$$\% \text{ Conversion} = \frac{\text{Qté } [^3\text{H}]\text{AMPc (cpm)}}{\text{Qté } [^3\text{H}]\text{AMPc} + \text{Qté } [^3\text{H}]\text{ATP (cpm)}} \times 100 \quad (2)$$

Puisque DOPR est couplé à G<sub>i</sub> et qu'il fallait stimuler l'activité de l'adénylyl cyclase à l'aide de la forskoline avant de pouvoir l'inhiber par les ligands de DOPR, les résultats sont présentés en termes de pourcentage de conversion de l'ATP en AMPc par la forskoline, en fonction de la concentration de ligand DOPR ajouté. Ainsi, une valeur de IC<sub>50</sub> (concentration pour laquelle 50 % de la stimulation était inhibé) était déterminée à l'aide du logiciel SigmaPlot.

### 3.8 Mesure de l'effet antihyperalgésique

#### 3.8.1 Déroulement de l'expérimentation comportementale

Les rats mâles Sprague-Dawley (200 – 225 g) étaient hébergés en groupe de 2 ou 3, selon un cycle lumière/noirceur de 12 heures, avec nourriture et eau *ad libitum*. Les expérimentations étaient toujours faites le matin (entre 7 hrs et 11 hrs). Aux jours 1 et 2, les rats étaient acclimatés au montage d'expérimentation, qui consiste à une cage de Plexiglas déposé sur un plancher de verre, pour une durée de 30 minutes. Au jour 3, une acclimatation au montage de 10 minutes était d'abord faite et les mesures du temps de retrait de la patte au niveau basal étaient pratiquées sur chacune des pattes arrières de l'animal. Ces mesures étaient faites au moyen de la méthode de Hargreave (test Plantar), qui consiste en l'application d'un faisceau infrarouge (stimulation thermique) sur la surface plantaire de l'animal au travers du plancher de verre. Lorsqu'il perçoit la chaleur comme étant douloureuse, l'animal retire sa patte et c'est le temps requis pour ce retrait qui correspond à la mesure prise. Trois (3) lectures de chaque patte étaient faites à des intervalles d'environ 5 minutes. Par la suite, une fois le rat anesthésié sous isoflurane (3 %, 1 l/min), l'inflammation était induite par l'injection de 100 µl d'une émulsion (2 µg/µl) de CFA dans l'espace intra-plantaire de la patte arrière gauche (appelée ipsilatérale). Suite à une journée de repos, une autre acclimatation au montage de 30 minutes était faite au jour 5. Soixante-douze (72) heures suivant l'induction de l'inflammation de la patte ipsilatérale (jour 6), une acclimatation de 10 minutes au montage était suivie de 2 mesures des temps de retrait des pattes ipsilatérale et controlatérale. Ces lectures permettaient de constater l'hyperalgésie induite, le temps de retrait de la patte ipsilatérale devant être inférieur à



celui de la patte controlatérale suite à l'application du stimulus thermique. L'injection des ligands à tester (analogue ou dlt II) par la voie intrathécale était ensuite pratiquée suite à une légère anesthésie du rat sous isoflurane. 15 minutes après l'injection intrathécale, une première mesure pour chaque patte était faite suivie de 3 autres lectures à des intervalles de 15 minutes afin d'évaluer l'effet anti-hyperalgésique des ligands jusqu'à 60 minutes après l'injection.

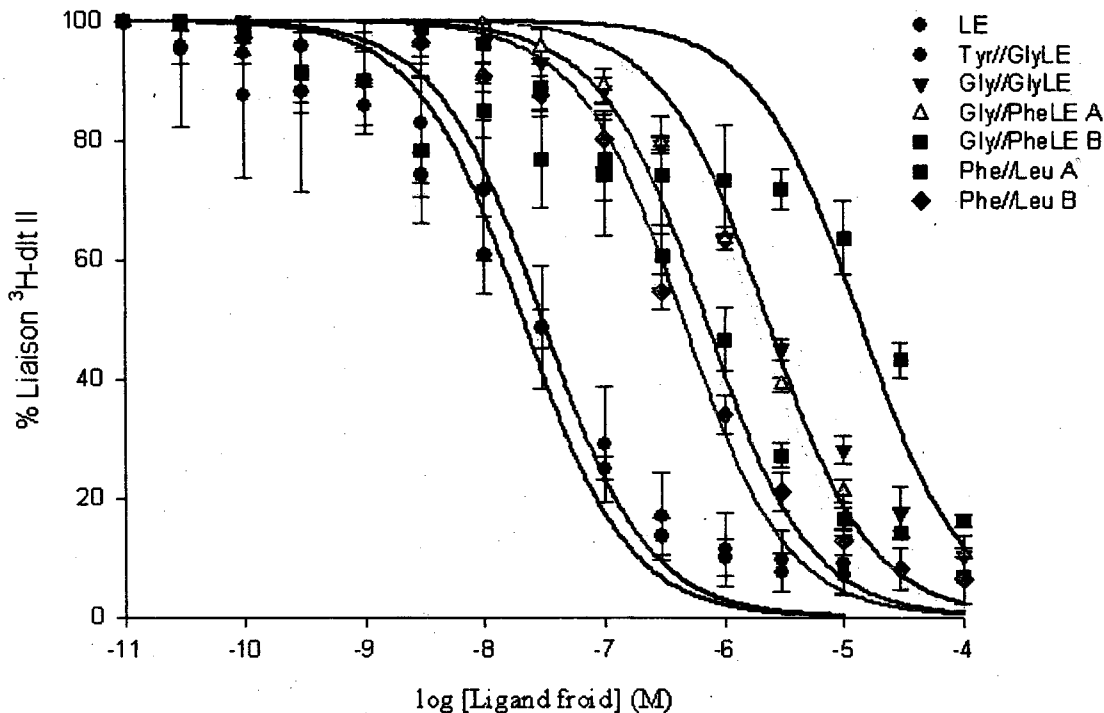
### 3.8.2 Analyses statistiques

Les résultats étaient présentés sous forme de graphique du temps de retrait de la patte en fonction du temps après l'injection du ligand (0, 15, 30 et 60 minutes), le temps de retrait basal de la patte étant aussi inclus dans le graphique (pré CFA). La signification statistique était ensuite évaluée à l'aide du logiciel GraphPad Prism par un test « two-way ANOVA » suivi de post-tests de Bonferroni.

## 4 RÉSULTATS

### 4.1 Affinité pour DOPR

Des essais de liaison par compétition ont été effectués pour la LE ainsi que pour chacun des ligands synthétisés qui sont présentés à la figure 10. Les études de liaison ont été réalisées sur des extraits de membranes de cellules GH3/DOPR (50  $\mu$ g de protéines membranaires par essai). Pour ces essais, le ligand radioactif sélectif pour DOPR, la  $^3\text{H}$ -dlt II ( $K_D \approx 1$  nM), a été utilisé à une concentration fixe de 1,8 nM (soit environ 50 000 cpm par essai).



**Figure 13. Mesure de l'affinité des analogues pour DOPR.** Courbes représentant le déplacement compétitif d'une concentration donnée de ligand radioactif  $^3\text{H-dlt II}$  par des concentrations croissantes de ligands testés. Les courbes de déplacement de la LE et de l'analogue Tyr//GlyLE sont très proches et indiquent une bonne affinité de ces ligands pour DOPR. De gauche à droite, les courbes des analogues Phe//Leu B, Phe//Leu A, Gly//PheLE A, Gly//GlyLE et Gly//PheLE B, présentent les ligands en ordre décroissant d'affinité pour DOPR. (n = 3)

Le graphique de la figure 13 montre le déplacement de la liaison du ligand  $^3\text{H-dlt II}$  en fonction de la concentration des différents analogues enképhalinerigiques, en comparaison avec le déplacement obtenu pour la LE. Ainsi, la position des courbes dans le graphique permet d'observer le degré d'affinité de chacun des ligands, les courbes se retrouvant le plus à gauche dans le graphique étant celles des ligands nécessitant une moins grande concentration afin de déplacer le ligand radioactif sélectif. De gauche à droite on retrouve donc les ligands LE, Tyr//GlyLE, Phe//Leu B, Phe//Leu A, Gly//PheLE A, Gly//GlyLE et Gly//PheLE B, en ordre décroissant

d'affinité pour DOPR. Le tableau 3 présente les valeurs de la constante d'inhibition de la liaison ( $K_i$ ) calculées pour chacun des composés. Cette valeur représente la concentration de ligand nécessaire pour déplacer la moitié du ligand  $^3\text{H}$ -dlt II lié sur DOPR. Cette valeur est calculée à partir des résultats des courbes de la figure 13 en incorporant à l'équation de Cheng-Prusoff le  $K_D$  du ligand radioactif, soit 1 nM, la concentration de la  $^3\text{H}$ -dlt II utilisée pour les essais, ainsi que l' $\text{EC}_{50}$  mesuré pour chacun des composés (mesure obtenue par les tracés illustrés à la figure 13).

Ligands	Valeurs de $K_i$ (nM) moyenne (n = 3)	SEM (nM)
LE	7.8	1.2
Tyr//GlyLE	15.3	6.8
Gly//GlyLE	960	78.6
Gly//PheLE A	639	23.3
Gly//PheLE B	> 5000	-
Phe//Leu A	261	24.2
Phe//Leu B	164	30.6

**Tableau 3. Valeurs de  $K_i$  des ligands testés en essais de liaison.** Les valeurs ont été obtenues à partir des résultats de la figure 13 à l'aide de l'équation Cheng-Prusoff. La LE et l'analogue Tyr//GlyLE possèdent les meilleures affinités pour DOPR.

Nos résultats indiquent que le ligand Tyr//GlyLE est l'analogue enképhalinergique qui possède la meilleure affinité pour DOPR. En effet, son  $K_i$  se rapproche de celui obtenu pour la LE. Viennent ensuite en ordre décroissant d'affinité, les ligands Phe//Leu B, Phe//Leu A et Gly//PheLE A, avec des valeurs respectives de  $K_i$  de 164, 261 et 639 nM. Enfin, les ligands Gly//GlyLE et

Gly//PheLE B sont de moins bons ligands pour DOPR possédant des affinités de l'ordre du micromolaire (Gly//PheLE B) ou presque (Gly//GlyLE).

#### **4.2 Induction de l'internalisation de DOPR-GFP**

Puisqu'il est connu que la majorité des agonistes de DOPR induisent son internalisation (PEI *et al.*, 1995), une première façon simple d'évaluer l'efficacité des analogues synthétisés à activer DOPR a été d'utiliser la lignée cellulaire d'origine neuronale, les cellules DRGF11. À l'aide d'une population de DRGF11 dans laquelle DOPR-GFP était transfecté, nous avons pu suivre le déplacement du récepteur suite à l'ajout des ligands (le tag GFP étant une protéine fluorescente). La capacité d'internalisation de DOPR par la dlt II étant connue, les résultats étaient comparés systématiquement avec ceux observés suite à l'ajout de dlt II. Les essais avec chacun des ligands à tester ont d'abord été effectués avec une concentration de 100 nM. La figure 14 présente des images prises avant (contrôle) et 35 minutes après le traitement pour chacun des ligands.

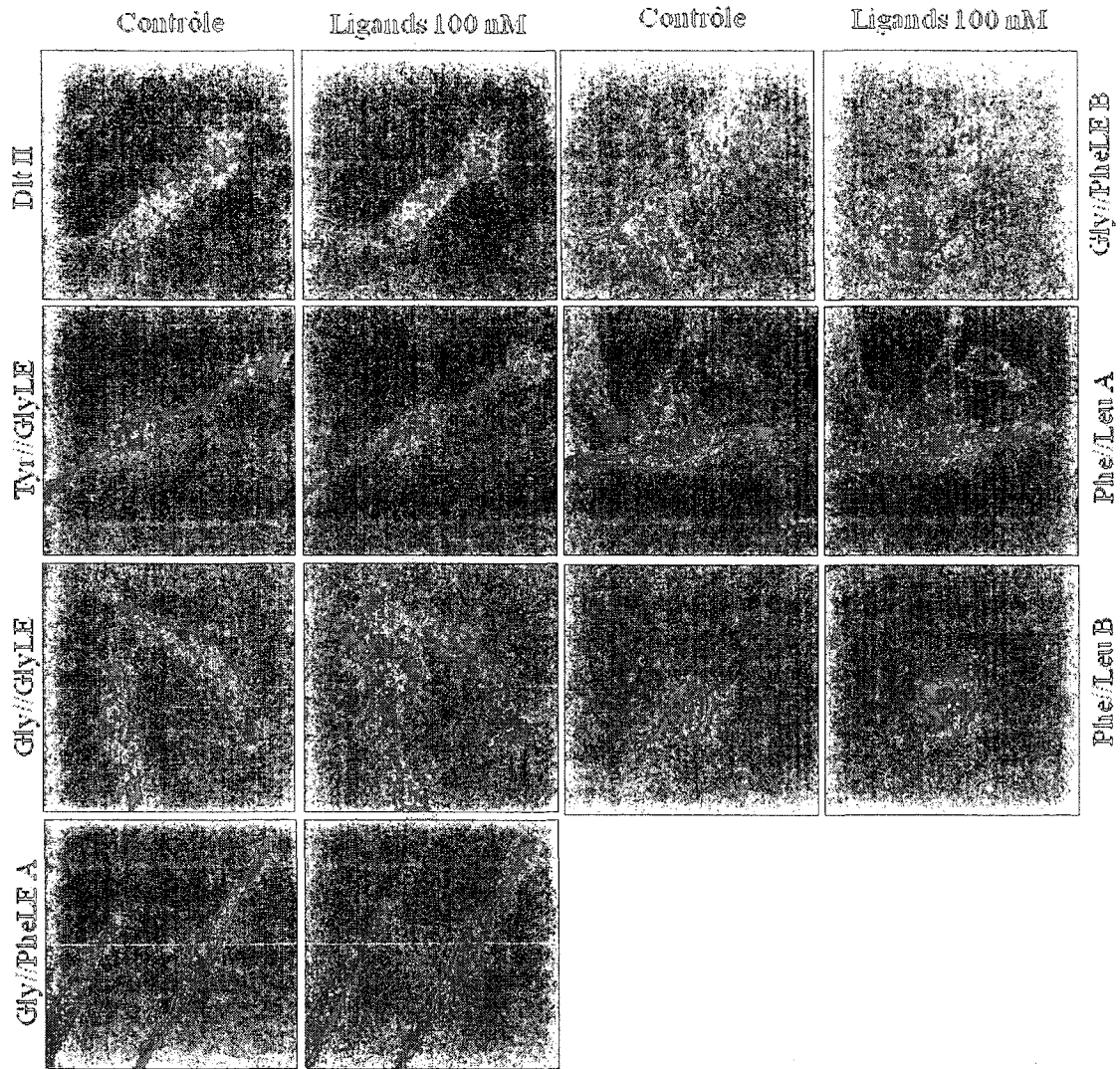


Figure 14. Mesure de la capacité des analogues, à une concentration de 100 nM, d'induire l'internalisation de DOPR-GFP. Photos de microscopie en fluorescence montrant le déplacement de DOPR-GFP suite à la stimulation par les différents analogues en comparaison avec l'internalisation induite par la dlt II. La photo contrôle est prise avant le traitement et la seconde, 35 minutes après l'application du ligand. L'analogue Tyr//GlyLE semble pouvoir induire une internalisation de DOPR-GFP comparable à ce qui est obtenu avec la dlt II. Au contraire, les autres analogues semblent en être incapables.

D'abord, en situation contrôle, c'est-à-dire à l'état basal, DOPR-GFP est principalement exprimé à la surface cellulaire. En effet, nous observons que le

contour des neurones est bien défini par l'expression membranaire de DOPR-GFP. Trente-cinq (35) minutes après l'application d'une concentration de 100 nM de dlt II, très peu de récepteurs taggés à la GFP semblent encore présents à la membrane indiquant que l'activation de DOPR-GFP par la dlt II a induit l'internalisation du complexe ligand-récepteur. L'augmentation du marquage fluorescent dans des structures intracellulaire vésiculaires suggère en effet la présence de DOPR-GFP dans des vésicules d'internalisation. Pour ce qui est des analogues étudiés, l'application d'une concentration de 100 nM de l'analogue Tyr//GlyLE semble induire l'internalisation de DOPR-GFP de façon similaire à la dlt II puisque le signal fluorescent du contour de la cellule se transpose en marquage de type vésiculaire. Pour leurs parts, les autres analogues testés ne semblent pas avoir la capacité d'induire l'internalisation de DOPR-GFP, du moins à une concentration de 100 nM. Notons que si certaines cellules semblent s'être déplacées au cours des 35 minutes suivant l'application du ligand, le contour de celles-ci est encore très bien défini, suggérant que DOPR-GFP se retrouve encore majoritairement à la surface cellulaire.

Suite à ces observations, d'autres essais avec les analogues n'ayant pas induit d'internalisation ont été effectués avec une concentration de 10  $\mu$ M. Enfin, 35 minutes plus tard, l'ajout de dlt II à une concentration de 100 nM était effectuée. Cette stratégie devait nous permettre de déterminer si l'analogue testé pouvait agir en tant qu'antagoniste de DOPR.

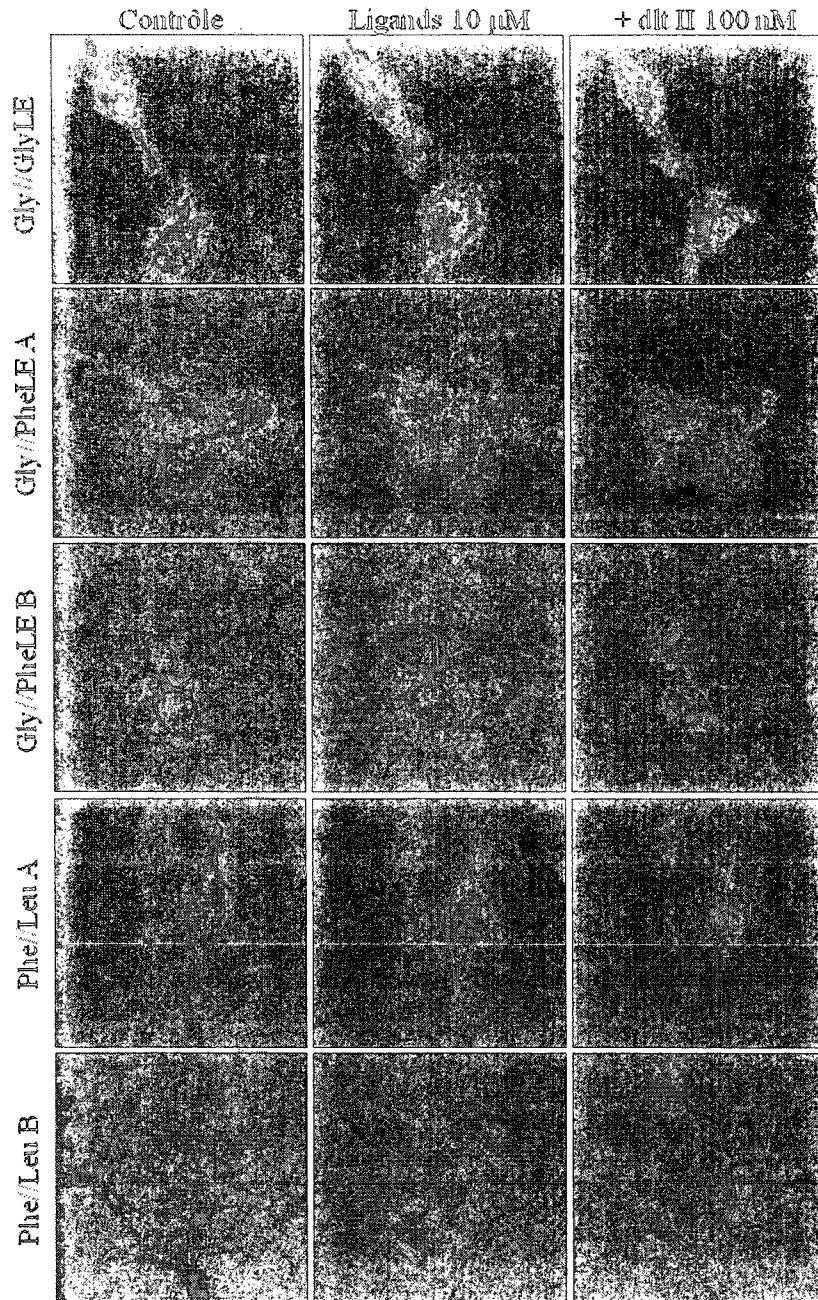


Figure 15. Mesure de la capacité de certains analogues, à une concentration de 10  $\mu$ M, d'induire l'internalisation de DOPR-GFP. Photos de microscopie en fluorescence montrant le déplacement de DOPR-GFP suite à la stimulation par certains ligands, suivi de l'ajout de dlt II à 100 nM 35 minutes après. La photo contrôle est prise avant le premier traitement, la seconde, 35 minutes après l'application des analogues, et la troisième, 35 minutes après l'application de dlt II. Les analogues Gly//PheLE A, Phe//Leu A et Phe//Leu B semblent être en mesure d'induire l'internalisation de DOPR-GFP, tandis que les analogues Gly//GlyLE et Gly//PheLE B en sont incapables.

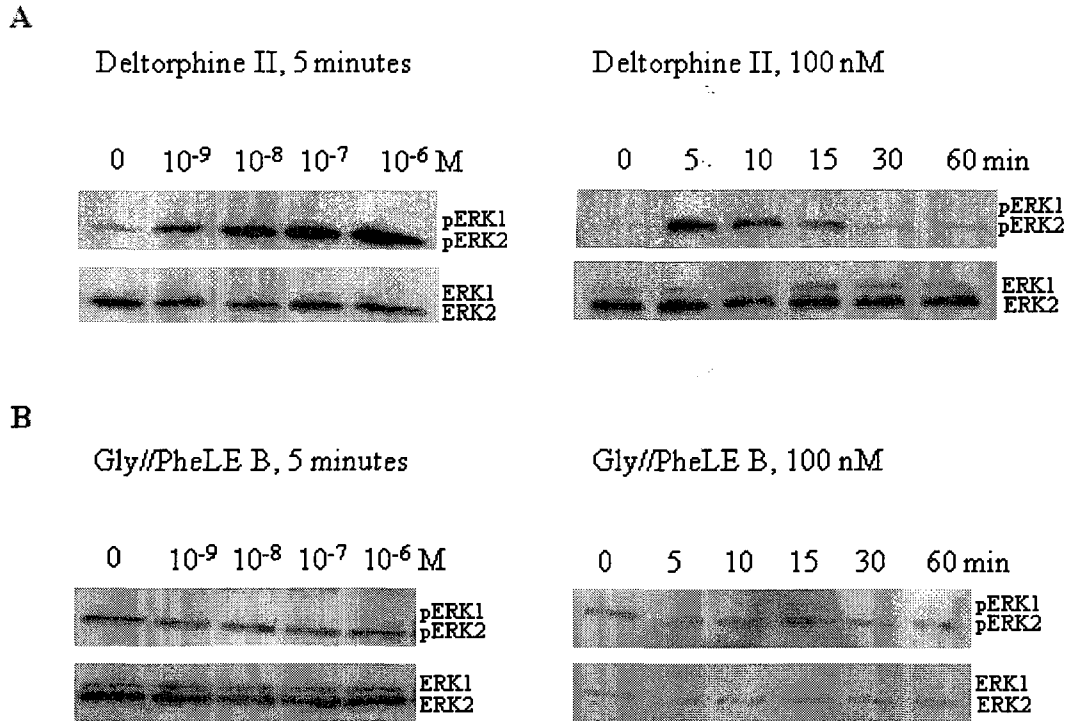


Les illustrations montrées à la figure 15 indiquent que l'analogue Phe//Leu B semble induire une internalisation de DOPR-GFP comparable à celui induit par 100 nM de dlt II (voir figure 14), le contour de la cellule n'étant plus défini et l'ajout de dlt II n'entraînant pas de changements supplémentaires. Ce résultat est cohérent avec le fait que l'analogue Phe//Leu B détient la meilleure affinité pour le récepteur (voir tableau 3) après l'analogue Tyr//GlyLE. De leurs côtés, les analogues Gly//PheLE A et Phe//Leu A semblent être capables d'induire une certaine internalisation qui est cependant plus importante suite à l'ajout de dlt II. Enfin, les analogues Gly//GlyLE et Gly//PheLE B ne semblent posséder aucune capacité à induire l'internalisation de DOPR-GFP sans toutefois pouvoir bloquer l'activité de la dlt II qui, à 100 nM, parvient toujours à induire l'internalisation de DOPR-GFP même en présence du composé à l'étude. Par ces essais, les ligands Gly//GlyLE et Gly//PheLE ne semblent ni être agoniste, ni antagoniste. Ces observations appuient les données des études de liaison qui indiquent que ces deux composés n'ont qu'une affinité très faible pour DOPR (c'est-à-dire de l'ordre du mM).

#### **4.3 Activation de la voie des MAP kinases ERK1/2**

Une autre façon d'évaluer l'activité biologique des ligands synthétisés sur DOPR consiste à regarder au niveau d'une voie de signalisation connue pour être activée suite à la liaison de DOPR par un agoniste. Or, l'activation de la voie des MAP

kinases ERK1/2 est connue pour être induite lors de l'activation de DOPR, menant à une augmentation de la phosphorylation des protéines kinases ERK1 et ERK2 (BURT *et al.*, 1996; FUKUDA *et al.*, 1996). L'utilisation d'un anticorps reconnaissant les formes phosphorylées de ces kinases ERK1/2, suivi d'une détection des kinases ERK1/2 totales (phosphorylées ou non), permet l'évaluation de l'activation de cette voie, par rapport au contrôle, relative à la phosphorylation induite par les différents analogues synthétisés. Cette analyse a été effectuée sur des cellules DRGF11, qui expriment DOPR et aucun autre des récepteurs opioïdiques. Nous avons traité les cellules avec des concentrations croissantes d'analogues (1 nM, 10 nM, 100 nM et 1  $\mu$ M) pour une durée fixe de 5 minutes, ou encore, selon une cinétique (5, 10, 15, 30 et 60 minutes) avec une concentration fixe de 100 nM ou de 10  $\mu$ M (selon le cas) des différents composés. L'électrophorèse des protéines cytosoliques extraites de ces cellules traitées suivie du transfert sur une membrane de PVDF et de l'immunobuvardage de type western permet la détection des protéines ERK1/2 phosphorylées et totales, comme le montre la figure 16.



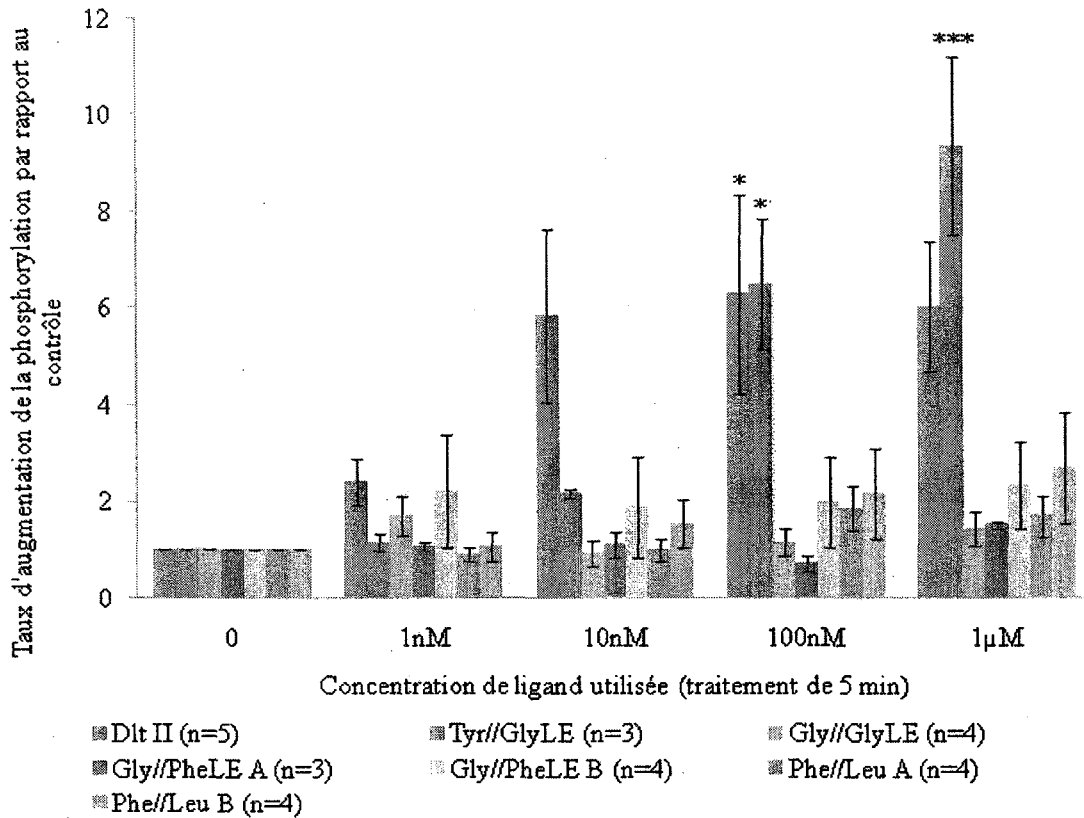
**Figure 16. Analyse du niveau de phosphorylation des protéines kinases ERK1/2.** Détection des protéines kinases ERK1/2 phosphorylées (pERK1/2) et totales (ERK1/2) par immunobuvardage de type western dont la révélation était faite à l'aide d'un système ECL.

- A) Activation par la dlt II dépendante de la concentration pour un traitement de 5 minutes (gauche) et cinétique d'activation par un traitement à une concentration de 100 nM (droite). L'application de dlt II induit une augmentation transitoire (maximum à 5 minutes) de la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 de façon concentration-dépendante (maximum à 10<sup>-6</sup> M)
- B) Activation par le ligand Gly//PheLE B dépendante de la concentration par un traitement de 5 minutes (gauche) et cinétique d'activation par un traitement à une concentration de 100 nM (droite). L'application de Gly//PheLE B semble n'induire aucune augmentation des niveaux de phosphorylation, le résultat obtenu avec chacune des conditions de stimulation (concentrations et durées) ne montrant pas de différences avec les contrôles (0).

Après 5 minutes de stimulation, la dlt II entraîne une phosphorylation des ERK1/2 dépendante de la concentration (Figure 16A; panneau de gauche). Cette augmentation des niveaux de phosphorylation de ERK1/2 par la dlt II à 100 nM est fonction du

temps, avec un maximum de phosphorylation atteint après 5 minutes de stimulation (Figure 16A; panneau de droite). À la Figure 16B est présenté un exemple de résultat obtenu avec un des ligands (le Gly//PheLE B) qui semble incapable d'activer la voie ERK1/2. Dans ce cas, ni l'augmentation de la concentration ni la durée du traitement avec l'analogue n'ont d'effet sur les niveaux de phosphorylation des ERK1/2.

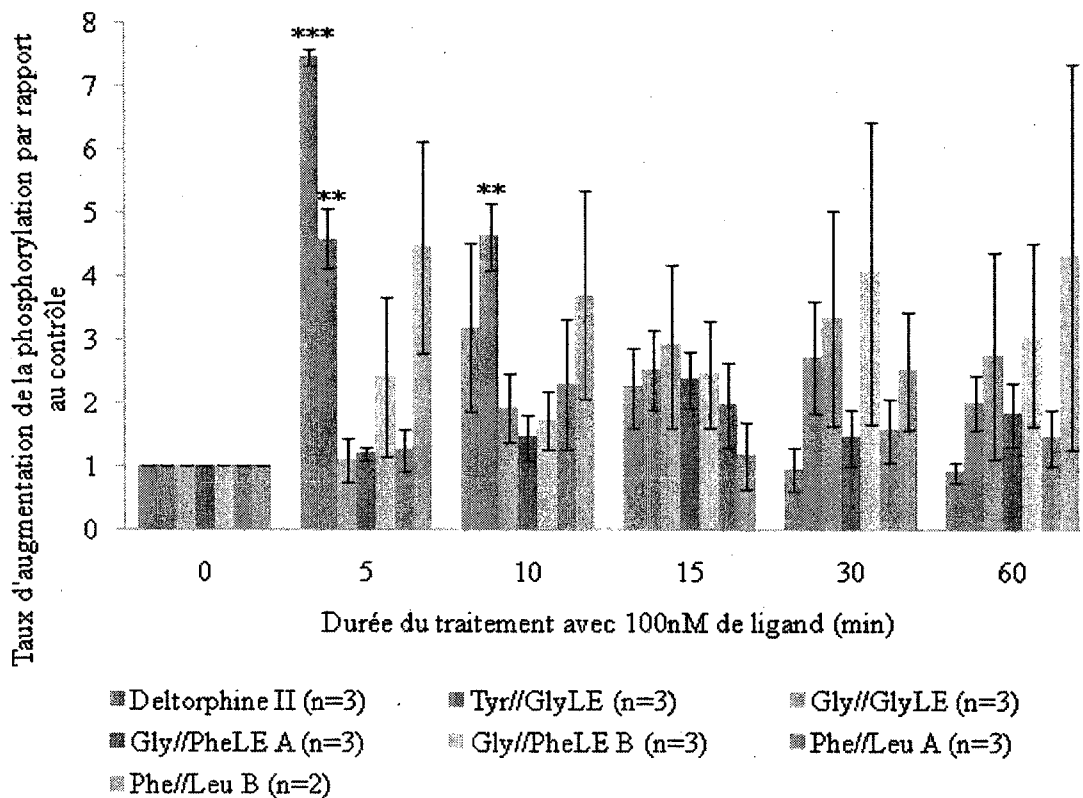
Une analyse densitométrique de l'intensité des bandes ERK1/2 phosphorylées (p-ERK1/2) rapportée sur celle des bandes ERK1/2 totales permet d'évaluer de façon semi-quantitative les taux d'augmentation de la phosphorylation. Ainsi, le graphique de la figure 17 présente les taux d'augmentation de la phosphorylation par rapport au contrôle (valeur relative fixée à 1) en fonction de la concentration du traitement appliqué aux cellules et ce, pour chacun des analogues testés.



**Figure 17. Mesure de l'augmentation du taux de phosphorylation des ERK1/2 en fonction de la concentration des analogues.** Graphique des activations de la voie ERK1/2, dépendantes de la concentration, obtenues par l'application des ligands pour une durée de 5 minutes. Seul l'analogue Tyr//GlyLE présente une augmentation de la phosphorylation significative, comme le fait la dlt II. Significativité: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; en comparaison aux cellules non traitées (0). Analyse statistique one-way ANOVA suivi d'un test de Dunnett.

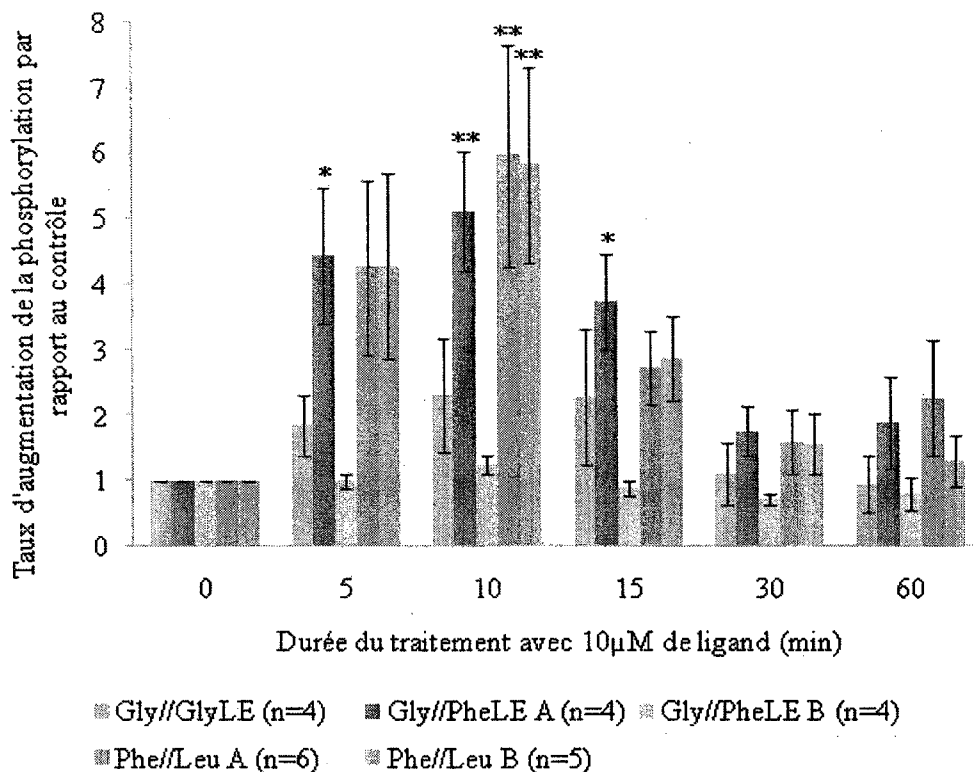
La figure 17 démontre qu'un seul des analogues synthétisés, le Tyr//GlyLE, semble posséder la capacité d'induire l'activation de la voie ERK1/2 aux mêmes concentrations que la dlt II. En effet, l'analyse statistique confirme que l'augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 est significative par rapport au contrôle (0) pour un traitement à 100 nM ainsi qu'à 1 µM. Nous remarquons aussi que la dlt II possède un certain effet d'activation à partir de 10 nM, bien que celle-ci

ne soit pas statistiquement significative, alors que l'analogue Tyr//GlyLE ne semble avoir aucun effet avant 100 nM. Enfin, en ce qui concerne les autres analogues, même une concentration de l'ordre du micromolaire est insuffisante pour augmenter de façon significative la phosphorylation des ERK1/2. D'autre part, la figure 18 présente le graphique des résultats de l'analyse densitométrique des cinétiques d'activation avec une concentration de 100 nM.



**Figure 18. Mesure de l'augmentation du taux de phosphorylation des ERK1/2 en fonction de la durée du traitement avec 100 nM des analogues.** Graphique des cinétiques d'activation de la voie ERK1/2 obtenues par l'application des analogues. L'analogue Tyr//Gly présente une augmentation de la phosphorylation qui semble transitoire (5 et 10 minutes) de la même manière que la dlt II. Significativité: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; en comparaison aux cellules non traitées (0). Analyse statistique one-way ANOVA suivi d'un test de Dunnett.

Encore une fois, nos résultats indiquent que seul l'analogue Tyr//GlyLE augmente la phosphorylation ERK1/2 de façon comparable à ce qui est obtenu avec la dlt II, c'est-à-dire que cette activation semble transitoire, avec des niveaux d'augmentation significatifs pour un traitement de 5 minutes (dlt II) ou pour des durées de 5 et 10 minutes (Tyr//GlyLE). Pour ce qui est des autres analogues, qui n'ont pas d'effet significatif à une concentration de 100 nM, nous avons tenté des stimulations (cinétiques) avec une concentration de 10  $\mu$ M, et cela, puisque certains ligands semblaient tout de même avoir certains effets d'augmentation des niveaux de phosphorylation des ERK1/2 (bien que non significatifs).

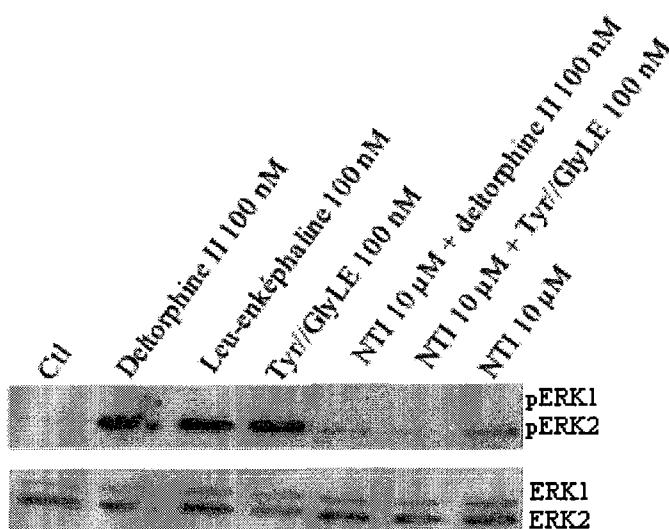


**Figure 19. Mesure de l'augmentation du taux de phosphorylation des ERK1/2 en fonction de la durée du traitement avec 10 µM de certains analogues.** Graphique des cinétiques d'activation de la voie ERK1/2 obtenues par l'application de certains analogues. Les analogues Gly//PheLE A, Phe//Leu A et Phe//Leu B présente une augmentation de la phosphorylation significative surtout pour un traitement de 10 minutes. Significativité: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; en comparaison aux cellules non traitées (0). Analyse statistique one-way ANOVA suivi d'un test de Dunnett.

Ainsi, comme montré à la figure 19, les ligands Gly//PheLE A, Phe//Leu A et Phe//Leu B semblent induire une augmentation du taux de phosphorylation de façon significative, ayant leur maximum d'effet à 10 minutes, plutôt qu'à 5 minutes comme la dlt II le fait. Quant à eux, les ligands Gly//GlyLE et Gly//PheLE B n'induisent aucune augmentation significative, ce qui confirme les résultats déjà présentés aux figures 17 et 18.



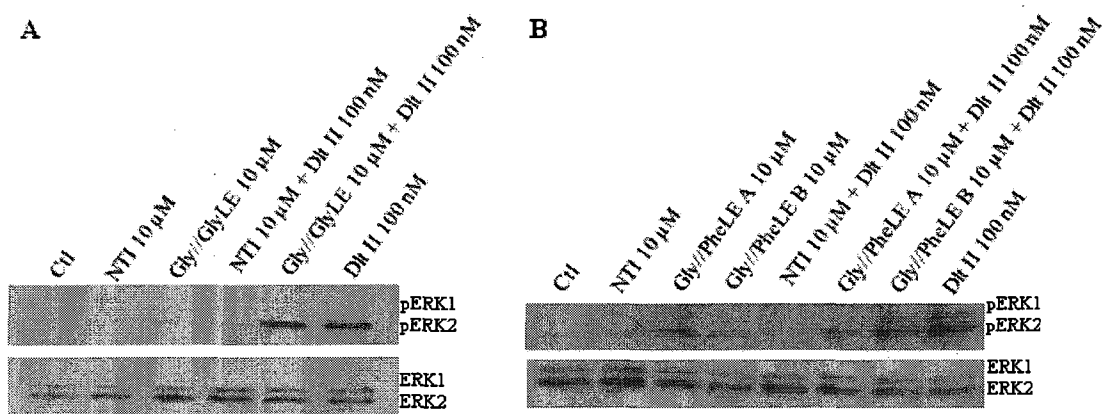
Dans un deuxième temps, afin de s'assurer que ces augmentations de la phosphorylation des ERK1/2 par l'analogue Tyr//GlyLE se font bien via DOPR, des essais avec l'antagoniste compétitif sélectif pour DOPR, le NTI, ont été effectués. Ainsi, le résultat d'immunobuvardage de la figure 20 montre bien que l'effet d'activation de cette voie par le Tyr//GlyLE est bloqué par un prétraitement de 15 minutes avec 10  $\mu$ M de NTI, tout comme l'effet de la dlt II peut l'être.



**Figure 20.** Effet de l'antagoniste de DOPR, le NTI, sur la phosphorylation des ERK1/2 par l'analogue Tyr//GlyLE et la dlt II. Détection des protéines kinases ERK1/2 phosphorylées (pERK1/2) et totales (ERK1/2) par immunobuvardage de type western dont la révélation est faite à l'aide d'un système ECL. L'effet d'augmentation de la phosphorylation par l'analogue Tyr//GlyLE 100 nM (5 minutes) est inhibé par un pré traitement avec le NTI 10 $\mu$ M (15 minutes), de la même façon que l'est celui de la dlt II 100 nM (5 minutes).

D'un autre côté, la possibilité que certains des autres analogues puissent être des antagonistes de DOPR a aussi été évaluée. À la Figure 21A, nous observons qu'un prétraitement de 15 minutes avec 10  $\mu$ M du ligand Gly//GlyLE ne semble pas bloquer l'effet d'activation de 100 nM de dlt II, les niveaux de phosphorylation des ERK1/2

étant équivalents à ceux obtenus avec le traitement à la dlt II seule. La comparaison avec l'effet bloquant du prétraitement avec l'antagoniste NTI sur la réponse induite par la dlt II met en évidence cette observation. L'essai a aussi été effectué avec les ligands Gly//PheLE A et Gly//PheLE B (figure 21B). Dans ce cas, un traitement avec 10  $\mu$ M de ces ligands semble activer légèrement la phosphorylation des ERK1/2, si l'on compare à la situation contrôle. Malgré cela, aucun blocage de l'effet de la dlt II n'est observé, confirmant que ces ligands ne sont pas antagonistes de DOPR.

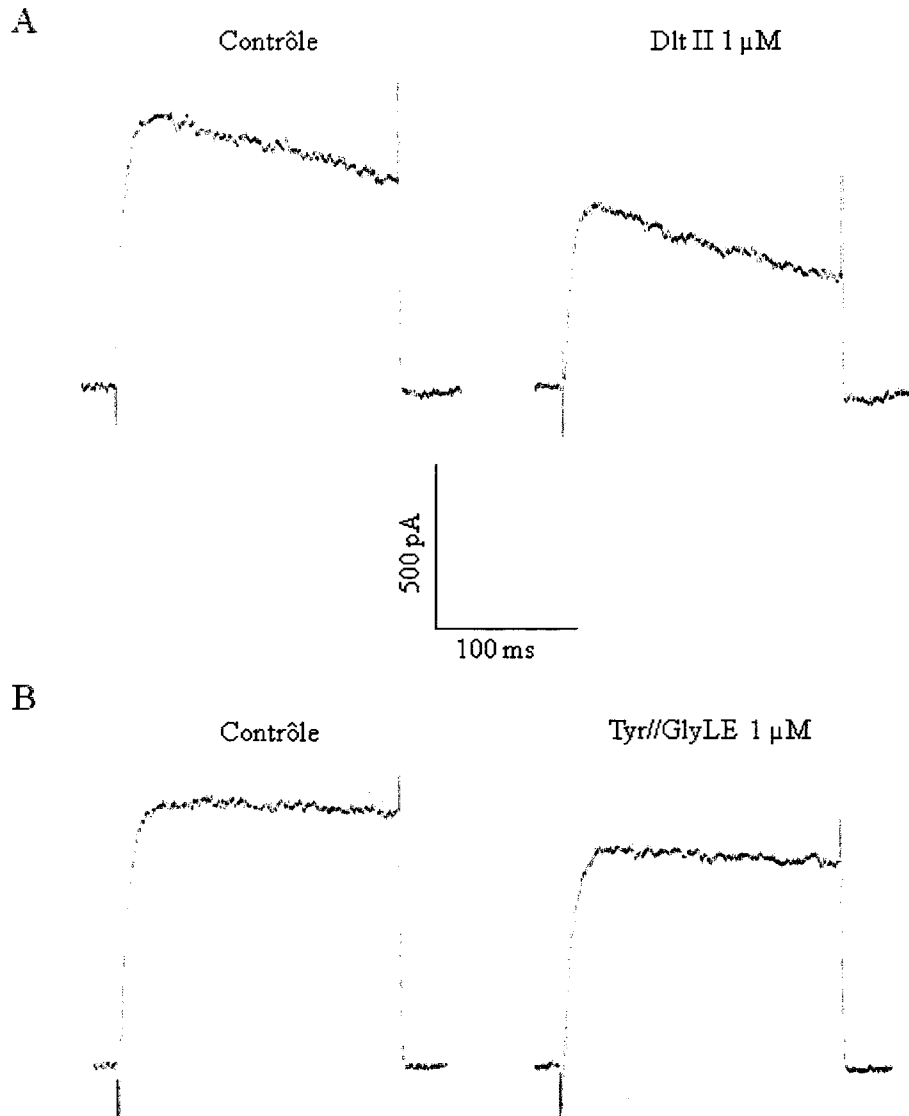


**Figure 21. Effet d'un prétraitement de 10  $\mu$ M avec certains analogues sur la phosphorylation des ERK1/2 par la dlt II.** Détection des protéines kinases ERK1/2 phosphorylées (pERK1/2) et totales (ERK1/2) par immunobuvardage de type western dont la révélation est faite à l'aide d'un système de chimiluminescence (ECL). Effets de pré traitements avec les analogues Gly//GlyLE (A), Gly//PheLE A et Gly//PheLE B (B) sur l'augmentation de la phosphorylation par la dlt II, en comparaison avec l'effet d'inhibition de l'antagoniste NTI. L'analogue Gly//GlyLE ne bloque pas l'effet d'augmentation de la phosphorylation de la dlt II. Les analogues Gly//PheLE A et Gly//PheLE B semble avoir un certain effet sur l'augmentation de la phosphorylation de la dlt II. D'ailleurs, une augmentation de la phosphorylation est observée avec ces ligands utilisés à une concentration de 10  $\mu$ M.

#### 4.4 Effet sur un courant potassique

Afin de parvenir à bloquer la conduction neuronale et donc à produire un effet antidouleur, les opiacés, par la liaison à leurs récepteurs, ont la capacité de moduler différents courants ioniques neuronaux, agissant ainsi sur la génération de potentiel d'action et/ou sur la libération de neurotransmetteurs. Entre autres et comme mentionné dans l'introduction, il est connu que l'activation de DOPR mène à l'inhibition d'un courant cationique entrant, le courant  $I_h$  (INGRAM et WILLIAMS, 1994). Ainsi, nous nous sommes d'abord intéressés à ce courant et bien que nous ayons été capables de l'enregistrer au niveau des neurones de DRG (culture primaire) au départ, d'importantes difficultés à obtenir une jonction étanche puis à la maintenir assez longtemps pour permettre l'enregistrement du courant nous ont ensuite mené vers un autre modèle cellulaire. Nous avons donc appliqué la technique de patch clamp sur les cellules DRGF11/DOPR-GFP, avec lesquelles nous avons aussi rencontré d'importantes difficultés. Enfin, c'est avec les cellules GH3/DOPR que nous avons réussi à maintenir des jonctions étanches assez longtemps pour permettre l'enregistrement d'un courant. Malheureusement, le courant que nous voulions évaluer au départ, soit le courant  $I_h$ , n'était que très rarement présent dans ces cellules et était d'une trop faible amplitude lorsqu'on le trouvait. Nous avons donc décidé d'enregistrer un courant d'une plus grande amplitude dans ces cellules. C'est en mesurant un courant potassique sortant global que nous avons évalué l'effet d'un des ligands synthétisés, le Tyr//GlyLE, en comparaison avec celui de la dlt II. Les expérimentations de voltage clamp en configuration cellule entière ont été faits avec

des milieux extracellulaires et intracellulaires (intrapipettes) ne bloquant aucun courant, un courant potassique sortant global stimulé par dépolarisation était ainsi enregistré. En effet, suite à la formation de la jonction étanche entre la pipette d'enregistrement et la cellule, un potentiel de membrane de -80 mV était imposé. Un protocole de dépolarisation où le potentiel appliqué passait de -80 mV à +60 mV permettait l'enregistrement d'un courant potassique sortant. La figure 22 présente des exemples de ce courant enregistré avant (contrôle) et suivant l'ajout de 1  $\mu$ M de dlt II (en A) ou d'analogue Tyr//GlyLE (en B) dans le milieu extracellulaire.



**Figure 22. Modulation d'un courant potassique sortant global activé par dépolarisation (-80 mV à +60 mV) par l'application de dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE. L'application de 1 μM de dlt II (A) ou de 1 μM de l'analogue Tyr//GlyLE (B) induit une diminution du courant potassique sortant global enregistré.**

Il est possible de constater que lors de ces 2 expérimentations, la dlt II ainsi que l'analogue Tyr//GlyLE ont tous les deux induit une diminution du courant potassique enregistré. En effet, dans ces deux cas, les courants enregistrés suite à l'application de

dlt II et de Tyr//GlyLE étaient respectivement diminués de 17 % et 18 % par rapport aux courants enregistrés en condition contrôle. Le tableau 4 présente un résumé des effets obtenus sur ce courant potassique suite à l'application de différentes concentrations de dlt II ou de ligand Tyr//GlyLE.

Ligands (concentrations)	Effets obtenus	Nombre de cellules
Dlt II(500 nM)	Diminution 24,3 ± 1,2 %	2
Dlt II(1 µM)	Diminution 15,3 ± 4,7 %	8
	Augmentation 12,1 ± 6,1 %	2
Dlt II(10 µM)	Diminution 23,5 ± 3,5 %	2
	Augmentation 13,9 %	1
Tyr//GlyLE (500 nM)	Diminution 12,6 ± 8,2 %	5
	Augmentation 11,7 %	1
	Diminution 19,8 ± 10,2 %	4
Tyr//GlyLE (1 µM)	Augmentation 7,7 ± 4,9 %	2
	Aucun effet	1
Tyr//GlyLE (10 µM)	Diminution 7,9 %	1

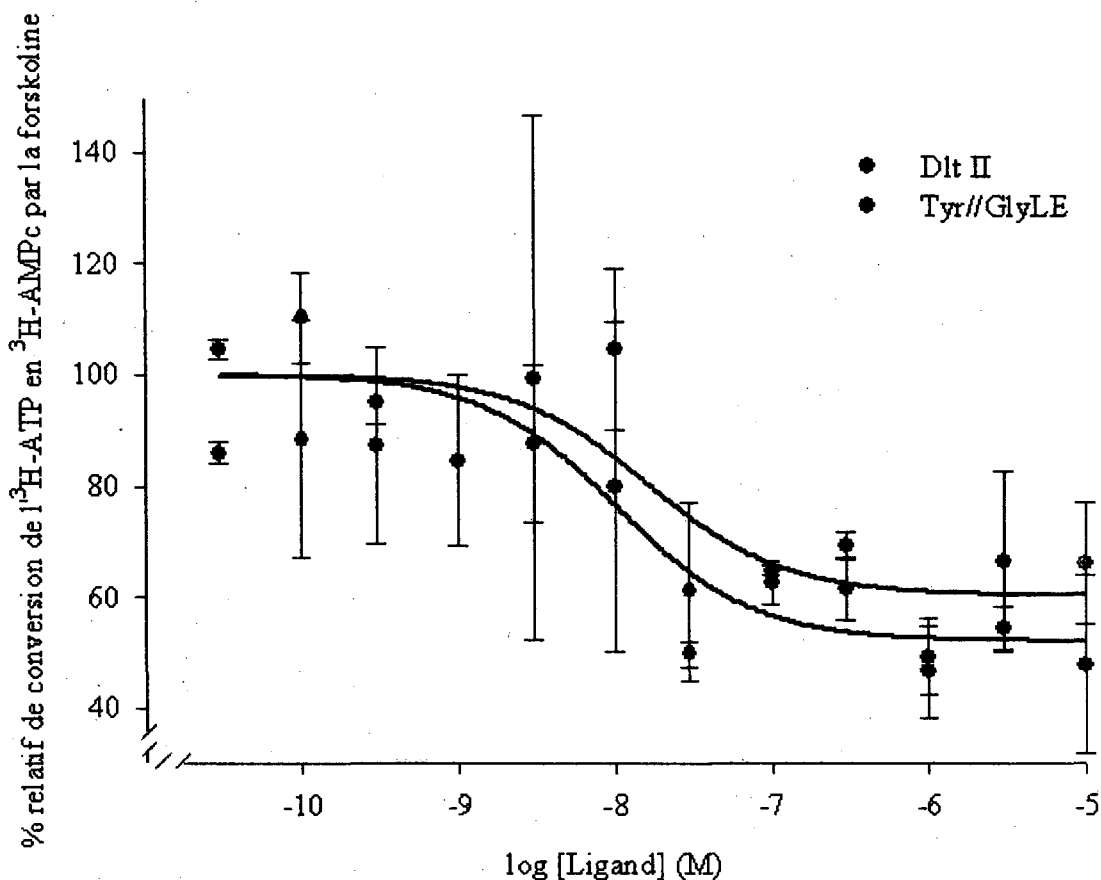
**Tableau 4. Ensemble des effets de la dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE sur un courant potassique sortant global.** Bien que différents effets aient été obtenus selon la cellule testée et les différentes concentrations appliquées, la dlt II et le ligand Tyr//GlyLE semblent avoir eu des effets comparables sur ce courant potassique.

Ainsi, nos résultats indiquent que, en fonction des cellules testées et des concentrations ajoutées, l'effet obtenu peut être une diminution ou une augmentation du courant potassique sortant global. L'effet le plus souvent observé (i.e. avec le plus grand nombre de cellules) consiste en une diminution, et ce, autant avec l'application

de dlt II qu'avec celle de ligand Tyr//GlyLE. Ainsi, le ligand Tyr//GlyLE semble pouvoir induire les mêmes effets que ceux induits par la dlt II sur un courant potassique sortant global.

#### 4.5 Inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc

Comme mentionné précédemment, l'activation des récepteurs couplés aux protéines  $G_i$ , dont DOPR, mène à l'inhibition de l'adénylyl cyclase et donc, à une diminution de la conversion de l'ATP intracellulaire en AMPc (COSTA *et al.*, 1985). Par l'incubation des cellules GH3/DOPR avec un excès d'adénine tritiée ( $^3\text{H}$ -adénine), les sources cellulaires de nucléotides ATP sont marquées au tritium et la conversion de l'ATP en AMPc peut être suivie. La stimulation des cellules avec les ligands à tester a permis la détermination du degré d'inhibition, via l'activation de DOPR, de cette conversion de l'ATP en AMPc stimulée par la forskoline, activateur direct de l'adénylyl cyclase. Ce test *in vitro* représente une manière quantitative et très sensible d'évaluer les différents ligands à tester pour leur capacité à activer DOPR. Jusqu'à maintenant, un des analogues ainsi que la dlt II ont été testés. La figure 23 présente le graphique du pourcentage relatif de conversion de l' $^3\text{H}$ -ATP en  $^3\text{H}$ -AMPc par la forskoline en fonction de la concentration de ligand DOPR ajoutée.



**Figure 23. Mesure de l'inhibition de la conversion de l'<sup>3</sup>H-ATP en <sup>3</sup>H-AMPC de la dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE.** Courbe représentant la diminution de la conversion de l'ATP en AMPc induite par la forskoline en fonction de la concentration de ligand de DOPR ajouté. La dlt II et l'analogue Tyr//GlyLE peuvent induire une diminution du pourcentage relatif de conversion de façon comparable. (n = 2)

Par les courbes obtenues, bien que les variations soient importantes pour chaque duplicata, nous observons que la dlt II et l'analogue Tyr//GlyLE ont le pouvoir de diminuer les taux de conversion de l'ATP en AMPc induits par la forskoline, et ce, de façon comparable. Par ces courbes, il est ensuite possible de déterminer une valeur de IC<sub>50</sub>, c'est-à-dire la concentration pour laquelle 50 % de la conversion est inhibée. Cette détermination a été réalisée à l'aide du logiciel SigmaPlot. Les valeurs d'IC<sub>50</sub>

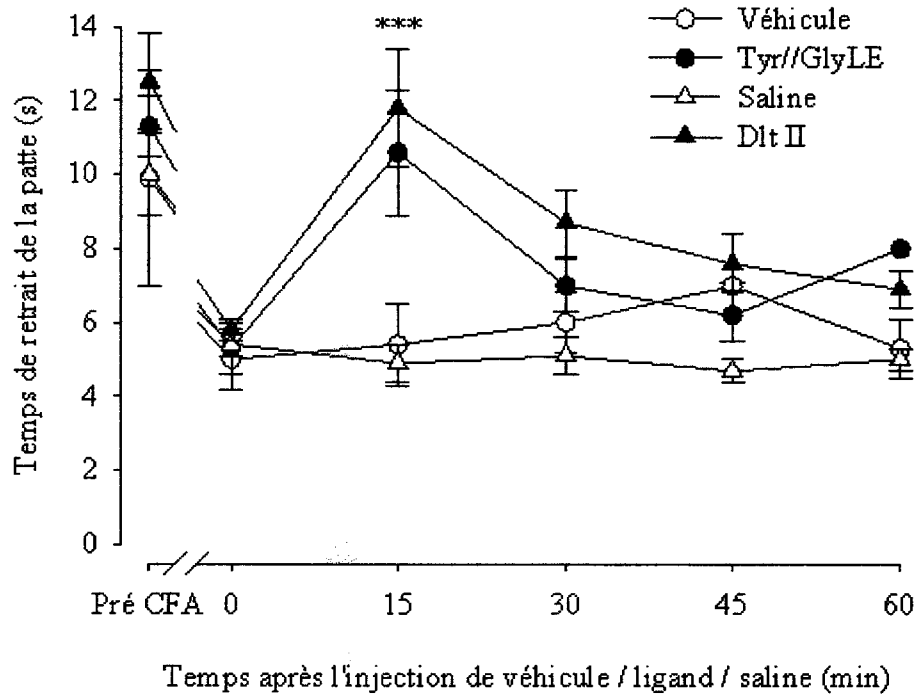


obtenues pour chacun des essais réalisés jusqu'à maintenant avec la dlt II (56.7 et 0.049 nM) et l'analogue Tyr//GlyLE (1.2 et 38.7 nM) indiquent des écarts importants entre les 2 essais effectués avec chacun des ligands, tout comme le laissaient croire les erreurs standards des courbes de la figure 23. Ces résultats ne permettent donc pas la détermination d'une valeur d'IC<sub>50</sub> qui soit fiable.

#### 4.6 Effet antihyperalgésique

Le but premier de concevoir, de synthétiser et enfin, de caractériser de nouveaux ligands susceptibles de lier DOPR étant la recherche de nouveaux composés antidouleurs, l'étape suivant l'évaluation *in vitro* consiste à l'évaluation *in vivo* sur un modèle animal de douleur. Ainsi, un modèle d'inflammation sub-chronique (72 heures) chez le rat a permis l'évaluation de l'effet anti-hyperalgésique d'un des analogues au moyen de la méthode de Hargreaves. Trois (3) animaux ont été testés pour l'injection de véhicule. Le véhicule dans lequel est dissout le ligand Tyr//GlyLE consiste en une solution de saline contenant 0.7 % de DMSO. Six (6) animaux ont été testés pour chacune des injections de Tyr//GlyLE, saline (véhicule de la dlt II) et dlt II. La figure 24 montre le graphique du temps de retrait de la patte ipsilatérale (inflammée) en fonction du temps suivant l'injection intrathécale (véhicule / saline / ligand). Les valeurs pré CFA constituent les mesures prises avant l'induction de l'inflammation par l'injection de CFA (adjuvant complet de Freund) dans la patte ipsilatérale. Les valeurs au temps 0 constituent les mesures prises 72 heures après

l'induction de l'inflammation, mais avant l'injection intrathécale des véhicule / saline / ligands.



**Figure 24. Mesure de l'effet antihyperalgésique de la dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE. Graphique montrant le temps de retrait de la patte ipsilatérale en fonction du temps suivant l'injection intrathécale.** Le temps de retrait au temps 0 étant diminué démontre l'induction d'une hyperalgésie dans la patte ipsilatérale. Contrairement aux injections de véhicule et de saline, l'injection de l'analogue Tyr//GlyLE et de dlt II induisent un effet antihyperalgésique transitoire (15 minutes suivant l'injection), les temps de retrait de la patte étant comparables aux temps obtenus en condition normale (pré CFA). Significativité: \*\*\*  $p < 0,001$ ; en comparaison avec l'injection de saline. Analyse statistique two-way ANOVA suivi d'un test de Bonferroni.

D'abord, nous observons que le temps de retrait de la patte au temps 0 est diminué d'environ de moitié par rapport au temps de retrait en condition normale, c'est-à-dire au temps « pré CFA », ce qui indique qu'une hyperalgésie s'est bien développée dans la patte ipsilatérale. Pour chacune des conditions, des mesures de la patte

controlatérale étaient aussi prises, les temps de retrait ne variant pas de façon significative en comparaison avec la condition pré CFA (résultats non montrés). L'injection du véhicule de l'analogue Tyr//GlyLE, pas plus que l'injection de saline, n'induisent d'effet antihyperalgésique, les temps de retrait de la patte suivant leur injection n'étant pas significativement différents de ceux au temps 0. D'autre part, puisque les temps de retrait de la patte suite à l'injection (15 minutes) de dlt II et de l'analogue Tyr//GlyLE sont significativement augmentés par rapport à ceux obtenus pour l'injection de saline, cela indique que ces deux ligands, agonistes de DOPR, ont eu des effets antihyperalgésiques. Ces effets sont transitoires, les temps de retrait de la patte n'étant plus significativement différents de ceux de l'injection de saline pour les temps 30, 45 et 60 minutes suivant l'injection des ligands.

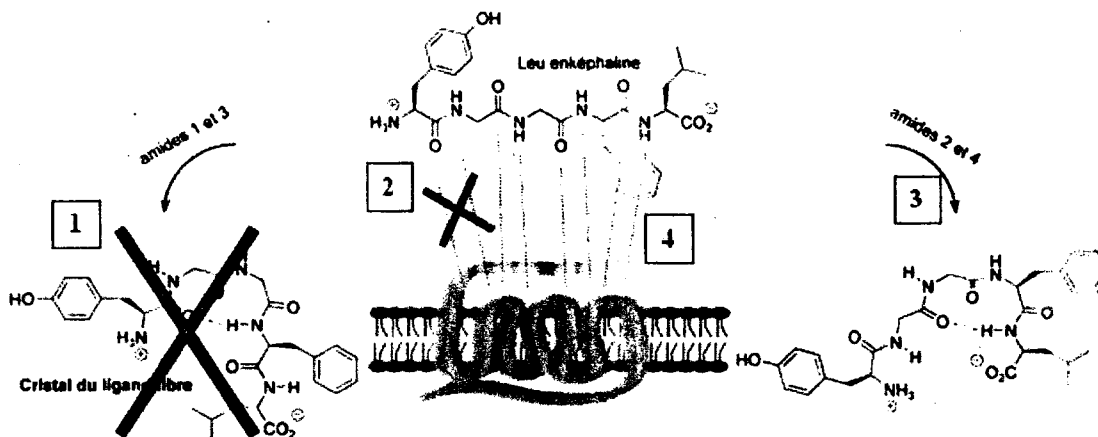
## 5 DISCUSSION

Étant des molécules endogènes possédant une bonne affinité pour DOPR, les enképhalines représentent une alternative intéressante à l'utilisation des dérivés de la morphine pour le traitement de la douleur chronique. C'est dans cette optique qu'en collaboration avec le laboratoire de chimie du Pr Yves Dory, nous avons procédé à la conception et à la synthèse de peptidomimétiques, analogues de la leu-enképhaline (LE). La LE consiste en un petit peptide possédant un caractère fortement hydrophile et étant très instable face à la dégradation par les peptidases. Afin d'arriver à améliorer ses propriétés pharmacocinétiques, nous avons procédé au remplacement systématique de chacun des liens amides de la LE par un groupement alcène (double lien C=C), qui est plus lipophile et plus stable face à la dégradation par les peptidases. Bien que certaines modifications des enképhalines aient été étudiées par le passé, nous sommes les premiers à étudier la présence du groupement alcène pour chacun des 4 liens peptidiques de la LE. Ce remplacement systématique aura permis de définir l'importance de chacun des 4 liens amides de la LE. En effet, la formation de ponts hydrogène intra- ou intermoléculaires par le lien amide n'est plus possible lorsque celui-ci est remplacé par un groupement alcène. L'objectif de ce projet était de caractériser cette série d'analogues enképhalinerigiques. Brièvement, les résultats indiquent que seul le 1<sup>er</sup> lien amide ne semble pas important au maintien de la liaison de la LE sur DOPR ainsi qu'au maintien de sa capacité d'activation du récepteur. Ainsi, pour la première fois, cette étude aura permis de confirmer l'importance de 3

des 4 liens amides de la LE pour sa liaison à DOPR, et conséquemment, pour sa capacité à l'activer.

### 5.1 Affinité pour DOPR et hypothèses émises

La première étape de la caractérisation *in vitro* des analogues enképhalinerigiques conçus et synthétisés avec cette stratégie de remplacement systématique des liens peptidiques (amides) de la LE consistait en la mesure de leur capacité de liaison, appelée affinité, sur DOPR, récepteur auquel nous nous intéressons et pour lequel les enképhalines possèdent une bonne affinité. Des essais de liaison par compétition ont permis la détermination d'une valeur de  $K_i$ , indice de l'affinité des analogues pour DOPR. Ainsi, plus les valeurs de  $K_i$  sont petites, plus la concentration nécessaire au déplacement de la  $^3\text{H}$ -dlt II est faible et donc, meilleure est l'affinité du ligand testé pour DOPR. À la lumière de ces mesures de  $K_i$  obtenues avec les 6 analogues, il est alors possible de discuter de l'importance de chacun des liens amides de la LE pour sa liaison sur DOPR. Le schéma de la figure 25 présente nos hypothèses suite aux résultats que nous avons obtenus.



**Figure 25. Schéma des hypothèses concernant les ponts hydrogènes intra- et intermoléculaire, découlant des valeurs de  $K_i$  obtenues avec les analogues.** Nos résultats suggèrent que 1) la conformation en tournant  $\beta$  stabilisée par un pont hydrogène intramoléculaire entre le premier et le troisième lien amide ne doit pas être essentiel à la liaison de la LE sur DOPR; 2) le premier lien amide ne forme pas de pont hydrogène intermoléculaire essentiel à la liaison de la LE sur DOPR; 3) la conformation en tournant  $\beta$  formée par un pont hydrogène intramoléculaire entre le deuxième et le quatrième lien amide est possible; et 4) la présence de ponts hydrogène entre les deuxième, troisième et quatrième liens amides et DOPR n'est pas impossible. N.B. Pour des fins de simplification, la LE et DOPR ne sont pas à l'échelle un par rapport à l'autre.

D'abord, pour l'analogue Tyr//GlyLE une valeur de  $K_i$  très proche de celle obtenue avec la LE a été obtenue. Ainsi, la substitution du premier lien amide par un alcène ne semble pas avoir altéré l'affinité de l'enképhaline pour DOPR. Comme mentionné dans l'introduction, les liens amides ont la capacité de former des liaisons non covalentes de types ponts hydrogène soit avec le récepteur, lui permettant de s'y lier, ou encore, avec la molécule elle-même, lui permettant d'adopter une conformation active. Or, puisque l'alcène ne permet pas la formation de ce type de liaison et que l'affinité de l'analogue Tyr//GlyLE n'est pas altérée malgré tout, il est possible de déduire que ce premier lien amide de la LE ne semble pas participer à la formation de ponts hydrogène, du moins de ponts hydrogène essentiels à la liaison au

récepteur. Ce résultat est d'ailleurs en accord avec celui d'une équipe qui s'est aussi intéressé au remplacement de ce lien amide par un double lien C=C (HANN *et al.*, 1982). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues suite aux essais de liaison par compétition effectués par les auteurs sont respectivement de 3 et 1 nM pour la LE et le Tyr//GlyLE, alors que nos valeurs de K<sub>i</sub> sont respectivement de 7.8 et 15.3 nM pour la LE et le Tyr//GlyLE.

Cependant, en ce qui concerne l'analogue Gly//GlyLE, la valeur de K<sub>i</sub> obtenue montre qu'il possède plus que 100 fois moins d'affinité pour DOPR que la LE, ce qui indique que la présence du deuxième lien amide de la LE est très importante pour la liaison du ligand sur DOPR. Cette substitution a aussi fait l'objet d'une étude antérieure et nos résultats sont en accord avec les données obtenues par Cox et collaborateurs (COX *et al.*, 1980). Ce résultat suggère la possibilité de l'existence d'un pont hydrogène intramoléculaire entre l'atome d'oxygène (accepteur) de ce deuxième lien amide et l'atome d'azote (donneur) du quatrième lien amide, comme déjà proposé, pour que la LE adopte une conformation secondaire de type tournant β, lui permettant d'être active envers DOPR (voir figure 25). Toutefois, il n'est pas non plus impossible que ce lien intramoléculaire ne soit pas essentiel, mais que ce soit plutôt une liaison intermoléculaire entre l'oxygène ou l'azote de ce deuxième lien amide et DOPR qui soit essentiel à la liaison de la LE au récepteur. Enfin, chaque lien amide pouvant former 2 ponts hydrogène, il est aussi possible que cette substitution avec un alcène entraîne à la fois la perte de liaisons intra- et intermoléculaire.

Par la suite, pour ce qui est des analogues Gly//PheLE A et B, il est d'abord possible de constater une grande différence entre les valeurs de  $K_i$  de ces 2 diastéréoisomères. En effet, alors que l'analogue Gly//PheLE A possède environ 100 fois moins d'affinité que la LE envers DOPR, l'analogue Gly//PheLE B en a presque 1000 fois moins. Ainsi, il est possible de déduire que cette différence d'affinité de 10 fois est due à leur différence de chiralité (stéréochimies D et L), étant la seule différence entre les deux analogues. À ce sujet, ces modifications de chiralités pour chacun des résidus de la LE ont déjà été expérimentées par le passé et il avait alors été constaté que la LE possédant un résidu Phe de stéréochimie D avait presque 100 fois moins d'affinité pour les récepteurs opioïdrgiques que celle possédant un résidu Phe de stéréochimie naturelle L (BEDDELL *et al.*, 1977). En plus de confirmer cette différence d'affinité que nous avons obtenue, ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que notre analogue Gly//PheLE A posséderait un résidu Phe de stéréochimie L et que l'analogue Gly//PheLE B posséderait un résidu Phe de stéréochimie D. Nous avons comme prochain objectif de déterminer la stéréochimie de chacun de ces composés au moyen de la cristallographie. D'autre part, la baisse d'affinité pour DOPR en comparaison avec la LE, et ce, pour les deux analogues, permet de confirmer que le troisième lien amide de la LE est important pour sa liaison sur DOPR. L'importance de ce lien amide entre les résidus Gly et Phe avait d'ailleurs été confirmée au moyen de cette substitution par un alcène, mais à l'intérieur d'autres peptides ayant de l'affinité pour DOPR (TOURWE *et al.*, 1992). Selon le schéma présenté à la figure 11, à gauche, ce troisième lien amide pourrait former une liaison intramoléculaire avec le premier lien amide, son groupement NH étant le



donneur du pont hydrogène. Or, puisque notre analogue Tyr//GlyLE ne montre pas de perte d'affinité marquée, nous pensons que ce pont hydrogène intramoléculaire est moins probable et qu'il est davantage possible que le troisième lien amide de la LE soit plutôt important pour sa participation à une liaison intermoléculaire avec DOPR.

Enfin, en ce qui concerne les analogues Phe//Leu A et B, bien que beaucoup moins importante, il existe encore une différence entre les valeurs de  $K_i$  des 2 diastéréoisomères, l'analogue Phe//Leu B possédant une meilleure affinité pour DOPR que le Phe//Leu A, d'environ 1.5 fois. Encore une fois, ces résultats sont en accord avec ceux de Beddell et ses collaborateurs (BEDDELL *et al.*, 1977), la LE contenant le résidu Leu en stéréochimie L ayant environ 2 fois plus d'affinité pour les récepteurs opioïdiques que celle contenant le résidu Leu en stéréochimie D. Ainsi, nous pouvons en déduire que notre analogue Phe//Leu A serait de stéréochimie D et que l'analogue Phe//Leu B serait plutôt de stéréochimie L. Comme dans le cas précédent, nous devons confirmer cette hypothèse à l'aide de la cristallographie. En comparaison avec l'affinité obtenue avec la LE, les analogues Phe//Leu A et B possèdent environ 30 fois et 20 fois moins d'affinité pour DOPR, respectivement, et bien que faible, cette baisse d'affinité indique l'importance du quatrième lien amide de la LE pour sa liaison sur DOPR. À notre connaissance, aucune autre étude ne s'était jusqu'ici intéressée directement à l'importance de ce lien amide, que ce soit au niveau des enképhalines ou d'autres peptides s'y apparentant. En lien avec le résultat obtenu avec l'analogue Gly//GlyLE, nous pouvons déduire qu'il est fort possible que l'atome d'azote du quatrième lien amide puisse former un pont hydrogène avec l'atome d'oxygène du deuxième lien amide de la LE (voir figure 25). Comme nous

l'avons déjà mentionné pour le cas de l'analogue Gly//GlyLE, il n'est pas impossible que ce soit plutôt un lien intermoléculaire entre le quatrième lien amide et DOPR qui soit perdu lors de cette substitution par un alcène. Alternativement, il peut aussi y avoir eu à la fois perte de liaisons intra- et intermoléculaire.

En résumé, nous pouvons suggérer que 1) la présence d'un pont hydrogène entre le premier et le troisième lien amide retrouvé dans le cristal de la LE libre ne semble pas essentielle au maintien d'une conformation propice à sa liaison avec DOPR; 2) des ponts hydrogène intermoléculaires entre le premier lien amide et DOPR ne soit pas essentiels à une bonne liaison de la LE à celui-ci; 3) il est possible que la présence d'un pont hydrogène entre le deuxième et le quatrième lien amide soit essentiel à la liaison de la LE avec DOPR; et 4) il se peut que les deuxième, troisième et quatrième liens amides forment des ponts hydrogène avec DOPR essentiels pour que la LE se lie à ce dernier. Bien que le cristal libre de la LE, c'est-à-dire en l'absence du récepteur, indique la présence d'un tournant  $\beta$ , la conformation que prend le ligand à l'intérieur de DOPR n'est pas connue. À ce stade, il est difficile d'éliminer les nombreuses possibilités.

Afin de pouvoir mieux comprendre les interactions importantes à la liaison de la LE sur DOPR, nous avons prévu tester d'autres modifications sur la LE. Entre autres, nous envisageons remplacer systématiquement les liens amides par un groupement 1,2,3-triazole, un groupement ester, ou un groupement N-méthyl amide qui possèdent tous la capacité d'accepter un pont hydrogène sans avoir la capacité d'être donneur. Ainsi, ces modifications, combinées aux résultats déjà obtenus, nous permettront, par

déduction, de distinguer l'importance des pouvoirs accepteur et donneur de ponts hydrogène de chacun des liens amides de la LE pour sa liaison à DOPR.

Finalement, bien qu'elle nous soit fort utile pour nous donner des indices de l'importance de chacun des liens amides de la LE, cette mesure de l'affinité des analogues pour DOPR nous donne seulement une indication sur leur capacité de liaison, mais aucune sur leur capacité d'activation de DOPR et donc sur le caractère agoniste ou antagoniste de chacun d'eux.

## **5.2 Évaluation de l'activité *in vitro***

Lors de expérimentations ayant menées à ce mémoire, l'activité des analogues était toujours comparée à celle de la dlt II, ligand de DOPR utilisé au laboratoire. Cependant, il sera bien sûr intéressant d'effectuer ces expérimentations avec la LE afin de comparer l'activité des analogues avec celle de la molécule naturelle. Comme on pourrait s'y attendre d'après les résultats d'affinité de la LE pour DOPR, l'activité de la LE dans les différents essais doit être comparable à celle de la dlt II. D'ailleurs, l'évaluation de la phosphorylation des ERK1/2 de la figure 20 le montre bien.

### **5.2.1 Internalisation de DOPR-GFP**

Un des moyens de procéder à l'évaluation de la capacité d'activation de DOPR par les analogues consiste en la mesure de la capacité d'internalisation du récepteur, et ce, puisqu'il est connu que la majorité des agonistes de DOPR induisent son

internalisation (PEI *et al.*, 1995). Par un modèle cellulaire dans lequel DOPR est couplé à une protéine fluorescente GFP, il nous était possible de suivre le déplacement du récepteur en temps réel et donc de vérifier cette capacité d'internalisation suite à l'ajout de chacun des analogues. Par les résultats obtenus, il est possible de constater que pour ces analogues, cette mesure de la capacité d'internalisation de DOPR-GFP, indice de l'activation de ce dernier, corrèle bien avec la valeur de  $K_i$  obtenu dans les essais de liaison. Il peut sembler logique que cette capacité d'activation d'un ligand soit proportionnelle à sa capacité de liaison au récepteur, mais dans le cas d'un agoniste partiel ou d'un antagoniste, le ligand peut posséder une excellente affinité pour son récepteur sans toutefois pouvoir l'activer. Inversement, il est certain que si un ligand possède peu d'affinité pour un récepteur, il faudra une plus grande quantité du ligand pour arriver à l'activer. Ainsi, avec une concentration de 100 nM, seul l'analogue Tyr//GlyLE est capable d'induire l'internalisation de DOPR-GFP comme le fait la dlt II, d'ailleurs, c'est effectivement le seul dont la valeur de  $K_i$  était inférieure à 100 nM. Par la suite, avec une concentration de 10  $\mu$ M, l'analogue Phe//Leu B induit une internalisation équivalente à ce qui est obtenu avec la dlt II 100 nM, tandis que les analogues Gly//PheLE A et Phe//Leu A sont capables d'induire une certaine internalisation complétée avec l'ajout de dlt II. L'analogue Phe//Leu B possède effectivement une meilleure affinité pour DOPR que les analogues Gly//PheLE A et Phe//Leu A. Cette mesure de la capacité d'internalisation n'étant que qualitative, cela pourrait expliquer que nous n'observions pas de différence de réponses entre les analogues Gly//PheLE A et Phe//Leu A malgré qu'ils aient des valeurs de  $K_i$  assez différentes. Enfin, en ce qui

concerne les analogues Gly//GlyLE et Gly//PheLE B, qui possèdent d'ailleurs les moins bonnes affinités pour DOPR de l'ensemble des composés étudiés, ils étaient incapables de faire internaliser DOPR-GFP même avec une concentration de 10  $\mu$ M. L'ajout de cette concentration n'empêchait pas l'internalisation subséquente par une concentration de 100 nM de dlt II, ce qui confirme qu'ils ne possèdent pas d'activité antagoniste. Ces résultats nous indiquent que, d'après la capacité d'internalisation de DOPR-GFP, les analogues Tyr//GlyLE, Gly//PheLE A, Phe//Leu A et Phe//Leu B possèdent un caractère agoniste pour DOPR. De leur côté, comme on pouvait s'y attendre vu qu'ils ne possèdent pas d'affinité pour DOPR ( $K_i$  de l'ordre du  $\mu$ M ou presque) les analogues Gly//GlyLE et Gly//PheLE B ne semblent ni être agoniste, ni antagoniste de DOPR.

### 5.2.2 Activation de la voie des MAP kinases ERK1/2

Puisque différentes voies peuvent être régulées par l'activation de DOPR, il est intéressant de vérifier la capacité d'activation de DOPR des analogues au moyen de différents essais *in vitro*. Ainsi, en plus de la vérification de leur capacité d'internalisation de DOPR-GFP, leur capacité d'activation de la voie des MAP kinases ERK1/2 a été vérifiée. C'est en fait la mesure du taux d'augmentation de la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 dans les cellules DRGF11/DOPR-GFP qui a permis cette vérification. Comme c'était le cas avec la mesure de la capacité d'internalisation, nos résultats montrent qu'il y a corrélation avec l'affinité mesurée des analogues pour DOPR. En effet, une première mesure concentration-dépendante

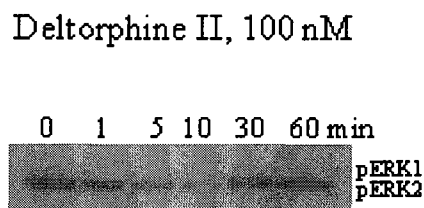
(1 nM à 1  $\mu$ M) nous indique encore une fois que seul l'analogue Tyr//GlyLE induit une augmentation significative de la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2, comme le fait la dlt II, et donc, qu'il possède aussi un caractère agoniste pour DOPR pour cette voie d'activation. Aussi, avec une mesure en cinétique, l'analogue Tyr//GlyLE active la voie ERK1/2 de façon transitoire, ayant des augmentations de la phosphorylation significatives à 5 et 10 minutes seulement. De plus, des essais avec l'antagoniste NTI nous ont permis de supposer que l'analogue Tyr//GlyLE devait lier et interagir avec DOPR de la même façon que la dlt II, du moins, de façon à ce qu'un prétraitement avec le NTI puisse bloquer son effet, comme c'est le cas pour la dlt II. Afin de poursuivre de la même manière que dans l'évaluation de la capacité d'internalisation, des essais avec les autres analogues à une concentration de 10  $\mu$ M ont été effectués en cinétique. Comme pour l'internalisation, les analogues Gly//PheLE A, Phe//Leu A et Phe//Leu B étaient capables d'activer cette voie ERK1/2, et donc peuvent être considérés comme des agonistes de DOPR, alors que les analogues Gly//GlyLE et Gly//PheLE B en étaient incapables et ne semblent donc pas être agonistes. Aussi, il était intéressant d'observer que l'activation maximale se faisait à 10 minutes pour les 3 analogues, plutôt qu'à 5 minutes comme c'est le cas pour la dlt II. À notre connaissance, le peu de littérature au sujet de la cinétique d'activation de cette voie ERK1/2 par l'activation de DOPR montre un maximum à 5 minutes. Avec un maximum d'activation à 10 minutes, l'activation peut encore être considérée comme étant transitoire. Enfin, en ce qui concerne les analogues Gly//GlyLE et Gly//PheLE B, un prétraitement avec ceux-ci ne bloque pas l'effet de la dlt II sur cette voie. Nous pouvons donc affirmer qu'ils n'agissent pas en tant

qu'antagoniste, comme il nous a été possible de le déduire dans le cas de l'internalisation.

### 5.2.3 Effet sur un courant potassique

Afin de réduire la sensation de douleur, les ligands opioïdiques via leur récepteurs sont connus pour moduler l'activité de différents courants ioniques des neurones, ceci ayant pour résultante de diminuer la conduction neuronale et donc le transport de l'information nociceptive. Il est donc fort intéressant d'évaluer la capacité des analogues à induire la modulation d'un de ces courants. Les cellules GH3/DOPR nous ont servi de modèle pour ces essais et nous avons regardé au niveau d'un courant potassique sortant global. Bien que nous ayons observé une diminution du courant pour un plus grand nombre de cellules, des effets contradictoires ont été obtenus selon la cellule testée. Bien sûr, l'état physiologique des cellules pouvant varier d'une cellule à l'autre, cela avait probablement une influence sur les résultats obtenus. À notre connaissance, peu d'études concernent la régulation d'un courant potassique de ce type par des ligands de DOPR. Une équipe l'a étudié au niveau des cellules DRF11 et ils avaient pu observer un effet biphasique selon la concentration de ligands utilisée (FAN et CRAIN, 1995). Malheureusement, dans notre cas, la variabilité des effets observés ne corrèle pas avec les concentrations utilisées. Cependant, nous pouvons émettre la même hypothèse que Fan et ses collaborateurs avaient émise voulant que DOPR puisse être couplé à plus d'un type de protéines G. De plus, par d'autres essais effectués dans ces cellules GH3/DOPR, une des

étudiantes du laboratoire avait observé que, contrairement à ce qui se passe au niveau des DRGF11/DOPR-GFP, une diminution de la phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 était induite par l'ajout de dlt II. Ce résultat est présenté à la figure 26 qui montre la détection des protéines kinases ERK1/2 phosphorylées (pERK1/2) suivant la stimulation (cinétique d'activation) des cellules GH3/DOPR avec 100 nM de dlt II.



**Figure 26. Analyse du niveau de phosphorylation des protéines kinases ERK1/2 dans des cellules GH3/DOPR, suivant une stimulation avec 100 nM de dlt II.** Contrairement à ce qui est obtenu dans des cellules DRGF11/DOPR-GFP, une diminution transitoire de la phosphorylation des ERK1/2 est induite par l'ajout de dlt II. Résultats obtenus par Hélène Beaudry, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Pr Louis Gendron.

Ceci nous laisse croire qu'un couplage anormal et qu'une machinerie cellulaire différente existent au niveau de ces cellules. D'ailleurs, les résultats de l'inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc, discutés plus loin, viennent aussi appuyer cette hypothèse. Malgré tout, puisque l'analogue Tyr//GlyLE démontrait les mêmes effets que la dlt II sur ce courant potassique, ces données soutiennent les autres résultats sur l'activation de DOPR voulant que l'analogue Tyr//GlyLE soit bien un agoniste de ce récepteur.



#### 5.2.4 Inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc

Sachant que l'inhibition de l'adénylyl cyclase par l'activation des GPCRs couplés à la protéine Gi est l'un des mécanismes les mieux connus, nous considérons essentiel de faire la mesure de cette inhibition, et ce, par la mesure de l'inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc. D'autre part, en plus d'être quantitative, la technique utilisée pour mesurer cette conversion est très sensible, permettant une comparaison précise et quantitative de l'effet des analogues avec celui de la dlt II et de la LE. Jusqu'à maintenant très peu d'essais ont été faits et les premiers résultats obtenus nous ont quelque peu embêtés. En effet, le grand écart existant entre les 2 valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues pour le duplicata de chacun des ligands testés (dlt II et Tyr//GlyLE) nous font douter de notre méthode, ou plutôt de l'efficacité du couplage DOPR-Gi dans le modèle cellulaire utilisé. En s'attardant de plus près à nos résultats, nous pouvons observer que les taux de conversion obtenus sans l'ajout de ligand, c'est-à-dire par l'activation de l'adénylyl cyclase par 1 µM de forskoline, sont très bas (moyenne de 0,5 % pour les 4 essais) en comparaison à ce qui est obtenu dans un autre modèle cellulaire utilisé au laboratoire. Nous savons maintenant que ce n'est pas notre méthode en soi qui est la cause d'une si faible stimulation de la conversion de l'ATP en AMPc puisqu'un étudiant du laboratoire arrive à des taux de conversion plus importants (environ 3 % de conversion) avec la même méthode, mais en utilisant un autre modèle cellulaire (cellules CHO). Ainsi, là revient encore la question à savoir si les cellules GH3/DOPR sont vraiment un modèle cellulaire approprié pour l'étude des divers effets cellulaires résultants de l'activation de DOPR ou si elles possèdent une machinerie cellulaire aberrante pour l'étude de DOPR. Prochainement,

nous avons prévu faire des essais de l'inhibition de la conversion de l'ATP en AMPc au moyen des cellules DRGF11/DOPR-GFP pour lesquelles l'activation de la voie ERK laisse penser que la machinerie cellulaire et le couplage de DOPR sont normaux et fonctionnels.

### 5.3 Évaluation de l'activité *in vivo*

Suivant l'évaluation *in vitro* de l'analogue Tyr//GlyLE, qui conserve la capacité de liaison sur DOPR de la LE et possède des propriétés agonistes comparables à ceux de la dlt II, nous avons considéré intéressant de vérifier *in vivo* son pouvoir anti-hyperalgésique dans un modèle animal de douleur inflammatoire induite par le CFA. Ainsi, comme on pouvait s'y attendre, les résultats obtenus montrent que l'analogue Tyr//GlyLE a la capacité d'induire un effet anti-hyperalgésique comparable à celui de la dlt II. De plus, comme c'est le cas pour la dlt II, aucun effet secondaire évident n'a été décelé, par observation qualitative, suivant l'injection intrathécale de l'analogue (aucune convulsion et pas d'effet locomoteur). D'autre part, puisque nous ne connaissons pas pour le moment la sélectivité de l'analogue pour DOPR, versus MOPR et KOPR, nous ne pouvons exclure la possibilité que cet effet *in vivo* soit médié par MOPR, sachant que la LE ne possède que 2 à 5 fois plus d'affinité pour DOPR que pour MOPR et qu'il est connu que l'activation de ce récepteur mène aussi à des effets anti-hyperalgésiques. Bien que l'utilisation d'antagonistes sélectifs pour chacun des récepteurs opioïdiques *in vivo* permettra la vérification de cette

hypothèse, nous envisageons d'abord de vérifier cette sélectivité *in vitro* au moyen d'essais de liaison avec des cellules GH3/MOPR et GH3/KOPR et les ligands radioactifs sélectifs  $^3\text{H}$ -DAMGO et  $^3\text{H}$ -U69593, respectivement. Enfin, bien que nous ayons procédé à l'évaluation *in vivo* pour cet analogue, ultérieurement, seul les meilleurs analogues sélectionnés suite à une caractérisation *in vitro* complète feront l'objet d'une évaluation *in vivo*.

#### **5.4 Discussion générale et conclusion**

L'objectif éventuel de ce projet consiste en la découverte d'un nouveau ligand peptidomimétique sélectif pour DOPR qui aurait un meilleur profil pharmacologique que les ligands peptidiques de DOPR et serait dépourvu des effets secondaires rencontrés avec certains ligands de DOPR non peptidiques. Pour y parvenir, une première étape fût la conception, la synthèse et la caractérisation de 6 analogues enképhalinerigiques pour lesquels chacun des liens amides étaient systématiquement remplacés par un groupement alcène. Bien que sa sélectivité ne soit pas encore déterminée, nous savons maintenant que l'analogue Tyr//GlyLE possède une bonne affinité et est capable d'activer DOPR. Or, ce constat est intéressant, car nous supposons que la présence du groupement alcène à cette position de la LE pourrait rendre le peptide plus stable. En effet, la dégradation de ce premier lien amide par l'aminopeptidase M est en partie responsable de la dégradation rapide de la LE. De plus, comme mentionné dans l'introduction, les groupements alcènes possèdent un

caractère beaucoup plus lipophile qu'un lien amide, et bien que la présence d'un seul groupement alcène dans le peptide soit bien sûr insuffisant pour qu'il puisse passer la barrière hémato-encéphalique, nous supposons que l'augmentation de la lipophilicité ne serait pas négligeable. D'ailleurs, des expériences préliminaires effectuées par le laboratoire de la Pr Brigitte Guérin ont permis de mesurer une valeur de Log P, indice de la lipophilicité d'un composé, pour la LE et un des analogues. Le Log P est en fait le coefficient de partition octanol / eau. Ainsi, plus il est élevé pour un composé donné, plus ce dernier possède la caractéristique de pouvoir se dissoudre dans les lipides, c'est-à-dire, plus il est lipophile. Les valeurs de log P expérimentales obtenues pour la LE et l'analogue Gly//PheLE A étaient de -0.70 et -0.37, respectivement. Cette augmentation de la lipophilicité est encourageante, mais tout de même loin de ce qu'il faudrait atteindre, soit un log P d'environ 2, afin que le futur composé puisse potentiellement passer la barrière hémato-encéphalique.

Éventuellement, ce sont des analogues enképhalinerigiques possédant plus d'une modification qui seront conçus, synthétisés et caractérisés, et ce, dans le but d'améliorer davantage la stabilité et la lipophilicité des ligands. Aussi, il sera essentiel de voir à concevoir et synthétiser des ligands possédant une excellente sélectivité envers DOPR afin d'éviter les effets secondaires rencontrés avec les agonistes de MOPR. Enfin, une vision plus lointaine du projet permet de penser que la conception, la synthèse et la caractérisation de ces peptidomimétiques mèneront un jour au développement d'une nouvelle thérapie analgésique dépourvue des effets secondaires rencontrés avec les thérapies actuelles. Ceci permettrait une amélioration importante

de la qualité de vie des patients qui souffrent de douleur chronique ainsi que des comorbidités associées, telles l'anxiété et la dépression.

## 6 REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier le Pr Marcel-Daniel Payet qui m'a permis de faire une maîtrise en m'offrant ce beau projet collaboratif entre son laboratoire et celui du Pr Louis Gendron. Merci de m'avoir permis d'apprendre les rudiments de la technique du patch clamp. Bien qu'elle m'ait souvent parue difficile et que je n'ai pas pu en apprécier toute sa richesse, j'ai à tout le moins découvert une technique réellement intéressante. Enfin, merci d'avoir su me rediriger, avec Louis, vers un autre beau projet, l'objet de ce mémoire, qui se voulait tout aussi motivant.

Bien sûr, merci au Pr Louis Gendron de m'avoir si bien accueilli dans son équipe. Merci d'avoir été un patron juste assez exigeant, un pédagogue hors pair et je dirais même un « papa poule » attentionné à ses étudiants. J'ai beaucoup apprécié ta grande disponibilité autant pour répondre à une simple question que pour parler d'autre chose que la science, tes conseils m'ont toujours été d'un support précieux. Tu trouves agréable que notre équipe soit aussi unie, et bien dis toi que tu y es assurément pour quelque chose.

Merci au Pr Yves Dory, responsable de la partie chimie de ce projet collaboratif, sans qui rien n'aurait été possible. Merci à Arnaud, mon complice #1 dans ce projet, qui bien malgré lui, est devenu expert dans l'art de simplifier la chimie pour moi et les autres étudiants du labo. Merci d'avoir été aussi disponible pour mes questions.

Merci aux Prs Éric Rousseau et Éric Marsault d'avoir accepté de faire parti du jury de ce mémoire. Merci pour vos commentaires constructifs qui ont bien sûr permis l'amélioration de mon mémoire, mais aussi plusieurs réflexions.

Je tiens aussi à remercier le Pr Jean-Paul Praud avec qui j'ai fait mes premiers pas dans la recherche au cours de mes stages du baccalauréat. C'est assurément grâce à ces stages et à ta passion contagieuse pour la recherche que j'ai envisagé des études supérieures.

Merci aussi à Shirley qui m'a tout appris lors de ces stages, avec patience et humilité, et qui continue encore à m'encourager et à prendre de mes nouvelles à distance.

Un énorme merci à Lyne, collègue et amie, pour sa présence depuis le tout début. Merci de ton aide inestimable pour les expérimentations de patch clamp, mais aussi de ton support moral toujours très apprécié. Je n'aurais pu demander mieux que de partager ce bureau avec toi. Je trouve ta compagnie très agréable, j'ai beaucoup apprécié nos discussions de « filles » et tes conseils avertis et surtout, garde ton beau sens de l'humour.

Merci à tous les membres du « labo Gendron », Hélène, Valérie, Arnaud, Dave et Alexandre. J'ai adoré travailler, discuter et... fêter avec vous. De collègues, vous êtes tous devenus des amis. Quelle belle gang!

Un merci tout particulier à Hélène, sans qui, j'en suis certaine, ma maîtrise n'aurait pas été la même. Des détails qui peuvent paraître anodins comme de passer du bon temps avec des enfants (Julien, Antoine et Samuel) ou de découvrir une activité sportive qu'on aime vraiment (cardio plein-air) peuvent faire toute la différence sur la qualité de vie.

durant des études graduées. Femme, mère et étudiante accomplie, tu es sincèrement une amie exceptionnelle. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée au laboratoire et dans mes présentations, et surtout, merci de m'avoir inculqué ta belle philosophie de vie.

Merci aussi à Kristina, ma première « élève officielle », à qui je passe maintenant le flambeau. Ta motivation m'enlève tout doute quant à l'avenir du projet. Garde ce beau sourire et ta joie de vivre.

Merci à mes amies de toujours, celles que je ne vois pas souvent, mais qui savent trouver les mots pour m'encourager et me dire qu'elles sont fières de ce que j'accomplie.

Merci à mes parents de nous avoir sans cesse encouragées dans notre éducation et de nous avoir si souvent répétées combien « c'est important l'école ». Auriez-vous cru que j'y serais encore à 26 ans! Merci à ma petite sœur, confidente et amie, qu'est-ce que je ferais sans toi.

Enfin, merci à Marco, mon amoureux, la personne la plus importante à mes yeux. Merci d'avoir été patient avec toutes ces années d'études. Merci d'être là pour écouter mes moments de découragement et pour féliciter mes bons coups.



## 7 RÉFÉRENCES

ACOSTA,C. G. et LOPEZ,H. S. delta opioid receptor modulation of several voltage-dependent Ca(2+) currents in rat sensory neurons *J.Neurosci.* **19** 8337-8348 (1999).

AKIYAMA,K., GEE,K. W., MOSBERG,H. I., HRUBY,V. J. et YAMAMURA,H. I. Characterization of [3H][2-D-penicillamine, 5-D-penicillamine]-enkephalin binding to delta opiate receptors in the rat brain and neuroblastoma--glioma hybrid cell line (NG 108-15) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **82** 2543-2547 (1985).

ALMARESTANI,L., WATERS,S. M., KRAUSE,J. E., BENNETT,G. J. et RIBEIRO-DA-SILVA,A. De novo expression of the neurokinin 1 receptor in spinal lamina I pyramidal neurons in polyarthritis *J.Comp.Neurol.* **514** 284-295 (2009).

BEAUDRY,H., PROTEAU-GAGNE,A., LIS., DORY,Y., CHAVKIN,C. et GENDRON,L. Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents *Neuroscience* **161** 381-391 (2009).

BEAVER,W. T., WALLENSTEIN,S. L., HOUDE,R. W. et ROGERS,A. A comparison of the analgesic effects of pentazocine and morphine in patients with cancer *Clin.Pharmacol.Ther.* **7** 740-751 (1966).

BEDDELL,C. R., CLARK,R. B., LOWE,L. A., WILKINSON,S., CHANG,K. J., CUATRECASAS,P. et MILLER,R. A conformational analysis for leucine-enkephalin using activity and binding data of synthetic analogues *Br.J.Pharmacol.* **61** 351-356 (1977).

BELCHEVA,M. M., VOGEL,Z., IGNATOVA,E., AVIDOR-REISS,T., ZIPPEL,R., LEVY,R., YOUNG,E. C., BARG,J. et COSCIA,C. J. Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits *J.Neurochem.* **70** 635-645 (1998).

BENYAMIN,R., TRESOT,A. M., DATTA,S., BUENAVENTURA,R., ADLAKA,R., SEHGAL,N., GLASER,S. E. et VALLEJO,R. Opioid complications and side effects *Pain Physician.* **11** S105-20 (2008).

BERNARD,J. F., BESTER,H. et BESSON,J. M. Involvement of the spino-parabrachio -amygdaloid and -hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain *Prog.Brain Res.* **107** 243-255 (1996).

BLOMBERG,D., KREYE,P., FOWLER,C., BRICKMANN,K. et KIHLEBERG,J. Synthesis and biological evaluation of leucine enkephalin turn mimetics *Org.Biomol.Chem.* **4** 416-423 (2006).

BLUME,A. J. Opiate binding to membrane preparations of neuroblastoma x glioma hybrid cells NG108-15: effects of ions and nucleotides *Life Sci.* **22** 1843-1852 (1978).

BODNAR,R. J. Endogenous opiates and behavior: 2006 *Peptides* **28** 2435-2513 (2007).

BRANDT,M. R., FURNESS,M. S., RICE,K. C., FISCHER,B. D. et NEGUS,S. S. Studies of tolerance and dependence with the delta-opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **299** 629-637 (2001).

BROOM,D. C., JUTKIEWICZ,E. M., FOLK,J. E., TRAYNOR,J. R., RICE,K. C. et WOODS,J. H. Nonpeptidic delta-opioid receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats *Neuropsychopharmacology* **26** 744-755 (2002).

BURT,A. R., CARR,I. C., MULLANEY,I., ANDERSON,N. G. et MILLIGAN,G. Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation *Biochem.J.* **320 ( Pt 1)** 227-235 (1996).

BYAS-SMITH,M. G., CHAPMAN,S. L., REED,B. et COTSONIS,G. The effect of opioids on driving and psychomotor performance in patients with chronic pain *Clin.J.Pain* **21** 345-352 (2005).

CAI,Y., ZHANG,Y., WU,Y. et PEI,G. delta Opioid receptor in neuronal cells undergoes acute and homologous desensitization *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **219** 342-347 (1996).

CALDERON,S. N., ROTHMAN,R. B., PORRECA,F., FLIPPEN-ANDERSON,J. L., MCNUTT,R. W., XU,H., SMITH,L. E., BILSKY,E. J., DAVIS,P. et RICE,K. C. Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist *J.Med.Chem.* **37** 2125-2128 (1994).

CHANG,K. J., RIGDON,G. C., HOWARD,J. L. et MCNUTT,R. W. A novel, potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonist BW373U86 *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **267** 852-857 (1993).

CHEN,Y., MESTEK,A., LIU,J., HURLEY,J. A. et YU,L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain *Mol.Pharmacol.* **44** 8-12 (1993).

CHILDERS,S. R., CREESE,I., SNOWMAN,A. M. et SYNDER,S. H. Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides *Eur.J.Pharmacol.* **55** 11-18 (1979).

CHU,P., MURRAY,S., LISSIN,D. et VON ZASTROW,M. Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist *J.Biol.Chem.* **272** 27124-27130 (1997).

COMER,S. D., HOENICKE,E. M., SABLE,A. I., MCNUTT,R. W., CHANG,K. J., DE COSTA,B. R., MOSBERG,H. I. et WOODS,J. H. Convulsive effects of

systemic administration of the delta opioid agonist BW373U86 in mice  
*J.Pharmacol.Exp.Ther.* **267** 888-895 (1993).

COSTA,T., WUSTER,M., GRAMSCH,C. et HERZ,A. Multiple states of opioid receptors may modulate adenylate cyclase in intact neuroblastoma X glioma hybrid cells *Mol.Pharmacol.* **28** 146-154 (1985).

COWAN,A., ZHU,X. Z., MOSBERG,H. I., OMNAAS,J. R. et PORRECA,F. Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **246** 950-955 (1988).

COX,M. T., GORMLEY,J. J., HAYWARD,C. F. et AND PETER,N. F. Incorporation of trans olefinic dipeptide isostere into enkephaline and substance P analogs.*J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 800-802. (1980).

DE LUCA,A. et COUPAR,I. M. Insights into opioid action in the intestinal tract  
*Pharmacol.Ther.* **69** 103-115 (1996).

DESMEULES,J. A., KAYSER,V., GACEL,G., GUILBAUD,G. et ROQUES,B. P. The highly selective delta agonist BUBU induces an analgesic effect in normal and arthritic rat and this action is not affected by repeated administration of low doses of morphine *Brain Res.* **611** 243-248 (1993).

DEVULDER,J., RICHAZ,U. et NATARAJA,S. H. Impact of long-term use of opioids on quality of life in patients with chronic, non-malignant pain  
*Curr.Med.Res.Opin.* **21** 1555-1568 (2005).

DI CHIARA,G. et IMPERATO,A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **244** 1067-1080 (1988).

EVANS,C. J., KEITH,D. E.,Jr, MORRISON,H., MAGENDZO,K. et EDWARDS,R. H. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression *Science* **258** 1952-1955 (1992).

FAN,S. F. et CRAIN,S. M. Dual regulation by mu, delta and kappa opioid receptor agonists of K<sup>+</sup> conductance of DRG neurons and neuroblastoma X DRG neuron hybrid F11 cells *Brain Res.* **696** 97-105 (1995).

FILLINGIM,R. B. et GEAR,R. W. Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings *Eur.J.Pain* **8** 413-425 (2004).

FRASER,G. L., GAUDREAU,G. A., CLARKE,P. B., MENARD,D. P. et PERKINS,M. N. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation *Br.J.Pharmacol.* **129** 1668-1672 (2000a).

FRASER,G. L., PARENTEAU,H., TU,T. M., DUCHARME,J., PERKINS,M. N. et CLARKE,P. B. The effects of delta agonists on locomotor activity in habituated and non-habituated rats *Life Sci.* **67** 913-922 (2000b).

FUKUDA,K., KATO,S., MORIKAWA,H., SHODA,T. et MORI,K. Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated

protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells  
*J.Neurochem.* **67** 1309-1316 (1996).

GALLANTINE,E. L. et MEERT,T. F. A comparison of the antinociceptive and  
adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist  
SNC80 *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* **97** 39-51 (2005).

GALLIGAN,J. J., MOSBERG,H. I., HURST,R., HRUBY,V. J. et BURKS,T. F.  
Cerebral delta opioid receptors mediate analgesia but not the intestinal motility  
effects of intracerebroventricularly administered opioids *J.Pharmacol.Exp.Ther.*  
**229** 641-648 (1984).

GENDRON,L., ESDAILE,M. J., MENNICKEN,F., PAN,H., O'DONNELL,D.,  
VINCENT,J. P., DEVI,L. A., CAHILL,C. M., STROH,T. et BEAUDET,A.  
Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between  
antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin *Neuroscience* **144**  
263-274 (2007).

GILLAN,M. G., KOSTERLITZ,H. W. et PATERSON,S. J. Comparison of the  
binding characteristics of tritiated opiates and opioid peptides *Br.J.Pharmacol.* **70**  
481-490 (1980).

HAMBROOK,J. M., MORGAN,B. A., RANCE,M. J. et SMITH,C. F. Mode of  
deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain  
homogenates *Nature* **262** 782-783 (1976).

- HANN, M. M. et AND SAMMES, P. G. On double bond isosteres of the peptide bond; an enkephalin analogue *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* 234-235 (1980).
- HANN, M. M., SAMMES, P. G., KENNEWELL, P. D. et AND TAYLOR, J. B. On the double bond isostere of the peptide bond: preparation of an enkephalin analogue *J.Chem.Soc., Perkin Trans.* 307-314 (1982).
- HESCHELER, J., ROSENTHAL, W., TRAUTWEIN, W. et SCHULTZ, G. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels *Nature* **325** 445-447 (1987).
- HOLDRIDGE, S. V. et CAHILL, C. M. Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain *Eur.J.Pain* **11** 685-693 (2007).
- HONORE, P., ROGERS, S. D., SCHWEIM, J., SALAK-JOHNSON, J. L., LUGER, N. M., SABINO, M. C., CLOHISY, D. R. et MANTYH, P. W. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons *Neuroscience* **98** 585-598 (2000).
- HSIA, J. A., MOSS, J., HEWLETT, E. L. et VAUGHAN, M. ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding *J.Biol.Chem.* **259** 1086-1090 (1984).



HUGHES,J., SMITH,T. W., KOSTERLITZ,H. W., FOTHERGILL,L. A., MORGAN,B. A. et MORRIS,H.-R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity *Nature* **258** 577-580 (1975).

HUNT,S. P. et MANTYH,P. W. The molecular dynamics of pain control *Nat.Rev.Neurosci.* **2** 83-91 (2001).

HURLEY,R. W. et HAMMOND,D. L. The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation *J.Neurosci.* **20** 1249-1259 (2000).

IGNATOVA,E. G., BELCHEVA,M. M., BOHN,L. M., NEUMAN,M. C. et COSCIA,C. J. Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence *J.Neurosci.* **19** 56-63 (1999).

INGRAM,S. L. et WILLIAMS,J. T. Opioid inhibition of I<sub>h</sub> via adenylyl cyclase *Neuron* **13** 179-186 (1994).

INGRAM,S. L. et WILLIAMS,J. T. Modulation of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons *J.Physiol.* **492 ( Pt 1)** 97-106 (1996).

JIN,W., LEE,N. M., LOH,H. H. et THAYER,S. A. Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells *J.Neurosci.* **14** 1920-1929 (1994).

JULIUS,D. et BASBAUM,A. I. Molecular mechanisms of nociception *Nature* **413** 203-210 (2001).

JUTKIEWICZ,E. M., ELLER,E. B., FOLK,J. E., RICE,K. C., TRAYNOR,J. R. et WOODS,J. H. Delta-opioid agonists: differential efficacy and potency of SNC80, its 3-OH (SNC86) and 3-desoxy (SNC162) derivatives in Sprague-Dawley rats *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **309** 173-181 (2004).

JUTKIEWICZ,E. M. The antidepressant-like effects of delta-opioid receptor agonists *Mol.Interv.* **6** 162-169 (2006).

KABLI,N. et CAHILL,C. M. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain *Pain* **127** 84-93 (2007).

KANE,B. E., SVENSSON,B. et FERGUSON,D. M. Molecular recognition of opioid receptor ligands *AAPS J.* **8** E126-37 (2006).

KATON,W. The epidemiology of depression in medical care *Int.J.Psychiatry Med.* **17** 93-112 (1987).

KATZUNG,B. G. Basic & Clinical Pharmacology, 9e édition *Lange Medical Books/McGraw-Hill* 1202 pages (2004).

KEEFE,F. J., RUMBLE,M. E., SCIPIO,C. D., GIORDANO,L. A. et PERRIL,L. M. Psychological aspects of persistent pain: current state of the science *J.Pain* **5** 195-211 (2004).

KIEFFER,B. L., BEFORT,K., GAVERIAUX-RUFF,C. et HIRTH,C. G. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89** 12048-12052 (1992).

KNAPP,R. J., MALATYNSKA,E., COLLINS,N., FANG,L., WANG,J. Y., HRUBY,V. J., ROESKE,W. R. et YAMAMURA,H. I. Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors *FASEB J.* **9** 516-525 (1995).

KOVOOR,A., CELVER,J., ABDRYASHITOV,R. I., CHAVKIN,C. et GUREVICH,V. V. Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells *J.Biol.Chem.* **274** 6831-6834 (1999).

KRAMES,E. S., WILKIE,D. J. et GERSHOW,J. Intrathecal D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>-enkephalin (DADL) restores analgesia in a patient analgetically tolerant to intrathecal morphine sulfate *Pain* **24** 205-209 (1986).

KREEK,M. J. Opioid receptors: some perspectives from early studies of their role in normal physiology, stress responsivity, and in specific addictive diseases *Neurochem.Res.* **21** 1469-1488 (1996).

LAW,P. Y., LOUIE,A. K. et LOH,H. H. Effect of pertussis toxin treatment on the down-regulation of opiate receptors in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells *J.Biol.Chem.* **260** 14818-14823 (1985).

LAZARUS,L. H., BRYANT,S. D., COOPER,P. S. et SALVADORI,S. What peptides these deltorphins be *Prog.Neurobiol.* **57** 377-420 (1999).

LE BOURDONNEC,B., WINDH,R. T., AJELLO,C. W., LEISTER,L. K., GU,M., CHU,G. H., TUTHILL,P. A., BARKER,W. M., KOBLISH,M., WIANT,D. D., GRACZYK,T. M., BELANGER,S., CASSEL,J. A., FESCHENKO,M. S., BROGDON,B. L., SMITH,S. A., CHRIST,D. D., DERELANKO,M. J., KUTZ,S., LITTLE,P. J., DEHAVEN,R. N., DEHAVEN-HUDKINS,D. L. et DOLLE,R. E. 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.* **51** 5893-5896 (2008).

LE BOURDONNEC,B., WINDH,R. T., LEISTER,L. K., ZHOU,Q. J., AJELLO,C. W., GU,M., CHU,G. H., TUTHILL,P. A., BARKER,W. M., KOBLISH,M., WIANT,D. D., GRACZYK,T. M., BELANGER,S., CASSEL,J. A., FESCHENKO,M. S., BROGDON,B. L., SMITH,S. A., DERELANKO,M. J., KUTZ,S., LITTLE,P. J., DEHAVEN,R. N., DEHAVEN-HUDKINS,D. L. et DOLLE,R. E. Spirocyclic delta opioid receptor agonists for the treatment of pain: discovery of N,N-diethyl-3-hydroxy-4-(spiro[chromene-2,4'-piperidine]-4-yl)benzamide (ADL5747) *J.Med.Chem.* **52** 5685-5702 (2009).

LOESER,J. D. et TREEDE,R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology *Pain* **137** 473-477 (2008).

LOU, L. G. et PEI, G. Modulation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase by delta-opioid *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236** 626-629 (1997).

MALFROY, B., SWERTS, J. P., GUYON, A., ROQUES, B. P. et SCHWARTZ, J. C. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine *Nature* **276** 523-526 (1978).

MANSOUR, A., KHACHATURIAN, H., LEWIS, M. E., AKIL, H. et WATSON, S. J. Anatomy of CNS opioid receptors *Trends Neurosci.* **11** 308-314 (1988).

MANSOUR, A., FOX, C. A., AKIL, H. et WATSON, S. J. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications *Trends Neurosci.* **18** 22-29 (1995).

MARCHAND, S. Le phénomène de la douleur, 2e édition *Chenelière Éducation* 392 pages (2009).

MARTIN, W. R. Pharmacology of opioids *Pharmacol. Rev.* **35** 283-323 (1983).

MARTINEZ-LAVIN, M. Fibromyalgia as a sympathetically maintained pain syndrome *Curr. Pain Headache Rep.* **8** 385-389 (2004).

MAY, C. N., DASHWOOD, M. R., WHITEHEAD, C. J. et MATHIAS, C. J. Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution *Br. J. Pharmacol.* **98** 903-913 (1989).

MCCRACKEN,L. M., ZAYFERT,C. et GROSS,R. T. The Pain Anxiety Symptoms Scale: development and validation of a scale to measure fear of pain *Pain* **50** 67-73 (1992).

MCKENZIE,F. R. et MILLIGAN,G. Delta-opioid-receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein Gi2 *Biochem.J.* **267** 391-398 (1990).

MCLEAN,S., ROTHMAN,R. B. et HERKENHAM,M. Autoradiographic localization of mu- and delta-opiate receptors in the forebrain of the rat *Brain Res.* **378** 49-60 (1986).

MCQUAY,H. Opioids in pain management *Lancet* **353** 2229-2232 (1999).

MENG,F., XIE,G. X., THOMPSON,R. C., MANSOUR,A., GOLDSTEIN,A., WATSON,S. J. et AKIL,H. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90** 9954-9958 (1993).

MEYER-ROSBERG,K., BURCKHARDT,C. S., HUIZAR,K., KVARNSTROM,A., NORDFORS,L. O. et KRISTOFFERSON,A. A comparison of the SF-36 and Nottingham Health Profile in patients with chronic neuropathic pain *Eur.J.Pain* **5** 391-403 (2001).

MIASKOWSKI,C., SUTTERS,K. A., TAIWO,Y. O. et LEVINE,J. D. Comparison of the antinociceptive and motor effects of intrathecal opioid agonists in the rat *Brain Res.* **553** 105-109 (1991).

MIKA,J., PRZEWLOCKI,R. et PRZEWLOCKA,B. The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain *Eur.J.Pharmacol.* **415** 31-37 (2001).

MILLAN,M. J. Descending control of pain *Prog.Neurobiol.* **66** 355-474 (2002).

MORINVILLE,A., CAHILL,C. M., AIBAK,H., RYMAR,V. V., PRADHAN,A., HOFFERT,C., MENNICKEN,F., STROH,T., SADIKOT,A. F., O'DONNELL,D., CLARKE,P. B., COLLIER,B., HENRY,J. L., VINCENT,J. P. et BEAUDET,A. Morphine-induced changes in delta opioid receptor trafficking are linked to somatosensory processing in the rat spinal cord *J.Neurosci.* **24** 5549-5559 (2004).

MOSBERG,H. I., HURST,R., HRUBY,V. J., GEE,K., AKIYAMA,K., YAMAMURA,H. I., GALLIGAN,J. J. et BURKS,T. F. Cyclic penicillamine containing enkephalin analogs display profound delta receptor selectivities *Life Sci.* **33 Suppl 1** 447-450 (1983).

MOULIN,D. E., MAX,M. B., KAIKO,R. F., INTURRISI,C. E., MAGGARD,J., YAKSH,T. L. et FOLEY,K. M. The analgesic efficacy of intrathecal D-Ala2-D-Leu5-enkephalin in cancer patients with chronic pain *Pain* **23** 213-221 (1985).

MOULIN,D. E., CLARK,A. J., SPEECHLEY,M. et MORLEY-FORSTER,P. K. Chronic pain in Canada--prevalence, treatment, impact and the role of opioid analgesia *Pain Res.Manag.* **7** 179-184 (2002).

MULDER,A. H., WARDEH,G., HOGENBOOM,F. et FRANKHUYZEN,A. L. Kappa- and delta-opioid receptor agonists differentially inhibit striatal dopamine and acetylcholine release *Nature* **308** 278-280 (1984).

NADAL,X., BANOS,J. E., KIEFFER,B. L. et MALDONADO,R. Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice *Eur.J.Neurosci.* **23** 830-834 (2006).

NEGUS,S. S., BUTELMAN,E. R., CHANG,K. J., DECOSTA,B., WINGER,G. et WOODS,J. H. Behavioral effects of the systemically active delta opioid agonist BW373U86 in rhesus monkeys *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **270** 1025-1034 (1994).

NORTH,R. A., WILLIAMS,J. T., SURPRENANT,A. et CHRISTIE,M. J. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84** 5487-5491 (1987).

ONOFRIO,B. M. et YAKSH,T. L. Intrathecal delta-receptor ligand produces analgesia in man *Lancet* **1** 1386-1387 (1983).

OSSIPOV,M. H., LAI,J., MALAN,T. P.,Jr et PORRECA,F. Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **909** 12-24 (2000).

PATRICK,G. L. Chimie Pharmaceutique, 2e édition *De Boeck* 629 pages (2002).

PEI,G., KIEFFER,B. L., LEFKOWITZ,R. J. et FREEDMAN,N. J. Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G



protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C *Mol.Pharmacol.* **48** 173-177 (1995).

PERRINE,S. A., HOSHAW,B. A. et UNTERWALD,E. M. Delta opioid receptor ligands modulate anxiety-like behaviors in the rat *Br.J.Pharmacol.* **147** 864-872 (2006).

PERT,C. B. et SNYDER,S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue *Science* **179** 1011-1014 (1973).

PETRILLO,P., ANGELICI,O., BINGHAM,S., FICALORA,G., GARNIER,M., ZARATIN,P. F., PETRONE,G., POZZI,O., SBACCHI,M., STEAN,T. O., UPTON,N., DONDIO,G. M. et SCHEIDELER,M. A. Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS\*,8aalpha,8abeta, 12bbeta)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]iso quinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **307** 1079-1089 (2003).

PIROS,E. T., PRATHER,P. L., LOH,H. H., LAW,P. Y., EVANS,C. J. et HALES,T. G. Ca<sup>2+</sup> channel and adenylyl cyclase modulation by cloned mu-opioid receptors in GH3 cells *Mol.Pharmacol.* **47** 1041-1049 (1995).

PIROS,E. T., CHARLES,R. C., SONG,L., EVANS,C. J. et HALES,T. G. Cloned delta-opioid receptors in GH(3) cells inhibit spontaneous Ca(2+) oscillations and

prolactin release through K(IR) channel activation *J.Neurophysiol.* **83** 2691-2698 (2000).

PORRECA,F., MOSBERG,H. I., HURST,R., HRUBY,V. J. et BURKS,T. F. Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **230** 341-348 (1984).

PORTOGHESE,P. S., SULTANA,M. et TAKEMORIA,A. E. Design of peptidomimetic delta opioid receptor antagonists using the message-address concept *J.Med.Chem.* **33** 1714-1720 (1990).

PRICE,D. D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain *Science* **288** 1769-1772 (2000).

QUOCK,R. M., BURKEY,T. H., VARGA,E., HOSOHATA,Y., HOSOHATA,K., COWELL,S. M., SLATE,C. A., EHLERT,F. J., ROESKE,W. R. et YAMAMURA,H. I. The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy *Pharmacol.Rev.* **51** 503-532 (1999).

RICHTER,K., EGGER,R. et KREIL,G. D-alanine in the frog skin peptide dermorphin is derived from L-alanine in the precursor *Science* **238** 200-202 (1987).

ROMANO,J. M. et TURNER,J. A. Chronic pain and depression: does the evidence support a relationship?*Psychol.Bull.* **97** 18-34 (1985).

SHARIF NAEINI,R., CAHILL,C. M., RIBEIRO-DA-SILVA,A., MENARD,H. A. et HENRY,J. L. Remodelling of spinal nociceptive mechanisms in an animal model of monoarthritis *Eur.J.Neurosci.* **22** 2005-2015 (2005).

SIMON,E. J., HILLER,J. M. et EDELMAN,I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **70** 1947-1949 (1973).

SMITH,D. et GRIFFIN,J. F. Conformation of [Leu5]enkephalin from X-ray diffraction: features important for recognition at opiate receptor *Science* **199** 1214-1216 (1978).

SPINA,L., LONGONI,R., MULAS,A., CHANG,K. J. et DI CHIARA,G. Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80: 1. Locomotion, rearing and stereotypies in intact rats *Behav.Pharmacol.* **9** 1-8 (1998).

STEWART,P. E. et HAMMOND,D. L. Activation of spinal delta-1 or delta-2 opioid receptors reduces carrageenan-induced hyperalgesia in the rat *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **268** 701-708 (1994).

SZETO,H. H., SOONG,Y., WU,D., OLARIU,N., KETT,A., KIM,H. et CLAPP,J. F. Respiratory depression after intravenous administration of delta-selective opioid peptide analogs *Peptides* **20** 101-105 (1999).

TERENIUS,L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex *Acta Pharmacol.Toxicol.(Copenh)* **32** 317-320 (1973).

TOURWE,D., COUDER,J., CEUSTERS,M., MEERT,D., BURKS,T. F., KRAMER,T. H., DAVIS,P., KNAPP,R., YAMAMURA,H. I. et LEYSEN,J. E. Synthesis and biological activities of linear and cyclic enkephalin analogues containing a psi (E,CH = CH) or psi (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) isosteric replacement *Int.J.Pept.Protein Res.* **39** 131-136 (1992).

TRESCOT,A. M., DATTA,S., LEE,M. et HANSEN,H. Opioid pharmacology *Pain Physician.* **11** S133-53 (2008).

VERGURA,R., BALBONI,G., SPAGNOLO,B., GAVIOLIE., LAMBERT,D. G., MCDONALD,J., TRAPPELLA,C., LAZARUS,L. H., REGOLI,D., GUERRINI,R., SALVADORI,S. et CALO,G. Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH<sub>2</sub>-COOH)-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist *Peptides* **29** 93-103 (2008).

VON KORFF,M. et SIMON,G. The relationship between pain and depression *Br.J.Psychiatry Suppl.* (**30**) 101-108 (1996).

WANG,J. F., REN,M. F., XUE,J. C. et HAN,J. S. Cyclic AMP mediates mu and delta, but not kappa opioid analgesia in the spinal cord of the rat *Life Sci.* **52** 1955-1960 (1993).

WATERFIELD,A. A., SMOKCUM,R. W., HUGHES,J., KOSTERLITZ,H. W. et HENDERSON,G. In vitro pharmacology of the opioid peptides, enkephalins and endorphins *Eur.J.Pharmacol.* **43** 107-116 (1977).

WOOLF,C. J., American College of Physicians et American Physiological Society. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management *Ann.Intern.Med.* **140** 441-451 (2004).

WU,S. C., WROBEL,J. S. et ARMSTRONG,D. G. Assessing the impact of pharmacologic intervention on the quality of life in diabetic peripheral neuropathic pain and fibromyalgia *Pain Med.* **8 Suppl 2** S33-42 (2007).