

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7242 -Biotechnologie et signalisation cellulaire

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Pharmacologie

Etude des interactions fonctionnelles entre les récepteurs à peptide RF-amide et caractérisation de ligands bifonctionnels des récepteurs mu opioïde et NPPF

Présentée et soutenue par **Armand DRIEU LA ROCHELLE**
Le **12 avril 2018**

JURY

Dr. SIMONIN Frédéric, Directeur de recherche, université de Strasbourg
Dr MORISSET-LOPEZ Séverine, Chargé de recherche, CBM, Orléans
Dr. BELTRAMO Massimiliano, Directeur de recherche, Centre INRA Val de Loire
Pr. GAVERIAUX-RUFF Claire, Professeur de l'université de Strasbourg

Directeur de Thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur interne

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail, Dr. Séverine Morisser-Lopez, Pr. Claire Gavériaux-Ruff, Dr. Massimiliano Beltramo et Dr. Didier Rognan.

Je voudrais également remercier Frédéric Simonin pour m'avoir accueilli dans son équipe, et pour son soutien dans la préparation du concours de l'école doctorale en Master 2. Merci pour le partage de tes connaissances, tant sur les mécanismes de l'hyperalgésie induite par les opiacés que sur les orchidées sauvages d'Alsace, merci pour ta disponibilité et pour l'autonomie que tu m'as accordée dans ces divers projets.

Ma gratitude et ma reconnaissance vont à Brigitte Ilien, ton exigence et ta rigueur accompagnées de ta bonne humeur resteront un exemple pour moi. Merci à toi pour ces longues conversations de pharmacologie moléculaire, en particulier sur le FRET, qui m'ont tant appris et m'auront permis de construire un regard critique sur ce travail de thèse. Merci de m'avoir fait découvrir les grands de ce monde : Kenakin, Christopoulos, Vilardaga et Lohse (pour ne citer qu'eux).

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe, Valérie Utard pour ton soutien technique et moral à toute épreuve, Sandra Lecat pour avoir pris le temps de corriger certains passages de ce manuscrit, et pour toutes ces critiques constructives en labmeeting qui ont contribué à faire avancer mes travaux. Je voudrais spécialement remercier Renaud Wagner et l'équipe d'IMPreSS (Valérie Kugler, Gabrielle Zeder-Lutz, Lucie Hartmann, Sarah Bouteben et ses prédécesseurs), pour la joie, la bonne humeur et l'expertise que vous m'avez partagé quand j'étais au plus mal dans mes clonages. Un hommage au « bureau des rousses » (Glenn, Raph et Lydia), lieu stratégique de remotivation et de débriefing en tout genre. Merci à Dayana, Laurent, Thibaud, Eleonora qui m'ont tenu compagnie dans ce bureau D319. Merci au Pr Vincent Phalip et Pr Claire Gavériaux-Ruff pour ces deux années d'assistant aux travaux pratiques d'enzymologie, vous accompagner dans cette mission d'enseignement fut pour moi une très belle expérience.

Et plus largement au sein de l'ESBS et sur le campus d'Illkirch, je remercie le comité des fêtes et les jeunes doc' post-doc' pour tous ces bons moments, raclettes, BBQ et fêtes de Noël. Je remercie également la plateforme PCBIS, Pascal Villa, Sophie Gioria, Christel Valencia, ainsi que Patrick Gizzi et François Daubeuf pour m'avoir patiemment aidé, cette thèse n'aurait pas eu d'aussi beaux résultats sans vos conseils.

Je voudrais également remercier Dr. Frédéric Bihel et Séverine Schneider pour ces collaborations fructueuses et ces échanges scientifiques. J'aurai aimé porter encore plus loin ces ligands fluorescents ! Je remercie Dr. Steven Ballet pour avoir su comprendre le potentiel du mystérieux KGFF09 et permis à cette histoire de voir le jour, et à Charlotte Martin pour sa réactivité à me ré-aprovisionner en KGFF09.

Enfin, je voudrais remercier tous ceux qui ont rendu ces années de doctorat strasbourgeois aussi magique : Alex évidemment, soutien infaillible moral et logistique, ces virées en ski de fond sur les crêtes et ces footing autour du lac pour oublier le RF9 ! Tes petits tup' excellents et ta voiture m'ont fait gagner de précieuses heures et m'ont évité plusieurs pneumonies. Chaque page de ce manuscrit te revient de droit. Glenn et Raph pour tous ces petits moments magiques du quotidien qui ont égaillé ces trop longues heures passées au labo, ces trajets à vélo, et toutes ces soirées, ces journées à découvrir l'Alsace, ces week-ends passés avec la dream team strasbourgeoise (Hélène, Oriane, GG, Juju, Mélissa, Thibaut, Geek, Etza, Angie, Pierre). Tant de joies ! Vous mériteriez chacun une page de remerciements, mais il se fait tard...

Pour finir, je voudrais remercier ma famille, mes parents et la fratrie pour leur soutien constant, et leurs encouragements. Cette thèse n'aurait pas été si bien écrite sans vos corrections, ni sans cette semaine de vacances à Gérardmer 1 semaine avant de rendre le manuscrit !

Je tiens à remercier également la mCherry pour m'avoir à ce point pourri ces années, et au NPF₂R pour m'avoir systématiquement tenu tête dans mes clonages. Mes nuits auraient définitivement été plus tranquilles sans vous, mes cernes moins grands et mes cheveux moins blancs. Même quand j'aurais Alzheimer je me souviendrai de vous et je continuerai à vous maudire. Comparé à vous, une manip au Brandel était presque agréable.

Ma petite mémoire ne saurait redonner la liste exhaustive des personnes qui ont pu me prêter main forte, mais dans mon oubli je les remercie du fond du cœur.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION

| | |
|---|-----------|
| I. Les récepteurs couplés aux protéines G | 1 |
| 1. Historique..... | 1 |
| 2. Généralités | 2 |
| 3. Activation et signalisation d'un récepteur couplé aux protéines G..... | 3 |
| 3.1. La protéine G hétérotrimérique | 4 |
| 3.2. Les kinases associées au RCPG | 5 |
| 3.3. La β -arrestine | 7 |
| 4. Notion de ligand biaisé | 8 |
| 4.1. Le récepteur à l'hormone parathyroïdienne, et régénération osseuse | 10 |
| 4.2. Les récepteurs β -adrénergiques, et β -bloquants | 10 |
| 4.3. Le récepteur à la dopamine D_2 , et antipsychotiques | 11 |
| 4.4. Le récepteur 1 à l'angiotensine II | 11 |
| 5. Interactions fonctionnelles et hétérodimérisation | 12 |
| 5.1. Interactions non-spécifiques | 13 |
| 5.2. Interactions spécifiques..... | 14 |
| 5.3. Interactions complexes | 17 |
| II. Douleur et modulation du l'influx nociceptif..... | 18 |
| 1. Physiologie de la douleur..... | 18 |
| 1.1. Stimulus nociceptif et intégration | 18 |
| 1.2. Modulation de la douleur, hypersensibilité à la douleur | 20 |
| 2. Le système opioïdérique..... | 22 |
| 2.1. Les opiacés..... | 23 |
| 2.2. Les opioïdes endogènes..... | 24 |
| 2.3. Les fonctions biologiques des récepteurs aux opioïdes..... | 25 |
| 3. Prise en charge thérapeutique de la douleur | 31 |
| 3.1. Traitements actuels | 31 |
| 3.2. Limites des traitements actuels..... | 33 |
| III. Le système RF-amide..... | 41 |
| 1. Les neuropeptides RF-amide et leurs récepteurs | 42 |
| 1.1. Les peptides de libération de la prolactine (PrRP) et leur récepteur GPR10 | 42 |
| 1.2. La kisspeptine (Kp) et son récepteur GPR54..... | 43 |
| 1.3. Les peptides QRFP et leur récepteur GPR103..... | 44 |
| 1.4. Les peptides apparentés RF-amide (RFRP) et leur récepteur NPFF ₁ R..... | 44 |
| 1.5. Le neuropeptide FF (NPFF) et son récepteur NPFF ₂ R..... | 45 |
| 2. Les rôles physiologiques des peptides RF-amide..... | 47 |
| 2.1. Modulation de la nociception et de la douleur..... | 47 |
| 2.2. Régulation du métabolisme énergétique | 49 |
| 2.3. Le contrôle de la reproduction | 51 |
| 2.4. Rôle dans le système cardiovasculaire..... | 52 |

RESULTATS & DISCUSSION

PARTIE I : Interactions fonctionnelles entre récepteurs à peptide RF-amide

| | |
|--|-----------|
| I. Stratégie d'étude, objectifs | 56 |
| 1. Contexte..... | 56 |
| 2. Hypothèses de travail et stratégie d'étude | 57 |
| II. Mise au point de la mesure de la réponse $G_{i/o}$ | 60 |
| 1. Introduction..... | 60 |
| 1.1. Une sonde luminescente pour mesurer la quantité d'AMPC en cellules vivantes..... | 60 |
| 1.2. Différentes conditions expérimentales pour mesurer une activité $G_{i/o}$ en cellule | 61 |
| 2. Matériel et méthodes..... | 61 |
| 3. Résultats..... | 63 |
| 3.1. Potentialisation de la réponse AMPC à la forskoline et à l'isoprotérénol par l'IBMX | 63 |
| 3.2. Effet de l'IBMX sur le seuil basal d'AMPC et sur l'activité de NPFF ₁ R | 64 |
| 3.3. Effets de la forskoline sur l'activité de NPFF ₁ R, seul ou en présence d'IBMX..... | 65 |
| 3.4. Temps d'incubation du RFRP3 et de l'IBMX..... | 65 |
| 4. Discussion..... | 66 |
| 4.1. Saturation du signal AMPC mesuré | 66 |
| 4.2. Effet délétère de l'IBMX à 1 mM..... | 67 |
| 4.3. Relation entre IBMX, forskoline et mesure de l'activation de NPFF ₁ R par le RFRP3 | 67 |
| 4.4. Conclusion | 69 |
| III. Caractérisation de récepteurs fluorescents exprimés seuls ou par paire | 70 |
| 1. Introduction..... | 70 |
| 2. Matériel et méthodes..... | 71 |
| 3. Résultats : étude dans un modèle d'expression transitoire | 74 |
| 3.1. Construction de récepteurs RF-amide marqués par un fluorophore..... | 74 |
| 3.2. Mise au point du modèle d'étude | 75 |
| 3.3. Interaction fonctionnelle entre NPFF ₁ R et GPR10, GPR54 ou GPR103..... | 77 |
| 3.4. Conclusion et discussion | 78 |
| 4. Résultats : étude dans un modèle d'expression stable..... | 80 |
| 4.1. Préparation des plasmides codant pour les récepteurs RF-amide | 80 |
| 4.2. Caractérisation de lignées stables exprimant GPR103, NPFF ₁ R ou NPFF ₂ R..... | 80 |
| 4.3. Obtention d'une lignée co-exprimant hGPR103 avec NPFF ₁ R ou NPFF ₂ R..... | 82 |
| 4.4. Réponses fonctionnelles des récepteurs GPR103, NPFF ₁ R et NPFF ₂ R co-exprimés | 84 |
| 4.5. Rapprochement physique entre mCherry-GPR103 et EGFP-NPFF ₁ R ou EGFP-NPFF ₂ R..... | 87 |
| 4.6. Biais de localisation de mCherry-GPR103 | 88 |
| 4.7. Utilisation de CFP et YFP pour étudier les interactions entre GPR103 et NPFF ₁ R..... | 90 |
| 5. Discussion – conclusion..... | 91 |
| 5.1. La biologie moléculaire | 91 |
| 5.2. Expression et co-expression des récepteurs RF-amide | 92 |
| 5.3. Interactions entre GPR103 et NPFF ₁ R..... | 92 |
| I. Objectifs de l'étude et résumé | 96 |
| 1. Contexte..... | 96 |
| 2. Objectifs..... | 97 |
| 3. Résumé | 97 |
| II. Publication | 99 |

| | |
|---|------------|
| III. Résultats complémentaires et discussion..... | 154 |
| 1. Caractérisation de l'activité antagoniste sur le récepteur NPFF₂R..... | 154 |
| 1.1. Mesure de la production d'AMPc..... | 154 |
| 1.2. Mesure de la réponse calcique par activation de G _{q15} | 155 |
| 1.3. Mesure de la liaison de [³⁵ S]-GTPγS..... | 155 |
| 1.4. Mesure de la réponse calcique sans G _{q15} | 156 |
| 1.5. Discussion sur la pharmacologie de NPFF ₂ R..... | 156 |
| 2. Mesure de la dépression respiratoire induite par les opiacés chez la souris..... | 157 |
| 2.1. Pléthysmographie sur animal entier..... | 157 |
| 2.2. Mesure de l'effet du composé KGOP01..... | 158 |
| 2.3. Optimisation et amélioration de l'état d'éveil..... | 160 |
| 2.4. Discussion..... | 160 |
| IV. Conclusion | 161 |
| Bibliographie | 162 |

Liste des tableaux

Tableau 1 – Classification, fonction et expression des sous-unités α , β et γ des protéines G.

Tableau 2 – Séquence peptidique des peptides opioïdes endogènes.

Tableau 3 – Neuropeptides RF-amide et leurs récepteurs chez l'homme.

Tableau 4 – Constantes d'affinité de liaison (K_i) et de réponse fonctionnelle (EC_{50}) des différents peptides RF-amide sur les 5 récepteurs humains.

Tableau 5 – Valeurs d'activité (EC_{50}), signal maximum et pente de la courbe effet-dose de la forskoline et de l'isoprotérénol en absence et en présence de différentes concentrations d'IBMX.

Tableau 6 – Valeurs d'activité (EC_{50}), amplitude de réponse et pente de la courbe effet-dose du RFRP3 en absence de forskoline et en présence de différentes concentrations d'IBMX.

Tableau 7 – Protocole de transfection des cellules CHO ou HEK.

Tableau 8 – Protocole de transfection des cellules CHO.

Tableau 9 – Optimisation des conditions de transfection transitoire.

Tableau 10 – Viabilité et taux de transfection.

Tableau 11 – Valeurs d'activité (EC_{50}), signal maximum et pente de la courbe effet-dose du 26RFa.

Tableau 12 – Valeurs d'activité (EC_{50}), signal maximum et pente de la courbe effet-dose du RFRP3 et NPFF.

Tableau 13 – Valeurs d'activité (EC_{50}), signal maximum et pente de la courbe effet-dose du NPFF et RFRP3.

Tableau 14 – Etude de la dépression respiratoire induite par les opiacés par pléthysmographie dans la littérature.

Liste des figures

Figure 1 – Cycle d'activation de la protéine G hétérotrimérique par un récepteur.

Figure 2 – Principales cascades de signalisation des RCPG.

Figure 3 – Signalisation des ligands biaisés.

Figure 4 – Le pré-traitement par l'ATP révèle la réponse calcique induite par l'interleukine-8 dans des HEK-293 surexprimant le récepteur CXCR2.

Figure 5 – Voie de signalisation de l'influx nociceptif et intégration en expérience douloureuse.

Figure 6 – Structures chimiques des 5 principaux alcaloïdes opiacés.

Figure 7 – Topologie de GPR10.

Figure 8 – Topologie de GPR54.

Figure 9 – Topologie de GPR103.

Figure 10 – Topologie de NPFF₁R.

Figure 11 – Topologie de NPFF₂R.

Figure 12 – Profils d'affinité de liaison des peptides RF-amide pour les récepteurs GPR10, GPR54, GPR103, NPFF₁R et NPFF₂R.

Figure 13 – Les différentes hypothèses de recherche.

Figure 14 – Fonctionnement du GloSensor.

Figure 15 – Effet de l'IBMX sur la production d'AMPc induite par la forskoline ou par l'isoprotérénol dans les HEK-Glo-hNPFF₁R.

Figure 16 – Activation de hNPFF₁R et inhibition de l'activité basale des AC en présence d'IBMX.

Figure 17 – Effets de la forskoline et de l'IBMX sur la sensibilité de mesure de l'activation de hNPFF₁R au RFRP3.

Figure 18 – Dose-réponse de RFRP3 en variant les temps d'incubation du RFRP3 et de l'IBMX par rapport à la forskoline.

Figure 19 – Dose-réponse de RFRP3 en présence de différentes combinaisons équipotentes de forskoline et d'IBMX.

Figure 20 – Composition d'une construction d'un récepteur RF-amide fluorescent.

Figure 21 – Evaluation de l'efficacité de différents agents de transfection.

Figure 22 – Evaluation du taux de transfection par cytométrie en flux.

Figure 23 – validation des propriétés de fluorescence des récepteurs CFP-hGPR103 et YFP-hNPFF₁R

Figure 24 - Réponse calcique de GPR103, seul ou co-exprimé avec NPFF₁R, au 26RFa dans les cellules HEK.

Figure 25 - Comparaison des réponses AMPc de NPFF₁R, seul ou co-exprimé avec GPR103, au RFRP3 et au 26RFa dans des cellules HEK-Glo.

Figure 26 - Caractérisation de la lignée stable HEK-Glo + mCherry-hGPR103.

Figure 27 - Caractérisation de la lignée stable HEK-Glo + EGFP-hNPFF₁R.

Figure 28 - Caractérisation de la lignée stable HEK-Glo + EGFP-hNPFF₂R.

Figure 29 - Profil de fluorescence EGFP et mCherry des cellules HEK-Glo co-exprimant mCherry-hGPR103 et EGFP-hNPFF₁R.

Figure 30 - Profil de fluorescence EGFP et mCherry des cellules HEK-Glo co-exprimant mCherry-hGPR103 et EGFP-hNPFF₂R.

Figure 31 - Réponses AMPc et calciques des lignées co-exprimant hGPR103 et NPFF₁R ou hGPR103 et NPFF₂R.

Figure 32 - Localisation des récepteurs mCherry-hGPR103, EGFP-hNPFF₁R et EGFP-hNPFF₂R par microscopie confocale.

Figure 33 - Propriétés spectrales et étude de FRET par FLIM avec l'EGFP et la mCherry.

Figure 34 - Co-expression stable et réponses fonctionnelles des récepteurs CFP-hGPR103 et YFP-hNPFF₁R.

Figure 35 - Activité des composés KGFF03, KGFF09 et RF9 sur hNPFF₂R par mesure de la production d'AMPc.

Figure 36 - Activité des composés KGFF et du RF9 sur hNPFF₂R révélée avec la protéine chimérique G_{qi5}.

Figure 37 - Activité du NPFF et du RF9 sur hNPFF₂R mesurée par liaison de GTPγS.

Figure 38 - Mise au point de la mesure de dépression respiratoire avec KGOP01 (Ti, Te, TV, MV, f).

Figure 39 - Mise au point de la mesure de dépression respiratoire avec KGOP01 (RT, penh, Sr).

Figure 40 - Mise au point de la mesure de dépression respiratoire avec KGOP01 avec réveil toutes les 20 minutes.

Figure 41 - Effets des composés KGOP01, KGFF03 et KGFF09 sur la fonction respiratoire.

Liste des abréviations

5HT_{1A}R : Récepteur 1A à l'histamine
5HT_{2C}R : Récepteur 2C à l'histamine
AC : Adénylate cyclase
ACTH : Hormone adrénocorticotropine
ADN : Acide désoxyribonucléique
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
AKAP79/150 : protéine d'échafaudage de la kinase A, AKAP79 (humain) AKAP150 (murin)
ALT : Alanine aminotransférase
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AP-2 : Protéine adaptatrice 2
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASIC : Canal ionique sensible à l'acide
AST : Aspartate aminotransférase
ATM : Macrophage du tissu adipeux
AT₁R : Récepteur 1 à l'angiotensine II
ATII : Angiotensine II
ATP : Adénosine triphosphate
□AR : Récepteur □ adrénergique
BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BRET : Transfert d'énergie bioluminescente non radiative
CB₁R : Récepteur 1 aux cannabinoïdes
CFA : Adjuvant complet de Freund
CFP : Protéine fluorescente cyan
CGRP : Peptide relié au gène calcitonine
CHO : Ovaire de hamster chinois
COX : Cyclo-oxygénase
CREB : Protéine de liaison en réponse à l'AMPc
CTX : Toxine cholérique
CTZ : Centre du vomissement du cerveau (« chemotrigger zone »)
D₁R : Récepteur 1 à la dopamine
D₂R : Récepteur 2 à la dopamine
DOR : Récepteur □ opioïde
DSM : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (« Diagnostic and statistical manual of mental disorders »)
EGFP : Protéine fluorescente verte améliorée
Erk1/2 : Kinase régulée par un signal extracellulaire (« Extracellular signal-regulated kinase »)
EV : Volume d'air expiré
f : Fréquence respiratoire
FACS : Tri cellulaire par fluorescence (« Fluorescence activated cell sorting »)
FRET : Transfert d'énergie fluorescente non radiative
FSH : Hormone folliculo-stimulante
GABA : Acide □-aminobutyrique
GDP : Guanosine diphosphate
GFP : Protéine fluorescente verte

GIRK : Canal potassique entrant rectifiant (« **G** protein coupled **Inwardly-Rectifying** potassium channel »)

GnRH : Hormone de libération des gonatrophines

GRK : Kinase associée aux RCPG (« **GPCR Related Kinase** »)

GTP : Guanosine triphosphate

HAS : Haute autorité de santé

HEK : Human embryonic kidney, rein d'embryon humain

HIO : Hyperalgésie induite par les opiacés

HRH1 : Récepteur H1 à l'histamine

IASP : Association internationale d'étude de la douleur

IBMX : 3-isobutyl-1-méthylxanthine

i.c.v. : Intra-cérébro-ventriculaire

IFN- α : Interféron α

IHC : Immunohistochimie

IL-8 : Interleukine 8

ISH : Hybridation *in situ*

i.t. : Intrathécale

KissR : Récepteur à la kisspeptine, ou GPR54

KOR : Récepteur μ opioïde

Kp : Kisspeptine

LDH : Lactate déshydrogénase

LH : Hormone lutéinisante

MOR : Récepteur μ opioïde

MSH : Hormone de stimulation des mélanocytes

MT₂R : Récepteur 2 à la mélatonine

MV : Volume minute

NK₁R : Récepteur 1 à la neurokinine

NOR : Récepteur à la nociceptine

NPAF : Neuropeptide AF

NPFF : Neuropeptide FF

NPFF₁R : Récepteur 1 au NPFF

NPFF₂R : Récepteur 2 au NPFF

OX₁R : Récepteur 1 à l'orexine

PDE : Phosphodiesterase

PDYN : Prodynorphine

PEF : Pic du flux d'air à l'expiration

penh : Temps de pause augmenté

PENK : Proenképhaline

PIF : Pic de flux d'air à l'inspiration

PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PNOC : Pronociceptine

POMC : Pro-opiomélanocortine

PrRP : Neuropeptide de libération de la prolactine

PTH : Hormone para-thyroïdienne

PTX : Toxine pertussique

PVN : noyau paraventriculaire
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RFRP : « RF-amide related peptide »
RT : Temps de relaxation
s.c. : Sous-cutané
SFETD : Société française d'étude des traitements de la douleur
SNC : Système nerveux central
SpO₂ : Saturation pulsée en oxygène
Sr : Résistance respiratoire spécifique
SRAA : Système rénine angiotensine aldostérone
Te : Temps d'expiration
Ti : Temps d'inspiration
TNF : Facteur de nécrose tumorale
TRPV : « Transient receptor potential vanilloid »
TV : Volume tidal, aussi appelé volume courant
UTP : Uridine triphosphate
V₂R : Récepteur 2 à la vasopressine
YFP : Protéine fluorescente jaune

Introduction

I. Les récepteurs couplés aux protéines G

1. Historique

Si l'étude de l'action biologique de molécules chimiques et le développement de traitements remontent débuts de la médecine, la pharmacologie ne s'en est distinguée comme discipline propre qu'à partir du XIXe siècle avec l'émergence des notions fondamentales de ligand et de récepteur. Les travaux pionniers de Claude Bernard (1813 – 1878) sur l'action paralysante des curares sur le muscle strié introduisirent la notion de cible spécifique pour l'action d'une drogue. De plus, il apporte une approche méthodologique rationnelle de la médecine expérimentale en publiant en 1865 l'*Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* qui contribua à l'essor des études pharmacologiques (Bernard, 1865).

Rudolf Buchheim (1820 – 1879) fonde en 1847 le premier Institut de Pharmacologie, à Dorpat (actuel Tartu, en Estonie), et eu notamment comme élève Oswald Schmiedeberg (1838 – 1921) qui lui succéda à Dorpat, avant de prendre en 1872 la tête de l'Institut de Pharmacologie de Strasbourg. Il est souvent considéré comme le fondateur de la pharmacologie moderne pour ses études de relation structure-activité sur les composés actifs d'origine naturelle comme la nicotine, la muscarine, la digitonine ou la caféine. Il étudie les phénomènes de modifications chimiques d'une molécule par un organisme vivant, contribuant ainsi à l'émergence de la toxicologie (Koch-Weser and Schechter, 1978).

Les travaux de Paul Ehrlich (1854 – 1915, prix Nobel 1908) permirent de passer de la pharmacologie expérimentale à la pharmacologie thérapeutique, on lui attribue notamment la naissance de la chimiothérapie (Bosch and Rosich, 2008). Il utilise la pharmacologie non plus pour étudier la physiologie mais pour comprendre et reproduire des pathologies chez l'animal, afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de composés chimiques. Il structure le développement de nouveaux médicaments en trois étapes : la synthèse d'un grand nombre de composés chimiques, le criblage pharmacologique de ces composés dans le but d'évaluer leur activité, et enfin l'optimisation toxicologique des composés actifs. Sur un plan fondamental, Paul Ehrlich élabore la théorie de la sélectivité ou spécificité d'action de diverses substances. Il énonce le principe suivant : « corpora non agunt nisi fixata », une substance n'agit que si elle se fixe.

John Newton Langley (1852 – 1925), reprenant les travaux de Claude Bernard, montre que la nicotine et le curare agissent sur la même « substance réceptrice ». Il ébauche la théorie de l'occupation, selon laquelle l'amplitude de l'effet est en relation avec la quantité de ligand combinée à la « substance réceptrice ». Les échanges entre Langley et Ehrlich permettront de développer en 1900 la notion de récepteur, pouvant être activé par un agoniste ou bloqué par un antagoniste (Bosch and Rosich, 2008).

2. Généralités

La pharmacologie correspond à l'étude des mécanismes d'interaction entre une substance active et l'organisme dans lequel elle évolue. L'activité de la substance dépend de sa liaison à une substance réceptrice ou récepteur, à l'origine de la réponse biologique de l'organisme à la substance active. Le récepteur est une protéine transmembranaire désignée pour reconnaître des messages chimiques venant d'autres cellules et les traduire par une réponse cellulaire. C'est un élément clef de communication entre les cellules, nécessaire au bon fonctionnement des organismes pluricellulaires. L'interaction entre le récepteur et le ligand est spécifique, et se fait par des liaisons chimiques faibles non covalentes, ce qui rend la liaison réversible. Cette liaison induit une modification de conformation du récepteur, qui va initier la réponse cellulaire.

On distingue plusieurs classes de récepteurs, selon leur mode d'action et leur structure moléculaire :

- les récepteurs à activité enzymatique, telle que tyrosine-kinase (récepteurs des facteurs de croissance), sérine/thréonine kinase (récepteur au TGF β) ou guanylate cyclase (récepteur de l'ANP)
- les récepteurs comportant un canal ionique (récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine)
- les récepteurs couplés aux protéines G (ou RCPG) dont l'activation permet le recrutement de protéines hétérotrimériques, qui à leur tour peuvent agir sur des enzymes (adénylate cyclase, phospholipase C) ou modifier directement la conductance de canaux ioniques (hyperpolarisation de canaux K⁺, dépolarisation de canaux Ca²⁺).

Depuis les travaux de Langley et Ehrlich, les avancées en Pharmacologie ont mis en évidence l'importance des RCPG dans un nombre toujours croissant de fonctions biologiques. Cette famille de plus de 800 récepteurs chez l'homme (>1% du génome) offre une grande diversité de structure et de fonction, et détecte des substances actives aussi distinctes qu'un photon, une odeur, un nucléotide ou une protéine. Leurs rôles incontournables dans la communication des cellules au sein de l'organisme en font des cibles privilégiées pour le développement de

médicaments. Les caractéristiques communes de cette famille de récepteur sont structurales, avec la présence de 7 hélices α transmembranaires (TM-I à TM-VII) connectées entre elles par 3 boucles extracellulaires (E-I à E-III) et 3 boucles intracellulaires (C-I à C-III). Il existe plusieurs classifications au sein de la famille des RCPG, et la plus consensuelle se base sur des homologies de séquences pour les séparer en 6 groupes (Alexander et al., 2017) :

- la classe A (rhodopsin-like),
- la classe B (récepteur à la sécrétine),
- la classe C (récepteurs métabotropiques au glutamate),
- la classe D (récepteurs aux phéromones fongiques),
- la classe E (récepteurs à l'AMP cyclique), et
- la classe F (smoothened/frizzled).

Les classes D et E ne sont pas représentées chez les vertébrés. La classe A est le groupe majoritaire avec près de 90% des RCPGs.

3. Activation et signalisation d'un récepteur couplé aux protéines G

La liaison du ligand au récepteur provoque de multiples réarrangements au sein des 7TM qui se traduisent du côté intracellulaire par un basculement marqué de certains segments transmembranaires (Katritch et al., 2013; Venkatakrisnan et al., 2016). On sait aujourd'hui qu'il existe pour un même récepteur plusieurs états conformationnels et que la fixation d'un ligand stabilise une ou plusieurs conformations différentes qui amènent le recrutement des partenaires intracellulaires variés, qui à leur tour vont permettre d'amorcer une ou plusieurs cascades de signalisation (Hilger et al., 2018; Nygaard et al., 2013; Solt et al., 2017). Il existe trois grands groupes de protéines capables d'interagir avec la forme activée du récepteur : les protéines G, les arrestines, et des kinases associées aux RCPG (GRK). Ces partenaires sont complémentaires : la protéine G démarre la cascade de signalisation, tandis que la GRK et la β -arrestine délimitent de manière spatio-temporelle l'activité du récepteur initiée par la protéine G.

3.1. La protéine G hétérotrimérique

Les protéines G sont constituées de 3 sous-unités, α , β , et γ . Il existe 21 types de sous-unités α , 6 sous-unités β , et 13 sous-unités γ , offrant un grand nombre de combinaisons possibles, à l'image de la diversité des cascades de signalisation qui en découlent (table 1) (Milligan and Kostenis, 2006). A l'état inactif, la sous-unité α est liée à un GDP. Lorsqu'un agoniste se lie au récepteur, le changement conformationnel de ce dernier permet l'activation de la protéine G dont la sous-unité α va relarguer le GDP (Figure 1).

| sous-unité | famille | sous-type | effecteurs | expression |
|------------------|------------------|-----------------------|--|---|
| G α | α_s | $\alpha_{s(S, L)}$ | ↗ AC, canaux Ca ²⁺ | ubiquitaire |
| | | $\alpha_{s(XL, XXL)}$ | ↗ AC, canaux Ca ²⁺ | tissu neuroendocrinien |
| | | α_{olf} | ↗ AC | épithélium olfactif, cerveau, pancréas |
| | $\alpha_{i/o}$ | α_{o1-3} | ↘ AC | tissu neuroendocrinien, cardiomyocytes |
| | | α_{i1-3} | ↘ AC type I, V, VI, ↘ canaux Ca ²⁺ | ubiquitaire |
| | | α_z | ↘ AC type V | plaquettes, neurones |
| | | $\alpha_{t(r, c)}$ | ↗ cGMP-PDE | bâtonnets et cônes de la rétine |
| | | α_{gust} | ↗ PDE | papilles gustatives |
| | α_q | $\alpha_{q/11}$ | ↗ PLC β (1, 3), Rho-GEF | ubiquitaire |
| | | α_{14-16} | ↗ PLC β (1, 3) | cellules hématopoïétiques |
| $\alpha_{12/13}$ | $\alpha_{12/13}$ | ↗ Rho-GEF | ubiquitaire | |
| G $\beta\gamma$ | β | β_{1-6} | ↗ AC type II, IV et VII, GIRK, PLC β | ubiquitaire pour β_{1-2} , étendue pour β_{3-4} |
| | γ | γ_{1-13} | ↗ PLA ₂ , PI3K, GRK2, 3 ↘ VDCC | ubiquitaire pour γ_{12} , étendue pour $\gamma_{2-7, 10, 11, 13}$ |

Table 1 : Classification, fonction et expression des sous-unités α , β et γ des protéines G. Il existe 21 variants de la sous-unité α classés en 4 sous-familles selon les similarités de séquence. Il existe 4 variantes d'épissage de G α_s de différentes tailles : court (S), long (L) et très long (XL, XXL). ↗ = stimulation ; ↘ = inhibition ; AC : adénylate cyclase ; PDE : phosphodiesterase ; cGMP-PDE : PDE dépendant du GMP cyclique ; PLC β : phospholipase C β ; Rho-GEF : facteur d'échange du nucléotide guanine de la GTPase Rho ; GIRK : canal K⁺ entrant rectifiant modulé par une protéine G ; PLA₂ : phospholipase A₂ ; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase ; GRK : kinase de RCPG ; VDCC : canal Ca²⁺ voltage dépendent. D'après (Ellis, 2004; Hermans, 2003; Milligan and Kostenis, 2006; Smrcka, 2008).

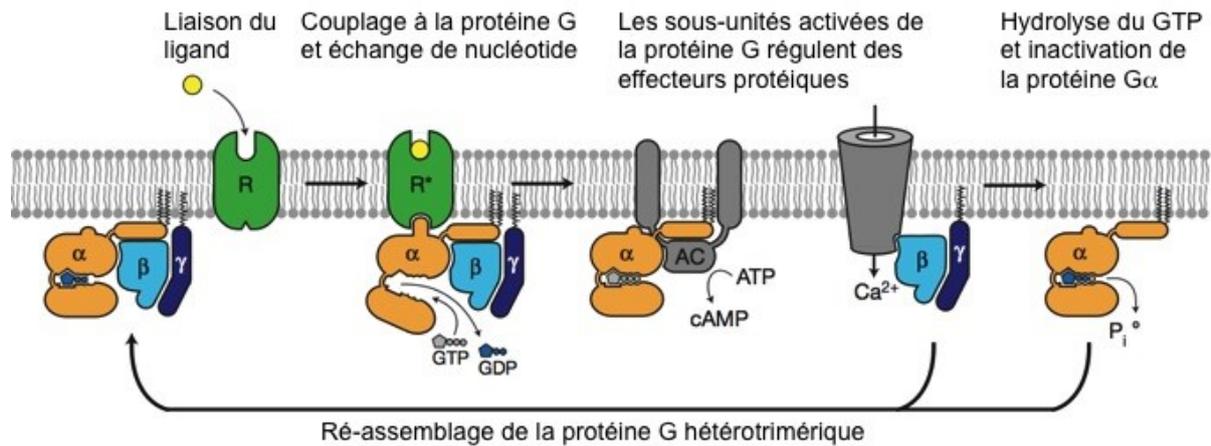


Figure 1 : cycle d'activation de la protéine G hétérotrimérique par un récepteur. Un ligand extracellulaire se lie au récepteur ce qui entraîne des réarrangements conformationnels au niveau de ses domaines intracellulaires, ce qui permet à la protéine G de lier le récepteur. La sous-unité α échange du GDP pour du GTP permettant à $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de se dissocier pour aller réguler des effecteurs (ici l'adénylate cyclase pour $G\alpha$ et un canal Ca^{2+} pour $G\beta\gamma$). Schéma traduit de (Rasmussen et al., 2011).

La protéine G, et plus particulièrement la sous-unité α joue un rôle de modulateur allostérique positif sur la liaison du ligand au récepteur (Rasmussen 2011, Carpenter 2016). Le recrutement de GTP par $G\alpha$ provoque la dissociation de l'hétérotrimère en $G\alpha$ d'un côté et $G\beta\gamma$ de l'autre. Les sous-unités ainsi séparées vont ensuite interagir et activer un large panel d'effecteurs qui vont aboutir à un signal intracellulaire faisant intervenir une cascade de phosphorylation protéique et/ou une régulation des concentrations ioniques de la cellule (Figure 2). Les paramètres les plus usuellement mesurés pour suivre l'activation des protéines G sont la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (qui augmente suite à l'activation de $PLC\beta$, reflétant l'activité de $G\alpha_q$) et la production d'AMPc par les adénylate cyclases (AC, stimulées par $G\alpha_s$ et inhibées par $G\alpha_{i/o}$).

3.2. Les kinases associées au RCPG

Il en existe 7 isoformes chez les mammifères, qui sont spécifiques de la vision (GRK1, GRK7) ou ubiquitaires (GRK2-6). Une fois activées, elles rejoignent la membrane plasmique pour phosphoryler des récepteurs activés par leurs ligands sur des résidus sérine et thréonine au niveau de la troisième boucle intracellulaire et dans le domaine carboxyl-terminal. Ces phosphorylations sont un véritable « code-barres » imprimé par les GRK pour être lu par les β -arrestines et traduit sous forme de cascades d'activation de différentes protéines (Nobles et al., 2011).

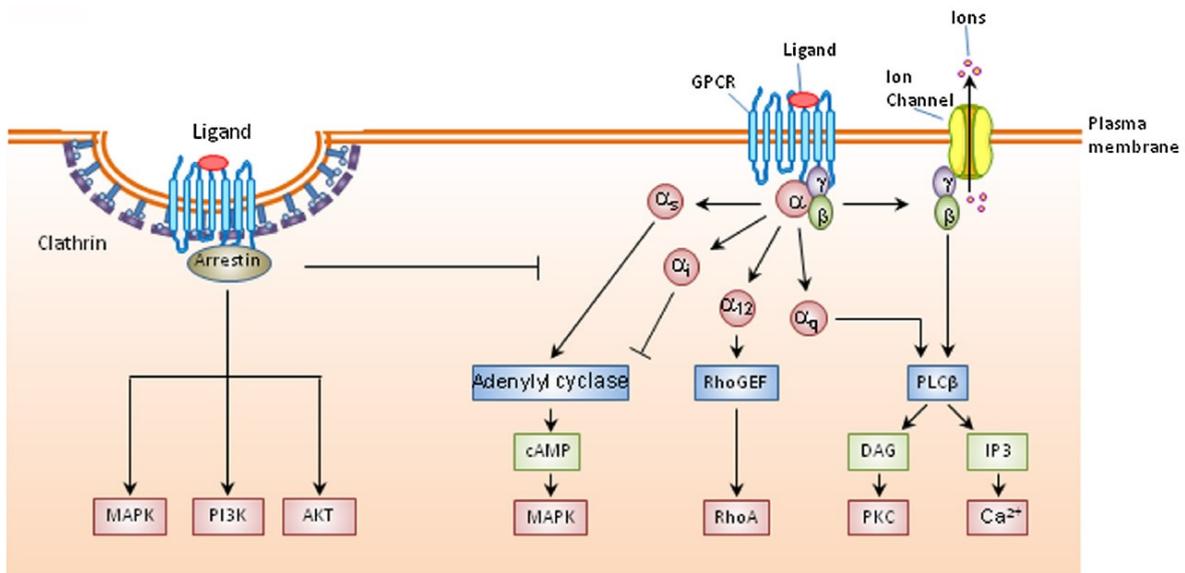


Figure 2 : Principales cascades de signalisation des RCPG. Suite à la liaison d'un agoniste sur son récepteur, celui-ci interagit avec la protéine hétérotrimérique qui se dissocie pour activer une cascade d'effecteurs intracellulaires et des canaux ioniques. La β -arrestine permet le recrutement de clathrines et l'internalisation du récepteur, mais peut également initier des voies de signalisation qui lui sont propres. D'après (Galandrin et al., 2016).

Chaque GRK peut « imprimer » un code-barres différent selon le récepteur et le type cellulaire et cette signature va déterminer la conformation active adoptée par la β -arrestine. Les GRK1, 4, 5, 6, 7 sont localisées à la membrane plasmique et peuvent facilement interagir avec le récepteur activé, alors que les GRK2 et 3 sont cytosoliques, et leur translocation à la membrane nécessite leur recrutement par les sous-unités $G\beta\gamma$ activées (Kohout, 2003). Les GRK2 et 3 peuvent également interagir avec $G\alpha_q$ et diminuer l'activation de la $PLC\beta$ par cette dernière.

Les processus d'activation des GRK ne sont pas clairement élucidés, et leur activation n'est pas toujours directement dépendent des protéines G : par exemple quand le récepteur β_2 adrénergique (β_2AR) est activé, il stimule la production d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA). La protéine d'échafaudage dépendant de la PKA (AKAP79/150) se lie à β_2AR et phosphoryle la GRK2 qui se lie à $G\beta\gamma$ et module son activité (Cong et al., 2001; Fraser et al., 2000). De même, l'activation de α_1AR va, via $G\alpha_q$, stimuler la protéine kinase C (PKC) qui va phosphoryler GRK2 et provoquer sa translocation à la membrane (Chuang et al., 1995; Winstel et al., 1996). Dans ces deux cas, les protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_q$ sont en amont de l'activation des PKA et PKC, respectivement, et gardent donc un rôle indirect sur l'activation de la GRK. Il n'y a, à ce jour, pas de mécanisme d'activation des GRK décrit dans la littérature qui soit strictement indépendant des protéines G.

3.3. La β -arrestine

Les arrestines sont des protéines intracellulaires « d'échafaudage » (scaffold protein en anglais), ces molécules servent de support pour rassembler et permettre l'interaction entre plusieurs autres protéines de signalisation de la cellule. Parmi les protéines d'échafaudage, les arrestines se distinguent par leur capacité à se lier à des récepteurs couplés aux protéines G. Il existe 4 isoformes d'arrestine, deux isoformes strictement impliquées dans la vision (arrestine-1 et arrestine-4) et deux isoformes qui ne sont pas impliquées dans la vision (arrestine-2 ou β -arrestine-1, et arrestine-3 ou β -arrestine-2). On connaît trois grands rôles aux β -arrestines : elles sont responsables de la désensibilisation et du recyclage des récepteur ; de la régulation spatio-temporelle de la signalisation du récepteur activé ; et les β -arrestines ont également un rôle de plate-forme de signalisation (Bahouth and Nooh, 2017; Peterson and Luttrell, 2017).

Les β -arrestines ont initialement été identifiées dans les processus de désensibilisation et recyclage des RCPG à la membrane plasmique (Goodman et al., 1996; Lohse et al., 1990). En effet, suite à la phosphorylation du récepteur par les GRK, la β -arrestine est recrutée à la membrane par le récepteur et provoque l'interaction entre la clathrine et sa protéine adaptatrice (AP-2) ce qui initie la formation de vésicules d'endocytoses (Goodman et al., 1996). Le récepteur est internalisé dans des endosomes, d'où il est ensuite dégradé ou recyclé à la membrane plasmique. La β -arrestine joue un rôle important de contrôle du récepteur, en régulant les niveaux d'expression des récepteurs à la membrane non seulement suite à sa propre activation, mais aussi suite à l'activation d'autres récepteurs de la cellule (Paradis et al., 2015).

Les β -arrestines ne servent pas seulement à désensibiliser le récepteur, mais plus largement à déplacer le récepteur dans la cellule grâce à des interactions avec des protéines à domaine PDZ (Magalhaes et al., 2012) et ainsi à moduler son activité, notamment via les protéines G. La β -arrestine contrôle ainsi le temps de résidence du récepteur activé à la membrane (Puthenveedu and von Zastrow, 2006), et oriente le récepteur vers des compartiments intracellulaires ciblés, ce qui peut permettre de prolonger l'activation de protéines G au niveau intracellulaire (Thomsen et al., 2016). Or la signalisation cellulaire est résolutive dans l'espace, ce qui signifie qu'un même signal, la production d'AMPc par exemple, peut avoir des conséquences différentes selon qu'il soit produit à la membrane plasmique, au niveau des endosomes, ou vers la membrane nucléaire (Tsvetanova and von Zastrow, 2014).

La β -arrestine est un important régulateur de l'expression et de la localisation des RCPG, mais elle est également un partenaire de signalisation pour le récepteur en offrant une plateforme d'ancrage, ou réceptosome, pour de nombreux partenaires du récepteur dont de nombreuses kinases, phosphatases, facteurs nucléaires, phosphodiesterases et ubiquitine ligases (Peterson and Luttrell, 2017). Le rôle des protéines G dans cette signalisation n'est pas encore bien compris, elles peuvent participer avec la β -arrestine dans ces complexes de signalisation, formant des « mégaplexes » où la protéine G et la β -arrestine sont liées simultanément au récepteur (Thomsen et al., 2016). La β -arrestine pourrait également développer une signalisation indépendamment des protéines G, comme la phosphorylation de Erk1/2 (Shenoy et al., 2006; Tilley, 2011; Wei et al., 2003), mais les études ne sont pas unanimes sur le sujet (Grundmann et al., 2018).

4. Notion de ligand biaisé

La notion de ligand biaisé vient du constat simple que deux agonistes différents d'un même récepteur peuvent induire des réponses cellulaires différentes, ces phénomènes ont été mis en évidence pour la première fois sur le récepteur α_2 adrénergique capable d'activer les protéines G_i et, selon l'agoniste utilisé, G_s (Eason et al., 1994). Le principe de ligand biaisé s'explique d'un côté par la capacité d'un récepteur à engendrer différentes réponses cellulaires, et d'autre part à la capacité des ligands à favoriser l'une ou l'autre voie de signalisation du récepteur (Kenakin and Christopoulos, 2013). Cette orientation par le ligand du récepteur vers une voie d'activation particulière peut se faire à trois niveaux : dans la capacité du récepteur à recruter des protéines effectrices (protéines G, β -arrestine) ; dans la localisation intracellulaire du récepteur actif ; et dans les cinétiques d'interaction du ligand au récepteur (Costa-neto et al., 2016). On peut définir un ligand de biaisé dans la réponse cellulaire provoquée par sa liaison au récepteur par rapport à l'activation de ce récepteur par un ligand de référence, le plus souvent le ligand endogène. Autrement dit, un ligand est biaisé lorsqu'il induit une réponse cellulaire différente de celle du ligand endogène.

La première possibilité de biais correspond aux protéines de signalisation interagissant directement avec le récepteur. Un ligand est biaisé s'il favorise le couplage d'une protéine G différente du couplage de référence (Eason et al., 1994), ou s'il modifie l'équilibre d'activation de la protéine G par rapport à la β -arrestine (Wisler et al., 2014) (Figure 3).

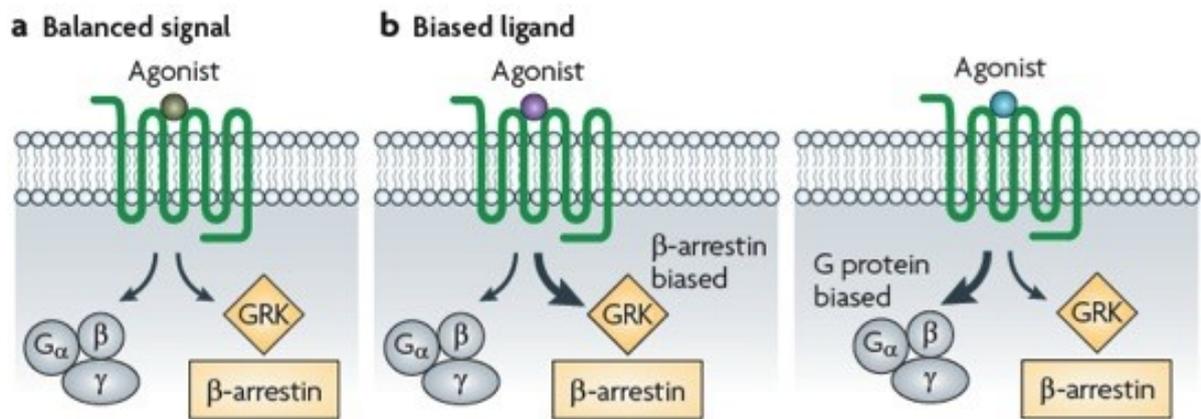


Figure 3 : Signalisation des ligands biaisés. Un ligand non biaisé permet l'activation des voies protéine G et β -arrestine (a), alors qu'un agoniste biaisé favorise l'une des deux voies (b). D'après (Rajagopal et al., 2010).

L'activation par un ligand d'un récepteur le stabilise dans une conformation active ce qui lui permet de recruter différents partenaires intracellulaires, protéine G, GRK et β -arrestine. Cependant, certains ligands favorisent des conformations particulières qui activent préférentiellement la protéine G par rapport à la β -arrestine, amenant un biais dans la signalisation du récepteur en faveur de la protéine G. C'est le cas du TRV130, un agoniste du récepteur μ opioïde (MOR) pour la voie $G_{i/o}$, mais qui n'induit pas le recrutement de la β -arrestine (DeWire et al., 2013). Ce type de ligand MOR biaisé est associée à un effet analgésique (par $G_{i/o}$) sans ralentissement de la fonction respiratoire (par la β -arrestine)(Schmid et al., 2017). A l'inverse, il existe des ligands biaisés vers la β -arrestine par rapport à la protéine G. Par exemple, TRV120027 est un agoniste du récepteur 1A à l'angiotensine II ($AT_{1A}R$) qui active la voie de la β -arrestine (améliore la contractilité cardiaque) tout en bloquant la voie des protéines G, ce qui offre la perspective d'améliorer la contractilité cardiaque (β -arrestine) tout en diminuant la pression artérielle en bloquant la vasoconstriction (protéine G). Cette activité biaisée lui procure un avantage sur les antagonistes classiques de l'angiotensine, qui diminuent la pression artérielle mais détériorent la contractilité cardiaque (Violin et al., 2010).

La diversité des réponses cellulaires suite à l'activation d'un récepteur par différents ligands peut également s'expliquer par des différences de localisation de ce récepteur dans la cellule. Le lieu d'activation et de signalisation des récepteurs couplés aux protéines est généralement la membrane plasmique, suivie d'une internalisation dans des endosomes, cette internalisation découple le récepteur de la protéine G, ce qui met fin à la signalisation. C'est donc de manière contre-intuitive qu'il a été montré que certains récepteurs continuaient d'induire une signalisation après leur internalisation. Ainsi, la PTH(1-34), qui donne un signal AMPc prolongé par rapport à la PTH(1-36), internalise avec le récepteur qui reste activé dans les

endosomes, ce qui prolonge la production d'AMPc (Calebiro et al., 2009; Ferrandon et al., 2009). De même, la réponse fonctionnelle du récepteur 1 à la dopamine (D₁R) se poursuit après son internalisation (Kotowski et al., 2011), et la réponse du récepteur β_2 adrénergique (β_2 AR) à l'isoprotérénol continue dans les endosomes (Irannejad et al., 2013). De plus, cette signalisation du β_2 AR depuis les endosomes est nécessaire pour obtenir la réponse transcriptionnelle complète de l'isoprotérénol (Tsvetanova and von Zastrow, 2014). L'endosome n'est pas le seul compartiment intracellulaire d'où les récepteurs couplés aux protéines G peuvent activer des voies de signalisation, en effet le récepteur à l'adrénaline est capable d'activer le récepteurs β_1 adrénergique présent au niveau du golgi et d'activer la voie de signalisation protéine Gs –PKA (Irannejad et al., 2017).

La notion de ligand biaisé se base sur des observations faites *in vitro*, le plus souvent dans des modèles cellulaires susceptibles de générer des artefacts dus à la surexpression du récepteur et/ou des partenaires intracellulaires, des récepteurs modifiés, des conditions de mesure plus ou moins proche des conditions physiologiques (Galandrin et al., 2016; Onaran et al., 2017). Ces observations doivent donc être confirmées dans des études *in vivo*, comme illustré ci-dessous avec le récepteur à l'hormone parathyroïdienne, le récepteur β -adrénergique, le récepteur 2 à la dopamine, et le récepteur 1 à l'angiotensine II :

4.1. Le récepteur à l'hormone parathyroïdienne, et régénération osseuse

L'hormone parathyroïdienne (PTH) contrôle l'homéostasie calcique et le renouvellement de la matrice osseuse par un équilibre entre formation osseuse par les ostéoblastes et dégradation par les ostéoclastes. La caractérisation d'un analogue de la PTH biaisé β -arrestine pour le récepteur de la PTH (Gesty-Palmer et al., 2006) *in vivo* et l'étude de la PTH dans des souris KO pour la β -arrestine ont montré que la voie de signalisation dépendante de la β -arrestine était reliée à la formation osseuse et l'activation des ostéoblastes, alors que la voie de signalisation dépendante de la protéine G aboutissait à l'activation des ostéoclastes et à la dégradation du tissu osseux (Gesty-Palmer et al., 2009).

4.2. Les récepteurs β -adrénergiques, et β -bloquants

Les β -bloquants sont une classe de médicaments utilisés principalement dans l'hypertension artérielle ou l'insuffisance coronarienne, ce sont des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques. Il existe des β -bloquants non sélectifs des récepteurs β_1 et β_2 adrénergiques, comme le carvedilol, et des β -bloquants sélectifs pour le récepteur β_1 , comme le métoprolol.

Compte-tenu des avancées en pharmacologie, et en compréhension des voies de signalisation, notamment avec la β -arrestine, des études récentes ont approfondi les caractéristiques pharmacologiques de cette classe de médicaments, et ont montré que le carvedilol était en fait un antagoniste des récepteur β adrénergiques pour le recrutement de la protéine G_s , mais un agoniste pour la signalisation par la β -arrestine, il s'agit donc d'un agoniste biaisé pour la β -arrestine (Kim et al., 2008; Wisler et al., 2007). Une étude plus poussée du carvedilol a pu montrer que ce ligand est agoniste pour la voie de la protéine G_i , en plus d'être agoniste pour le recrutement de la β -arrestine (Wang et al., 2017). De même, une caractérisation plus fine de la pharmacologie du métoprolol a montré qu'il s'agit d'un agoniste inverse du récepteur β_1 pour la voie de la protéine G_s , mais un agoniste de ce même récepteur vers la β -arrestine, et que la signalisation du récepteur β_1 par la voie GRK / β -arrestine est responsable du développement de la fibrose cardiaque induite par le métoprolol (Nakaya et al., 2012).

4.3. Le récepteur à la dopamine D_2 , et antipsychotiques

L'application du concept d'agoniste biaisé sur la cas du récepteur D_2 à la dopamine a apporté des interprétations contradictoires des mécanismes d'action des antipsychotiques se liant se ce récepteur, certains proposant l'antagonisme de la voie β -arrestine pour expliquer l'activité antipsychotique (Masri et al., 2008), alors que d'autres montraient que les agonistes biaisés vers la β -arrestine offraient de bons résultats sur des modèles animaux de psychose (Allen et al., 2011). L'aripiprazole a même été successivement décrit comme agoniste biaisé vers la β -arrestine (Allen et al., 2011) puis vers la protéine G_i (Szabo et al., 2014). Pour concilier ces différentes observations, une étude a montré l'importance d'une part de la maîtrise rigoureuse des conditions d'expérimentation, et d'autre part de la prise en compte des cinétiques de liaison dans la mesure des réponses fonctionnelles de différents composés antipsychotiques (Herenbrink et al., 2016).

4.4. Le récepteur 1 à l'angiotensine II

L'angiotensine II (ATII) est un peptide appartenant au système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et qui joue un rôle important dans la fonction cardiovasculaire, et plus précisément dans le maintien de la pression artérielle. Les antagonistes sélectifs du récepteur 1 à l'angiotensine II (AT_{1R}) forment une classe de médicaments (« sartan ») utilisés contre l'hypertension artérielle. L'étude comparative de l'angiotensine II et d'un agoniste de AT_{1R} biaisé pour la β -arrestine sur des cardiomyocytes a montré que les effets positifs de l'ATII sur

le tissu cardiaque, à savoir des effets inotropes positifs (amélioration de la contraction cardiaque) et lusinotrope (amélioration de la relaxation diastolique) dépendaient de la signalisation de la β -arrestine dans les cardiomyocytes (Rajagopal et al., 2006). Une observation confirmée avec le développement d'un composé biaisé β -arrestine pour l'AT₁R d'efficacité comparable au telmisartan sur la pression artérielle, mais qui contrairement au telmisartan préserve les paramètres cardiaques (volume d'éjection systolique, contractilité) (Violin et al., 2010). Ce composé a passé avec succès les essais cliniques de phase 1 et de phase 2a, mais a été arrêté en phase 2b faute de résultats suffisants sur les critères principaux et secondaires (Pang et al., 2017), bien qu'une sous-analyse rétrospective fasse ressortir un effet positif à 180 jours chez les individus ayant une forte pression systolique et traité à la plus faible dose par l'agoniste biaisé (Cotter et al., 2017).

Cette dissociation subtile des affinités du récepteur activé pour ses différents partenaires intracellulaires ouvre de nouvelles stratégies de développement de composés à visée thérapeutique, afin d'améliorer leur sélectivité vis-à-vis d'une voie de signalisation et donc d'un effet biologique précis, afin de limiter les effets indésirables d'un médicament par exemple. Les mécanismes structuraux et fonctionnels permettant de dissocier le recrutement de chaque partenaire par le récepteur sont des axes de recherche qui permettent de mieux comprendre les limites de médicaments existants, comme les β -bloquants (van der Westhuizen et al., 2014) ou les antagonistes de l'angiotensine II, et d'ouvrir des nouvelles perspectives thérapeutiques (Kenakin and Christopoulos, 2013).

5. Interactions fonctionnelles et hétérodimérisation

Chaque cellule exprime plusieurs types de récepteurs, et en particulier de récepteurs couplés aux protéines G, c'est pourquoi l'activité de ces récepteurs est finement régulée dans le temps et dans l'espace. Afin d'assurer une cohérence et une harmonie au sein d'une cellule dans l'intégration des différents signaux captés et transmis par les récepteurs, la cellule a développée des mécanismes de régulation et d'interaction entre les différents effecteurs de la signalisation cellulaire. Ces interactions fonctionnelles entre deux récepteurs peuvent se faire à différents niveaux :

- au niveau des voies de signalisation engagées par chaque récepteur, par exemple les protéines G_q et $G_{i/o}$ activent toutes deux la PLC β et la libération de Ca^{2+}
- cette interaction peut également se faire par l'interaction physique entre deux récepteurs similaires (homodimérisation) ou différents (hétérodimérisation) qui va modifier leur fonctionnement (Ferré et al., 2014; Jonas and Hanyaloglu, 2017; Prezeau et al., 2010).

Il faut distinguer les mécanismes de régulation des voies de signalisation qui ne sont pas spécifique d'un tandem de récepteurs et qui sont généralement du à une convergence des voies de signalisation, des interactions spécifiques pour un couple de récepteur donné.

5.1. Interactions non-spécifiques

Chaque cellule exprime une quantité limitée de protéines G disponible pour l'ensemble des récepteurs de la cellule, l'activation d'un récepteur et le recrutement de protéines G par des récepteurs peut donc diminuer la quantité de protéines G disponible pour les autres récepteurs de la cellule. Ce phénomène permet d'expliquer que l'activation concomitante de deux récepteurs couplés à la protéine G résulte en un signal inférieur au cumul de l'intensité de la réponse de chaque récepteur activé séparément. Ainsi, dans la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y, l'activation de la protéine $G_{i/o}$ et l'inhibition de la production d'AMPc engendrée par l'activation des récepteurs μ opioïde (MOR) n'est pas renforcée par la co-activation d'autres récepteurs couplés à la protéine $G_{i/o}$, comme les récepteurs delta aux opioïdes (DOR), les récepteurs α_2 adrénergiques, les récepteurs 1 aux cannabinoïdes (CB_1R), les récepteurs 1A à l'histamine ($5HT_{1A}R$), ou les récepteurs au NPFF présents dans ces cellules (Kersanté et al., 2010; Levitt et al., 2010).

Il semble que des mécanismes similaires puissent avoir lieu avec les β -arrestines. En effet, l'activation par la substance P du récepteur 1 à la neurokinine (NK_1R) dans des neurones striataux va empêcher l'internalisation de MOR par la morphine en recrutant la β -arrestine, qui n'est plus disponible pour interagir avec MOR et permettre son internalisation (Yu et al., 2009). Cette observation n'a pour le moment pas été généralisée à d'autres récepteurs.

L'activation d'un récepteur peut avoir des répercussions sur les niveaux d'expression des autres récepteurs à la membrane de la cellule. Ainsi, l'activation de la voie Erk1/2 – MAP kinases par le récepteur 2 à la vasopressine (V_2R) va permettre la phosphorylation et l'activation de la β -arrestine, qui va séquestrer d'autres récepteurs ($CXCR4$, AT_1R) dans des compartiments intracellulaire et réduire leur expression à la membrane plasmique (Paradis et al., 2015).

A l'inverse de ces mécanismes de désensibilisation hétérologues, il existe une synergie entre les voies de signalisation relative à l'activation de la protéine G_q et celles liées à la protéine $G_{i/o}$, qui s'explique par des convergences entre ces deux voies de signalisation au niveau de la phospholipase C. Par exemple, l'activation du récepteur CXCR2 ($G_{i/o}$) par l'interleukine 8 (IL8) ne provoque une réponse calcique qu'en cas d'activation au préalable du récepteur P2Y2 par l'UTP (Figure 4) (Werry et al., 2002). Ce phénomène d'amplification de la réponse $G_{i/o}$ par sensibilisation avec un récepteur couplé G_q est appelé « priming » et a été décrit avec de nombreux récepteurs (Werry et al., 2003), y compris avec des récepteurs couplés G_s (Gutknecht et al., 2010) et s'explique par une synergie d'action des protéines $G\alpha_q$ et des sous-unités $\beta\gamma$ issues de l'activation de $G_{i/o}$ (ou G_s) sur la PLC β (Philip et al., 2010a).

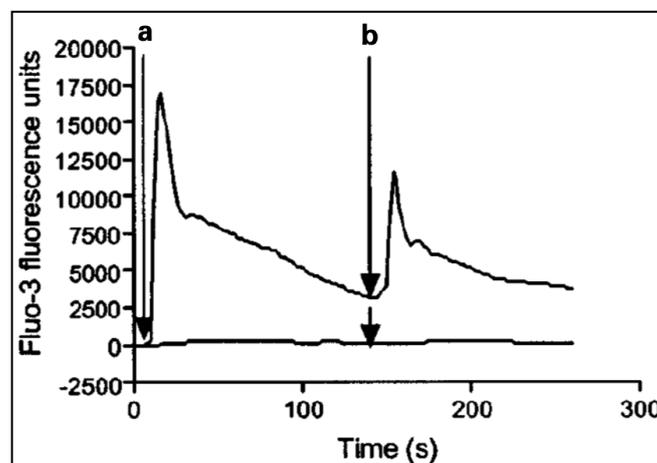


Figure 4 : Le pré-traitement par l'ATP révèle la réponse calcique induite par l'interleukine 8 dans des HEK-293 surexprimant le récepteur CXCR2. La flèche A montre l'ajout de 100 μ M d'ATP (tracé du haut uniquement) et la flèche B indique l'ajout de 30 nM d'IL-8 (tracés du haut et du bas). Courbes représentatives de la concentration en Ca^{2+} mesurée en imagerie FLIPR avec le fluo-3. D'après (Werry et al., 2002).

5.2. Interactions spécifiques

Un grand nombre d'interactions fonctionnelles spécifiques entre des récepteurs couplés aux protéines G est décrite dans la littérature, mais la diversité des interactions rapportées rend difficile une classification ou hiérarchisation de ces mécanismes. De nombreuses recherches se sont penchées sur la capacité que certains récepteurs ont d'interagir avec d'autres récepteurs par contact physique direct au sein de la membrane plasmique, ce qui a pu être mis en évidence notamment grâce aux avancées des techniques de fluorescence. Ces interactions ouvrent un niveau supplémentaire de complexité dans le fonctionnement des RCPG, et en particulier pour les récepteurs de classe C, qui nécessitent une organisation en homodimères ou hétérodimères pour leur bon fonctionnement (Kniazeff et al., 2011).

L'une des principales limitations à considérer quand on parle de dimères repose sur la validité des observations expérimentales qui apportent la preuve des interactions physiques entre récepteurs. En effet, ces études sont principalement réalisées dans des lignées cellulaires hétérologues, comme les cellules HEK293. Or dans ces modèles les niveaux d'expression sont élevés, ce qui peut augmenter la probabilité de rapprochement entre récepteurs non spécifique, il est donc important de remettre ensuite ces observations dans un contexte plus physiologique, voir pathophysiologique. Trois grands critères sont établis par (Gomes et al., 2016) pour définir et valider un hétérodimère :

- i- L'hétérodimère correspond à la colocalisation et à l'interaction physique des deux récepteurs qui forment cet hétérodimère

La co-expression des deux partenaires au sein d'un même type cellulaire peut être observée chez l'animal par des techniques d'hybridation in situ (ISH, détection de l'ARN), d'immunohistochimie (IHC, détection de la protéine) ou en utilisant des animaux transgéniques exprimant le récepteur d'intérêt associé à une étiquette fluorescente. Pour montrer l'interaction physique entre les deux partenaires, la plupart des techniques se basent sur un transfert d'énergie par résonance de type Förster entre un donneur et un accepteur, en utilisant soit la fluorescence (FRET) soit la luminescence (BRET) comme source d'énergie. Ce transfert d'énergie peut se faire en fusionnant directement les fluorophores sur les récepteurs, en utilisant des ligands fluorescents, ou en utilisant des anticorps, ces deux dernières solutions présentent l'avantage de permettre de travailler sur des récepteurs non modifiés (de forme native, ou « wild-type ») exprimé de manière endogène, et potentiellement directement dans les tissus appropriés.

- ii- L'hétérodimère montre des propriétés distinctes de chacun des récepteurs qui le composent

L'interaction entre les deux récepteurs peut aboutir à une diminution de la signalisation des deux partenaires, comme c'est le cas pour les récepteurs H1 et H2 à l'histamine qui co-internalisent et désensibilisent de manière croisée (Alonso et al., 2013), ou comme le récepteur MOR, qui après activation par la morphine hétérodimérise avec le récepteur α_{2A} adrénergique et empêche son couplage à la protéine G_i et la cascade d'activation des MAP kinases (Vilardaga et al., 2008).

A l'inverse, cette interaction peut amener une amplification de l'activité de l'un des récepteurs, par exemple l'activité spontanée du récepteur 1 aux cannabinoïdes (CB₁R) augmente la phosphorylation de Erk induite par l'activation du récepteur 1 à l'orexine (OX₁R) par interaction physique entre les deux récepteurs (Hilairret et al., 2003).

L'hétérodimère peut activer des voies de signalisation différentes de chacun des récepteurs qui le composent, ou d'une localisation dans la cellule qui est propre à l'hétérodimère. Par exemple, le récepteur α_{2c} adrénergique (couplé G_{i/o}) et le récepteur 1 à l'angiotensine II (AT₁R, couplé G_q) forment un hétérodimère dont la co-stimulation simultanée par l'adrénaline et l'angiotensine II active la voie de signalisation protéine G_s – AMPc – PKA (Bellot et al., 2015). De même, les récepteurs 1 et 2 à la dopamine (D₁R et D₂R) sont respectivement couplés à G_s (activation AC, production AMPc) et G_i (inhibition AC, diminution AMPc), l'activation simultanée des deux récepteurs active la voie de signalisation G_q – PLC – Ca²⁺ (Lee et al., 2004; Rashid et al., 2007).

D'autres comportements d'hétérodimères plus atypiques ont été décrits, par exemple entre le récepteur 2 à la mélatonine (MT₂R) et le récepteur 2C à la sérotonine (5HT_{2c}R). La mélatonine est capable de transactiver la voie protéine G_q – PLC β – Ca²⁺ du 5HT_{2c}R, et des antagonistes spécifiques de MT₂R, le 4-PPDOT et le luzindole, agissent sur l'hétérodimère comme antagonistes de MT₂R et agonistes de 5HT_{2c}R (Kamal et al., 2015).

Le fonctionnement d'un hétérodimère est spécifique d'un couple de récepteur donné, et peut amener une régulation négative ou positive des deux partenaires, permettre une nouvelle voie de signalisation, mais l'hétérodimérisation peut également modifier les propriétés de liaison et d'affinité des récepteurs engagés. Les répercussions de ce type d'interaction peut être unidirectionnelle (cis ou trans) comme bidirectionnelle, et peuvent jouer sur les propriétés de signalisation tout comme sur la liaison et l'affinité des récepteurs engagés. Il est donc difficile de définir des propriétés communes à tous les types d'hétérodimères.

iii- Les propriétés spécifiques de l'hétérodimère doivent être altérées par la dissociation de l'hétérodimère

Le troisième critère, plus difficile à mettre en oeuvre, définit que pour caractériser un hétérodimère, il faut pouvoir inhiber sélectivement son fonctionnement. Différentes stratégies existent : on peut utiliser un anticorps ciblant spécifiquement l'hétérodimère (Rozenfeld et al., 2011), empêcher le dimère avec des mutations ponctuelles sur l'un des récepteurs (Kamal et

al., 2015), ou utiliser un peptide perméable aux membranes capable de perturber l'interaction physique des deux récepteurs formant le dimère (Hasbi et al., 2014; Tripathi et al., 2015).

L'interaction fonctionnelle et spécifique entre deux récepteurs ne nécessite pas systématiquement un rapprochement physique entre les deux partenaires, mais peut avoir lieu au niveau des effecteurs secondaires intracellulaires (Prezeau et al., 2010). Ainsi, le récepteur β_2 adrénergique et le récepteur à la PTH sont tous deux exprimés de manière endogène dans les cellules dérivés d'ostéoblastes, ROS17/2.8. Ces deux récepteurs sont couplés G_s et leur activation respective conduit à une production d'AMPc transitoire, mais la co-activation des deux récepteurs simultanément conduit à un signal AMPc prolongé. L'activation de β_2AR permet à la PTH d'induire la production d'AMPc au niveau des endosomes par l'adénylate cyclase 2 (AC2) activée par les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G (Jean-Alphonse et al., 2017).

5.3. Interactions complexes

Grâce aux avancées dans les techniques de microscopie à fluorescence (Albizu et al., 2010; Faklaris et al., 2015) des interactions entre récepteurs plus complexe que la dimérisation, comme l'interaction entre deux hétérodimères, ou deux homodimères ont pu être observées. Ainsi des études in vitro suggèrent que les récepteurs 1A à la sérotonine (Ganguly et al., 2011), le récepteur 2 à la dopamine (Guo et al., 2008), et les récepteurs aux chimiokines CXCR4 (Armando et al., 2014) puissent s'organiser en homo-tétramères, et des hétéro-tétramères puissent se former entre les récepteurs A et B au GABA (Comps-Agrar et al., 2011), ainsi que pour les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR2 (Armando et al., 2014). Ces études offrent des perspectives élargies de compréhension des récepteurs couplés aux protéines G (Ferré, 2015).

II. Douleur et modulation de l'influx nociceptif

1. Physiologie de la douleur

1.1. Stimulus nociceptif et intégration

La douleur est définie par l'Association Internationale d'Etude de la Douleur (IASP) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel ou décrite en termes d'un tel dommage ». Cette expérience émotionnelle désagréable vise à alerter l'organisme d'une menace de son intégrité physique et psychique, elle nous apprend et nous motive à éviter les situations dangereuses.

La douleur correspond à détection du stimulus nociceptif, qui est transmis au système nerveux central (SNC) où il est associé à une émotion douloureuse. Les terminaisons nerveuses à l'origine des sensations de la douleur sont les nocicepteurs. Ces sont des neurones sensoriels primaires possédant des terminaisons nerveuses libres amyéliniques (fibre C) ou faiblement myélinisées (fibre A δ) distribués dans tout l'organisme à l'exception du système nerveux central. Il existe trois types de nocicepteurs selon le type de stimulus qu'ils peuvent détecter : les nocicepteurs mécaniques (fibre A δ), les nocicepteurs thermiques (fibre A δ), et les nocicepteurs polymodaux (fibre C) sensibles à des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques. La détection de stimuli nociceptifs se fait par l'activation de récepteurs spécifiques exprimés par les nocicepteurs. Les récepteurs TRPV (en anglais, transient receptor potential vanilloid) détectent la chaleur, alors que les récepteurs TRPM8 et TRPA1 sont sensibles au froid. Les stimuli mécaniques activent des mécanorécepteurs tels que les canaux potassiques KCNK. La détection d'un signal chimique fait intervenir une grande variété de récepteurs différents, comme le TRPV1 (capsaïcine), TRPM8 (menthol), le TRPA1 (isothiocyanate du wasabi) ou des canaux ioniques sensibles à l'acide (ASICs) (Basbaum et al., 2009).

Ces récepteurs jouent le rôle de système de détection, permettant au nocicepteur de « lancer l'alerte » sous la forme d'un influx nociceptif. Ce neurone, dont le corps cellulaire se trouve au niveau des ganglions rachidiens, projette l'influx nociceptif dans la corne dorsale de la moelle épinière et le transmet au deutoneurone (ou neurone de deuxième ordre) qui assure le relais de l'influx jusqu'au thalamus, il s'agit de la voie spino-thalamique (Figure 5). La propagation du

signal nociceptif est dépendante de canaux voltage-dépendant calciques (famille des Cav1) et sodiques (famille des Nav1). Un troisième neurone assure la transmission spino-corticale où l'information nociceptive est intégrée en douleur par quatre composantes :

- Le cortex somesthésique primaire : intègre la composante sensorielle (détection, localisation : homoculus sensoriel)
- Le striatum : initie la réponse motrice (aspects motivationnels des mouvements, expression motrice des émotions) à la douleur
- Le cortex préfrontal : apporte le contexte affectif de la douleur
- Le système limbique : contrôle les aspects de l'apprentissage, de mémorisation (hippocampe) et apporte la distinction de désagréable associée à la douleur.

A chaque relais, l'influx nociceptif peut être amplifié ou diminué.

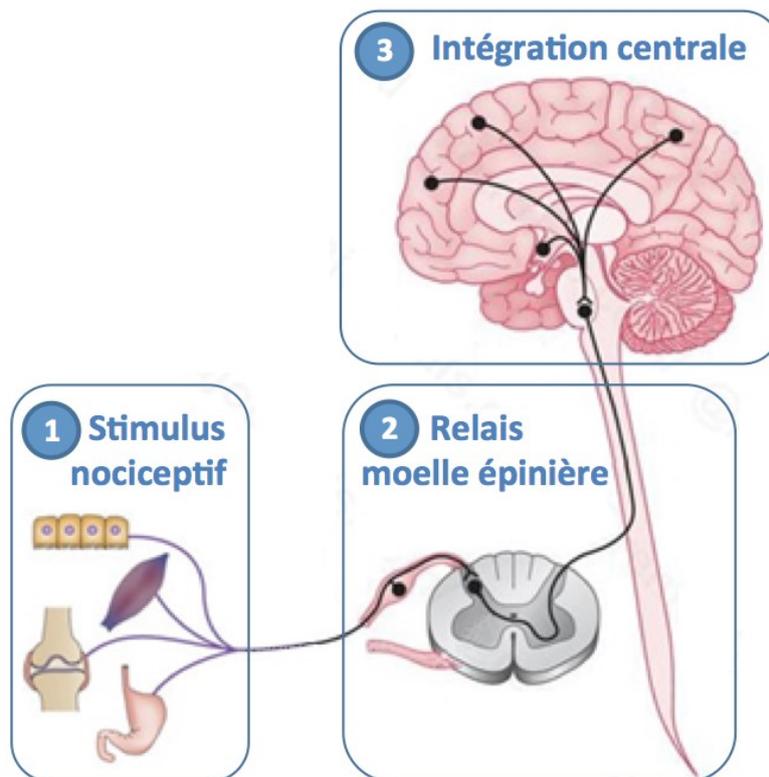


Figure 5 : Voie de signalisation de l'influx nociceptif et intégration en expérience douloureuse. (1) les nocicepteurs périphériques sont sensibles aux stimuli thermiques, mécaniques et chimiques. (2) Ces neurones primaires vont transmettre l'information nociceptive à un neurone de deuxième au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. (3) Cet influx est relayé dans les centres supraspinaux où il est intégré en sensation douloureuse. Schéma adapté de (Camilleri and Boeckxstaens, 2017).

1.2. Modulation de la douleur, hypersensibilité à la douleur

Inflammation et hypersensibilité à la douleur

La douleur, dans son fonctionnement physiologique, est qualifiée de douleur nociceptive, et sert à préserver l'intégrité de l'organisme. Il existe cependant des cas où, suite à un dérèglement, la douleur ne remplit plus ce rôle et devient délétère, ce qui mène dans le cas le plus général au développement d'une hypersensibilité à la douleur. Lorsque la douleur se prolonge au delà du temps de guérison de la lésion à l'origine cette douleur, elle devient chronique. Sur le plan clinique, la douleur est qualifiée de chronique dès lors qu'elle se prolonge au delà de 6 mois. Cette douleur chronique peut être d'origine inflammatoire, ou neuropathique. La douleur inflammatoire est une douleur d'origine nociceptive dont le signal est amplifié à cause de médiateurs inflammatoires pronociceptifs. La douleur neuropathique n'est pas initiée par stimulus nociceptif, mais correspond à une lésion nerveuse provoquant un dysfonctionnement des voies de signalisation de la douleur.

L'inflammation, au niveau du tissu lésé, perturbe la détection de stimulus nociceptif par les nocicepteurs avec la libération d'un cocktail de substances neuroactives (substance P, bradykinine, prostaglandines, sérotonine, histamine, cytokines, H⁺, oxyde nitrique, radicaux libres...) qui entretiennent et amplifient la stimulation de la fibre sensorielle. Cette augmentation de la perception douloureuse qui ne correspond plus au message douloureux l'ayant initiée définit l'hyperalgésie, alors que l'allodynie correspond une perception douloureuse d'un stimulus qui ne l'est normalement pas. Ces deux phénomènes, hyperalgésie et allodynie, participent au développement d'une hypersensibilité à la douleur qui est une perturbation du signal douloureux très répandue, en particulier dans les douleurs inflammatoires et les douleurs neuropathiques. L'un des principaux contributeurs de l'hyperalgésie est l'augmentation de la sensibilité des neurones sensitifs primaires, phénomène appelé sensibilisation latente (Treede et al., 1992).

La sensation douloureuse, en cas de neuro-inflammation, est entretenue par une série de « réflexe d'axones » : la fibre qui véhicule l'information douloureuse vers le SNC possède des collatérales qui libèrent la substance P au niveau de multiples cibles (capillaires, mastocytes...) qui libèrent à leur tour des substances excitatrices pour les fibres de la douleur (histamine, sérotonine, bradykinine...). Malgré la disparition de la stimulation douloureuse initiale, la fibre continue de faire monter un message douloureux, et sensibilise les fibres proches.

Modulation du signal nociceptif

L'influx nociceptif est modulé aux différents niveaux de sa transmission, et ces contrôles peuvent être facilitateurs ou inhibiteurs. Ces mécanismes peuvent avoir lieu à tous les niveaux de la transmission du signal nociceptif. Au niveau de la première synapse, dans la corne dorsale de la moelle épinière, les fibres sensorielles non nociceptives sont capables d'inhiber la transmission de l'influx nociceptif via l'activation d'interneurones selon la théorie du « gate control » (Melzack and Wall, 1965). Il existe également de nombreux contrôles inhibiteurs centraux et descendants qui provoquent une diminution de l'activité des neurones nociceptifs de la moelle, dont les principaux neurotransmetteurs sont les amines (sérotonine, norépinéphrine) et les opiacés endogènes (enképhaline, endorphine et dynorphine).

Ces systèmes facilitateurs et inhibiteurs co-existent dans un équilibre dynamique qui définit le seuil de sensibilité à la douleur d'un individu. De nombreux types cellulaires participent à cet équilibre, avec les cellules du système immunitaire, comme les macrophages et cellules lymphocytaires qui peuvent envoyer des signaux pronociceptifs (TNF, IL-1 β , IL-33, IFN- γ) et antinociceptifs (IL-4, IL-10) ; des cellules du système nerveux, comme les cellules de Schwann, les cellules gliales, les astrocytes, la microglie qui eux aussi peuvent envoyer des signaux pronociceptifs (TNF, IL-1 β , ATP, CCL2, BDNF) et antinociceptifs (IL-10, IFN- α).

En cas d'inflammation, des agents pro-nociceptifs sont sécrétés (substance P, ATP, H⁺, histamine...) et font pencher cet équilibre vers un état de plus grande sensibilité à la douleur, qui peut se traduire sur le plan clinique par le développement d'une hyperalgésie et d'une allodynie.

Ainsi, lors d'une coupure de la peau par exemple, une douleur aiguë est ressentie, qui correspond à l'apparition de la lésion. Cette douleur, par son ressenti désagréable, stimule l'individu à retenir l'enchaînement d'évènements ayant conduit à cette blessure afin de l'éviter si les conditions se reproduisent. Dans un deuxième temps, suite à la lésion tissulaire une inflammation locale se développe et des médiateurs inflammatoires sont libérés. Ces médiateurs sont également pro-nociceptifs (substance P, ATP, H⁺, histamine...) et vont sensibiliser les nocicepteurs présents. De ce fait, l'équilibre de sensibilité à la douleur est modifié et une hyperalgésie locale se développe, ce qui enjoint l'individu à protéger particulièrement ce tissu, le temps de la cicatrisation. Une fois le tissu cicatrisé, l'inflammation se résorbe et la sensibilité à la douleur revient à son équilibre initial. Cet exemple illustre le fonctionnement physiologique des mécanismes de régulation de la douleur, cependant dans le

cas où l'inflammation se prolonge et devient chronique, les médiateurs pro-inflammatoires et pro-nociceptifs vont durablement sensibiliser les voies de signalisation de l'influx nociceptif et modifier profondément l'équilibre de sensibilité à la douleur.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la douleur chronique ne sont pas clairement élucidés, mais il semblerait que la répétition du stimulus nociceptif sensibilise les nerfs impliqués, et que cela puisse occasionner une réaction neuro-inflammatoire. Le passage d'une douleur à un état chronique résulte d'une sensibilisation périphérique et chronique. La sensibilisation périphérique est le plus souvent le résultat de modifications dans l'environnement de la fibre nerveuse sensibilisée qui sont provoquées par une inflammation, les principales cibles moléculaires sont les récepteurs canaux TRPV1, TRPA1 et ASICs. La chronicisation de la douleur passe également par des mécanismes centraux, avec une activation des systèmes glutamatergiques (récepteurs NMDA-R, mGluR), une diminution des contrôles inhibiteurs GABAergiques et glycinergiques, et une activation des cellules gliales ce qui conduit à une neuro-inflammation (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2016).

Les systèmes impliqués dans le maintien de cette homéostasie de la douleur font l'objet de nombreuses recherches afin de mieux comprendre les phénomènes d'hypersensibilité à la douleur, et d'améliorer les solutions thérapeutiques pour la prise en charge de la douleur chronique.

2. Le système opioïdergique

Parmi les différents systèmes biologiques endogènes participant à l'homéostasie de la douleur, les opioïdes sont une famille de molécules et de récepteurs jouant un rôle central dans le contrôle inhibiteur de l'influx nerveux. Il faut distinguer les opiacés, qui correspondent aux substances dérivées de l'opium et qui agissent sur les récepteurs de ce système, et les opioïdes qui sont par définition toute substance ne répondant pas à la définition d'un opiacé mais pouvant se lier à un récepteur opioïde.

Le système opioïde endogène est représenté par des récepteurs et des peptides qui sont leurs ligands endogènes. Ces récepteurs, μ -opioïde (MOR), δ -opioïde (DOR), κ -opioïde (KOR) et le récepteur à la nociceptine (NOR) appartiennent à la famille des RCPG et sont couplés préférentiellement à la protéine $G_{i/o}$, dont l'activation diminue la synthèse d'AMPc, l'activité des canaux Ca^{2+} voltage dépendant et facilite l'ouverture de canaux potassiques rectifiants entrants (GIRK).

2.1. Les opiacés

L'opium correspond au latex séché obtenu par incision de la capsule du pavot somnifère (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae). Les opiacés (Figure 6) sont des alcaloïdes naturels ou hémisynthétiques extraits de l'opium, on distingue les dérivés du phénanthrène (morphine, codéine, thébaïne) et ceux de l'isoquinoléine (papavérine, noscapine). La teneur de l'opium en morphine varie entre 9,5 % et 12 %, en codéine d'environ 2,5% et la concentration en thébaïne se situe entre 1 et 1,5 % (Bruneton and Poupon, 2016).

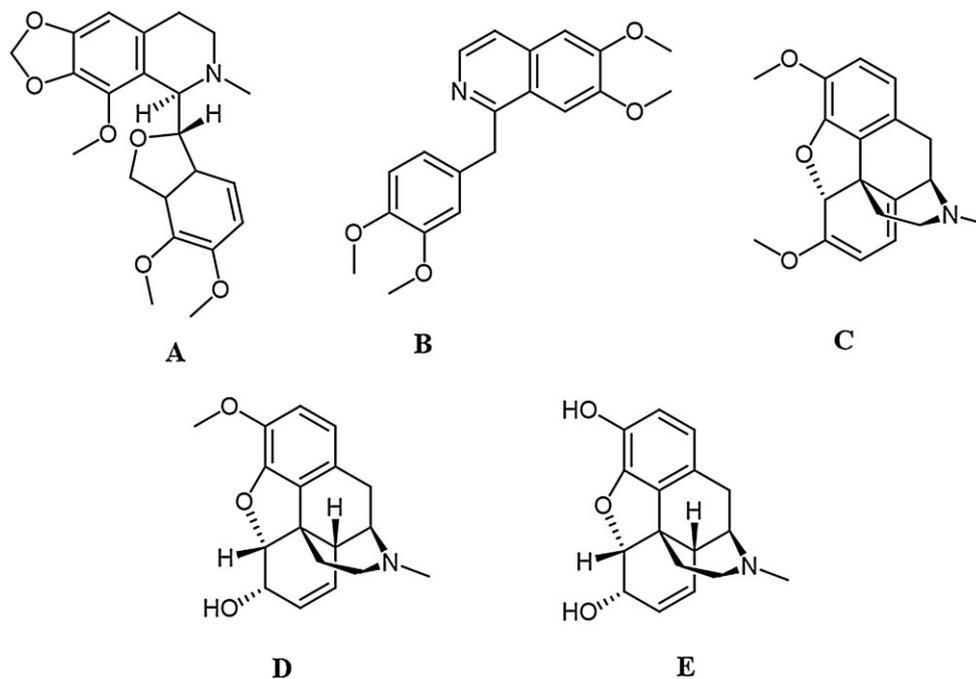


Figure 6 : Structures chimiques des 5 principaux alcaloïdes opiacés. (A) noscapine, (B) papavérine, (C) thébaïne, (D) codéine, (E) morphine.

La **morphine** est un agoniste puissant de MOR et dans une moindre mesure des récepteurs DOR et KOR. Il est utilisé comme antalgique de référence dans les douleurs sévères aiguës et chroniques, mais il est également consommé pour un usage récréatif à cause de son action euphorisante. De part le développement d'une accoutumance et d'une dépendance physique, il est classé dans les stupéfiants. La morphine provoque également de la constipation, de la dépression respiratoire, et c'est à la fois un psychostimulant et un déprimeur, la morphine induit de l'hyperactivité, de l'hyperexcitabilité mais peut également provoquer une sédation importante. La grande diversité des effets cliniques de la morphine rend son utilisation complexe.

La **codéine**, ou 3-méthylmorphine est un stupéfiant qui n'est pas directement actif mais est déméthylé en morphine dans le foie par le cytochrome CYP2D6. Ce cytochrome présente un

fort polymorphisme génétique, notamment dans la population caucasienne (Samer and Dayer, 2005) :

- 1-10% de la population sont métaboliseurs ultrarapides (jusqu'à 14 exemplaires du gène) ce qui leur confère un métabolisme accéléré
- 65 – 80% bons métaboliseurs, avec une activité enzymatique normale
- 10-15 % métaboliseurs intermédiaires à l'activité enzymatique diminuée
- 5-10 % métaboliseurs lents avec une déficience enzymatique complète.

Cette variabilité génétique et phénotypique détermine l'efficacité antalgique de la codéine, avec des effets très limités chez les métaboliseurs lents, et au contraire des risques de surdosage chez les métaboliseurs ultrarapides. Le tramadol, l'oxycodone et la méthadone sont également activés par ce cytochrome. En plus de cette variabilité de métabolisation, il y a des risques d'interactions médicamenteuses avec de nombreux antidépresseurs. En effet, ces derniers sont souvent utilisés comme co-antalgiques dans les douleurs neuropathiques alors qu'ils sont transformés en métabolites inactifs par le CYP2D6.

La **thébaïne** est un stupéfiant (liste I) qui tire son nom de la ville de Thèbes en Egypte antique, qui faisait commerce de l'opium. Cet alcaloïde est principalement utilisé comme molécule de départ pour la synthèse de dérivés comme l'oxycodone, la buprénorphine et la naloxone.

La **noscapine** et la papavérine ne possède pas de propriétés narcotiques et ne lient pas les récepteurs opioïdes. La noscapine a des propriétés antitussives et antitumorales par une action antimitotique en se liant à la tubuline et en perturbant la polymérisation des μ -tubules (Ye et al., 1998). La papaverine un inhibiteur de la phosphodiesterase 10A (PDE10A) ce qui lui confère des propriétés spasmolytiques et vasorelaxantes (Siuciak et al., 2006).

2.2. Les opioïdes endogènes

Les peptides opioïdes endogènes sont issus de 3 prépropeptides (Table 2) : la proopiomélanocortine (POMC), la proenképhaline (PENK) et la prodynorphine (PDYN), qui sont clivés en peptides actifs par différentes endopeptidases.

Les endorphines sont issues de la maturation d'un prépropeptide, la **pro-opiomélanocortine** (gène POMC), qui est également le précurseur de l'hormone adrénocorticotropine (ACTH) et des hormones de stimulation des mélanocytes (MSH). La β -endorphine peut être clivée en α -

endorphine et γ -endorphine, ces trois peptides sont des ligands endogènes pour les récepteurs MOR et DOR, et dans une moindre mesure KOR.

Le gène PENK code pour un prépropeptide, la **proenképhaline**, qui est clivée en met-enképhaline et leu-enképhaline, deux peptides qui sont les ligands endogènes de DOR, également capable de lier MOR (Rossier 1988). Chaque proenképhaline est clivée en 5 met-enképhaline et 1 leu-enképhaline.

La **prodynorphine** (gène PDYN) est clivée en dynorphines (A et B), qui sont les ligands endogènes de KOR, mais peuvent également lier DOR et MOR avec une moins bonne affinité. La **pronociceptine** (gène PNOC) donne la nociceptine, qui est le ligand endogène pour NOR.

Les **endomorphines** sont des peptides endogènes découverts plus récemment (Zadina et al., 1997) et dont la séquence codante n'a toujours pas été identifiée dans le génome humain. Les endomorphines 1 et 2 sont les ligands endogènes opioïdes les plus affins pour MOR et les plus sélectifs.

| précurseur | peptide | séquence | affinité |
|------------------------------|---------------------------------|--|------------------|
| pro-opiomélanocortine | β -endorphine | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-LeuPhe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu | MOR = DOR > KOR |
| pro-enképhaline | [Met ⁵]-enképhaline | Tyr-Gly-Gly-Phe-Met | DOR > MOR >> KOR |
| | [Leu ⁵]-enképhaline | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu | |
| pro-dynorphine | dynorphine A | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln | KOR >> MOR > DOR |
| | dynorphine B | Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr | |
| inconnu | endomorphine-1 | Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂ | MOR |
| | endomorphine-2 | Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂ | |

Table 2 : Séquence peptidique des peptides opioïdes endogènes.

2.3. Les fonctions biologiques des récepteurs aux opioïdes

Douleur et nociception

Les récepteurs MOR, DOR et KOR sont des RCPG préférentiellement couplés à la protéine G_{i/o}, dont la sous-unité α inhibe l'adénylate cyclase, et les sous-unités $\beta\gamma$ provoquent la fermeture de canaux calciques voltage dépendants de type N ainsi que l'ouverture des canaux GIRK. Au niveau présynaptique, la diminution de l'influx de Ca²⁺ et l'inhibition de l'adénylate cyclase bloque la libération de neurotransmetteurs comme la substance P (Chen et al., 2018), et empêche ainsi la propagation du signal nociceptif. Au niveau post-synaptique, l'augmentation

de l'efflux de K^+ cause une hyperpolarisation ce qui prévient la formation et la propagation d'un potentiel d'action.

La compréhension du rôle du **récepteur MOR** dans la modulation de la douleur et de l'analgésie provoquées par les opiacés a été rendu possible grâce au clonage de la séquence codante pour ce récepteur (Chen et al., 1993) et à l'étude de souris rendues déficientes (knock-out, KO) pour ce gène (Matthes et al., 1996). Le clonage des récepteurs opioïdes a permis d'évaluer la sélectivité des ligands et de trouver des agonistes et antagonistes sélectifs de chaque récepteur (Knapp et al., 1995). La génération de souris KO-MOR a mis en avant, en outre, le rôle central de ce récepteur dans l'effet analgésique de la morphine (Matthes et al., 1996) et dans l'analgésie provoquée par un stress aigu (LaBuda et al., 2000). De part cette puissante activité analgésique, ce récepteur a été le plus étudié du système opioïde et est resté depuis la cible thérapeutique privilégiée pour la prise en charge des douleurs sévères (Bodnar; Pasternak and Pan, 2013).

Le récepteur DOR est impliqué dans la nociception mécanique et dans la douleur inflammatoire (Martin et al., 2003). Ce récepteur est exprimé en présynaptique au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière par des nocicepteurs détectant les stimuli nociceptifs mécaniques, et son activation inhibe les canaux calciques voltage dépendants et empêche ainsi la libération de glutamate (Bardoni et al., 2014). Le DOR ne joue pas un rôle important dans l'analgésie dans des conditions physiologiques, mais est activé lors de douleurs chroniques inflammatoires, neuropathiques et cancéreuses et possède alors une forte activité anti-hyperalgésique et anti-allodynique (Gavériaux-Ruff and Kieffer, 2011; Gavériaux-Ruff et al., 2008; Pradhan et al., 2013). L'activité de ce récepteur est en lien étroit avec MOR, en effet l'administration répétée de morphine augmente le nombre de DOR présent à la membrane et potentialise son activité antinociceptive (Cahill et al., 2001; Lucido et al., 2005), ce qui est confirmé dans les souris KO-MOR (Gendron et al., 2007).

Le rôle du **récepteur KOR** n'est pas tout à fait aussi clair que celui de MOR, il a été décrit comme diminuant l'analgésie et l'hyperalgésie produite par MOR (Bie and Pan, 2003; Pan et al., 1997) ou comme étant lui-même analgésique (Kolesnikov et al., 1996; Simonin et al., 1995). L'hyperalgésie induite par une lésion neuropathique est moins importante chez les souris KO - PDYN, le gène codant pour la dynorphine agoniste endogène de KOR (Wang et al., 2001; Xu et al., 2004), ce qui suggère un rôle hyperalgésiant et pronociceptif de ce système. A l'inverse, chez les souris KO-KOR cette hyperalgésie induite par une lésion neuropathique est plus

importante et perdure plus longtemps (Xu et al., 2004), ce qui suggère une action antinociceptive du récepteur. De plus, le récepteur KOR possède une activité analgésique vis-à-vis des douleurs viscérales (Simonin et al., 1998) ce qui a conduit au développement d'agonistes KOR périphérique pour soulager les douleurs viscérales et pancréatiques (Arendt-Nielsen et al., 2009; Eisenach et al., 2003).

Chez la souris, l'activation de **NOR** par administration de nociceptine en injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) bloque l'action analgésique des récepteurs MOR, DOR et KOR, et joue donc un rôle anti-opioïde (Mogil et al., 1996). La nociceptine est également antinociceptive dans des modèles d'analgésie induite par un stress aigu. La nociceptine bloque totalement l'analgésie induite par le stress aigu alors que la naloxone ne la bloque que partiellement, ce qui suggère que les propriétés anti-analgésiques de NOR soient plus larges que la seule activité anti-opioïde (Rizzi et al., 2001). A l'opposé, l'administration de nociceptine en injection intrathécale (i.t.) a un effet antinociceptif et antihyperalgésique direct, et potentialise l'action analgésique de la morphine (Tian et al., 1997; Xu et al., 1996). Cette activité antinociceptive au niveau spinal s'explique par l'activation de canaux potassiques rectifiants via les récepteurs NOR en présynaptique dans la corne dorsale (Ikeda et al., 1997; Liebel et al., 1997). Cette complexité d'action selon le site d'injection explique la difficulté de développer des composés à visée thérapeutique dans le traitement de la douleur qui ciblent ce récepteur.

Le contrôle des émotions

MOR a une action euphorisante et antidépressive, c'est également un acteur clef dans les circuits de la récompense, il est responsable du développement de la dépendance liée à la consommation de substances addictogènes et aux comportements addictogènes. Les récepteurs MOR exprimés dans le noyau du raphé dorsal et dans l'aire tegmentaire ventrale permettent la levée de l'inhibition GABAergique des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques (Lutz and Kieffer, 2013). A l'inverse, les neurones adrénérgiques sont directement inhibés par MOR. A l'arrêt de l'administration chronique de morphine, les neurones adrénérgiques voient leur activité augmenter, ce qui se traduit par un syndrome de sevrage.

DOR semble être impliqué dans les circuits de la récompense mais sa contribution reste controversée. Il s'oppose au développement de l'anxiété (anxiolytique) et aux comportements dépressifs (Filliol et al., 2000). DOR est le récepteur opioïde le plus étudié des récepteurs opioïdes dans la dépression, et semble être le plus efficace. Il intervient dans la régulation de

libération de dopamine et de sérotonine dans le noyau accumbens (Gendron et al., 2016). Un agoniste DOR AZD2327 développé par Astrazeneca a montré des résultats encourageants en préclinique et en clinique contre les troubles dépressifs majeurs avec une composante anxiolytique marquée (Richards et al., 2016).

KOR intervient surtout dans la réponse au stress et conduit à de la dysphorie et un comportement dépressif. Ces récepteurs sont exprimés au niveau présynaptique dans le noyau accumbens par des neurones sérotoninergiques. Lors d'un stress aigu, l'activation du système dynorphine – KOR inhibe ces neurones sérotoninergiques et conduit à de la dysphorie (Land et al., 2008). KOR a des effets opposés à MOR et DOR sur la dépression en inhibant directement les neurones dopaminergiques, ce sont donc les antagonistes KOR qui présentent un intérêt thérapeutique pour la prise en charge des troubles dépressifs (Beardsley et al., 2005).

La nociceptine est capable de diminuer les niveaux extracellulaires de dopamine dans le noyau accumbens ou l'aire tegmentaire ventrale, qui sont des aires du cerveau impliquées dans les circuits de la récompense et la modulation des émotions (Witkin et al., 2014). De fait, l'injection de nociceptine empêche les changements comportementaux liés à la consommation chronique de cocaïne (Bebawy et al., 2010), d'alcool ou de méthamphétamine (Sakoori and Murphy, 2008) et diminue les manifestations physiques du syndrome de manque suite à une administration chronique de morphine (Kotlińska et al., 2000). L'activation du système nociceptine bloque la mise en place de la dépendance en empêchant le phénomène de récompense habituellement provoqué par ces composés addictogènes. De même, la nociceptine a une activité dysphorique, qui s'oppose à l'action euphorique du MOR pour réguler ainsi un tonus hédonique (Spanagel et al., 1992), ouvrant la possibilité d'améliorer les troubles dépressifs avec des antagonistes de ce récepteur (Post et al., 2016).

Le système respiratoire

Les récepteurs opioïdes sont présents au niveau des centres de contrôle de la respiration dans le système nerveux central (complexe pré-botzien), ainsi qu'au niveau des mécanorécepteurs sensoriels des voies respiratoires. L'activation des récepteurs opioïdes mène à une inhibition central de la respiration et une obstruction des voies respiratoires par inhibition des motoneurones du pharynx et de larynx (Ehsan et al., 2016). La contribution respective de chaque type de récepteur opioïde prête à discussion, si le rôle de MOR est central, les résultats sur l'implication des récepteurs DOR et KOR est conflictuelle (Dosakaakita et al., 1993; Takita

et al., 1997). La nociceptine et le récepteur NOR sont également capable de diminuer la fréquence respiratoire (Shah et al., 1998) et sont efficace contre la toux (Lee et al., 2006).

Les agonistes MOR et NOR ont été décrit comme ayant des propriétés antitussives. Les agonistes MOR sont actuellement utilisé en sirop dans le traitement de la toux (dextrométhorphan, codéine, éthylmorphine, noscapine), et un agoniste NOR a été développé dans le traitement de l'asthme, mais son développement s'est arrêté à la suite de résultats d'essais cliniques montrant une efficacité faible et une forte prévalence de léthargie (Singh et al., 2016; Spaziano et al., 2017; Woodcock et al., 2010).

Le système digestif

La constipation est l'un des principaux effets indésirables des opioïdes, avec la survenue de constipation chez 40 % à 95 % des patients traités par un opioïde (Imam et al., 2017). L'intensité de cette constipation peut amener à diminution des doses d'antalgique opioïde administré et même jusqu'à une reconsidération de la prise en charge thérapeutique de la douleur. Les mécanismes sous-jacent de la constipation induite par les opioïdes révèlent une atteinte de l'ensemble du système digestif avec un ralentissement de la vidange gastrique et du transit intestinal (de l'intestin grêle au colon) et une diminution des sécrétions gastriques, intestinales, biliaires et pancréatiques (Imam et al., 2017). Ces perturbations s'accompagnent de nausées et de vomissements fréquents, du au ralentissement du transit intestinal et à la stimulation directe du centre intégré du vomissement du cerveau (chemotrigger zone, CTZ, (Mallick-Searle and Fillman, 2017). La perturbation du système digestif par les opioïdes fait intervenir les récepteurs MOR, DOR KOR et NOR au niveau périphérique mais également via une régulation centrale. La complexité et la grande diversité des mécanismes par lesquels les opioïdes modifient le système digestif expliquent l'extrême difficulté à palier à ces effets indésirables dans le cas d'une prise en charge de la douleur par un antalgique opioïde comme la morphine.

La fonction cardiovasculaire

La morphine provoque une diminution du rythme cardiaque (bradycardie) et une diminution de la pression artérielle (hypotension) par une inhibition du tonus central sympathique (Huggins et al., 1951). La contribution des récepteurs MOR ou DOR sur ces effets cardiovasculaires n'est pas bien défini, mais ces propriétés sont partagées par les récepteurs KOR (Pugsley et al., 1992) et NOR (Champion and Kadowitz, 1997; Shirasaka et al., 1999). Le système opioïde pourrait de plus avoir des propriétés cardioprotectrices endogènes, et l'ensemble des récepteurs opioïdes semblent participer aux effets bénéfiques d'une activité sportive sur la fonction cardiovasculaire

(Armstead, 2011; Borges et al., 2014; Dickson et al., 2008; Geng et al., 2017; Headrick et al., 2015).

Les fonctions rénales et hépatiques

L'ensemble des récepteurs opioïdes sont impliqués dans la fonction excrétrice des reins, et ont une action diurétique (Burmeister and Kapusta, 2007; Franklin et al., 2015; Kapusta et al., 1997; Sezen et al., 1998). De plus, MOR, KOR et NOR diminuent l'élimination de sodium dans les urines (action antinatriurétique) alors que DOR a été décrit comme ayant une action natriurétique (Sezen et al., 1998). L'administration d'un agoniste sélectif de KOR induit également une activation du nerf sympathique rénal, mais qui est dissociée de l'activité diurétique (Franklin et al., 2015). De plus, le récepteur KOR est également décrit comme diminuant l'élimination de potassium dans les urines (antikaliurétique), et modulant positivement la rénine et la corticostérone (Ashton et al., 1989).

La morphine est métabolisée par le foie et éliminée par le rein, et une exposition prolongée peut amener à une toxicité hépatique et rénale au cours de son métabolisme (Van Der Laan et al., 1995). L'administration journalière de morphine (4 – 12 mg/kg/j) à des rats adultes conduit à de fortes lésions hépatiques, avec :

- une augmentation des marqueurs biochimiques (alanine aminotransférase ALT, aspartate aminotransférase AST, lactate déshydrogénase LDH),
- une destruction du tissu hépatique avec une stéatose microvésiculaire,
- une dilatation sinusoidale avec une congestion allant jusqu'à l'hémorragie et la nécrose périveinulaire,

et ce en l'espace de 30 jours d'exposition à la morphine (Atici et al., 2005). L'atteinte rénale se traduit sur le plan biochimique par une augmentation de l'urée sanguine (BUN) et de la créatinine, et en histopathologie on observe des vacuoles dans les cellules tubulaires, une infiltration interstitielle de monocytes, le développement d'une néphropathie glomérulaire et dans certains cas une hémorragie accompagnée d'une nécrose focale (Atici et al., 2005). DOR est très peu exprimé dans les reins, et l'apparition de glomérulopathie serait principalement le résultat de l'activation des KOR exprimés par les cellules mésangiales, tandis que les MOR seraient exprimés au niveau des cellules endothéliales (Weber et al., 2008).

La réponse immunitaire

Les récepteurs opioïdes interagissent avec le système immunitaire et peuvent modifier la réponse immunitaire innée ou acquise. La contribution de chaque récepteur n'est pas toujours clairement déterminée, c'est l'action de la morphine sur le système immunitaire qui a été le plus étudié. MOR, DOR et KOR diminuent l'activité phagocytaire des macrophages (Rojavin et al., 1993; Szabo et al., 1993). L'activation de MOR joue un rôle inhibiteur dans la chimiotaxie des neutrophiles, des monocytes (Grimm et al., 1998) et des cellules microgliales (Chao et al., 1997). L'activation concomitante des récepteurs MOR, DOR ou KOR avec la stimulation du système immunitaire par un antigène diminue la quantité d'anticorps produit en réponse à cet antigène, comme détaillé dans la revue (McCarthy et al., 2001). L'administration de morphine chez l'animal diminue la réponse immunitaire et la survie face à une infection fongique, bactérienne ou virale, mais protège des atteintes neurologiques lors d'infections virales (Ris Dahl et al., 1993). Inversement, le développement d'une infection augmente la toxicité de la morphine et diminue la dose létale médiane chez la souris (Starec et al., 1991).

3. Prise en charge thérapeutique de la douleur

3.1. Traitements actuels

Les antalgiques sont classés en trois paliers selon leur intensité d'action.

Palier I : douleurs légères à modérées

Le paracétamol a des propriétés antipyrétiques et antalgiques, et peut être utilisé dès la naissance. C'est un médicament de premier choix dans le traitement de la douleur de par sa souplesse d'utilisation, sa bonne tolérance et un nombre limité d'interactions médicamenteuses. Le paracétamol n'est pas directement actif, mais ses métabolites *N*-acéty-*p*-benzoquinonéimine et *p*-benzoquinone activent au niveau des neurones sensoriels primaires le récepteur canal TRPA1 ce qui diminue les courants calciques et potassiques voltage dépendants (Andersson et al., 2011). Les contre-indications sont dominées par l'hypersensibilité au paracétamol et l'insuffisance hépatocellulaire, l'insuffisance rénale n'est pas une contre-indication à condition d'adapter la posologie. Les principaux risques sont une toxicité hépatique et rénale.

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) ont des propriétés antalgique, antipyrétique anti-inflammatoire, et leur efficacité antalgique est supérieure au paracétamol dans de nombreuses situations (traumatologie, migraine, inflammation). Ce sont des inhibiteurs

périphériques de cyclo-oxygénases (COX1 et 2) qui sont impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique et la synthèse de prostaglandines pro-inflammatoire et pronociceptive. Cependant leur utilisation est contre-indiquée aux enfants de moins de 15 ans, en cas de déshydratation ou de mauvais état nutritionnel, d'hémorragie ou de troubles de la coagulation non maîtrisé, d'ulcère, d'insuffisance hépatique, rénale, ou cardiaque sévère. Les principaux risques sont des troubles gastro-intestinaux. L'aspirine (acide acétylsalicylique) fait partie des AINS mais n'est plus utilisé en dehors des migraines et en rhumatologie.

Palier II : douleurs modérées à intenses

Ce palier correspond aux douleurs modérées insuffisamment prises en charge par un antalgique de palier I. Il s'agit d'opioïdes faibles et du néfopam, qui est classé en palier I à cause de son mécanisme d'action non opioïde ou en palier II pour sa puissance analgésique. Il est conseillé de toujours associer les antalgiques de ce palier à un ou deux antalgiques du palier précédent, mais ils ne doivent pas être associés à ceux du palier III.

La codéine (3-méthylmorphine) est un morphinique faible (agoniste entier MOR mais moins puissant que la morphine) avec une forte variabilité d'efficacité, du à un polymorphisme de l'enzyme de métabolisation (CYP2D6) de la codéine en morphine. Elle est utilisée pour ses propriétés antalgique et antitussive.

Le tramadol est un morphinique faible et un inhibiteur de la recapture des monoamines. Cette molécule est notamment contre-indiquée en association à des inhibiteurs de la monoamine oxydase (antidépresseurs).

Le néfopam est un antalgique non morphinique utilisé dans le traitement de courte durée des douleurs modérées à sévères. Son action se situe au niveau spinal et central par inhibition de la recapture des catécholamines et monoamines, ce qui permet un renforcement de l'activité des voies inhibitrices descendantes. Les effets indésirables découlent de son action sur les catécholamines et monoamines, et malgré sa nature non opioïdurgique le néfopam expose à des risques d'accoutumance et de dépendance mais n'expose pas à des risques de dépression respiratoire ni à des troubles gastro-intestinaux.

Palier III : douleurs très fortes

Le palier III correspond aux opioïdes forts, ce sont tous des dérivés morphiniques (oxycodone, fentanyl, hydromorphine) et la morphine est la molécule de référence. Ces molécules agissent

sur les récepteurs opioïdes, principalement le MOR et sont les plus puissants antalgiques de l'arsenal thérapeutique. La buprénorphine a la particularité d'être un agoniste partiel de MOR et un antagoniste KOR, ce qui diminue le risque d'intoxication et de dépression respiratoire. Les mécanismes des effets analgésiques, neuropsychiques, émétisants, antitussifs, de constipation et de dépression respiratoire ont été détaillé précédemment.

Prise en charge de la douleur neuropathique

Les douleurs neuropathiques sont le plus souvent des affections de longue durée dont la prise en charge est compliqué, les antalgiques conventionnels de palier I sont peu ou pas efficaces et les antalgiques de nature opioïdérique sont d'efficacité modérée mais mal tolérés sur le long terme. La Société Française d'Etude des Traitements de la Douleur (SFETD) a émis des recommandations sur ces douleurs et sur leur prise en charge (Martinez et al., 2010). Il y est indiqué que « *le choix du traitement médicamenteux des douleurs neuropathiques ne dépend pas de l'intensité des douleurs comme dans les douleurs nociceptives* » mais prend en compte les effets secondaires et les comorbidités. Le choix de traitements est d'autant plus complexe qu'il existe une grande variété de neuropathies avec des mécanismes physiopathologiques différents. La SFETD classe ainsi les traitements en trois grades selon le niveau de preuve obtenu de leur efficacité :

- le grade A concerne les traitements dont l'efficacité est démontrée avec un haut niveau de preuve
- le grade B concerne les traitements dont l'efficacité est démontrée avec un niveau de preuve intermédiaire
- le grade C les traitements dont l'efficacité n'est pas établi.

En première intention sont recommandés en monothérapie les antidépresseurs tricycliques (amitriptyline, imipramine, clomipramine) et les antiépileptiques gabapentinoïde (gabapentine ouprégabaline). Les opiacés, bien que de grade A, ne sont recommandés qu'en deuxième intention ou en cas d'échec des traitements précédents.

3.2.Limites des traitements actuels

Les traitements opioïdes, bien que très efficaces dans le traitement de la douleur aigue de forte intensité, nécessitent des précautions d'usage. La consommation croissante et peu encadrée de ces antalgiques, notamment aux Etats-Unis, a conduit à une forte diminution de la qualité de

vie des patients, à cause des nombreux effets indésirables de ces médicaments (Manchikanti et al., 2017).

Dépression respiratoire

Le risque de dépression respiratoire suite à l'administration d'opioïde est relativement faible, environ 1% (Cashman and Dolin, 2004), et ce risque s'estompe après les premières prises. Cependant, si la dépression respiratoire n'est pas arrêtée par une injection de naloxone, elle peut être fatale. Cette éventualité est relativement faible dans les structures hospitalières, et survient dans les cas de consommation d'opiacés illicite ou en cas de surdosage.

Constipation

Les nausées, vomissements et sédation observés lors de la mise en route d'un traitement opiacé s'améliorent ou se résolvent souvent spontanément avec la poursuite du traitement, à la différence de la constipation qui persiste (Fallon and Hanks, 1999). Les règles hygiéno-diététiques et les laxatifs utilisés pour traiter la constipation induite par les opiacés restent d'une efficacité très limitée. 40 à 90 % des personnes sous traitement opiacés subissent des effets indésirables d'ordre gastro-intestinal, et ce même en cas co-traitement avec des laxatifs (Bell et al., 2009), et ces répercussions pousse un tiers des patients à diminuer, ralentir ou arrêter temporairement le traitement.

Afin de réduire ces troubles digestifs un antagoniste des récepteurs MOR d'action périphérique a été développé afin de bloquer l'effet des opioïdes sur le tractus gastro-intestinal tout en préservant l'effet antalgique d'action centrale. Le naloxégol, dérivé pegylé de la naloxone, a montré une diminution des atteintes digestives chez les patients traités par des opiacés tout en préservant l'effet analgésique en essai clinique de phase III (Chey et al., 2014; Webster et al., 2014). Le service médical rendu par le naloxégol (Moventig) a été évalué par la Haute Autorité de Santé (HAS) comme faible et une amélioration du service médical rendu nulle (HAS, 2015). La commission de transparence de la HAS n'a pas trouvé d'avantage clinique démontré dans le traitement de la constipation induite par les opioïde. Etant donné l'absence de traitement efficace actuel, le naloxégol a tout de même obtenu une autorisation de mise sur le marché en novembre 2015 dans le traitement de la constipation induite par les opioïdes chez les adultes ayant présenté une réponse inadéquate aux laxatifs.

Dépendance et addiction.

La composante addictive des antalgiques opiacés a longtemps été sous-estimé et a conduit aux Etats-Unis à une crise sanitaire de grande ampleur, jusqu'à parler « épidémie d'opioïde » (Sullivan and Howe, 2013). La prescription systématique d'opiacés dans le traitement à long terme des douleurs chroniques alors même que leur efficacité au-delà de 3 mois pose question (Chou et al., 2015), a eu pour conséquence l'explosion de comorbidités avec un triplement entre 2000 et 2015 des morts reliées aux opioïdes, traitement et drogue confondus (Manchikanti et al., 2017). L'addiction aux opiacés est devenu un problème de santé nord-américain majeur et un défi pour la recherche médicale actuelle (Grosser et al., 2017).

L'addiction est définie selon A. Goodman comme « un processus par lequel un comportement, qui peut fonctionner à la fois pour produire du plaisir et pour soulager un malaise intérieur, est utilisé sous un mode caractérisé par l'échec répété dans le contrôle de ce comportement et la persistance de ce comportement en dépit des conséquences négatives significatives » (Goodman, 1990).

Selon le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux édité (DSM) par l'association américaine de psychiatrie, la dépendance aux opioïdes se traduit par un mode d'utilisation inapproprié d'opioïdes entraînant une détresse ou un dysfonctionnement clinique significatif avec la survenue de deux ou plus des manifestations suivantes à un moment quelconque d'une période continue de 12 mois (Benoit-Iamy et al., 2005) :

- 1 – opioïdes souvent pris en quantité supérieure ou sur un laps de temps plus long que prévu
- 2 – désir persistant ou des efforts infructueux effectués pour réduire ou contrôler l'utilisation d'opioïdes
- 3 – temps considérable passé à faire le nécessaire pour se procurer la substance, la consommer ou récupérer de ses effets
- 4 – envie intense de consommer (craving)
- 5 – incapacité à remplir des obligations majeures au travail, à l'école ou à la maison
- 6 – consommation de la substance malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets des opioïdes
- 7 – activités sociales, occasionnelles ou récréatives importantes abandonnées ou réduites
- 8 – utilisation répétée d'opioïdes dans des situations où cela peut être physiquement dangereux
- 9 – utilisation d'opioïdes poursuivie malgré l'existence d'un problème physique ou psychologique persistant ou récurrent, déterminé ou exacerbé par la substance.

10 – tolérance définie par un besoin de quantités nettement majorées de la substance afin d’obtenir l’effet désiré ou un effet nettement diminué en cas d’usage continu de la même quantité de substance

11 – existence d’un syndrome de sevrage aux opioïdes ou de consommation d’opioïdes pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage

La sévérité des troubles est basée sur le nombre de critères rencontrés, 2 – 3 critères indiquent un trouble léger, 4 – 5 critères un trouble modéré et 6 – 7 critères un trouble sévère. La rémission récente d’une addiction consiste en au moins 3 mois sans que des critères du trouble ne soient applicables (sauf celui de l’envie de consommer), tandis que la rémission durable consiste en au moins 12 mois sans critère applicable (sauf l’envie de consommer).

Le syndrome de sevrage est défini par l’association américaine de psychiatrie par les critères suivants (Benoit-Iamy et al., 2005) :

1 – la présence de l’un des deux critères suivants :

1.1 l’arrêt ou la diminution d’une consommation d’opioïdes ayant été longue et/ou forte

1.2 l’administration d’un antagoniste opioïde après une période de consommation d’opioïde

2 – la survenue dans les minutes suivant le critère 1 d’au moins trois des critères suivants :

2.1 humeur dysphorique / dépressive

2.2 nausée vomissements

2.3 crampes et douleurs musculaires

2.4 écoulement nasal ou lacrymal

2.5 dilatation des pupilles, transpiration ou pilo-érection

2.6 contraction de la mâchoire

2.7 diarrhée

2.8 fièvre

2.9 insomnie

Hyperalgésie induite par les opiacés (HIO) et tolérance à l’analgésie opiacé

L’administration chronique d’opiacés s’accompagne de deux effets indésirables sur la sensibilité à la douleur, d’une part on observe une tolérance aux effets analgésiques, c’est à dire une diminution progressive de l’effet analgésique ; et d’autre part l’augmentation de la sensibilité à la douleur en dehors des périodes d’action du composé opioïde. La stimulation

exogène répétée du système endogène opioïde modifie l'équilibre interne entre des médiateurs pronociceptifs et antinociceptifs qui régulent la transmission de l'information nociceptive et son intégration en sensation douloureuse. Le développement d'une hypersensibilité à la douleur suite à un excès de stimulation du système opioïde peut s'expliquer à différents niveaux : au niveau des circuits neuronaux de transmission de l'information nociceptive, sur le fonctionnement des récepteurs opioïdes, et par le recrutement de systèmes pronociceptifs. Ces mécanismes et leurs répercussions en clinique font l'objet de nombreuses recherches (Hayhurst and Durieux, 2016; Koppert, 2007; Roeckel et al., 2016; Williams et al., 2013).

La sensibilisation neuronale

Les mécanismes sous-jacents de l'HIO et de la tolérance analgésique aux opiacés s'expliquent en partie par une atteinte neuronale, avec une sensibilisation des neurones afférents primaires (nocicepteurs), la sensibilisation des neurones de deuxième ordre et des changements dans les contrôles descendants vers une régulation positive de neuromodulateurs pronociceptifs. L'administration répétée d'opiacés provoque un phénomène de potentialisation à long terme de la synapse entre le nocicepteur et le neurone de deuxième ordre qui a lieu au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Drdla-Schutting et al., 2012; Liu and Sandkühler, 1997; Zhou et al., 2010). Cette potentialisation a pour effet un renforcement durable de l'efficacité de la synapse avec une plus grande amplitude du potentiel d'action déclenché post-synaptique ce qui aboutit à une hyperalgésie (Sandkühler and Gruber-Schoffnegger, 2012). Un autre mécanisme neuronal impliqué dans l'HIO est un phénomène d'amorçage ou « priming ». La stimulation répétée de MOR va amorcer une hyperalgésie prolongée via la libération de PGE₂ et la signalisation de son récepteur par la voie MAPK/Erk/Src (Araldi et al., 2015, 2017). En parallèle à ces phénomènes de sensibilisation spinal, les contrôles descendants inhibiteurs sont altérés et contribuent également au développement de l'HIO (Rivat et al., 2009).

Le rôle de MOR

MOR est responsable de l'action analgésique de la morphine, mais ce récepteur est également impliqué dans le développement de l'HIO et de la tolérance analgésique aux opiacés. Plusieurs mécanismes pouvant expliquer ces effets ont été étudiés, la désensibilisation plus rapide de MOR

suite à sa stimulation répétée ; l'existence de variants tronqués de MOR ; et le rôle de MOR en périphérique par opposition à son rôle central :

- la désensibilisation plus rapide de MOR suite à stimulation répétée, qui conduit à une accélération de la désensibilisation de ces récepteurs suite à leur activation, qui résulterait d'une diminution du recyclage du récepteur après endocytose (Dang et al., 2011; Williams et al., 2013). Cette désensibilisation plus rapide de ces récepteurs conduit à une diminution de leur signalisation et à une perte d'efficacité de des ligands opiacés.
- D'autre part on sait aujourd'hui qu'il existe plusieurs variants d'épissage de MOR, avec l'expression d'isoformes de MOR à 6 domaines transmembranaires (6TM) au lieu de 7, et d'autres variants avec une réduction de l'extrémité C-terminale intracellulaire (Xu et al., 2017). Ces isoformes tronquées de MOR sont capables d'activer la protéine Gs et d'induire une réponse calcique pour produire un effet hyperalgésique (Convertino et al., 2015; Gris et al., 2010; Oladosu et al., 2015). Ces isoformes seraient impliquées dans l'HIO et la tolérance analgésique mais ne participeraient pas aux effets analgésiques, ni de constipation ou de dépression respiratoire (Marrone et al., 2017).
- Avec la caractérisation d'antagonistes opioïdes périphériques, comme la méthylnaltrexone, le rôle des récepteurs MOR exprimés au niveau central a pu être comparé avec celui des MOR exprimés au niveau périphérique (Labuz et al., 2007; Shannon and Lutz, 2002). Ces études ont montré le rôle de MOR périphérique dans l'analgésie de la douleur inflammatoire, ce qui a pu être confirmé par inactivation génétique et sélective des récepteurs exprimés par des nocicepteurs primaires (Weibel et al., 2013). Ces observations ont également été confirmées chez l'homme dans le traitement de la douleur post-opératoire, en effet le blocage de MOR périphérique par la méthylnaltrexone conduit à une plus grande consommation de morphine (Jagla et al., 2014). Sur les base de ces travaux, un conjugué de morphine et de polyglycérol ne passant pas la barrière hémato-encéphalique a été développé (González-Rodríguez et al., 2017). Ce composé ne montre pas d'effet analgésique en l'absence de pathologie douloureuse, mais montre une puissance analgésique proche de celle de la morphine dans un modèle de douleur inflammatoire sans provoquer de sédation ni de constipation.

Le recrutement de systèmes pronociceptifs

Face à la stimulation répétée des récepteurs opioïdes, de nombreux mécanismes de régulation se mettent en place dans la modulation de la douleur qui voient l'activation de systèmes compensatoires pro-nociceptif et anti-opioïde. Ainsi, plus de 60 récepteurs couplés aux protéines G sont impliqués dans la modulation de la douleur (Stone and Molliver, 2009), et l'étude de ces systèmes pronociceptifs a permis d'identifier plus de 10 cibles dont le blocage permet de prévenir le développement d'une tolérance aux effets analgésiques de la morphine (Ossipov et al., 2003), comme la cholécystokinine, le glutamate, la nociceptine ou le neuropeptide FF (Quillet et al., 2016; Roeckel et al., 2016; Toll et al., 2016).

TRPV1

Le récepteur TRPV1 (pour Transient Receptor Potential Vanilloïde 1) est un récepteur cationique polymodal sensible à la chaleur ($> 44^{\circ}\text{C}$), à l'acidité ($\text{pH} < 5,9$) et à la capsaïcine présent dans les terminaisons sensibles des nocicepteurs primaires. Cependant, ce récepteur est également exprimé dans la synapse entre ce nocicepteur et le neurone de deuxième ordre au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière aussi bien en présynaptique qu'en postsynaptique (Valtschanoff et al., 2001) et module l'activité de la synapse (Goswami et al., 2010). Lors d'administration chronique de morphine, TRPV1 est activé au niveau de la moelle épinière, et son blocage pharmacologique ou génétique limite le développement d'une HIO, de tolérance analgésique à la morphine et le syndrome de sevrage opiacé (Nguyen et al., 2010; Vardanyan et al., 2009). TRPV1 exprimé au niveau spinal semble être capable d'intégrer une grande variété de signaux qui vont modifier l'état de phosphorylation du récepteur via la protéine d'échafaudage AKAP79/150 (Zhang et al., 2008). En effet, TRPV1 joue le rôle de point de convergence de nombreux systèmes pronociceptifs :

- la sérotonine et son récepteur $5\text{HT}_{2\text{B}}$ (Su et al., 2015) et $5\text{HT}_{3\text{A}}$ dans les contrôles descendants (Guo et al., 2014; Kim et al., 2014),
- l'histamine et son récepteur HRH1 dans le syndrome du colon irritable (Wouters et al., 2016),
- le glutamate et ses récepteurs métabotropiques (Masuoka et al., 2016),
- le système bradykinine / B_2R (Zhang et al., 2008),
- la prostaglandine E_2 et son récepteur EP1 (Zhang et al., 2008),
- le facteur de croissance neuronale (NGF) (Zhang et al., 2008),
- la kisséptine (Spampinato et al., 2011)

- des médiateurs pro-inflammatoires comme la substance P et la CGRP (Rogoz et al., 2014),

mais TRPV1 peut également être régulé négativement par le neurotransmetteur GABA (Hanack et al., 2015). Ce récepteur peut donc être vu comme un centre de convergence et d'intégration des signaux de modulation de la douleur (Bao et al., 2015; Choi et al., 2016) dont la plupart sont peu ou pas activés en situation physiologique basale mais qu'une stimulation intense et répétée du système opioïde va recruter. L'identification et la compréhension des systèmes opioïdes et pronociceptifs est nécessaire pour espérer trouver une solution plus efficace dans la prise en charge thérapeutique de la douleur chronique.

III. Le système RF-amide

Le système RF-amide se compose de neuropeptides qui partagent la séquence arginine-phénylalanine amidé (RF-amide) à leur extrémité C-terminale, et de récepteurs couplés aux protéines capables de reconnaître des neuropeptides. Le premier peptide RF-amide identifié en 1977 est un térapeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂, il a été isolé d'un extrait de ganglion d'un invertébré *Macrocallista nimbosa* et caractérisé pour son action sur la contractilité musculaire (Price and Greenberg, 1977). L'existence de cette famille de peptide chez les vertébrés supérieurs est prouvée quelques années plus tard par immuno-réactivité ciblée vers la fonction amide C-terminale (Boer et al., 1980; Dockray et al., 1981; Weber et al., 1981). Ce dénominateur commun a permis d'identifier un ensemble de neuropeptides largement conservé à travers l'évolution (Walker et al., 2009), et qui est constitué chez les mammifères de plus de 12 peptides encodés par 5 gènes différents et qui sont les ligands endogènes de 5 récepteurs couplés aux protéines G (Table 3) :

- le neuropeptide FF (NPFF) et son récepteur NPFF₂R ;
- le neuropeptide RFRP et NPFF₁R ;
- le neuropeptide de libération de la prolactine (PrRP) et GPR10 ;
- la kisspeptine (Kp) et GPR54 ;
- le neuropeptide QRFP et GPR103.

| peptide | séquence | récepteur |
|-------------------------------|----------|--|
| prepro- D ₁ DRD | PrRP-20 | TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH ₂ |
| | PrRP-31 | SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH ₂ |
| KISS-1 | Kp-10 | YNWNSFGLRF-NH ₂ |
| | Kp-13 | LPNYNWNSFGLRF-NH ₂ |
| | Kp-14 | DLPNYNWNSFGLRF-NH ₂ |
| | Kp-54 | GTSLSPPESSGSRQQGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRF-NH ₂ |
| prepro- C ₁ DRD | QRFP-23 | TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂ |
| | QRFP-43 | EDEGSEATGFLPAAGEKTSGLPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂ |
| pro- N ₁ DRD | RFRP-1 | MPHSFANLPLRF-NH ₂ |
| | RFRP-3 | VPNLQRF-NH ₂ |
| pro- N ₂ DRD | NPFF | SQAFLQPQRF-NH ₂ |
| | NPAF | AGEGLNSQFWSLAAPQRF-NH ₂ |

Tableau 3 : Neuropeptides RF-amide et leurs récepteurs chez l'homme. D'après (Quillet et al., 2016)

Ces peptides et récepteurs sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques aussi bien au niveau central que périphérique, comme la reproduction, le système cardiovasculaire, la douleur, le métabolisme et l'homéostasie énergétique, les systèmes de la récompense, et les tumeurs (Quillet et al., 2016).

1. Les neuropeptides RF-amide et leurs récepteurs

1.1. Les peptides de libération de la prolactine (PrRP) et leur récepteur GPR10

Le gène codant pour PrRP (locus chr2q37.3) contient deux exons codants pour un prépropeptide dont le clivage en extrémité N-terminale donne le peptide actif PrRP-31 qui est lui-même clivé en un second peptide actif, PrRP-20. Ces deux peptides sont les ligands endogènes du récepteur GPR10 (Hinuma et al., 1998). Ce récepteur est proche du récepteur au neuropeptide Y (31% d'homologie de séquence) mais il n'est pas capable de lier ce neuropeptide (Marchese et al., 1995). La séquence de GPR10 est illustrée dans la figure 7, avec les 7 domaines transmembranaires et les extrémités N-terminale (extracellulaire, en haut) et C-terminale (intracellulaire, en bas).

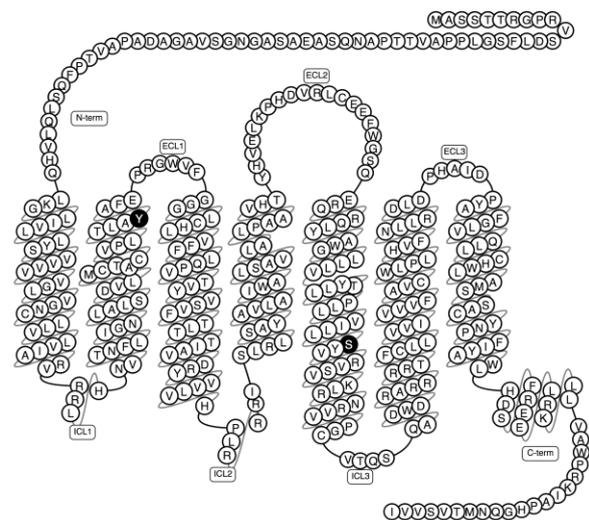


Figure 7 : Topologie de GPR10 (uniprot.org)

La voie de signalisation principale décrite pour GPR10 est le couplage à la protéine G_q , l'activation de la phospholipase C (PLC) et la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires (Hinuma et al., 1998; Langmead et al., 2000; Roland et al., 1999). La vague calcique initiée active la protéine kinase C (PKC) qui va entraîner des cascades de phosphorylation d'effecteurs intracellulaires, comme les kinases Erk1/2 et Jnk et aboutir à la libération de prolactine (Nanmoku et al., 2005). Cependant, dans la lignée cellulaire pituitaire de rat GH3 ou les cellules pituitaires murine, PrRP active la transcription du gène de la prolactine par une voie dépendante de la protéine $G_{i/o}$ et des sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G. Cette voie passe par la PKC et Erk1/2 mais est indépendante du calcium intra- et extracellulaire. L'action de PrRP sur le promoteur de la prolactine passe également par une autre voie indépendante de la protéine $G_{i/o}$ et qui active la kinase Jnk (Kimura et al., 2000). Une seconde étude a confirmé que le PrRP activait le

promoteur de la prolactine via les sous-unités $\beta\gamma$ associées à la $G_{i/o}$, la PI3 kinase, la kinase Akt et la protéine de réponse à l'AMPc (cAMP response element-binding protein, CREB, Hayakawa et al., 2002). Cependant, GPR10 pourrait également être capable de recruter la protéine G_s , en effet le PrRP provoque une augmentation d'AMPc dans la lignée cellulaire PC12 exprimant GPR10 (Nanmoku et al., 2003; Samson and Taylor, 2006; Wang et al., 2012).

1.2. La kisspeptine (Kp) et son récepteur GPR54

Le gène *KiSS-1* (locus chr1q32.1) contient deux exons codants, et le clivage et la maturation du prépropeptide donne la métastatine (54 résidus, Kp-54) et trois isoformes plus courtes : Kp-14, Kp-13 et Kp-10 (West et al., 1998). Ces quatre peptides sont les ligands endogènes du récepteur GPR54, également appelé récepteur à la kisspeptine (*Kiss1R*), qui possède une forte homologie de séquence avec les récepteurs à la galanine mais ne lie pas ce peptide (Lee et al., 1999; Ohtaki et al., 2001). La séquence de GPR54 est illustrée dans la figure 8, avec les 7 domaines transmembranaires et les extrémités N-terminale (extracellulaire, en haut) et C-terminale (intracellulaire, en bas).

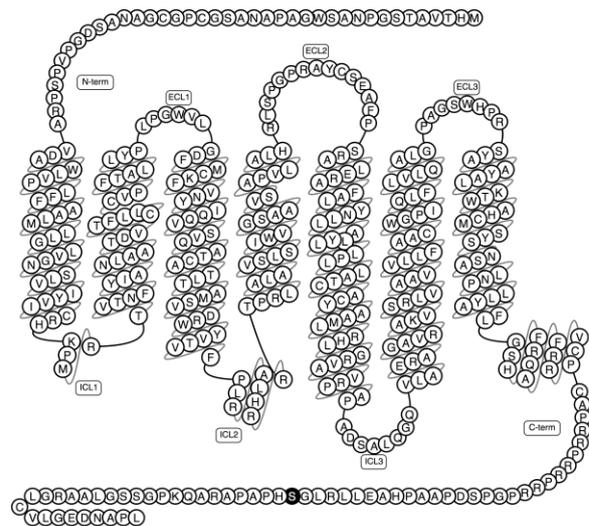


Figure 8 : Topologie de GPR54 (uniprot.org)

L'activation de GPR54 par la kisspeptine recrute la protéine G_q et provoque une réponse calcique dépendante de la PLC (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001), mais ne stimule ni n'inhibe la production d'AMPc (Muir et al., 2001). La vague calcique active la PKC et la voie de signalisation de Erk1/2 (Kotani et al., 2001). Le couplage de GPR10 à G_q et la réponse Ca^{2+} qui en découle augmente la fréquence des potentiels d'action des neurones à GnRH en diminuant les courants d'après hyperpolarisation (slow afterhyperpolarisation, sAHP) (Zhang et al., 2013), et inhibe les courants ioniques GIRK ce qui diminue la sensibilité de ces neurones au GABA (Castellano et al., 2006; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2009). De plus, GPR54 peut également provoquer la libération de GnRH par la voie de la β -arrestine et Erk1/2 indépendamment de G_q (Ahow et al., 2014; Babwah et al., 2015).

1.3. Les peptides QRFP et leur récepteur GPR103

Le gène codant pour QRFP (locus chr9q34.12) contient trois exons codants, et le prépropeptide synthétisé est clivé en deux peptides actifs de 43 (43RFa, QRFP43) et 26 (26RFa, QRFP26) résidus (Chartrel et al., 2003). Ces deux peptides sont les ligands endogènes du récepteur GPR103 (Fukusumi et al., 2003). Il n'existe qu'un seul récepteur pour le QRFP chez l'homme, mais deux formes orthologues ont été retrouvées chez la souris (Takayasu et al., 2006), appelées GPR103-A et GPR103-B. La séquence de hGPR103 est illustrée dans la figure 9, avec les 7 domaines transmembranaires et les extrémités N-terminale (extracellulaire, en haut) et C-terminale (intracellulaire, en bas).

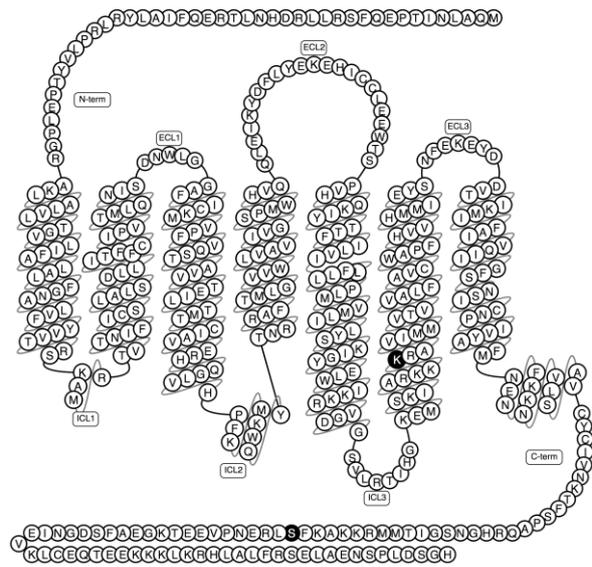


Figure 9: Topologie de GPR103 (uniprot.org)

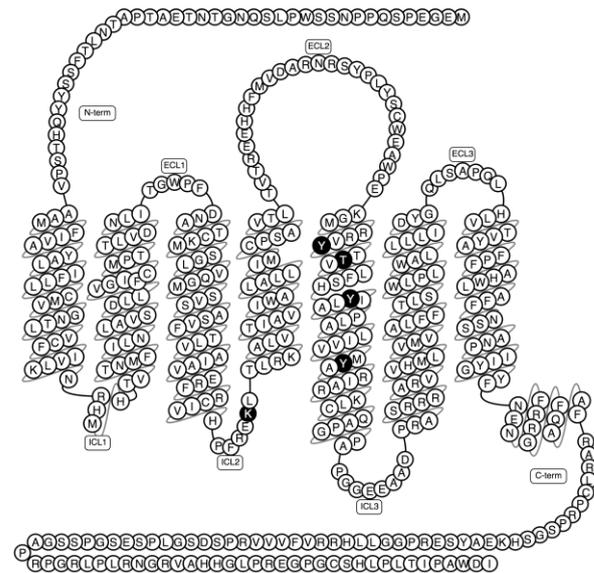
La voie de signalisation principale décrite pour GPR103 est le couplage à G_q et l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (Fukusumi et al., 2003; Kim et al., 2003; Takayasu et al., 2006) mais GPR103 serait également capable de moduler la production d'AMPc. Dans des cellules pituitaires de rat prétraitées à la forskoline, QRFP à fortes concentrations augmente la production d'AMPc (Chartrel et al., 2003) alors que dans les cellules CHO surexprimant GPR103, QRFP provoque à la fois une réponse calcique et une diminution de la production d'AMPc à des concentrations similaires (Fukusumi et al., 2003). De plus, l'action inhibitrice du QRFP sur la libération de glucose par l'insuline dans le pancréas est bloquée en présence de toxine pertussique (PTX), suggérant l'implication de la protéine $G_{i/o}$ (Egido et al., 2007).

1.4. Les peptides apparentés RF-amide (RFRP) et leur récepteur NPFF₁R

Le gène codant pour RFRP (locus chr7p15.3) contient trois exons codants pour un prépropeptide proNPFF_B clivé en deux peptides actifs de 12 résidus (RFRP-1) et 8 résidus (RFRP-3) (Schulz et al., 2002). Ces deux peptides sont les ligands endogènes de NPFF₁R et ils sont également capable, dans une moindre mesure, de lier et d'activer NPFF₂R (Bonini et al.,

Figure 10 : Topologie de NPFF₁R (uniprot.org)

2000; Liu et al., 2001; Mollereau et al., 2002; Yoshida et al., 2003). La séquence de NPFF₁R est illustrée dans la figure 10, avec les 7 domaines transmembranaires et les extrémités N-terminale (extracellulaire, en haut) et C-terminale (intracellulaire, en bas). Contrairement aux récepteurs GPR10, GPR54 et GPR103, le récepteur NPFF₁R est peu sélectif envers les différents peptides RF-amide, il est capable de lier avec une bonne affinité aussi bien RFRP que NPFF, PrRP, Kp et dans une moindre mesure QRFP (Table 4).



NPFF₁R est un récepteur majoritairement décrit comme couplé à la protéine G_{i/o} et conduisant à une diminution de la production d'AMPc (Elhabazi et al., 2013; Hinuma et al., 2000; Liu et al., 2001; Mollereau et al., 2002), et qui peut être activé par tous les peptides RF-amide (Mollereau et al., 2002). De plus, à forte concentration RFRP peut donner une petite réponse inositol-phosphate (IP) sensible à la PTX, qui est probablement due aux sous-unités $\beta\gamma$ libérées par l'activation de G $\alpha_{i/o}$ (Bonini et al., 2000).

1.5. Le neuropeptide FF (NPFF) et son récepteur NPFF₂R

Le gène codant pour NPFF (locus chr12q13.13) contient trois exons codants, et la maturation du prépropeptide proNPFF_A donne deux peptides actifs NPFF et NPAF, de 11 et 18 résidus respectivement (Perry et al., 1997). Ces peptides ont été identifiés par immunoréactivité dans le cerveau de bovin (Yang et al., 1985) avant d'être isolé dans le sérum humain (Sundblom et al., 1995). Les peptides NPFF et NPAF sont les ligands endogènes du récepteur NPFF₂R et sont également capable de lier et d'activer le récepteur NPFF₁R (Bonini et al., 2000; Liu et al., 2001; Mollereau et al., 2002). La séquence de NPFF₂R est illustrée dans la figure 11, avec les 7 domaines transmembranaires et les extrémités N-terminale (extracellulaire, en haut) et C-terminale (intracellulaire, en bas). Contrairement aux récepteurs GPR10, GPR54 et GPR103, mais avec une sélectivité plus prononcée que NPFF₁R, le NPFF₂R est capable de lier, dans l'ordre du plus affiné au moins affiné, les peptides NPFF, RFRP, PrRP, Kp et QRFP (Table 4).

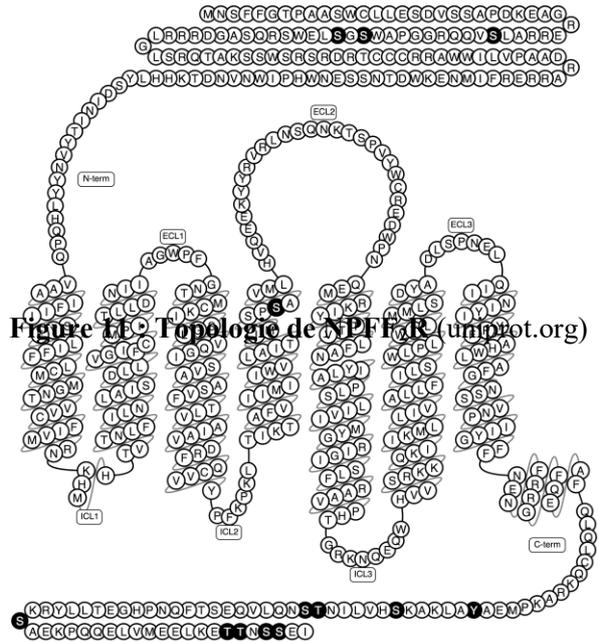


Figure 11. Topologie de NPFF₁R (uniprot.org)

| peptide | GPR10 | | GPR54 | | GPR103 | | NPFF ₁ R | | NPFF ₂ R | |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | K _i (nM) | EC ₅₀ (nM) |
| PrRP-20 | 0,06 - 1 | 0,2 - 1 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | 4,7 | 9280 | 0,7 - 23 | 466 |
| Kp-10 | > 10 000 | > 10 000 | 0,04 - 2,3 | 0,1 | > 10 000 | > 10 000 | 0,5-4,7 | 380-10 000 | 1,6 - 76 | 292 - 1 000 |
| QRFP-26 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | 3,2 - 21 | 0,2 - 7 | 24-38 | > 10 000 | 3 - 10 | > 10 000 |
| RFRP-3 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | 0,8 | 3-12 | 20 | 74 - 1 000 |
| NPFF | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | > 10 000 | 2,5 | 31-510 | 0,25 | 0,6-7 |

Table 4 : Constantes d'affinité de liaison (K_i) et de réponse fonctionnelle (EC₅₀) des différents peptides RF-amide sur les 5 récepteurs humains (Quillet et al., 2016). Les réponses fonctionnelles sont mesurées en réponse Ca²⁺ pour GPR10, GPR54 et GPR103, et en AMPc pour NPFF₁R et NPFF₂R.

Les ligands endogènes RF-amide ne permettent pas clairement de discriminer entre les récepteurs NPFF₁R et NPFF₂R. NPFF, PrRP et QRFP présentent une légère sélectivité pour NPFF₂R par rapport à NPFF₁R, RFRP et Kp présentent à l'inverse à une meilleure affinité pour NPFF₁R que NPFF₂R (Table 4).

NPFF₂R est couplé majoritairement à la protéine G_{i/o} et conduit à une diminution de la production d'AMPc (Elhabazi et al., 2013; Elshourbagy et al., 2000; Mollereau et al., 2002), mais NPFF₂R serait également capable d'interagir avec Gα_s (Gouardères et al., 2007; Mollereau et al., 2004). En effet, à très fortes concentrations (50 – 250 μM) sur des préparations membranaires de bulbe olfactif de souris, NPFF stimule la production d'AMPc (Gherardi and Zajac, 1997), et dans les ganglions rachidiens le NPFF diminue la réponse calcique des neurones à la nociceptine et cet effet du NPFF est bloqué par la toxine cholérique (CTX), inhibiteur de la protéine G_s (Roumy and Zajac, 2001).

2. Les rôles physiologiques des peptides RF-amide

Les peptides RF-amide et leurs différents récepteurs sont impliqués dans la régulation de nombreux paramètres physiologiques, comme la reproduction, la fonction cardiovasculaire, la douleur, l'homéostasie énergétique mais également les circuits de la récompense ou le développement tumoral (Quillet et al., 2016). Dans cette partie ne sont décrits que les différentes fonctions qui sont régulées par l'ensemble des peptides RF-amide et leurs récepteurs.

2.1. Modulation de la nociception et de la douleur

La douleur correspond à l'intégration par le cerveau d'un stimulus nociceptif périphérique. Le stimulus part des terminaisons d'un nocicepteur, dont le corps cellulaire se trouve dans les ganglions rachidiens, l'information est transmise à un deuxième neurone au niveau d'une synapse dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière. L'information remonte ensuite au thalamus et dans différents centres supérieurs d'intégration (voir chapitre « Douleur et modulation de l'influx nociceptif »).

GPR10 est retrouvé dans le cerveau mais pas dans la moelle épinière ni dans les ganglions rachidiens. L'injection de PrRP20 en intracérébroventriculaire provoque une hyperalgésie thermique et mécanique (Laurent et al., 2005), alors qu'en injection intracérébrale dans le noyau du tractus solitaire PrRP induit une forte analgésie thermique et mécanique chez des souris saines comme dans un modèle de douleurs neuropathiques (Kalliomäki et al., 2004). En accord avec l'absence d'expression dans la moelle épinière, l'injection intrathécale de PrRP n'a pas d'effet sur le seuil nociceptif basal (Kalliomäki et al., 2004). L'étude de souris n'exprimant plus GPR10 a permis de mieux comprendre son rôle dans la nociception et l'action de la morphine (Laurent et al., 2005). Ces souris présentent une plus grande analgésie induite par le stress ou par la morphine, et sont moins sujettes à une tolérance de l'analgésie morphinique. De plus, le syndrome de sevrage opioïde précipité par la naloxone est moins important quand GPR10 n'est pas exprimé. Ces différents éléments font apparaître le système PrRP / GPR10 comme un système pronociceptif et anti-opioïde.

GPR54 est exprimé dans le cerveau mais il est également présent dans la corne dorsale de la moelle épinière, dans les ganglions rachidiens et les fibres périphériques de neurones sensitifs (Dun et al., 2003; Mi et al., 2009). Dans le modèle d'inflammation chronique induite par le CFA (adjuvant complet de Freund) l'expression (ARNm et protéines) de GPR54 et de la

kisspeptine sont augmentés (Mi et al., 2009). L'administration i.c.v. de kisspeptine produit de l'hyperalgésie et diminue l'efficacité analgésique de la morphine (Elhabazi et al., 2013). En injection intrathécale ou intraplantaire kisspeptine est également pronociceptive, et donne de l'hyperalgésie dans les deux phases du test de la formaline. De plus, kisspeptine augmente la phosphorylation de TRPV1 au niveau du site d'injection et de Erk1/2 dans la corne dorsale de la moelle épinière (Spampinato et al., 2011). Le système kisspeptine / GPR54 semble donc participer à la sensibilisation nociceptive périphérique dans un contexte inflammatoire.

GPR103 est présent dans le cerveau, la corne dorsale de la moelle épinière mais également au niveau des ganglions rachidiens dans des fibres de taille moyenne et petite, compatible avec les fibres C impliquées dans la nociception (Chartrel et al., 2011; Yamamoto et al., 2011). L'injection i.t. ou i.c.v. de QRFP chez des animaux sains est reportée comme sans effet ou légèrement pronociceptive (Ayachi and Simonin, 2014) alors que dans des modèles de douleur inflammatoire ou neuropathique le QRFP a une action anti-allodymique (Yamamoto et al., 2008, 2011). Ces observations suggèrent que le système QRFP / GPR103 n'est pas ou peu impliqué dans la nociception à l'état basal mais intervient dans les altérations de la nociception dues à une inflammation ou une atteinte neuropathique.

NPFF₁R est exprimé dans le cerveau et dans une moindre mesure dans la corne dorsale de la moelle épinière (Ayachi and Simonin, 2014; Bonini et al., 2000; Gouardères et al., 2004a). RFRP n'a pas d'action sur la nociception directement (Liu et al., 2001) ou un effet pronociceptif (Elhabazi et al., 2013) et diminue l'analgésie induite par la morphine (Fang et al., 2011; Liu et al., 2001). Dans la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y, l'activation de NPFF₁R surexprimé inhibe la réponse au DAMGO de MOR endogène (Kersanté et al., 2006), ce qui confirme le caractère anti-opioïde de RFRP.

NPFF₂R est présent dans le cerveau, en particulier dans l'hypothalamus, et est abondant au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Gouardères et al., 2002, 2004a, 2004b; Yang et al., 2008). Le rôle de NPFF dans la modulation de la nociception est dépendant du site d'injection, son administration i.c.v. lui confère une activité hyperalgésiante et il diminue l'analgésie de la morphine (Liu et al., 2001; Oberling et al., 1993), alors qu'en administration i.t. le NPFF est analgésique et potentialise l'action de la morphine (Gouardères et al., 1993, 1996). La co-administration de morphine avec le RF9, un antagoniste des récepteurs NPFF₁R et NPFF₂R, potentialise l'activité analgésique de la morphine. De plus, en cas de co-administration répétée de morphine et RF9, il n'y a pas de développement

d'hyperalgésie induite par les opiacés (HIO), la tolérance aux effets analgésiques de la morphine est retardée et le syndrome de sevrage opiacé est atténué de moitié par le RF9 (Elhabazi et al., 2012; Simonin et al., 2006). De plus, l'administration de morphine chronique augmente les niveaux d'expression de NPPF dans le liquide céphalo-rachidien (Malin et al., 1990). En effet, l'exposition de coupes de moelle épinière à différentes concentrations de morphine provoque la libération de NPPF de manière dose dépendante et biphasique avec un effet à partir de 10^{-12} M de morphine et un maximum 10^{-10} M de morphine (Devillers et al., 1995). Le rôle de la morphine sur la libération de NPPF est retrouvé chez l'animal entier au niveau de l'hypothalamus, du cervelet, et plus fortement au niveau de la moelle épinière sur la partie thoraco-lombaire, avec une inhibition de la libération de NPPF la première heure, suivie d'une augmentation de la libération de NPPF sur les 12 heures suivantes (Stinus et al., 1995). Le système NPPF / NPPF₂R est également activé lors d'une inflammation induite par la carragénine ou par le CFA (Lin et al., 2017; Nystedt et al., 2004; Vilim et al., 1999) mais pas dans des modèles de douleurs neuropathiques (Nystedt et al., 2004; Vilim et al., 1999). De plus, l'activation de NPPF₂R par un agoniste dans une lignée de souris transgénique sur-exprimant ce récepteur induit la libération de substance P et de CGRP au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière et des ganglions rachidiens (Lin et al., 2017). Dans l'ensemble, ces études caractérisent le système NPPF / NPPF₂R comme un système pronociceptif et anti-opioïde, présent au niveau spinal et en supra-spinale, qui est activé lors d'une inflammation périphérique ou par la morphine (Ayachi and Simonin, 2014).

2.2.Régulation du métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique correspond à l'équilibre finement régulé entre des apports (consommation alimentaire), des dépenses (activité musculaire, métabolisme, thermogénèse) et un stockage (lipogénèse). Ces activités sont sous le contrôle neuroendocrinien de trois centres majeurs du métabolisme : le pancréas (insuline, glucagon), le tissu adipeux (leptine, adipolectine) et l'hypothalamus.

GPR10 est exprimé dans le pancréas, l'estomac et l'hypothalamus (Quillet et al., 2016), et l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) de PrRP produit une diminution des apports alimentaires et du poids accompagnée d'une augmentation des dépenses énergétiques du tissu adipeux brun et d'une hyperthermie (Ellacott et al., 2003; Lawrence et al., 2000), et ces effets anorexiques ne sont plus présent dans des souris dont le gène codant pour GPR10 est désactivé (Bechtold and Luckman, 2006; Gu et al., 2004).

Bien que **GPR54** soit retrouvé dans le pancréas, le foie, le tissu adipeux et l'hypothalamus, l'administration de kisspeptine n'a pas d'effet marqué sur le métabolisme (Quillet et al., 2016), mais allonge les intervalles entre les repas sans en changer la taille (Stengel et al., 2011). Au niveau du pancréas, kisspeptine n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline à l'état basal mais augmente la libération d'insuline provoquée par le glucose (Bowe et al., 2009; Hauge-Evans et al., 2006; Wahab et al., 2011).

GPR103 est présent au niveau, du tissu adipeux et de l'hypothalamus et le peptide QRFP est également retrouvé dans le pancréas (Primeaux et al., 2013). QRFP est un peptide orexigène dont l'administration augmente la prise d'aliments et la masse adipeuse (Chartrel et al., 2003; Moriya et al., 2006; do Rego et al., 2006). L'administration i.c.v. de 26RFa provoque la libération de neuropeptide Y dans l'hypothalamus ce qui diminue l'expression de POMC et la libération de α -MSH ce qui diminue la prise alimentaire (Lectez et al., 2009). L'expression de QRFP/GPR103 est augmentée dans le tissu adipeux suite à un régime hypercalorique, et GPR103 participe à la lipogenèse et à l'accumulation de triglycérides (Mulumba et al., 2010).

NPFF₁R est exprimé dans l'hypothalamus mais et à ce jour il n'a pas été détecté dans les autres structures impliquées dans le métabolisme (Quillet et al., 2016). Pour autant, ce récepteur est impliqué dans l'homéostasie énergétique, l'administration i.c.v. de RFRP augmente la prise alimentaire (Clarke et al., 2012; Johnson and Fraley, 2008; Johnson et al., 2007) et provoque de l'hypothermie (Quelven et al., 2005). Les fibres RFRP des noyaux dorso-médians de l'hypothalamus sont impliquées dans le comportement d'anticipation de la prise alimentaire (Acosta-Galvan et al., 2011), et les souris n'exprimant plus NPFF₁R sont plus vulnérables au jeûne, en cohérence avec l'action orexigène du RFRP (León et al., 2014).

NPFF₂R est exprimé dans l'hypothalamus et le tissu adipeux ainsi que dans le foie et l'estomac en quantité plus modérée (Bonini et al., 2000; Elshourbagy et al., 2000). A l'inverse du RFRP, l'administration i.c.v. de NPFF produit une diminution de la prise alimentaire (Bechtold and Luckman, 2006; Sunter et al., 2001) et une hyperthermie (Moulédous et al., 2010; Quelven et al., 2005). De plus, le NPFF est capable de bloquer l'effet orexigène des opioïdes (Nicklous and Simansky, 2003). Dans le tissu adipeux, le NPFF inhibe la lipolyse provoquée par les catécholamines (Dahlman et al., 2007; van Harmelen et al., 2010). NPFF₂R est exprimé par les macrophage du tissu adipeux (ATM) et son activation conduit à la différenciation de ces macrophage en type M2 anti-inflammatoire qui est associé au maintien d'un tissu adipeux sain, alors que lors d'un syndrome métabolique NPFF et NPFF₂R sont diminués (Waqas et al., 2017).

2.3. Le contrôle de la reproduction

Le contrôle des fonctions reproductrices est assuré chez les mammifères par l'axe hypothalamo-hypophysaire avec des rétrocontrôles négatifs stéroïdiens effectués par les organes périphériques. Le mécanisme central de régulation formé d'une sécrétion pulsatile d'hormone de libération gonadotrope (GnRH) par l'hypothalamus qui stimule la libération des hormones folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH) par l'hypophyse. La LH et la FSH vont permettre le bon développement et le bon fonctionnement des organes génitaux. Les peptides RF-amide interviennent dans la modulation de cette boucle hormonale, avec la kisspeptine : GPR54 qui est un modulateur positif essentiel au fonctionnement de cet axe, RFRP / NPFF1R qui semble jouer un rôle plus subtil de modulateur négatif, et quelques publications suggèrent que PrRP / GPR10 et QRFP / GPR103 pourraient également intervenir (Quillet et al., 2016).

GPR10 est présent dans l'hypothalamus, et colocalise avec la GnRH à ce niveau (Feng et al., 2007), et PrRP semble être exprimé dans le testicule chez le rat (Nieminen et al., 2000). Chez des rats femelles ayant subi une ovariectomie, l'œstrogène et la progestérone augmentent les niveaux de PrRP dans l'hypothalamus (Kataoka et al., 2001). L'injection de PrRP en i.c.v. provoque une augmentation de la concentration plasmatique de LH et FSH (Seal et al., 2000). Au niveau de l'hypothalamus, il semble que la libération de PrRP précède celle de GnRH, qui est suivie de la libération de LH et FSH par l'hypophyse (Watanobe, 2001). Cependant, des investigations plus poussées sont nécessaires pour comprendre dans quelles conditions physiologiques et par quel stimulus le système PrRP – GPR10 est amené à jouer un rôle sur la libération de GnRH.

Le rôle de **GPR54** et de kisspeptine dans la reproduction a été révélé par l'identification de mutations inactivantes de GPR54 dans l'hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique (de Roux et al., 2003), et l'inactivation du gène codant pour GPR54 chez la souris les rend stériles avec un hypogonadisme (Seminara et al., 2004). Ces observations ont suscité un grand intérêt pour GPR54 et de très nombreux travaux ont étudié son rôle dans la reproduction, et sont décrits dans la revue (Quillet et al., 2016). La kisspeptine est capable de directement activer les neurones à GnRH et de provoquer la libération de GnRH, qui à son tour provoque la libération de LH et FSH (Han et al., 2005), et GPR54 est un acteur nécessaire de la puberté (Teles et al., 2008). GPR54 est impliqué dans une boucle de rétrocontrôle positive initiée par l'œstrogène, kisspeptine s'oppose au rétrocontrôle GABAergique négatif sur les neurones GnRH (Adachi et

al., 2007). De plus, le système kisspeptine – GPR54 serait également actif, avec une action de régulation positive dans les organes périphériques (Hsu et al., 2014; Saadeldin et al., 2012).

GPR103 est exprimé dans l'hypothalamus, l'hypophyse et dans le testicule (Fukusumi et al., 2003; Navarro et al., 2006; Takayasu et al., 2006). L'administration de QRFP chez la femelle induit une libération dose dépendante de LH ainsi que de FSH à forte concentration, et ce par l'intermédiaire de la GnRH (Navarro et al., 2006; Patel et al., 2008).

NPF₁R est exprimé dans l'hypothalamus, où les fibres RFRP sont en contact avec les neurones GnRH de l'aire pré-optique et avec des neurones à kisspeptine (Clarke et al., 2008; Rizwan et al., 2012). NPF₁R est également exprimé dans les gonades mâles (Ubuka et al., 2014). RFRP a un rôle inhibiteur sur l'axe gonadotrophique et diminue la libération de LH induite par la GnRH (Kriegsfeld et al., 2006; León et al., 2014). L'œstrogène effectue un rétrocontrôle positif au moment du pic de LH préovulatoire en levant l'inhibition du RFRP sur la GnRH (Molnár et al., 2011). Le RFRP joue également un rôle inhibiteur sur les gonades mâles et diminue la production d'hormones stéroïdes à ce niveau (Anjum et al., 2014).

NPF₂R ne semble pas impliqué dans la régulation de la reproduction (Quillet et al., 2016).

2.4. Rôle dans le système cardiovasculaire

Le peptide **PrRP** augmente la pression artérielle en stimulant le tonus sympathique (Horiuchi et al., 2002; Samson et al., 2000) en agissant dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) en stimulant les neurones de l'hormone de libération de la cortisone (CRH) (Yamada et al., 2009). De plus, PrRP pourrait augmenter la contractilité myocardique (effet inotrope positive) (Kónyi et al., 2010). Chez l'homme un polymorphisme de son récepteur GPR10, qui diminue son l'activité, a été associé avec une diminution de la pression artérielle (Bhattacharyya et al., 2003; Franks et al., 2004) confirmant le rôle hypertenseur de ce système. Cependant cette observation chez l'homme est en apparente contradiction avec une étude réalisée dans des rats n'exprimant plus le récepteur GPR10 et qui montre que l'effet cardiovasculaire de PrRP est indépendant de son récepteur mais est bloqué par le RF9, antagoniste des récepteurs NPF₁R et NPF₂R (Ma et al., 2009), en accord avec la bonne affinité de PrRP pour NPF₂R (Engström et al., 2003). Ce résultats suggèrent que cet effet du PrRP pourrait être dus au récepteur du NPF₂R et non pas GPR10.

Le système **kisspeptine – GPR54** est présent au niveau de l'endothélium artériel, dans le placenta, le cordon ombilical, les plaquettes et les cellules myocardiques (Maguire et al., 2011; Mead et al., 2007; Mezei et al., 2015; Ramaesh et al., 2010). La kisspeptine a une activité inotrope positive (Maguire et al., 2011), vasoconstrictrice (Mead et al., 2007) et inhibe l'angiogénèse (Ramaesh et al., 2010; Sato et al., 2017). En effet, kisspeptine inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Ramaesh et al., 2010), provoque la sénescence de ces cellules, et ralentit ainsi la récupération cardiaque à la suite d'une ischémie (Usui et al., 2014). Les souris traitées avec de la kisspeptine développe une fibrose cardiaque avec une atteinte mitochondriale des myocytes (Zhang et al., 2017). De plus, kisspeptine semble jouer un rôle délétère dans l'athérosclérose : la kisspeptine favorise le développement des plaques d'athérome en stimulant la production de dérivés de l'acide arachidonique pro-inflammatoires par les plaquettes et l'endothélium (Mezei et al., 2015), en inhibant l'action de l'angiotensine II sur le développement de l'endothélium, et en stimulant l'infiltration de monocytes (Sato et al., 2017).

Il existe peu d'informations sur le rôle de **QRFP / GPR103** dans le système cardiovasculaire. Comme les autres peptides RF-amide, QRFP augmenterait la pression artérielle et la fréquence cardiaque en augmentant le tonus sympathique (Fang et al., 2009; Takayasu et al., 2006).

L'administration de **NPFF** provoque une augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque (Allard et al., 1995; Jhamandas and Goncharuk, 2013; Roth et al., 1987) en stimulant le tonus sympathique. En effet, l'action du NPFF sur la pression artérielle et la fonction cardiaque sont bloqués respectivement par des antagonistes α_1 adrénergiques et des β -bloquants (Allard et al., 1995). De plus, le NPFF diminue la libération de vasopressine consécutive à une hypovolémie (Arima et al., 1996). L'action du NPFF sur le système cardiovasculaire passe par des mécanismes centraux, en effet le NPFF augmente l'excitabilité des neurones parvocellulaires du PVN en atténuant la signalisation gabaergique (Jhamandas and MacTavish, 2003; Jhamandas et al., 2007). De plus, les patients souffrant d'une hypertension montrent des niveaux d'expression du NPFF fortement diminués dans diverses structures de l'hypothalamus (Jhamandas and Goncharuk, 2013).

Il existe peu d'informations sur l'implication de **RFRP** dans le système cardiovasculaire, RFRP aurait une action inhibitrice sur l'activité cardiaque, bien qu'il soit difficile de déterminer si cette action passe par le récepteur NPFF₁R ou NPFF₂R (Nichols et al., 2010, 2012).

Première partie

Etude de l'interaction fonctionnelle entre les récepteurs à peptide RF-amide

I. Stratégie d'étude, objectifs

L'étude des interactions fonctionnelles entre les récepteurs à peptide RF-amide se base sur des observations faites *in vitro* sur des modèles cellulaires et *in vivo* chez la souris, qui sous-tendent la possibilité d'interactions entre les récepteurs à peptide RF-amide dans la modulation de la nociception et de la douleur. Les travaux engagés visent à tester l'hypothèse d'interaction fonctionnelle par signalisation intracellulaire croisée et/ou par hétérodimérisation.

1. Contexte

Le système des peptides RF-amide est composé de 5 récepteurs, GPR10, GPR54, GPR103, NPFF₁R et NPFF₂R, chacun de ces récepteurs étant impliqué dans la modulation de la douleur. Dans leur ensemble, les peptides RF-amide sont pronociceptifs et contrecarrent l'action analgésique de la morphine (Ayachi and Simonin, 2014). Cependant la participation spécifique de chacun des 5 récepteurs RF-amide dans la modulation de la douleur reste à définir.

L'une des premières difficultés pour distinguer le rôle de chaque récepteur est le manque de sélectivité des récepteurs NPFF₁R et NPFF₂R pour l'ensemble des peptides RF-amide. En effet, alors que les récepteurs GPR10, GPR54 et GPR103 montrent une forte sélectivité d'affinité pour leur agoniste endogène (PrRP, kisseptine et QRFP respectivement), NPFF₁R et NPFF₂R lient et sont activés par tous les peptides RF-amide endogènes (Figure 12).

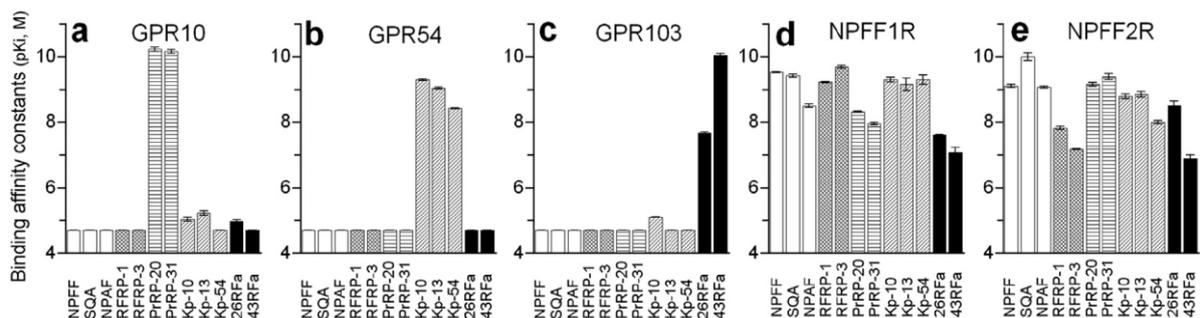


Figure 12 : Profil de l'affinité de liaison des peptides RF-amide pour les récepteurs GPR10, GPR54, GPR103, NPFF₁R et NPFF₂R (exprimée comme le négatif du logarithme du K_i), selon (Elhabazi et al., 2013).

Pour différencier l'action des peptides PrRP, Kp et QRFP sur leur propre récepteur de celle sur les récepteurs NPFF₁R et NPFF₂R, il existe un antagoniste sélectif de ces derniers, RF9 (Simonin et al., 2006). La co-administration de RF9 avec l'agoniste endogène de chaque récepteur RF-amide (PrRP20, Kp10, 26RfA, RFRP3 et NPFF) a montré que cet antagoniste est capable de bloquer les effets pronociceptifs et anti-opioïdes de chacun des peptides RF-amide

(Elhabazi et al., 2013). Ce résultat suggère que la composante nociceptive des peptides RF-amide est le résultat de leur liaison aux récepteurs NPFF₁₋₂R, et non pas aux récepteurs GPR10, GPR54 ou GPR103. Cependant, l'étude de souris KO pour le récepteur GPR10 a montré qu'en l'absence de ce récepteur, PrRP perd ses propriétés pronociceptive et anti-opioïde, ce qui laisse penser que ce peptide nécessite l'activation des récepteurs GPR10 et NPFF₁₋₂R dans la modulation de la douleur (Laurent et al., 2005). Plus étonnant, en l'absence du récepteur GPR10, le NPFF perd son action anti-opioïde alors que ce peptide est dépourvu d'affinité pour ce récepteur (Laurent et al., 2005). L'étude de souris KO-GPR10 dévoile un nouveau degré de complexité dans la modulation de la douleur par les peptides RF-amide : les systèmes PrRP - GPR10 et NPFF - NPFF₁₋₂R sont interdépendants par le biais de mécanismes que les connaissances pharmacologiques actuelles n'arrivent pas à expliquer.

De manière similaire, des interactions ont été observées dans notre laboratoire entre les récepteurs GPR103 et NPFF₁R dans la modulation de la douleur. Le peptide QRFP, agoniste du récepteur GPR103 pouvant également lier NPFF₁R, et RFRP, agoniste du récepteur NPFF₁R, sont pronociceptifs et leur administration i.c.v. provoque une hyperalgésie transitoire. Dans les souris KO pour le récepteur NPFF₁R, ni RFRP ni QRFP ne sont hyperalgésiants, ce qui suggère que l'action pronociceptive de QRFP implique l'activation des récepteurs NPFF₁R mais pas celle des récepteurs GPR103. Or, dans les souris KO pour le récepteur GPR103, l'administration de QRFP ne provoque plus d'hyperalgésie, il semble donc que les récepteurs GPR103 et NPFF₁R soient nécessaires à l'action de QRFP. De même, dans les souris KO pour le récepteur GPR103, le RFRP n'a plus d'effet pronociceptif. A l'image de ce qui existe entre les récepteurs GPR10 et NPFF₂R, ces données décrivent une interdépendance entre les récepteurs GPR103 et NPFF₁R qui n'est pas expliquée par les propriétés pharmacologiques *in vitro* de ces systèmes en l'état actuel des connaissances.

2. Hypothèses de travail et stratégie d'étude

Il ressort de la littérature et des résultats discutés ci-dessus que le décryptage des fonctions propres à chaque récepteur à peptide RF-amide dans la modulation de la douleur s'avère complexe. Cela justifie, en plus des approches de blocage génétique (souris KO pour les différents récepteurs à peptide RF-amide) et pharmacologique (antagonistes sélectifs de chaque récepteur), de réaliser des études transverses permettant d'évaluer plusieurs hypothèses (Figure 13) :

- **Hypothèse 1** : les peptides RF-amide modulent tous la nociception via l'activation des récepteurs NPFF₁₋₂R. Toutefois, l'étude des souris KO-GPR10 et KO-GPR103 ne soutient pas cette hypothèse.
- **Hypothèse 2** : les récepteurs RF-amide fonctionnent en réseau « continu ». Les peptides endogènes agissent tous sur leur récepteur prototype mais les récepteurs GPR10, GPR54 et GPR103 se situent en aval (et donc sous le contrôle) des récepteurs NPFF₁₋₂R. L'effet du RF9, antagoniste NPFF₁₋₂R et capable de bloquer l'action du 26RFa *in vivo* est cohérent avec cette hypothèse, mais pas l'étude des souris KO-GPR103 dans lesquelles RFRP n'a plus d'effet.
- **Hypothèse 3** : les récepteurs RF-amide fonctionnent en réseau « parallèle ». Les peptides agissent sur leur récepteur propre présent sur des neurones présynaptiques différents, mais l'effet combiné de ces neurones est nécessaire pour activer (ou inhiber) le neurone postsynaptique.
- **Hypothèse 4** : Les récepteurs RF-amide sont co-exprimés dans les mêmes cellules : par exemple GPR10/NPFF₂R ou GPR103/NPFF₁R sont co-exprimés à la surface d'une même cellule et leur interaction fonctionnelle permet la modulation de la nociception. Des interactions fonctionnelles entre récepteurs co-exprimés dans une même cellule peuvent découler d'une interaction physique entre récepteurs (hétérodimère) ou de connexions dans la cascade de signalisation intracellulaire (Kamal and Jockers, 2011; Prezeau et al., 2010).

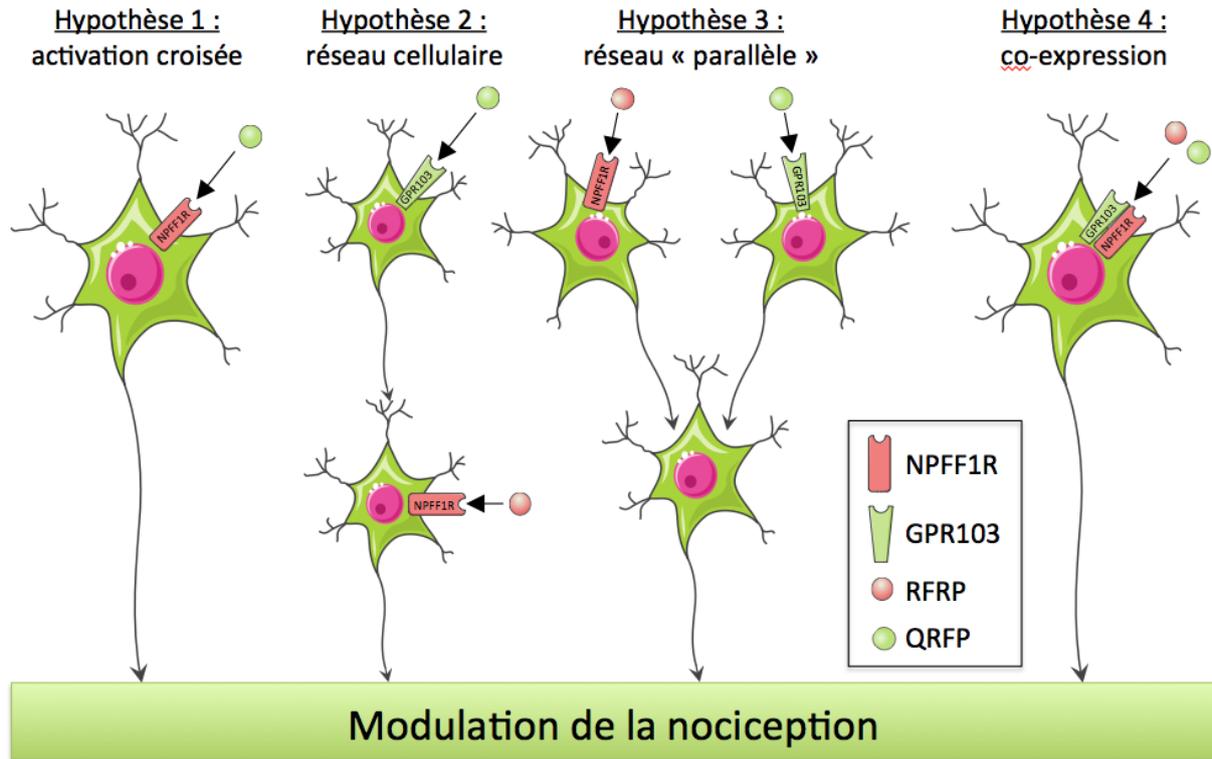


Figure 13 : Les différentes hypothèses de recherche sur la modulation de la douleur par les récepteurs à peptide RF-amide, avec l'exemple de GPR103 et NPFF₁R.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons entrepris de tester cette dernière hypothèse en faisant exprimer les récepteurs RF-amide par paire dans des modèles cellulaires. Afin de restreindre notre champ d'étude, nous avons étudié des couples de récepteurs qui impliquaient un récepteur couplé à une protéine $G_{i/o}$ (NPFF₁R ou NPFF₂R) et un récepteur couplé à une protéine G_q (GPR10, GPR54 ou GPR103). Pour évaluer la possibilité de connexions dans la cascade de signalisation intracellulaire la réponse G_q a été mesurée par l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, et la réponse $G_{i/o}$ par la diminution de production d'AMPc par l'adénylate cyclase. Pour évaluer la possibilité d'interaction physique entre les récepteurs, des fluorophores ont été fusionnés à l'extrémité amino-terminale des récepteurs et le rapprochement a été observé par transfert d'énergie (FRET) entre les fluorophores.

Cette étude a été réalisée en deux temps :

- la mise au point d'une méthode de mesure de la réponse $G_{i/o}$ en utilisant le GloSensor
- le développement et la caractérisation de récepteurs fluorescents exprimés seuls ou par paire

II. Mise au point de la mesure de la réponse $G_{i/o}$

1. Introduction

1.1. Une sonde luminescente pour mesurer la quantité d'AMPc en cellules vivantes

Pour mesurer la réponse $G_{i/o}$ des récepteurs NPPF₁R et NPPF₂R, nous avons choisi d'utiliser le système GloSensor (Proméga). Ce test est basé sur l'utilisation de la luciférase de luciole (« Firefly luciferase », *Photinus pyralis*), enzyme qui catalyse l'oxydation du substrat luciférine en oxyluciférine avec émission de lumière. Sur le plan structural, la luciférase de luciole contient deux modules connectés par une région charnière, qui se replie sur eux-mêmes suite à la liaison du substrat. Dans le cas du GloSensor développé par Proméga (Fan et al., 2008) (Figure 14), 5 résidus de la région charnière de la luciférase ont été remplacés par une séquence de 440 résidus correspondant au domaine de liaison de l'AMPc de la sous-unité régulatrice II β de la protéine kinase A (PKA) (Fan et al., 2008). L'activité luminescente de cette luciférase modifiée est modulée allostériquement par la conformation du domaine régulateur : la liaison d'AMPc libère la contrainte stérique, permet le repliement fonctionnel des deux modules de la luciférase et l'émission de lumière. En présence d'un excès de luciférine, l'intensité de luminescence est proportionnelle à la concentration en AMPc intracellulaire.

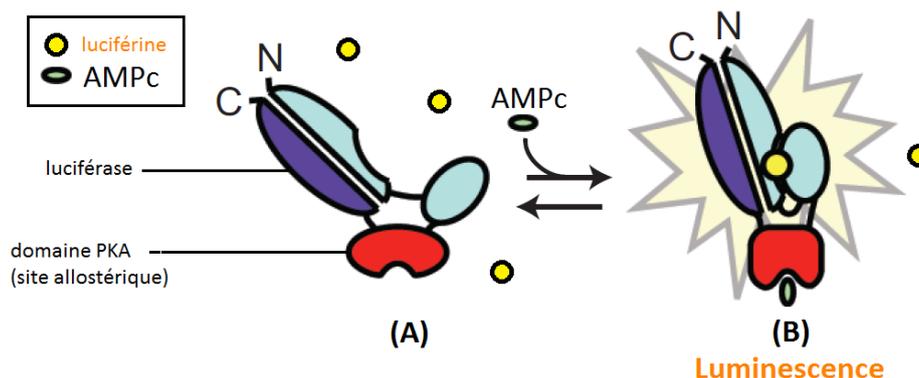


Figure 14 : Fonctionnement du GloSensor (Fan et al., 2008). Une sous-unité régulatrice de la PKA est insérée dans la luciférase et régule son activité (luminescence) de manière allostérique sous la dépendance de l'AMPc. Conformation inactive (A) et active (B) de la luciférase dite Glosensor.

1.2. Différentes conditions expérimentales pour mesurer une activité $G_{i/o}$ en cellule

Le niveau basal de production d'AMPc est faible, ce qui rend difficile une visualisation de l'activation de la protéine $G_{i/o}$, qui va inhiber cette production d'AMPc. Deux techniques sont utilisées dans la littérature pour augmenter la production basale d'AMPc intracellulaire, l'une artificielle et l'autre plus physiologique. La forskoline est un activateur direct des adénylate cyclases et augmente de manière dose-dépendante la production d'AMPc, permettant ainsi d'augmenter le rapport signal / bruit pour observer l'activité de la protéine $G_{i/o}$. Il est également possible de mimer l'activation physiologique des AC en utilisant un agoniste capable de se lier à un récepteur membranaire pour activer une protéine G_s qui va stimuler les AC (Wang et al., 2011). L'AMPc est un signal intracellulaire transitoire qui est rapidement dégradé par les phosphodiésterases (PDE). Toujours dans le but d'augmenter le niveau d'AMPc dans la cellule, des inhibiteurs de PDE comme le 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) peuvent être utilisés pour stabiliser le signal (Hill et al., 2010). Ces outils, bien que nécessaires pour mesurer l'activité de récepteurs couplés à la protéine $G_{i/o}$, apportent un biais dans l'évaluation de l'activité des récepteurs. En effet, plus la stimulation des AC sera forte, et plus il sera difficile pour la protéine $G_{i/o}$ de l'inhiber (Nordemann et al., 2013), avec le risque de sous-estimer l'activité du ligand testé. De même, l'inhibition des PDE amplifie le signal AMPc et potentialise de manière artificielle la réponse G_s , ce qui peut conduire à surestimer la réponse mesurée. Dans cette logique, une étude récente a montré que le système de mesure de l'AMPc GloSensor était suffisamment sensible pour mesurer des variations de niveau d'AMPc basal correspondant à l'activation d'un récepteur couplé $G_{i/o}$ sans avoir à amplifier le signal (Gilissen et al., 2015). Nous avons donc réalisé une étude sur l'utilité et l'influence de la forskoline et de l'IBMX dans la mesure de l'activité du récepteur NPPF₁R préférentiellement couplés à $G_{i/o}$.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les cellules HEK293 exprimant de manière stable le GloSensorTM cAMP (plasmide 20F ; Promega, Madison, USA), dénommées HEK-Glo, nous ont été données par le Dr Julien Hanson (ULB, Liège, Belgique).

Les milieux DMEM (glucose 4,5g/L) et le mélange Trypsine 0,05%/EDTA 0,02% (w/v) ont été achetés chez Gibco (Fischer Scientific, Illkirch, France).

La BSA, la forskoline et l'IBMX proviennent de Sigma-Aldrich (St Quentin, Fallavier, France), l'isoprotérénol chez Tocris (Lille, France) et la D-luciférine de Synchem OHG (Felsberg-Altenberg, Allemagne). Le peptide RFRP3 vient de Tebu Bio (Le Perray en Yvelines, France).

2.2. Mesure de l'AMPC sur des cellules HEK-Glo

2.2.1. Charge des cellules et préparation des composés

Les cellules adhérentes HEK-Glo exprimant de manière stable Flag-hNPFF1R sont récoltées à l'aide de trypsine/EDTA, mises en suspension dans le tampon Hepes/BSA (10 mM Hepes, 0,4 mM NaH₂PO₄, 137,5 mM NaCl, 1,25 mM MgCl₂, 1,25 mM CaCl₂, 6 mM KCL, 10 mM glucose, BSA 1g/L, pH 7,4), puis comptées et centrifugées (1 000 rpm, 5 min). Le culot cellulaire est repris dans du tampon Hepes/BSA contenant de la D-luciférine 1mM pour obtenir une densité finale de 10⁶ cellules/mL. Les cellules HEK-Glo en suspension sont distribuées en plaque 96-puits à fond blanc (Greiner ref 655075), à raison de 10⁵ cellules par 100µl par puits et incubées dans le tampon Hepes/BSA en présence de luciférine 1 mM pendant 2 h à 25 °C (à l'abri de la lumière).

Les composés à tester sont dilués dans du tampon Hepes/BSA contenant de la luciférine 1 mM puis distribués en plaque 96-puits (Greiner ref 651201) selon le plan de l'expérience. Les solutions d'agonistes contiennent de l'IBMX à la concentration indiquée.

2.2.2. Mesure de la luminescence et normalisations

La mesure de luminescence se fait à 25°C en mode cinétique (temps d'intégration de 1 s) avec lecture par le haut sur un lecteur de plaque FlexStation III (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). La mesure se décompose en 3 phases successives (sauf indication contraire) :

- 1) la luminescence basale est mesurée sur l'ensemble de la plaque durant 10 min, ce qui permet de contrôler l'homogénéité de la charge des cellules en luciférine et la stabilité du signal,
- 2) l'ajout automatisé des agonistes dans tous les puits, suivi d'une mesure cinétique de la luminescence pendant 15 min, et
- 3) l'ajout de forskoline dans tous les puits, suivi d'une mesure cinétique de la luminescence pendant 70 - 90 min.

Pour analyser la réponse AMPC de la forskoline et de l'isoprotérénol, la moyenne de luminescence au maximum de réponse est calculée sur 4 points et ramenée en pourcentage de la valeur maximale obtenue sur l'ensemble des conditions testées.

Pour analyser la réponse AMPc du RFRP3, la moyenne de luminescence au maximum de réponse est calculée sur 4 points et ramenée en pourcentage de la valeur obtenue en absence de RFRP3 pour chaque condition de forskoline et d'IBMX donnée.

Les valeurs ainsi obtenues sont représentées en fonction de la concentration de l'agoniste et les courbes dose-réponse sont analysées par régression non linéaire selon un modèle d'effet-dose sigmoïdale à pente variable en utilisant le logiciel Prism 4.0 (Synergy Software, Reading, PA, USA). L'effet de l'IBMX sur les réponses forskoline et l'isoprotérénol est représenté par $\log(A/A')$ le logarithme du rapport des EC_{50} obtenues en présence d'IBMX (A) et en absence d'IBMX (A') en fonction des concentrations d'IBMX. La relation effet-dose est analysée par régression linéaire selon un modèle polynomial de premier ordre (Prism 4.0).

3. Résultats

3.1. Potentialisation de la réponse AMPc à la forskoline et à l'isoprotérénol par l'IBMX

Afin d'évaluer la sensibilité du système GloSensor, nous avons mesuré la cinétique de production d'AMPc par l'adénylate cyclase stimulée soit directement par la forskoline, soit indirectement par la liaison de l'isoprotérénol au récepteur β_2 adrénergique et l'activation consécutive de la protéine G_s . Dans des cellules HEK exprimant de manière stable le système GloSensor (HEK-Glo), la forskoline induit la production d'AMPc avec une EC_{50} de 4,66 μ M (Figure 15A, Tableau 5). Pour évaluer l'influence de l'IBMX sur la réponse de la forskoline, des courbes dose-réponses de forskoline ont été réalisées en présence de différentes concentrations d'IBMX. Cet inhibiteur non spécifique des phosphodiésterases est fréquemment utilisé pour stabiliser le signal AMPc à des concentrations comprises entre 0,1 à 1 mM (Hill et al., 2010; Multispan). La présence d'IBMX potentialise la réponse de la forskoline de manière dose-dépendante et améliore son EC_{50} mais ne modifie pas son amplitude de réponse. L'effet maximum est atteint à partir de 0,3 mM d'IBMX ; l'augmentation à 1 mM d'IBMX ne change pas l' EC_{50} mais provoque un décalage de la cinétique de production d'AMPc d'environ 20 minutes (Figure 15B). Il semble donc qu'à forte concentration, l'IBMX ai un effet contre-productif en ralentissant la production d'AMPc.

Pour confirmer cette observation, une expérience similaire a été réalisée en induisant la production d'AMPc via l'activation d'un récepteur couplé à une protéine G_s . Comme le récepteur β_2 adrénergique, couplé à G_s , est présent de manière constitutive dans les cellules

HEK293 (Atwood et al., 2011), nous avons réalisé des courbes effet-doses d'isoprotérénol en présence de concentration variable d'IBMX (Figure 15C, D). En absence d'IBMX, l'isoprotérénol induit une réponse AMPc avec une EC_{50} de 10 nM avec un signal maximum de 5 600 r.l.u (Figure 15C et Tableau 5). La présence d'IBMX augmente l'amplitude de la réponse et l' EC_{50} de l'isoprotérénol de manière dose-dépendante jusqu'à 0,3 mM d'IBMX. Comme observé avec la forskoline, l'IBMX à fortes concentrations ralentit la cinétique de production d'AMPc (Figure 15D).

Afin d'évaluer la relation entre la concentration en IBMX et l' EC_{50} de la forskoline ou l'isoprotérénol, nous avons calculé un coefficient de potentialisation des réponse AMPc correspondant au log du rapport des EC_{50} obtenues en absence (A) et en présence (A') d'IBMX (Figure 15E) ; une valeur de 1 indiquant une EC_{50} (A') 10 fois plus petite qu'en condition (A). La représentation graphique de ce rapport en fonction de la concentration en IBMX montre une relation de proportionnalité linéaire pour des concentrations égales ou inférieures à 0,1 mM d'IBMX, modélisée par une régression linéaire de ces points. Le coefficient de proportionnalité, estimé par la pente de cette régression linéaire, est plus élevé pour la forskoline (0,78) que pour l'isoprotérénol (0,33). On peut donc en conclure que l'IBMX potentialise plus fortement la réponse AMPc à la forskoline que celle de l'isoprotérénol, avec une saturation du phénomène au delà de 0,1 mM d'IBMX, voire même un effet délétère au-delà de 0,3 mM.

3.2.Effet de l'IBMX sur le seuil basal d'AMPc et sur l'activité de NPFF₁R

Une étude précédente a montré avec le récepteur au succinate que le système GloSensor est suffisamment sensible pour détecter l'activation d'un récepteur couplé $G_{i/o}$ en absence de forskoline, c'est à dire qu'il permet de visualiser une diminution de la faible activité basale des AC (Gilissen et al., 2015). Nous avons pu confirmer avec NPFF₁R qu'une dose-réponse de RFRP3 est détectable et quantifiable même en absence de forskoline, et qu'il est possible de déterminer une EC_{50} reproductible dans ces conditions (Figures 16A et 16B, Tableau 6).

L'inhibition des PDE par l'IBMX augmente de manière dose-dépendante le niveau basal d'AMPc avec un effet moindre et une cinétique altérée pour la concentration de 1 mM en IBMX (Figure 16C). Le blocage de la dégradation de l'AMPc amplifie la sensibilité et augmente l'amplitude de réponse de NPFF₁R au RFRP3 et permet un meilleur signal (Figure 16D, Tableau 6).

3.3. Effets de la forskoline sur l'activité de NPFF₁R, seul ou en présence d'IBMX

L'activité d'un récepteur couplé G_{i/o} est habituellement révélée par la stimulation des AC par la forskoline. Pour déterminer si les conditions de forskoline peuvent influencer sur la détermination de l'EC₅₀ d'un agoniste G_{i/o}, des dose-réponses de RFRP3 ont été réalisées en présence de différentes concentrations de forskoline. Pour des concentrations comprises entre 0,5 µM et 5 µM, la forskoline ne semble pas modifier l'activité apparente de NPFF₁R (Figures 17A et 17B).

Cependant, en présence de 0,1 mM d'IBMX, des concentrations croissantes de forskoline diminuent l'amplitude de réponse et la puissance du RFRP3 (Figures 17C et 17D). Pour confirmer l'implication de l'IBMX, nous avons évalué la réponse du RFRP3 en présence d'une concentration fixe de forskoline et en faisant varier les concentrations d'IBMX. Alors qu'en absence de forskoline, l'IBMX améliore la sensibilité de mesure de la réponse de NPFF₁R au RFRP3 (Figure 16), en présence de forskoline (0,5 µM) l'IBMX diminue la puissance apparente et l'amplitude de réponse du RFRP3 (Figures 17E et 17F). Il semble donc que si l'utilisation de forskoline ou d'IBMX seuls ne modifie pas, voire améliore la sensibilité de détection de la réponse G_{i/o}, l'utilisation conjointe de ces deux outils diminue de manière dose-dépendante l'amplitude de réponse et l'EC₅₀ du NPFF₁R au RFRP3.

3.4. Temps d'incubation du RFRP3 et de l'IBMX

Dans les essais décrits jusqu'à présent, le RFRP3 est pré-incubé 15 min avant l'ajout de forskoline. Dans une démarche d'optimisation de cette technique de mesure de l'activité de NPFF₁R, plusieurs temps d'incubation de RFRP3 ont été testés (Figures 18A, 18B et 18C). En cas d'ajout simultané de RFRP3 avec la forskoline, le RFRP3 n'atteint pas son effet maximum et ce même au bout de 70 min (Figure 18A), alors qu'après 15 min de pré-incubation, l'effet du RFRP3 est stable dans le temps (Figure 18B). L'incubation prolongée à 25 min de RFRP3 se traduit par une pente de la courbe dose-réponse qui s'accroît et s'éloigne du rapport de proportionnalité de -1,0 (Figure 18C). Une pré-incubation de 15 min est donc considérée comme la plus adéquate pour mesurer l'effet-dose du RFRP3 sur NPFF₁R.

De même, plusieurs temps d'incubation ont été testés pour l'IBMX. A des concentrations de 0,1 mM (Figure 18D) et 0,5 mM (Figure 18E), l'IBMX est ajouté soit :

- en même temps que la forskoline (15 min après le RFRP3),

- 15 min avant la forskoline (en même temps que le RFRP3),
- 25 min avant la forskoline (10 min avant le RFRP3).

Une réponse au RFRP3 de plus grande amplitude est observée lorsque l'IBMX est pré-incubé avant la forskoline, avec un effet maximal obtenu après 15min d'incubation pour 0,1 mM (Figure 18D) et après 25 min pour 0,5 mM d'IBMX (Figure 18E).

4. Discussion

Dans ce travail nous avons pu étudier le système GloSensor comme outil de mesure en cinétique de l'AMPc intracellulaire et confirmer que la sensibilité de cet outil permet de mesurer l'inhibition des AC par la protéine $G_{i/o}$ suite à l'activation de NPFF₁R par le RFRP3. Nous avons montré que l'inhibition des phosphodiésterases par l'IBMX augmente de manière dose-dépendant le signal AMPc basal et potentialise les réponses AMPc de la forskoline et de l'isoprotérénol. Alors que décrit comme inhibiteur compétitif des PDE (Beavo, 1995), nous avons pu observer que l'IBMX, à forte concentration (1 mM), ralentit la formation d'AMPc. Nous avons également pu montrer que la forskoline et l'IBMX utilisés conjointement diminuent la sensibilité de mesure de la réponse $G_{i/o}$ du NPFF₁R, ce qui n'est pas le cas s'ils sont utilisés séparément.

4.1. Saturation du signal AMPc mesuré

Dans les cellules HEK-Glo utilisées, la forskoline active la production d'AMPc avec une EC_{50} d'environ 5 μ M, en accord avec les valeurs de 5- 10 μ M décrites dans la littérature (DiRaddo et al., 2014; Seamon and Daly, 1981). L'inhibition des PDE par l'IBMX empêche la dégradation de l'AMPc, ce qui augmente le signal induit par la forskoline. Cette amplification du signal se traduit par un déplacement vers la gauche de la courbe effet-dose de la forskoline, sans modifier son amplitude de réponse. A la différence de la forskoline, la présence d'IBMX déplace vers la gauche la courbe effet-dose de l'isoprotérénol en augmentant son amplitude de réponse de manière dose-dépendante, jusqu'à un maximum d'amplification obtenu pour la concentration de 0,3 mM d'IBMX. L'IBMX est un inhibiteur des phosphodiésterases, et entre en compétition avec l'AMPc pour se lier sur le site actif de ces PDE, ce qui explique que l'IBMX augmente de manière dose dépendante l'amplitude de la réponse de l'isoprotérénol (Hill et al., 2010). L'absence d'effet sur l'amplitude de réponse de la forskoline peut s'expliquer par un « effet plafond », la forskoline sans IBMX ayant une amplitude de signal similaire à celle de l'isoprotérénol avec 0,3 mM d'IBMX. La stimulation par la forskoline de l'adénylate cyclase conduit à des niveaux d'AMPc intracellulaires si élevés que les concentrations d'IBMX

utilisées pourraient ne pas être suffisantes pour entrer en compétition avec l'AMPc sur le site actif des PDE. Il est également envisageable que ces niveaux d'AMPc activent des voies de dégradation qui ne sont pas inhibées par l'IBMX, bien qu'il n'y ait pas d'éléments qui aillent dans ce sens dans la littérature. Enfin, cet effet plafond pourrait également résulter de la saturation du système GloSensor de mesure de l'AMPc, cet outil étant décrit comme sensible à des concentrations d'AMPc comprises entre 10 nM et 1 μ M (Proméga).

4.2. Effet délétère de l'IBMX à 1 mM

L'IBMX potentialise les réponses AMPc de la forskoline et de l'isoprotérénol de manière dose-dépendante jusqu'à 0,3 mM d'IBMX. Les effets délétères observés à 1 mM, avec un ralentissement de la production d'AMPc ainsi qu'une moins bonne réponse de l'isoprotérénol, ne sont pas étayés dans la littérature, ce qui peut en partie s'expliquer par la découverte relativement récente (environ 10 ans) de ces systèmes dynamiques de mesure de la cinétique de l'AMPc (Hill et al., 2010). Bien que cette observation soit intéressante dans la mesure où l'IBMX est souvent utilisé à forte concentration (Multispan) pour évaluer l'activité de RCPG, il serait pertinent de reproduire cette étude avec d'autres types cellulaires, ou avec d'autres systèmes de détection de l'AMPc (Hill et al., 2010). Il a déjà été rapporté que dans les cellules SHSY-5Y, l'IBMX ne permet pas d'augmenter le signal AMPc alors que d'autres inhibiteurs de phosphodiésterases comme le rolipram, inhibiteur de la PDE4, sont actifs (Morgan et al., 1993). L'hypothèse avancée dans cette étude porte sur l'activité antagoniste de l'IBMX vis-à-vis des récepteurs à l'adénosine. En effet, l'IBMX possède une affinité pour les récepteurs à l'adénosine évaluée aux environs de 1 à 10 μ M (Nicholson et al., 1989) et pourrait bloquer l'action autocrine de l'adénosine (Morgan et al., 1993). De plus, dans la mesure où l'IBMX a une capacité à inhiber les PDE quantifiée par son IC_{50} aux environs de 2 à 50 μ M (Beavo, 1995; Weston et al., 1997), il ne semble pas justifié d'utiliser des concentrations d'IBMX aussi élevées que 1 mM.

4.3. Relation entre IBMX, forskoline et mesure de l'activation de NPF F_1 R par le RFRP3

La forskoline, utilisée pour activer les adénylate cyclases, permet de révéler l'activité inhibitrice de la protéine $G_{i/o}$ sur ces dernières. De fait, en augmentant la concentration de forskoline, les AC devraient être plus fortement stimulées et donc plus difficilement inhibées. Cela correspond à une diminution de la sensibilité de la mesure de l'activité $G_{i/o}$, comme observée pour des concentrations de forskoline allant de 0,5 μ M à 5 μ M dans la réponse de l'histamine sur son

récepteur mH₄R (Nordemann et al., 2013). Cependant, dans notre cas, pour des concentrations de 0,5 – 1 – 5 μ M de forskoline, la réponse de NPFF₁R au RFRP3 n'est pas modifiée (Figure 16A). Dans l'étude de Nordemann et collaborateurs, la puissance de la forskoline (EC_{50}) dans les cellules exprimant mH₄R est d'environ 1 μ M, les concentrations utilisées de forskoline sont donc supérieures ou égales à son EC_{50} , alors que dans notre situation, la forskoline a été utilisée à une concentration inférieure à son EC_{50} (qui est d'environ 5 μ M). Cette différence est une explication possible à l'absence d'effets modulateurs des différentes concentrations de forskoline testées sur la réponse de NPFF₁R au RFRP3. Cependant, comme le signal AMPc sature à partir de 10 μ M de forskoline, il n'a pas été possible d'utiliser des concentrations de forskoline supérieures à son EC_{50} .

Lorsque la dégradation de l'AMPc est inhibée par 0,1 mM d'IBMX, la forskoline utilisée à 0,3 μ M et 0,6 μ M diminue la sensibilité de détection de l'activité de NPFF₁R par RFRP3 (Figure 16C). Or l' EC_{50} de la forskoline passe de 5 μ M en absence d'IBMX à 0,25 μ M en présence d'une concentration de 0,1 mM d'IBMX. Dans ce cas de figure, les concentrations de 0,3 μ M et 0,6 μ M de forskoline sont donc supérieures ou égales à son EC_{50} , ce qui permet de retrouver une interaction des concentrations de forskoline sur la réponse $G_{i/o}$ en accord avec l'étude faite sur le récepteur mH₄R (Nordemann et al., 2013).

Cette analyse suggère que l'IBMX n'impacte pas directement la réponse de NPFF₁R au RFRP3 mais peut interférer sur cette mesure en potentialisant la production d'AMPc induite par la forskoline. Pour tester cette hypothèse nous avons réalisé une expérience complémentaire en ajustant la concentration de forskoline utilisée pour chaque concentration d'IBMX de sorte que la réponse de NPFF₁R au RFRP3 soit mesurée à des niveaux d'AMPc similaires quelque soit les conditions de forskoline et d'IBMX testées (Figure 19). Pour utiliser des concentrations équipotentes de forskoline, nous avons ajusté sa concentration à son EC_{50} mesurée pour chaque concentration d'IBMX (Figure 15A et Tableau 5), soit une concentration en forskoline de 4 – 1,5 – 0,7 – 0,25 – 0,15 – 0,12 μ M respectivement pour des concentrations en IBMX de 0 – 0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 et 1 mM. Dans ces conditions, les niveaux d'AMPc intracellulaires sont équivalents (Figure 19B), et le NPFF₁R présente une réponse au RFRP3 de même amplitude et avec une EC_{50} similaire quelque soit la concentration en IBMX (Figure 19A). Ce résultat montre que l'IBMX n'a pas d'effet direct sur la sensibilité de mesure de l'activité $G_{i/o}$ et que l'effet observé de l'IBMX sur l'activité $G_{i/o}$ (Figure 18E) est dépendant de la forskoline. La

perte de sensibilité provoquée par l'IBMX pour une concentration constante de forskoline (Figure 17E) correspond donc en fait à une potentialisation des effets délétères de la forskoline.

4.4. Conclusion

Cette étude a permis de comprendre la relation entre l'IBMX, la forskoline et la réponse G_i/o mesurée avec le système GloSensor. Pour l'étude des récepteurs couplés $G_{i/o}$ de la famille des peptides RF-amide qui suit, nous avons choisi des conditions de forskoline et d'IBMX nous permettant d'observer un signal AMPc robuste et reproductible mais suffisamment éloigné du niveau de saturation afin de pouvoir détecter une éventuelle stimulation des AC par la voie G_s . Nous avons choisi de travailler en présence de 0,1 mM d'IBMX et 0,4 μ M de forskoline, soit un peu plus que l' EC_{50} de la forskoline afin que l'amplitude de réponse soit légèrement sub-optimale (Figure 18A), ce qui devrait nous permettre de détecter une éventuelle augmentation de l'amplitude de réponse.

III. Caractérisation de récepteurs fluorescents exprimés seuls ou par paire

1. Introduction

Sur la base de données de la littérature et d'observations faites au laboratoire (développées en *I. Stratégie d'étude* de cette première partie) nous avons souhaité, au cours de cette thèse, évaluer si les récepteurs RF-amide étaient capables d'interagir de manière spécifique entre eux. Nous avons choisi de développer une approche qui soit applicable pour chacun des 5 récepteurs RF-amide et qui ouvre la possibilité de tester des interactions entre n'importe quelle combinaison de deux récepteurs RF-amide. Pour ce faire notre stratégie se base d'une part sur une technique de biologie moléculaire combinatoire qui permette de travailler en parallèle sur les 5 récepteurs RF-amide ; et d'autre part sur une co-expression de ces récepteurs par paire en cellules CHO par transfection transitoire ce qui offre une grande flexibilité et permet de tester un grand nombre de conditions et de combinaisons de récepteurs. L'objectif est de générer une collection de plasmides contenant des constructions codant pour les récepteurs RF-amide marqués d'une étiquette fluorescente.

Cette étiquette sera variable ce qui permettra de distinguer ces récepteurs lorsqu'ils seront exprimé par paire et d'évaluer un éventuel rapprochement physique par transfert d'énergie de fluorescence (FRET) entre étiquettes fluorescentes complémentaires. Les fluorophores protéiques CFP ($\lambda_{exc} = 434\text{nm} / \lambda_{émi} = 477\text{nm}$) et YFP (514/527) sont complémentaires et sont très souvent utilisés pour mesurer un rapprochement par FRET entre récepteurs (Alonso et al., 2013; Boyer and Slesinger, 2010; Overton and Blumer, 2000) mais ces deux fluorophores ont des propriétés spectrales relativement proches et sont sujets à un photoblanchiment en cas d'exposition prolongée à la lumière. Les fluorophores protéiques EGFP (488/509) et mCherry (587/610) sont également utilisés pour des études de rapprochement par FRET (Greife et al., 2016; Levitz et al., 2016; Peterson et al., 2017). Ce couple offre un signal FRET plus stable que le couple CFP / YFP (Tramier et al., 2006) avec des propriétés spectrales bien distinctes.

Les outils moléculaires développés vont permettre de tester potentiellement les 10 combinaisons de paire parmi les 5 récepteurs RF-amide, mais dans un premier temps le champ d'exploration est réduit aux combinaisons entre NPFF₁R ou NPFF₂R et GPR10, GPR54 ou

GPR103. En effet, des observations *in vivo* existent déjà concernant les duo NPFF₂R et GPR10 (Laurent et al., 2005), ainsi que NPFF₁R et GPR103 (observations non publiées du laboratoire). D'autre part, les interactions fonctionnelles entre récepteurs couplés à G_{i/o} (comme NPFF₁R et NPFF₂R) et récepteurs couplés à G_q (comme GPR10, GPR54 et GPR103) sont fréquemment décrites (Bellot et al., 2015; Philip et al., 2010b; Werry et al., 2002). Enfin, les récepteurs NPFF₁R et NPFF₂R partagent une faible sélectivité d'affinité envers les différents peptides RF-amide, à l'opposé des récepteurs GPR10, GPR54 et GPR103 qui sont très sélectifs de leurs ligands (Elhabazi et al., 2013).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les ADNc codants pour les récepteurs GPR10, GPR54, GPR103, NPFFR1, NPFFR2 et YFP-hDOR et pour les fluorophores EGFP, YFP, CFP et mCherry sont tous disponibles au laboratoire dans le vecteur pcDNA3. Les amorces de PCR et de séquençage sont achetées chez sigma, les cellules ultra-compétentes StellarTM chez Clontech Laboratories (Mountain View, USA).

Les agents de transfection Lipofectamine® LTX & PLUS™ Reagent et Lipofectamine® 2000 proviennent de Invitrogen (Cergy Pontoise, France), le TransIT®-2020 et le TransIT®-CHO de Mirus Bio LLC (Madison, USA), le DreamFect™ Gold de Oz Sciences (Marseille, France) et le Metafectene® Pro de Biontex Laboratories (Planegg, Allemagne).

Les lignées CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary cells) et HEK 293 (Human Embryonic kidney cells) sont disponibles au laboratoire. Des cellules HEK exprimant de manière stable le GloSensor™ cAMP (plasmide 20F; Promega Corporation, Madison, USA), dénommées HEK-Glo, nous ont été données par le Dr Julien Hanson (ULB, Liège, Belgique).

Les milieux DMEM/HamF12, MEM et DMEM (glucose 4,5g/L) et le mélange Trypsine 0,05% /EDTA 0.02% (w/v) sont de Gibco (Fischer Scientific, Illkirch, France).

La digitonine, le probenecid, la forskoline et l'IBMX sont achetées chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), l'Indo-1 AM chez Interchim (Montluçon, France), le Fluo-4 AM chez Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), l'isoprotérénol chez Tocris (Lille, France) et la D-luciférine chez Synchem OHG (Felsberg-Altenberg, Allemagne). Les peptides RFamide 26RFa et RFRP3 proviennent de Tebu Bio (Le Perray en Yvelines, France) et les peptides NPFF, Kp-10 et PrRP-20 de Polypeptide (Strasbourg, France).

2.2. Construction des récepteurs RF-amide fusionnés à des étiquettes

Les techniques de biologie moléculaire utilisées au cours de ce projet sont classiques (Sambrook et Russell, 2001) à l'exception de la technique de LIC-PCR dont le principe est décrit ci-dessous.

Le clonage LIC (Aslanidis and de Jong, 1990) se fait par l'appariement sur 13 paires de bases des extrémités simples brins du vecteur (fluorophore) avec l'insert (le récepteur), le plasmide obtenu est ensuite directement introduit dans des bactéries compétentes pour être amplifié. Les extrémités simples brins sont obtenues grâce à l'activité exonucléasique de la T₄ DNA polymérase en présence d'un nucléotide (dTTP pour le vecteur, dATP pour l'insert), ce nucléotide permettant de limiter la digestion par la polymérase aux 13 premières paires de bases.

Les clones recombinants sont analysés par digestion enzymatique des plasmides purifiés et par PCR de contrôle. Les clones positifs sont validés par séquençage (GATC Biotech AG, Mulhouse, France). Les plasmides sont enfin purifiés à l'aide du kit (NucleoBond[®] Xtra, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Hoerd, France) qui limite la teneur en endotoxine pour optimiser la transfection du plasmide.

2.3. Culture cellulaire

Les cellules CHO-K1, HEK 293 et HEK-Glo sont cultivées respectivement dans les milieux DMEM/HamF12, MEM et DMEM (4,5g/L glucose), en présence de 10% de sérum de veau foetal (5% pour les CHO), de glutamine (2 mM), de pénicilline (100U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL). Les cellules HEK-Glo sont maintenues sous pression de sélection (hygromycine 200 µg/mL). Les cellules sont incubées à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Les cellules transfectées et stabilisées avec un ou plusieurs plasmides codant pour des récepteurs RF-amide sont maintenues sous pressions de sélection de G418 (500 µg/mL) et/ou de zéocine (100 µg/mL).

Les cellules sont repiquées 2 fois par semaine lorsqu'elles atteignent 80-90% de confluence, après lavage du tapis cellulaire au PBS, les cellules sont décollées à l'aide de Trypsine/EDTA avant d'être ensemencées dans de nouvelles boîtes/puits à la dilution désirée.

2.4. Transfection transitoire

De manière générale, les cellules sont transfectées à 80% de confluence dans un milieu sans antibiotique (changé 2h avant la transfection). Divers agents de transfection ont été

sélectionnés et utilisés selon les indications du fabricant (Tableaux 7 et 8). A l'exception de la méthode de précipitation au phosphate de calcium, tous les autres modes de transfection font usage de lipides cationiques qui complexent l'ADN pour former des liposomes qui entrent dans la cellule par endocytose. Pour optimiser la transfection des cellules CHO, réputée difficile, diverses concentrations d'ADN et de réactifs ont été testées (Tableau 9).

Les essais de co-transfection sont réalisés à quantité d'ADN plasmidique constante : les vecteurs codant pour l'un ou l'autre récepteur RF-amide sont utilisés en ratio 1 :1. Les résultats de co-expression sont systématiquement comparés à ceux obtenus sur les mêmes cellules après co-transfection d'un récepteur seul et du vecteur pcDNA 3 vide.

24 heures après la transfection, les cellules ont en général atteint la confluence, ce qui nécessite leur division : après lavage au PBS, les cellules sont décollées à l'aide de Versène puis re-ensemencées après dilution au demi dans du milieu de culture complet.

2.5. Viabilité cellulaire et expression de récepteurs fluorescents

La toxicité des agents de transfection est estimée par observation au microscope optique 24h et 48h après la transfection. La viabilité cellulaire est appréciée par analyse en cytométrie en flux 48h après la transfection.

L'évaluation comparative des niveaux d'expression du récepteur témoin YFP-hDOR obtenus après transfection transitoire, à l'aide de différents agents de transfection, de cellules HEK et CHO, de même que l'analyse des propriétés de fluorescence des récepteurs fusionnés à la CFP, à l'YFP, à l'EGFP et à la mCherry ont été réalisées comme suit.

Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence : 48 h après la transfection en cas d'expression transitoire et 48 h après leur dernier passage pour les lignées stables, les cellules sont décollées au Versène, mises en suspension dans le tampon Hepes/BSA et comptées. La suspension cellulaire est centrifugée (1000 rpm, 5 min), le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un volume de tampon Hepes/BSA approprié pour normaliser la densité cellulaire entre les échantillons. Les cellules sont conservées à l'abri de la lumière jusqu'à la mesure de la fluorescence sur un spectrofluorimètre Fluorolog[®]-3 (Horiba, Longjumeau, France). Les spectres d'émission CFP, EGFP, YFP et mCherry sont collectés après excitation à 430 nm, 480 nm, 490nm, et 560 nm respectivement. Les spectres d'excitation sont obtenus en mesurant l'émission à 480 nm, 520 nm, 560 nm et à 630nm, respectivement.

La proportion de cellules transfectées vivantes, exprimant un ou plusieurs fluorophores, a été déterminée par cytométrie en flux comme suit.

Cytométrie en flux : 48 h après la transfection en cas d'expression transitoire et 48 h après leur dernier passage pour les lignées stables, les cellules sont décollées, mises en suspension homogène (tampon PBS) puis centrifugées (1000 rpm, 5 min). Le culot est repris dans un volume minimal de tampon PBS. La suspension cellulaire est filtrée avant analyse en cytométrie de flux (FACSCalibur™, LSRII ou AriaII, BD Biosciences, San José, USA). Les propriétés morphologiques (taille, FSC et granulométrie, SSC) et fluorescentes (CFP, GFP, YFP, mCherry) des cellules sont examinées sur des échantillons de 20.000 cellules.

2.6. Mesure de la réponse AMPc sur des cellules HEK-Glo

L'AMPc intracellulaire est mesuré dans des cellules HEK exprimant de manière stable le Glosensor-20F selon un protocole dont la mise au point a été décrite précédemment. La réponse AMPc est mesurée en présence de D-luciférine (1 mM) et les peptides testés sont incubés en présence de 0,1 mM d'IBMX pendant 15 min avant de stimuler la production d'AMPc par la forskoline (0,4 µM). Les niveaux de luminescence sont ensuite enregistrés pendant 70 – 90 min sur une FlexStation3 et analysé avec la moyenne de luminescence au plateau de la réponse au peptide. Les antagonistes sont pré-incubés 10 min de plus que les agonistes.

2.7. Mesure de la réponse calcique

L'enregistrement du calcium intracellulaire est effectué selon un protocole déjà décrit (Elhabazi et al., 2013). Les cellules CHO ou HEK transfectées ou non sont chargées avec 5 µM d'Indo-1 AM en présence, pour les CHO, de 2,5 mM de probénécide. L'augmentation de calcium intracellulaire provoquée par un agoniste est enregistrée en cinétique par intervalle de 4 s pendant 220 s à 37°C en mesurant la fluorescence à 405 et 475 nm (excitation à 338 nm) sur une FlexStation3. Après déduction du seuil basal moyen, l'amplitude de réponse à l'agoniste est rapporté à l'intensité du signal de fluorescence maximal (obtenu avec 20 µM de digitonine). Les antagonistes sont pré-incubés 15 min avant l'ajout de l'agoniste.

3. Résultats : étude dans un modèle d'expression transitoire

3.1. Construction de récepteurs RF-amide marqués par un fluorophore

Afin de pouvoir étudier la signalisation intracellulaire associée à différents couples de récepteurs RF-amide, nous avons dans un premier temps réalisé des constructions dans un

vecteur d'expression eucaryote supérieur (pcDNA3) permettant l'expression de ces récepteurs fusionnés à différents fluorophores. Ils ont été introduits au niveau de l'extrémité NH₂-terminale du récepteur pour ne pas interférer avec le couplage fonctionnel à la protéine G et faciliteront la détection des récepteurs et la mesure de leur taux d'expression. L'ensemble est précédé du peptide signal de 31 acides aminés de la sous-unité alpha-7 du récepteur nicotinique (Ilien et al., 2003) pour améliorer l'adressage à la membrane et l'expression de ces récepteurs (Figure 20). Pour pouvoir distinguer chaque récepteur en cas de co-expression, nous avons sélectionné 4 fluorophores présentant des propriétés spectrales différentes : EGFP (vert), mCherry (rouge), CFP (cyan) et YFP (jaune). Ce choix permettra d'envisager ultérieurement des études de type FRET (couple CFP/YFP ou EGFP/mCherry).

A l'aide de la technique de clonage LIC (voir méthodes), nous avons obtenu et validé par séquençage 12 constructions de récepteurs fluorescents dans pcDNA3 : NPFF₁R, GPR10, GPR54 et GPR103 couplés soit à l'EGFP, la CFP ou la YFP. Les différentes tentatives de clonage du récepteur NPFF₂R fluorescent (quelque soit le fluorophore considéré) ainsi que des différents récepteurs en fusion avec la mCherry n'ont pas abouti. Les séquençages de l'insert NPFF₂R et du vecteur mCherry ont permis de mettre en évidence des mutations dans leurs séquences LIC qui pourraient être à l'origine du problème.

3.2. Mise au point du modèle d'étude

Les deux hôtes cellulaires disponibles au laboratoire étaient les cellules CHO et HEK couramment utilisées pour étudier la signalisation associée à différents RCPG. Les cellules CHO ont une croissance très rapide et sont fortement adhérentes, ce qui les rend très adaptées au format 96 puits des tests fonctionnels. Cependant ces cellules sont très peu perméables, notamment aux complexes de transfection. Les cellules HEK sont moins adhérentes donc plus délicates à manipuler, mais elles sont beaucoup plus faciles à transférer. Dans la mesure où cette étude est menée en réalisant des transfusions transitoires, nous avons donc décidé d'évaluer différents agents de transfection pour chacun des deux types cellulaires afin d'affiner notre choix de celui qui sera utilisé pour les mesures de signalisation.

Dans un premier temps, nous avons testé sur les cellules HEK et les CHO différents agents de transfection du laboratoire (phosphate de calcium, Lipofectamine 2000) et des agents conçus pour les cellules difficiles à transférer (Lipofectamine LTX, TransIT-2020, TransIT-CHO, DreamFect Gold, Metafectene Pro) avec un plasmide de référence codant pour le récepteur delta aux opiacés fusionné à la YFP (YFP-hDOR). Nous avons évalué le niveau

d'expression du récepteur par la mesure de la fluorescence de la YFP au spectrofluorimètre sur des cellules en suspension 48 h après transfection, et la toxicité des agents de transfection a été estimée par observation au microscope optique 24 h et 48 h après la transfection. Comme on peut le voir sur la Figure 21A, des deux agents de transfection évalués pour les HEK (CaPO₄ et lipofectamine), la lipofectamine s'est avérée présenter une toxicité moyenne mais un niveau d'expression du YFP-hDOR nettement meilleur que pour le CaPO₄. Concernant les CHO, nous avons évalué 7 agents de transfection différents (Figure 21B). La Lipofectamine LTX s'est avérée présenter des niveaux de toxicité très élevés et n'a donc pas été retenu malgré un très bon niveau d'expression du YFP-hDOR (courbe rouge). Deux agents se sont révélés peu toxiques avec des niveaux d'expression moyens (le Metafectène Pro et le TransIT CHO). Les autres agents présentaient soit un niveau d'expression plus bas pour une toxicité équivalente, soit le même niveau d'expression pour une toxicité plus élevée.

Ces résultats ont été confirmés dans une seconde série d'expériences et nous avons finalement retenu la lipofectamine 2000 pour les HEK et le TransIT-CHO pour les CHO afin d'évaluer l'efficacité de co-transfection des constructions pour l'expression des récepteurs RF-amide fluorescents dans ces deux lignées par cytométrie en flux. La figure 22 présente les résultats d'une expérience type obtenus pour les cellules CHO et HEK transfectées avec les récepteurs YFP-NPFFR1 et CFP-GPR54.

La représentation en « density plot » de la SSC (granulométrie) en fonction de la FSC (taille) permet de définir une population de cellules vivantes et une autre de cellules mortes (Figure 22A). La population de cellules vivantes est représentée en fonction de la fluorescence de la CFP par rapport à celle de la YFP (Figures 22B et 22C). Cette représentation permet de définir des sous-populations de cellules exprimant la CFP seule, la YFP seule ou co-exprimant les deux fluorophores et de calculer le pourcentage dans la population de cellules de cellules exprimant le(s) récepteur(s) transfecté(s).

Comme le montre la Figure 22 (B et C panels de droite), le niveau de co-expression (cellules YFP et CFP positives) obtenus dans les cellules CHO est beaucoup plus faibles que dans les HEK puisque seuls 2% des cellules semblent co-exprimer les deux récepteurs NPFFR1 et GPR54 alors que dans les HEK 12% des cellules expriment ces deux récepteurs. Ce résultat a été confirmé par la suite avec d'autres constructions (Tableau 10). Afin d'améliorer le taux de transfection dans les HEK, nous avons tenté d'optimiser les conditions de transfection en faisant varier notamment la quantité d'ADN mis en jeu et le rapport ADN sur agent de

transfection mais ces essais n'ont pas permis d'améliorer significativement le pourcentage de cellules co-transfectées (résultats non montrés). Néanmoins, l'efficacité de transfection obtenue s'est avérée suffisante pour réaliser des mesures fonctionnelles.

Les propriétés spectrales d'excitation (λ_{exc}) et d'émission ($\lambda_{ém}$) des constructions « CFP » et « YFP » sont mesurées au spectrofluorimètre (Figure 23) :

- CFP : $\lambda_{exc} = 433 \text{ nm}$, $\lambda_{ém} = 477 \text{ nm}$
- YFP : $\lambda_{exc} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{ém} = 525 \text{ nm}$

et sont conformes avec les données de la littérature pour ces deux fluorophores (Müller-Taubenberger and Anderson, 2007).

3.3. Interaction fonctionnelle entre NPFF₁R et GPR10, GPR54 ou GPR103

Afin de tester l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre récepteurs aux peptides RF-amide, nous avons mesuré la réponse calcique des récepteurs CFP-GPR10, CFP-GPR54 et CFP-GPR103 co-exprimés avec YFP-NPFF₁R pour leur ligand endogène dans les cellules HEK. Les réponses étant de faible amplitude (< 20 % signal digitonine), nous avons décidé de restreindre le champ d'investigation à GPR103, dont les réponses calciques sont mieux définies et de plus grandes amplitudes (15-20 %) que GPR10 (< 10 %) ou GPR54 (10 %). Le ligand endogène 26RFa de GPR103 exprimé seul dans les cellules HEK induit une libération de calcium dépendant de la dose avec une EC₅₀ de 1,9 nM ± 1,0 nM, en accord avec le couplage G_q de ce récepteur, et la co-expression du récepteur NPFF₁R avec GPR103 ne semble pas modifier cette réponse, avec une EC₅₀ de 3,5 nM ± 0,3 nM (Figure 24A). De nombreux cas de signalisation croisée sont reportés dans la littérature en cas de co-activation de récepteurs couplés G_q et G_{i/o} (Rives et al., 2009; Werry et al., 2003). Dans notre cas, la co-activation de NPFF₁R avec un prétraitement de 1 µM de RFRP3 ne semble pas modifier de manière significative la réponse fonctionnelle du récepteur GPR103 (Figure 24B).

Pour compléter l'étude de la réponse calcique pour le 26RFa du récepteur GPR103 co-exprimé avec NPFF₁R, nous avons exposé les cellules co-transfectées avec différents antagonistes à de concentrations croissantes, avant de mesurer le signal calcique induit par le 26RFa à une concentration fixe correspondant à 80% de la réponse maximale, soit 30 nM (Figure 24A). La pré-incubation des cellules avec un antagoniste sélectif de GPR103 identifié et caractérisé au laboratoire, le RF1156, bloque la réponse calcique au 26RFa des cellules mono- et co-transfectées de manière concentration dépendante avec respectivement une IC₅₀

estimée à 1 μM et 0,8 μM (Figure 24C). Ce résultat montre que les effets du RF1156 sur la réponse calcique au 26RFa sont cohérents avec les propriétés d'antagonistes GPR103 de ce composé et ne mettent pas en évidence de rôle éventuel de NPFF₁R. Nous avons également testé un antagoniste des récepteurs NPFF₁₋₂R, le RF9, qui ne présente pas d'affinité pour GPR103 (Simonin et al., 2006). De manière surprenante, le RF9 inhibe la réponse calcique induite par le 26RFa avec une IC₅₀ de 6 μM , proche de l'IC₅₀ du RF1156 (1 μM) (Figure 24D). Malgré le fait que nous n'ayons pas observé de modifications importantes dans la réponse calcique aux agonistes des récepteurs GPR103 et NPFF₁R qu'ils soient exprimés seuls ou ensemble, ce résultat nous suggère qu'une interaction fonctionnelle est possible entre ces deux récepteurs.

L'activation de NPFF₁R par son ligand endogène induit une diminution du signal AMPc provoqué par la forskoline avec une EC₅₀ de 38 nM \pm 10 nM (Figure 25A). Dans les mêmes conditions, le RFRP3, sur une large gamme de concentration, n'induit pas de réponse AMPc sur le récepteur GPR103 (Figure 25B), conformément à son couplage préférentiel G_q. Par contre, lorsque les deux récepteurs NPFF₁R et GPR103 sont co-exprimés, le RFRP3 se révèle moins actifs avec une EC₅₀ de 480 nM \pm 300 nM (Figure 25C). Le décalage de la courbe effet-dose d'un facteur 10 vers la droite suggère l'existence d'une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs. La réponse AMPc du récepteur NPFF₁R au 26RFa semble être faiblement inhibitrice à faibles concentrations et devient stimulatrice à plus forte concentration d'agoniste (Figure 25D). Il est à noter que ce ligand s'est révélé peu efficace dans les essais précédents menés au laboratoire sur ce récepteur (Elhabazi et al., 2013). Ce phénomène biphasique est difficile à caractériser vu la faible amplitude des effets observés. Comme attendu, le 26RFa n'induit pas de réponse AMPc significative sur les récepteurs GPR103 exprimés seuls (Figure 25E). Dans les cellules co-exprimant les récepteurs NPFF₁R et GPR103, le 26RFa induit une réponse AMPc inhibitrice de type G_{i/o} mais semble être moins actif que sur les récepteurs NPFF₁R exprimés seuls.

3.4. Conclusion et discussion

Il faut tout d'abord noter que les réponses fonctionnelles présentées ont été obtenues dans des conditions qui ne sont pas optimales. En effet, le taux de transfection des récepteurs RF-amide est relativement faible, entre 5 et 15 % selon les récepteurs. Les cellules CHO, initialement choisies pour leur croissance rapide et leur bonne adhérence, ce qui les rend très adaptées au format 96 puits des tests fonctionnels, se sont révélées être très peu perméables aux complexes

de transfection. Malgré des essais de mise en point des ratios ADN : agents de transfection avec des agents conçus pour des cellules difficiles à transfecter (Lipofectamine LTX, TransIT-2020, TransIT-CHO, DreamFect Gold, Metafectene Pro), nous n'avons pas trouvé de conditions offrant un rapport efficacité de transfection / toxicité suffisamment grand pour travailler avec les CHO. Cette optimisation de transfection est rendue plus difficile pour deux raisons supplémentaires : d'une part nous devons co-transfecter 2 plasmides différents, et donc mettre deux fois moins d'ADN de chaque, et d'autre part les récepteurs RF-amide s'expriment en moyenne deux fois moins bien que le récepteur contrôle utilisé, le YFP-hDOR. La combinaison de ces éléments nous a conduit à choisir de travailler en HEK avec la lipofectamine 2000, qui offre une efficacité de transfection relativement bonne, et une faible toxicité, ces conditions nous permettent de travailler avec un taux d'expression compris entre 6 et 18 % selon les récepteurs (Table 4).

Ces conditions nous ont permis d'étudier les réponses fonctionnelles des récepteurs GPR103 et NPFF₁R seuls ou co-exprimés. Bien que la co-expression de NPFF₁R ne semble pas modifier le fonctionnement de GPR103, nous avons pu observer que le RF9, antagoniste sélectif de NPFF₁₋₂R, bloque l'effet du 26RFa, agoniste de GPR103. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence que la co-expression de ces deux récepteurs se traduit par l'observation d'une diminution de puissance de RFRP3 et 26RFa sur la réponse $G_{i/o}$ de NPFF₁R mesurée en AMPc. Mais afin d'étudier plus en détail les interactions entre ces deux récepteurs, nous avons décidé de créer des lignées stables exprimant les récepteurs individuels ou combinés. Cette stratégie vise à sélectionner avec un antibiotique uniquement les cellules qui expriment le plasmide transfecté contenant une cassette de résistance à l'antibiotique, ce qui nous permettra de s'affranchir des problèmes de niveaux d'expression liés à l'efficacité de transfection. Nous pourrions alors d'une part évaluer plus finement et de manière plus robuste le profil biphasique de réponse AMPc de NPFF₁R au 26RFa (Figure 25D) et les mécanismes de blocage par le RF9 de la réponse calcique au 26RFa. D'autre part, nous pourrions nous servir de la présence des fluorophores pour tester la possibilité d'interaction physique entre récepteurs par transfert d'énergie FRET (Prezeau et al., 2010).

4. Résultats : étude dans un modèle d'expression stable

4.1. Préparation des plasmides codant pour les récepteurs RF-amide

Pour obtenir une lignée cellulaire exprimant de manière stable une protéine d'intérêt il faut, après transfection d'un plasmide codant pour cette protéine, exposer les cellules à une dose toxique d'antibiotique. En effet, le plasmide codant pour la protéine d'intérêt contient également une séquence codante pour un gène de résistance à un antibiotique, ce qui permet aux cellules possédant cette séquence de survivre à cet antibiotique. Les cellules HEK-Glo expriment le système Glo-Sensor de détection de l'AMPc sous la pression de sélection de l'hygromycine. Pour co-exprimer de manière stable deux récepteurs RF-amide, il est nécessaire d'utiliser des vecteurs possédant d'autres cassettes de résistance. Nous avons choisi de travailler avec le vecteur pcDNA3.1neo possédant une cassette de résistance à la néomycine et le vecteur pcDNA3.1zéo possédant une cassette de résistance à la zéocine car ces vecteurs procurent des résistances distinctes de l'hygromycine et ces antibiotiques ont une bonne efficacité de sélection (Lanza et al., 2013). Nous avons conservé le schéma de construction décrit précédemment (Figure 20), en plaçant l'étiquette fluorescente en N-terminale, elle-même précédée d'un peptide signal. A l'aide de techniques de clonages classiques par enzyme de restriction nous avons pu obtenir et valider par séquençage les constructions suivantes dans pcDNA3.1neo : GPR10, GPR54, GPR103 couplés soit à l'EGFP, la CFP, la YFP, la mCherry ou l'étiquette myc en N-terminale. Nous avons également pu obtenir et valider dans le vecteur pcDNA3.1zéo les constructions suivantes : NPFF₁R, NPFF₂R couplés soit à l'EGFP, la CFP, la YFP, la mCherry ou l'étiquette flag en N-terminale. Ce choix permet d'envisager des études de FRET avec le couple CFP/YFP ou avec le couple EGFP/mCherry. Les étiquettes flag et myc sont beaucoup plus petites et moins volumineuses que les fluorophores cités, et serviront de contrôle pour évaluer la gêne stérique potentielle des fluorophores protéiques. Nous avons décidé d'utiliser dans premier temps le couple de fluorophores EGFP/mCherry car la EGFP présente une meilleure résistance au phénomène de photoblanchiment (photobleaching) comparé à la CFP, ce qui permet avec le tandem EGFP/mCherry de mesurer un signal de transfert d'énergie FRET plus robuste et plus reproductible qu'avec le couple CFP/YFP (Tramier et al., 2006).

4.2. Caractérisation de lignées stables exprimant GPR103, NPFF₁R ou NPFF₂R

Afin d'obtenir une lignée stable exprimant hGPR103, les cellules HEK-Glo sont transfectées avec le vecteur pcDNA3.1zéo contenant la construction **PS-mCherry-hGPR103** (Figure 20), et les cellules transfectées sont sélectionnées à l'aide de zéocine. Une lignée stable est obtenue

au bout de 7 semaines, avec un profil de fluorescence mCherry homogène, plus de 99 % des cellules sont fluorescentes (Figure 26A). L'activation de ce récepteur par son ligand endogène induit une réponse calcique (Figure 26B, Tableau 11) sans stimuler ni inhiber la production d'AMPc (Figure 26C), en cohérence avec le couplage G_q de ce récepteur décrit dans la littérature (Quillet et al., 2016). De plus, la fusion de la mCherry à l'extrémité N-terminale ne semble pas modifier la réponse de hGPR103 au 26RFa (Figure 26B, Tableau 11). Un antagoniste spécifique de hGPR103, le RF1156, a été développé au laboratoire. Cet antagoniste entre en compétition avec le 26RFa sur le site de liaison de hGPR103 et inhibe son activité. Cet antagonisme se traduit par un décalage vers la droite de la courbe dose-réponse du 26RFa en présence de concentrations croissantes de RF1156 avec un pA_2 de 7,15 soit environ 70 nM (Figure 26D).

De la même façon, des cellules HEK-Glo sont transfectées avec le vecteur pcDNA3.1néo contenant la construction **PS-EGFP-hNPFF₁R**, et les cellules sont ensuite traitées par de la généticine. Une fois la lignée stabilisée, son profil d'expression est étudié en analysant la fluorescence EGFP par cytométrie en flux (Figure 27A). Il apparaît qu'une partie des cellules n'est pas fluorescentes, seulement près de 70 % des cellules sont positives à la fluorescence EGFP. Ce contraste avec le profil d'expression de mCherry-hGPR103 peut s'expliquer par la plus grande capacité des cellules à développer une résistance à la néomycine qu'à la zéocine (Lanza et al., 2013). Les cellules fluorescentes sont triées et permettent d'obtenir une lignée homogène de cellules exprimant hNPFF₁R (Figure 27B). RFRP3 et, dans une moindre mesure, NPFF et Kp10 sont capables d'activer la voie $G_{i/o}$ de ce récepteur (Figure 27C), ce qui confirme la capacité de ce récepteur de lier d'autres peptides RF-amide que son agoniste endogène, le RFRP3 (Quillet et al., 2016). La fusion de l'EGFP en N-terminal du récepteur ne semble pas modifier sa réponse au RFRP3 et au NPFF (Figure 27D, Tableau 12). La construction EGFP-hNPFF₁R peut donc être utilisée pour explorer les mécanismes de signalisation de ce récepteur, et notamment tester l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle avec GPR103. Le récepteur hNPFF₁R est décrit comme étant préférentiellement couplé à $G_{i/o}$, ce que nous avons pu vérifier en mesurant la réponse calcique du RFRP3. L'activation de hNPFF₁R par le RFRP3 produit une réponse calcique de faible amplitude (Figure 27E), ce qui peut résulter d'un couplage G_q ou de la signalisation des sous-unités $\beta\gamma$ de $G_{i/o}$, ce qui est plus cohérent avec la faible amplitude de la réponse calcique (Jiang and Bajpayee, 2009). Un antagoniste sélectif de hNPFF₁R, le RF3286, a été développé au laboratoire et sera utilisé afin d'étudier la pharmacologie de ce récepteur dans un modèle de co-expression avec GPR103. RF3286 bloque de manière dose-

dépendante la diminution d'AMPC provoquée par RFRP3 et déplace vers la droite sa courbe effet-dose, avec un pA_2 de 7,8, soit environ 16 nM (Figure 27F).

Les lignées stables mCherry-hGPR103 et EGFP-hNPFF₁R sont validées et pourront servir de contrôle pour étudier d'éventuelles interactions fonctionnelles entre ces deux récepteurs. L'utilisation d'antagonistes spécifiques pour chacun de ces récepteurs permettra d'étudier leur pharmacologie dans des cellules co-exprimant ces deux récepteurs. La co-expression de hGPR103 et hNPFF₁R sera comparée avec celle de hGPR103 et hNPFF₂R afin d'évaluer la spécificité des interactions observées.

Une lignée stable exprimant **EGFP-hNPFF₂R** est obtenu par le même procédé que pour hNPFF₁R. Une fois la lignée stabilisée, le profil d'expression est mesuré par cytométrie en flux (Figure 28A), et montre que plus de 95 % des cellules sont fluorescentes. Cette lignée exprime de manière homogène EGFP-hNPFF₂R sans qu'un tri ne soit nécessaire. Le récepteur EGFP-hNPFF₂R est activé par NPFF, RFRP3, PrRP20, Kp10 et dans une moindre mesure par le 26Rfa (Figure 28B). Le récepteur hNPFF₂R marqué d'une Flag donne un profil de réponse similaire au NPFF et RFRP3 avec EC_{50} plus élevée de une amplitude de réponse moins grande (Figure 28C, Tableau 13). La différence d'amplitude de réponse peut être due à une expression partielle et hétérogène de Flag-hNPFF₂R au sein de la lignée (63 % de cellules positives au marquage anti-flag, données non montrées), mais cette expression hétérogène ne devrait en théorie pas modifier la valeur d' EC_{50} . L'activation du récepteur hNPFF₂R par NPFF produit une réponse calcique abolie par la PTX, une toxine qui bloque la protéine $G_{i/o}$ dans un état inactif (Figure 28D, Tableau 13). L'activation de la voie $G_{i/o}$ par hNPFF₂R suite à la liaison de son agoniste endogène NPFF est donc mesurable à la fois en AMPC et en calcium.

4.3. Obtention d'une lignée co-exprimant GPR103 avec NPFF₁R ou NPFF₂R

Le profil de fluorescence des cellules transfectées est mesuré par cytométrie en flux. Ces mesures ont été réalisées sur deux appareils différents, le Calibur (analyse) et l'Aria-II (analyse et tri) selon les nécessités et les disponibilités des appareils. Cela explique que certains résultats décrit ci-dessous (Figure 29B et C) peuvent sembler manquer de cohérence, le Calibur étant moins sensible pour détecter la fluorescence mCherry.

Pour obtenir une lignée de cellules exprimant à la fois les récepteurs hGPR103 et hNPFF₁R ou hGPR103 et hNPFF₂R, nous avons co-transfecté les plasmides correspondant puis stabilisé la lignée à l'aide de généticine et zéocine (Figure 29A et 30A). Malheureusement, cette approche

n'a pas permis d'obtenir de lignée co-exprimant les deux récepteurs : les cellules transfectées avec hGPR103 et hNPFF₁R ont rapidement perdu l'expression de hGPR103 et ce malgré un tri effectué 3 semaines après la transfection (Figure 29A). De même, les cellules transfectées avec les plasmides codant pour hGPR103 et hNPFF₂R ont rapidement perdu l'expression des deux récepteurs (Figure 30A). L'obtention d'une lignée stable exprimant hGPR103 ayant été particulièrement longue, nous avons décidé de transfecter successivement chaque plasmide, et d'attendre que l'expression d'un premier récepteur soit stabilisée avant d'y ajouter le second. La sélection et la stabilisation de cellules exprimant le récepteur hGPR103 étant plus longue que pour hNPFF₁R et hNPFF₂R, la transfection de ces deux récepteurs dans la lignée HEK-Glo-mCherry-hGPR103 s'est avérée être une stratégie plus rapide que la stabilisation de l'expression de hGPR103 dans les lignées hNPFF₁R et hNPFF₂R. Seuls les résultats de cette première stratégie seront décrits ici, bien que les deux stratégies aient montré des résultats positifs.

Pour optimiser au mieux la stabilisation de l'expression des récepteurs hNPFF₁R et hNPFF₂R dans la lignée exprimant hGPR103, nous avons décidé d'essayer de suspendre le traitement des cellules à la zéocine le temps de sélectionner les cellules avec la généticine, pour éviter d'être en présence de trois antibiotiques, en comptant l'hygromycine pour le GloSensor. Dans la mesure où les plasmides sont linéarisés avant la transfection, il y a, en théorie, intégration du plasmide dans le génome de la cellule. De cette manière, l'antibiotique sélectionne les cellules ayant intégré le plasmide dans leur génome, mais n'est pas nécessaire pour maintenir l'expression. De fait, la lignée mCherry-hGPR103 cultivée sans zéocine pendant plusieurs semaines reste à 99 % de cellules positives à la fluorescence mCherry (données non montrées). La transfection de la lignée mCherry-hGPR103 avec le plasmide codant pour EGFP-hNPFF₁R puis la sélection par la généticine en absence de zéocine permet d'obtenir après quelques semaines plus de 99% de cellules possédant les deux fluorescences, avec la présence visible de deux populations avec des niveaux de fluorescences différentes (Figure 29B). Ces cellules sont triées pour obtenir la lignée 1, qui correspond à la population avec un peu moins de fluorescence EGFP et mCherry, et la lignée 2 possédant un peu plus de fluorescence mCherry et plus de fluorescence GFP (Figure 29B). Lorsque la sélection par la généticine se fait en présence de zéocine, seulement 50 % des cellules présentent les deux fluorescences, que plusieurs tris successifs ne feront qu'améliorer partiellement (Figure 29C). La lignée 3 ainsi obtenue présente 70 % de cellules doubles fluorescentes et 30% de cellules avec de la mCherry mais sans EGFP (Figure 29C).

La transfection du plasmide codant pour EGFP- hNPFF₂R dans la lignée mCherry-hPGR103 puis la sélection par la généticine en absence de zéocine permet d'obtenir 33 % de cellules possédant les deux fluorescences, avec le reste des cellules (67 %) exprimant uniquement la mCherry (Figure 30B). Cette population de cellules double fluorescentes est triée pour obtenir la lignée A, positive à plus de 97 % avec un profil d'expression homogène des fluorescences (Figure 30B). Lorsque la zéocine est laissée pendant la sélection à la généticine, nous obtenons des cellules réparties en trois populations selon le niveau d'expression de la EGFP : une première population n'exprimant pas la EGFP (22 %), une deuxième population exprimant l'EGFP avec une intensité moyenne (47 %), et une troisième population avec un fort signal EGFP (31 %). Ces deux dernières populations sont triées ce qui permet d'obtenir des lignées homogènes à plus de 80 %. La lignée avec le plus de fluorescence EGFP correspond à la lignée B et sera évaluée en test fonctionnel, alors que la lignée d'intensité EGFP moyenne est mise de côté pour pouvoir, si besoin, l'utiliser en comparaison avec la lignée B.

Nous avons donc pu obtenir plusieurs lignées co-exprimant de manière stable et avec différents niveaux d'expression les récepteurs mCherry-hPGR103 et EGFP-hNPFF₁R (lignées 1 – 2 – 3) ou les récepteurs mCherry-hPGR103 et EGFP-hNPFF₂R (lignées A et B).

4.4. Réponses fonctionnelles des récepteurs GPR103, NPFF₁R et NPFF₂R co-exprimés

Pour regarder s'il existe des interactions fonctionnelles entre hGPR103 et hNPFF₁R ou hNPFF₂R, nous avons regardé si la réponse fonctionnelle de chaque récepteur était modifiée par la présence, la co-activation ou le blocage de l'autre récepteur. Nous avons donc mesuré la réponse AMPc des lignées A et B au NPFF et au 26Rfa, que nous avons comparé à la réponse AMPc des lignées 1, 2 et 3 au RFRP3 et au 26Rfa. La réponse AMPc de hNPFF₂R activé par le NPFF est similaire que ce récepteur soit exprimé seul (pEC_{50} (M) = $8,37 \pm 0,13$; n = 5 ; Figure 31A) ou en présence de hGPR103, tel que mesuré dans la lignée A (pEC_{50} (M) = $8,18 \pm 0,19$; n = 2 ; Figure 31A) et dans la lignée B (pEC_{50} (M) = $8,23 \pm 0,04$; n = 2 ; Figure 31A). A l'inverse, la réponse AMPc de hNPFF₁R activé par le RFRP3 en absence de hGPR103 (pEC_{50} (M) = $7,81 \pm 0,07$; n = 8 ; Figure 31B) est fortement diminuée en présence de hGPR103 (Figure 31B). La lignée 1 conserve la même amplitude de réponse mais avec une EC_{50} grandement décalée vers la droite (pEC_{50} (M) = $5,59 \pm 0,13$; n = 4 ; Figure 31B) tandis que les lignées 2 et 3 qui semblent exprimer plus de mCherry-hGPR103 (Figure 29B, C) ne répondent pas assez pour pouvoir déterminer un effet-dose (Figure 31B). Ce résultat suggère

que la présence de hGPR103 altère la capacité de hNPFF₁R à être activé par son ligand endogène RFRP3, phénomène qui n'est pas observé avec le récepteur hNPFF₂R.

Comme hGPR103 semble altérer le fonctionnement de hNPFF₁R, nous avons évalué la réponse de hGPR103 en présence de hNPFF₁R ou hNPFF₂R. Exprimé seul, ce récepteur ne provoque ni augmentation ni diminution de la production d'AMPc (Figure 26C). De même, le 26RFa ne semble pas provoquer de réponse AMPc lorsque hNPFF₁R est exprimé seul (Figure 27C). Cependant, lorsque hGPR103 est co-exprimé avec hNPFF₁R, nous observons une réponse au 26RFa en deux temps, avec une augmentation de la production d'AMPc pour des concentrations 1 et 10 nM de 26RFa, et une diminution de cet effet pour des concentrations supérieures à 10 nM (Figure 31D). Cette réponse biphasique est plus marquée avec la lignée 2 qu'avec la lignée 1, ce qui peut s'expliquer par un niveau de fluorescence EGFP et mCherry et donc de récepteurs GPR103 et NPFF₁R plus élevé pour la lignée 2 (Figure 29B). Cette réponse en deux temps suggère que l'un ou les deux récepteurs activent la protéine G_s à faible concentration, provoquant ainsi une augmentation de la production d'AMPc, et qu'à plus forte concentration il y a également couplage à la protéine G_{i/o}.

Pour tester cette hypothèse nous avons essayé de mesurer la réponse de la lignée 2 au 26RFa dans différentes conditions de forskoline et d'IBMX (Figure 31E). Il apparaît clairement que l'absence de forskoline et l'augmentation d'IBMX permet de mieux mettre en évidence les deux phases de la réponse au 26RFa avec une amplitude de réponse relative qui dépasse 300 % du niveau d'AMPc sans 26RFa (Figure 31E). Cette observation est également faite avec la lignée 1, mais avec une amplitude de signal plus faible (données non montrées). Nous avons utilisé ces conditions pour poursuivre l'étude de la réponse de la lignée 2 au 26RFa en utilisant des toxines afin de dissocier l'activité de chaque protéine G. La toxine pertussique ADP-ribosyle la sous-unité G α_i ce qui bloque l'échange de GDP pour le GTP et maintient cette protéine en conformation inactive (Aktories, 2011). La toxine cholérique possède une activité ribosylase et empêche la sous-unité G α_s d'hydrolyser le GTP en GDP, et est utilisée pour bloquer cette protéine (Aktories, 2011; Cassel and Pfeuffer, 1978). En présence d'IBMX 0,5 mM et avec un traitement à la PTX, Le 26RFa provoque une production d'AMPc de manière concentration dépendante jusqu'à 1 μ M (Figure 31F). La présence de PTX abolit la deuxième phase de la réponse au 26RFa et révèle une activité stimulatrice d'AMPc à forte concentration, qui n'est plus neutralisée par l'activation concomitante de la protéine G_{i/o}. L'utilisation de CTX

abolit la composante stimulatrice de la réponse 26RFa, ainsi que la deuxième phase (Figure 31F), ce qui confirme l'activation de G_s par le 26RFa.

Lorsque GPR103 et hNPFF₁R sont co-exprimés, on observe une diminution de sensibilité au RFRP3 et une augmentation de l'activité de 26RFa dans la modulation de l'AMPc intracellulaire. Pour étudier plus en détail le fonctionnement de hGPR103 en présence de hNPFF₁R, nous avons étudié l'activité de RFRP3 et 26RFa sur la réponse calcique. Le récepteur hGPR103 est couplé G_q et son activation par le 26RFa induit une réponse calcique de grande amplitude (Figure 26B, pEC50 (M) = $9,24 \pm 0,09$; n = 6). L'activation de hNPFF₁R par le RFRP3 provoque également une réponse calcique (pEC50 (M) = $8,46 \pm 0,04$; n = 3) mais pas le 26RFa (Figure 27E). La présence de hNPFF₁R ne modifie pas la réponse de hGPR103 au 26RFa (Figure 31G, pEC50 (M) = $8,62 \pm 0,12$; n = 2). Par contre, la réponse calcique au RFRP3 est absente dans cette lignée. Ce résultat est en accord avec l'absence de réponse AMPc au RFRP3 dans cette lignée (Figure 31B). Toujours dans cette lignée, la réponse calcique du 26RFa est bloquée par RF1156, un antagoniste sélectif de GPR103, et n'est pas bloquée par le RF3286, un antagoniste de hNPFF₁R (Figure 31H). De manière surprenante mais cohérente avec les observations faites en transfection transitoire (Figure 24D), le RF9 à 10 μ M bloque la réponse du 26RFa (Figure 31H). Ce résultat est en contradiction avec l'absence d'effet du RF3286, un antagoniste plus puissant et plus sélectif que le RF9. Comme le RF1156 et le RF3286, le RF9 est pré-incubé avant de mesurer la réponse calcique induite par le 26RFa. L'analyse du signal calcique lors de cette pré-incubation montre que le RF9 induit une réponse calcique qui est maximale à 10 μ M (Figure 31I), et qui n'est pas retrouvée dans les HEK-Glo n'exprimant pas hGPR103. Cette observation est en contradiction avec la caractérisation publiée du RF9 qui montre une absence d'affinité pour ce récepteur (Simonin et al., 2006). Or comme les études d'affinité de liaison au laboratoire sont réalisées en cellules CHO, nous avons testé le RF9 sur des CHO-hGPR103. En accord avec les tests d'affinité de liaison, le RF9 ne provoque pas de réponse calcique dans les CHO-GPR103 (données non montrées). Ce résultat suggère donc que le RF9 aurait un effet agoniste sur le récepteur GPR103 à forte concentration qui est visible dans les cellules HEK et non les CHO.

En résumé, l'étude de l'activité des récepteurs GPR103 et hNPFF₁R lorsqu'ils sont co-exprimés dans des HEK-Glo montre une diminution de l'effet du RFRP3 au profil du 26RFa qui semble capable d'activer à la fois les protéines G_q , G_s et $G_{i/o}$. Pour essayer de comprendre les mécanismes qui pourraient expliquer cette singularité, nous avons évalué la possibilité d'un

rapprochement physique entre ces deux récepteurs grâce à la présence de fluorophores complémentaires en N-terminal de chaque récepteur.

4.5. Rapprochement physique entre mCherry-GPR103 et EGFP-NPFF₁R ou EGFP-NPFF₂R

Pour évaluer la possibilité de rapprochement physique entre les récepteurs hGPR103 et hNPFF₁R nous avons utilisé la complémentarité des fluorophores EGFP et mCherry qui nous permet d'étudier leur proximité par transfert d'énergie non radiative (FRET) de l'EGFP vers la mCherry (Albertazzi et al., 2009). Préalablement à l'étude de rapprochement physique des récepteurs hGPR103 et hNPFF₁R ou hNPFF₂R, nous avons recherché la possibilité d'une colocalisation de la fluorescence EGFP et mCherry (Figure 32) dans les cellules co-exprimant les deux récepteurs. Les récepteurs hNPFF₁R et hNPFF₂R, lorsqu'ils sont exprimés seuls, sont exprimés majoritairement à la membrane, avec une présence au niveau de vésicules intracellulaires (Figures 32A et 32B). De manière surprenante, le récepteur mCherry-hGPR103 est principalement localisé dans des vésicules intracellulaires, et semble absente de la membrane plasmique comparée aux récepteurs hNPFF₁₋₂R (Figure 32C). De plus, comparé à l'EGFP le signal mCherry semble de plus forte intensité. En effet, malgré une brillance plus faible d'environ 50 % (Day and Davidson, 2009), la mCherry donne un signal qui sature pour un réglage du laser à une intensité à 10 % de sa capacité maximale, tandis que l'EGFP est mesurée avec un laser à une intensité réglée à 25 % de sa capacité maximale. Bien que cette mesure de fluorescence ne soit pas quantitative, elle suggère que le niveau d'expression de la mCherry est plus élevé que celui de l'EGFP.

De même, dans les lignées exprimant les récepteurs par paire (lignées 1, 2 et A) la fluorescence EGFP est majoritairement localisée à la membrane tandis que la fluorescence mCherry est présente sous forme de ponctuations dans le cytoplasme (Figure 32D-F). Nous observons une absence de colocalisation des deux fluorescences à la membrane, et une colocalisation (en jaune dans les images combinées, Figure 31) au niveau de certaines vésicules intracellulaires. Cependant, les images des lignées 2 et A montrent la présence de fluorescence mCherry de faible intensité au niveau membranaire (Figure 31), il n'est donc pas exclu que la forte présence de cette fluorescence dans des vésicules intracellulaires masque sa présence au niveau membranaire en saturant le signal.

L'étude de transfert d'énergie de l'EGFP à la mCherry peut être mesurée par diminution du temps de vie de la fluorescence EGFP (Tramier et al., 2006). Des spectres d'émission et d'excitation de chaque fluorophore sont réalisés pour confirmer que leur fusion en N-terminal d'un récepteur membranaire ne modifie pas leurs propriétés spectrales (Figure 33A). L'EGFP (488/509) et la mCherry (587/608) conservent leurs caractéristiques d'émission et d'excitation de fluorescence qui leurs sont spécifiques (Müller-Taubenberger and Anderson, 2007). Le temps de vie de l'EGFP fusionnée à hNPFF₁R (Figure 33B, moyenne de demi-vie $t_{1/2} = 2,49 \pm 0,03$ ns ; n = 8) est similaire à celui de la GFP soluble (Figure 33B, $t_{1/2} = 2,54 \pm 0,01$ ns ; n = 8) et la co-expression de mCherry-hGPR103 ne modifie pas la durée de vie de la fluorescence de l'EGFP localisée au niveau de la membrane (Figure 33B, $t_{1/2} = 2,45 \pm 0,03$ ns ; n = 4). L'absence de signal FRET peut être due à une absence de proximité entre les deux fluorophores mais peut également résulter d'une mauvaise orientation des fluorophores, ce résultat n'exclut donc pas la possibilité de rapprochement physique.

4.6. Biais de localisation de mCherry-GPR103

L'étude de la localisation cellulaire des récepteurs mCherry-hGPR103 par microscopie confocale a mis en avant un profil d'expression singulier au niveau de vésicules intracellulaires. Cette différence de localisation avec hNPFF₁R peut s'expliquer par trois hypothèses différentes :

- 1) *le récepteur GPR103 est un récepteur physiologiquement exprimé dans des vésicules :* notre observation diffère d'une étude précédente d'hétérodimérisation de GPR103 avec le récepteur à l'orexine, et qui montre que GPR103-CFP (fusion C-terminale) n'est pas localisé en vésicules intracellulaires (Davies et al., 2015).
- 2) *la fusion de la mCherry modifie le profil d'expression du récepteur GPR103 :* Il n'existe pas d'autres descriptions de récepteur membranaire marqué en N-terminal par la mCherry, mais la fusion de ce fluorophore à la protéine G_i ne l'empêche pas d'avoir un profil d'expression membranaire (Shivnaraine et al., 2016), ce qui suggère que la mCherry n'amène pas de biais de localisation. Cependant, lorsque la mCherry est fusionnée en N-terminal du récepteur MOR dans des souris génétiquement modifiées (knocked-in), un profil d'expression similaire aux cellules HEK-Glo-mCherry-hGPR103 est observable (Erbs et al., 2015).
- 3) *la sélection et stabilisation à la zéocine ont modifié le profil d'expression protéique des cellules :*

En effet la sélection et stabilisation de la lignée exprimant mCherry-hGPR103 ont été particulièrement longues, et ce bien que la concentration en zéocine ait été choisie après détermination de la dose toxique la plus faible (n = 2 en duplicat).

Pour départager ces différentes hypothèses, nous avons dupliqué par clonage nos constructions du plasmide pcDNA3.1zéo dans le plasmide pcDNA3.1néo et vice-versa, afin générer les lignées cellulaires stables suivantes pour hNPF₁R :

- 4) mCherry-hNPF₁R en HEK-Glo sous la sélection de la zéocine,
- 5) mCherry-hNPF₁R en HEK-Glo sous la sélection de la néomycine,
- 6) EGFP-hNPF₁R en HEK-Glo sous la sélection de la zéocine,
- 7) EGFP-hNPF₁R en HEK-Glo sous la sélection de la néomycine.

Un travail similaire a été fait avec les récepteurs GPR103 et NPF₂R, et l'étude de la fluorescence par microscopie a permis d'exclure des hypothèses 1 et 3 et de confirmer l'hypothèse 2 : lorsque la mCherry est fusionnée en N-terminale des récepteurs hGPR103, hNPF₁R ou hNPF₂R nous avons observé une fluorescence en punctuations dans le cytoplasme (données non montrées). De plus, mCherry-hNPF₂R montre une réponse AMPc au NPF de plus grande amplitude et d'EC₅₀ plus basse, ce qui peut laisser penser que le niveau d'expression est plus élevé, un phénomène similaire est observé avec hNPF₁R (données non montrées). Le nombre de sites de liaison à la membrane n'a pas été quantifié faute d'outils adéquats, mais aurait permis d'étayer cette hypothèse.

La présence de mCherry dans des vésicules intracellulaires est retrouvée avec le MOR-mCherry (fusion C-ter) dans les souris KI-MOR-mCherry (Erbs et al., 2015) mais pas avec le récepteur β_2 AR-mCherry (Bubnell et al., 2013), ni la fusion de la mCherry à l' α -tubuline (Shaner et al., 2004) ou à la protéine G_i (Shivnaraine et al., 2016). Il a été proposé que la cytotoxicité de certains fluorophores était due à leur capacité à s'agréger, mais ce n'est pas le cas de la mCherry, qui ne forme pas d'oligomères (Han et al., 2014). La protéine membranaire Orai1 fusionnée avec la mCherry est présente à la membrane et également de manière artefactuelle dans des vésicules intracellulaires et localise en partie avec un marqueur lysosomal (Han et al., 2014).

En effet, dans cette étude la mCherry est décrite comme formant des agrégats en fonction de la protéine à laquelle elle est fusionnée (Han et al., 2014). Ainsi, le marquage de la protéine membranaire Orai1 avec la mCherry conduit à la visualisation de fluorescence intracellulaire,

et notamment dans les lysosomes (Han et al., 2014). Cette présence de mCherry-Orail correspond à la dégradation physiologique des protéines de la cellule pour permettre leur renouvellement. Contrairement à la mCherry, de nombreux fluorophores, dont l'EGFP, sont sensibles au pH et perdent leurs propriétés fluorescentes quand ils arrivent dans les lysosomes (Kneen et al., 1998). La visualisation de la mCherry en intracellulaire peut être vu non pas comme un biais amené par ce fluorophore mais comme l'absence d'extinction de sa fluorescence dans un environnement acide.

Cette explication ne permet cependant pas de comprendre l'apparente différence (qui reste à confirmer) de niveau d'expression des récepteurs hGPR103, hNPFF1R ou hNPFF2R selon qu'ils soient fusionnés à l'EGFP ou à la mCherry. Lors de la sélection des cellules transfectées, il est intéressant de noter que seules les cellules avec un fort niveau d'expression de mCherry-récepteur ont survécu, et que ces cellules présentent une bonne réponse calcique bien que le récepteur ne soit pas clairement visualisé à la membrane. Ces deux observations pourraient s'expliquer par un défaut de dégradation de la mCherry ce qui entrainerait son accumulation dans les lysosomes sans pour autant qu'elle perde sa fluorescence. Cette concentration de mCherry dans des vésicules intracellulaires cacherait sa localisation membranaire. En effet, les paramètres de sensibilité du microscope confocal se règlent sur le pixel le plus intense de l'image qui, s'il est très intense, fait paraître les autres éléments de l'image d'autant moins fluorescents.

4.7. Utilisation de CFP et YFP pour étudier les interactions entre GPR103 et NPFF₁R

La mise en évidence d'un biais d'expression des récepteurs RF-amide fusionnés à la mCherry rend ce fluorophore incompatible avec l'étude des interactions fonctionnelles entre ces récepteurs et remet en questions les observations faites avec l'utilisation de cette étiquette fluorescente, notamment la modulation de la production d'AMPc par le 26Rfa lorsque hNPFF₁R et hGPR103 sont co-exprimés (Figure 31). Cependant, la diminution de réponse fonctionnelle de EGFP-hNPFF₁R en présence de mCherry-hGPR103 n'est pas retrouvée avec le récepteur EGFP-hNPFF₂R et mCherry-hGPR103, ce qui laisse suggérer une interaction entre hGPR103 et hNPFF₁R indépendante du biais provoqué par la mCherry.

Pour ces raisons, nous avons décidé de générer de nouvelles lignées stables pour étudier l'interaction fonctionnelle entre hNPFF₁R et hGPR103 en utilisant les étiquettes fluorescentes CFP et YFP. Nous avons pu générer une lignée stable de HEK-Glo exprimant YFP-hNPFF₁R

sous la pression de sélection de la zéocine et une lignée exprimant CFP-hGPR103 sous la pression de sélection de la généticine. Après tri par cytométrie en flux, nous avons obtenu des lignées relativement homogènes avec plus de 80 % de cellules positives en fluorescence YFP ou CFP (Figure 34A). La lignée exprimant YFP-hNPFF1R a ensuite été transfectée et stabilisée pour co-exprimer CFP-hGPR103. Une fois triées, plus de 80 % des cellules sont positives à la fois à la fluorescence YFP et CFP (Figure 34A). La réponse fonctionnelle de hGPR103 et hNPFF₁R est ensuite évaluée dans ces trois lignées. Le RFRP3, agoniste endogène de hNPFF₁R, induit une diminution de la production d'AMPC de manière dose-dépendante en accord avec le couplage G_{i/o} de ce récepteur, et la co-expression de hGPR103 ne semble pas modifier la réponse AMPC de hNPFF₁R au RFRP3 (Figure 34B). Le 26RFa provoque une réponse calcique de manière dose-dépendante en accord avec le couplage G_q de son récepteur hGPR103 (Figure 34C). La réponse calcique du 26RFa dans la lignée co-exprimant les deux récepteurs est d'EC₅₀ semblable mais semble d'amplitude inférieure à la réponse mesurée en présence de hGPR103 seul (Figure 34C), ce qui n'est pas le cas lorsque hGPR103 est fusionné à la mCherry et pourrait résulter d'une plus grande proportion de cellules n'exprimant pas CF-hGPR103 dans la lignée co-exprimant les deux récepteurs (Figure 34A).

Cette courte étude des récepteurs CFP-hGPR103 et YFP-hNPFF₁R n'a pas permis de retrouver les observations faites en transfection transitoire ni avec les récepteurs fusionnés à l'EGFP et la mCherry en lignée stable.

5. Discussion – conclusion

Devant les problèmes de localisation cellulaire rencontrés avec les récepteurs fusionnés avec la mCherry et l'incohérence des résultats trouvés avec cette nouvelle lignée CFP-hGPR103 / YFP-hNPFF₁R par rapport aux lignées mCherry-hGPR103 / EGFP-hNPFF₁R, nous avons décidé de ne pas poursuivre cette étude.

5.1. La biologie moléculaire

Les travaux de biologie moléculaire ont permis de générer une banque de plasmides codant pour chaque récepteur RF-amide avec une étiquette CFP, YFP, EGFP, mCherry ou Flag fusionnée en N-terminale. La séquence codante pour le récepteur NPFF₂R a été visiblement mal tolérée par le type de bactérie utilisée lors de ces clonages (*E.coli* « *Stellar* »), avec un fort taux de mutation et de réarrangement de cette séquence. De plus, les clones contenant le plasmide avec cette séquence intacte montrent une vitesse de pousse réduite, et la purification

du plasmide après amplification montre des rendements inférieurs de 10 à 100 fois comparés aux autres récepteurs.

Le passage d'un clonage par technique LIC (sans ligation) à un clonage classique par enzyme de restriction a permis de réduire un peu les phénomènes de recombinaisons de la séquence codante pour NPPF₂R. Cette solution, bien que moins élaborée, conserve une plus grande flexibilité. Grâce à l'amélioration des vitesses de digestion et de ligation ce type de clonage devient aussi, voire plus rapide qu'un clonage LIC.

Dans le but d'améliorer les rendements de production de plasmides et de trouver une souche bactérienne qui tolère mieux cette séquence, un criblage de différentes bactéries aurait pu être réalisé. Ce criblage n'a pas été réalisé dans la mesure où nous avons principalement travaillé en pharmacologie avec des lignées stables, nous n'avons pas eu besoin de grandes quantités de plasmides.

5.2. Expression et co-expression des récepteurs RF-amide

Pour étudier la pharmacologie *in vitro* des récepteurs RF-amide et la possibilité d'interactions fonctionnelles, nous avons choisi de travailler en cellules de mammifère en expression transitoire. Un travail de mise au point des conditions de transfection n'a pas donné de résultats satisfaisants en cellules CHO avec moins de 5% de cellules co-transfectées, mais a permis d'identifier avec les cellules HEK des conditions permettant d'obtenir environ 10% de cellules co-transfectées avec 2 récepteurs RF-amide. Ce niveau de transfection est tout juste suffisant pour observer une réponse fonctionnelle de ces récepteurs mais nous avons jugé que ces conditions n'étaient pas suffisantes pour une étude détaillée de la pharmacologie de ces récepteurs. Pour cette raison, nous avons généré des lignées stables exprimant seuls ou par paires les récepteurs RF-amide, en se concentrant sur l'interaction entre GPR103 et NPPF₁R.

5.3. Interactions entre GPR103 et NPPF₁R

L'étude des réponses AMPc et calcique des récepteurs mCherry-GPR103 et EGFP-NPPF₁R a permis d'identifier un comportement de ces récepteurs différent selon qu'ils soient exprimés seuls ou ensemble. Le peptide 26RFa, qui a une forte affinité pour GPR103 et une faible affinité pour NPPF₁R (Quillet et al., 2016), provoque une réponse AMPc biphasique en cas de co-expression de deux récepteurs, avec une composante G_s avec laquelle vient entrer en compétition une composante G_{i/o}. Avec la réponse calcique de GPR103, le 26RFa induit donc à la fois l'activation des protéines G_s, G_{i/o} et G_q lorsque les récepteurs GPR103 et NPPF₁R sont

co-exprimés. Il est possible que l'hétérodimérisation de deux récepteurs leur permettent d'induire une nouvelle signalisation : par exemple l'activation simultanée des récepteurs à la dopamine D1R (G_s) et D2R ($G_{i/o}$) permet le recrutement de G_q et une réponse calcique (Lee et al., 2004; Rashid et al., 2007), et l'activation simultanée des récepteurs $\alpha_{2C}AR$ ($G_{i/o}$) et AT1R (G_q) exprimés dans la même cellule permet une signalisation par la voie $G_s - AMPc - PKA$ (Bellot et al., 2015). Il serait donc possible que le 26RFa se lie conjointement aux récepteurs GPR103 et NPFF₁R pour une nouvelle signalisation par la protéine G_s . Il serait intéressant de mesurer d'autres intermédiaires cette cascade de signalisation comme la protéine G elle-même ou des protéines kinases pour mieux comprendre pourquoi et comment les protéines $G_{i/o}$ et G_s sont activées simultanément, et de bloquer sélectivement chaque récepteur à l'aide d'antagonistes, de manière similaire à l'expérience réalisée en réponse calcique (Figure 30H).

En présence de GPR103, la réponse de NPFF₁R au RFRP3 est fortement diminuée, voire abolie. Ce phénomène est retrouvé dans plusieurs lignées stables et n'est pas observé avec NPFF₂R et GPR103, ce qui suggère que cette perte de réponse de NPFF₁R n'est pas artefactuelle. En cas de co-expression GPR103 et NPFF₁R, le RFRP3 ne semble pas modifier la production d'AMPc ni le calcium intracellulaire ce qui suggère que les protéines G_s et G_q ne sont pas activées. Il serait donc intéressant de comparer l'affinité de RFRP3 pour NPFF₁R en présence de GPR103 pour vérifier si l'affinité de NPFF₁R est modifiée par GPR103. En effet il est possible que l'interaction entre deux récepteurs conduisent à une diminution, voire une perte d'affinité de l'un des deux récepteurs pour son ligand (Birdsall, 2010) : ainsi la présence de GPR50 suffit à inhiber la liaison de la mélatonine à son récepteur MT₁R lorsque ces deux récepteurs sont co-exprimés dans les mêmes cellules (Levoye et al., 2006).

De manière surprenante, cette perte de sensibilité au RFRP3 n'est pas reproduite quand les récepteurs sont marqués avec les étiquettes CFP et YFP. Le biais induit par la mCherry en N-terminal de GPR103 ne suffit pas à expliquer cette différence, dans la mesure où la présence de mCherry-hGPR103 ne modifie pas le fonctionnement de EGFP-hNPFF₂R. Il est possible que les niveaux d'expression soient différents entre les lignées EGFP/mCherry et CFP/YFP, mais il n'est pas possible de comparer directement les mesures de fluorescence faites par cytométrie en flux entre fluorophores différents. Par contre, il serait possible de mesurer et de comparer les niveaux d'expression entre mCherry-hGPR103 / EGFP-hNPFF₁R et CFP-hGPR103 / YFP-hNPFF₁R en utilisant des billes de calibration de fluorescence. Ces billes possèdent un nombre connu d'un fluorophore donné à leur surface et permettent d'établir une relation entre un niveau

de fluorescence mesuré sur un appareil donné avec un nombre de fluorophore. En analysant par cytométrie en flux la fluorescence des cellules et en la comparant aux billes de calibration, il est donc possible de convertir la fluorescence des cellules en une unité de nombre d'équivalent de fluorophores (MESF, Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome) (Gerena-López et al., 2004).

La localisation atypique du récepteur mCherry-hGPR103 ainsi que l'absence de cohérence des résultats obtenus avec les récepteurs CFP-hGPR103 et mCherry-hGPR103 nous ont amené à arrêter le développement de ce projet.

Seconde partie

Identification et caractérisation d'un composé
agoniste opioïde et antagoniste des récepteurs
NPPF₁₋₂R dans le traitement de la douleur

I. Objectifs de l'étude et résumé

1. Contexte

La douleur est un problème de santé publique majeur qui réduit considérablement la qualité de vie, et sa prise en charge représente un coût élevé dans les pays développés (Florence et al., 2016). Aux Etats Unis, l'explosion d'un usage abusif des opiacés, qualifié d' « épidémie » a été corrélée avec une forte comorbidité et une augmentation du coût de la prise en charge. Jusqu'à présent, les efforts de la recherche, universitaire et pharmaceutique, n'ont pas permis la découverte de nouvelles molécules antalgiques apportant une sécurité d'emploi sur un usage répété à long terme. La faiblesse/danger des opiacés vient des adaptations que l'organisme développe face à l'administration répétée de ces molécules. Le développement de la tolérance à leurs effets analgésiques et une hypersensibilité à la douleur (hyperalgésie) demandent une réévaluation constante de leur posologie ; et l'augmentation progressive des doses administrées conduit à une dégradation de la qualité de vie du aux nombreux effets indésirables de ces composés. Ils sont fortement addictifs, et donc susceptibles à la surconsommation ; or les opiacés peuvent provoquer des dépressions respiratoires graves, et des troubles digestifs (constipation) pouvant nécessiter l'arrêt du traitement au risque de provoquer un syndrome de sevrage. Alors que les opiacés sont incontournables dans la gestion de la douleur aigue, notamment péri-opératoire, la balance bénéfico-risque est beaucoup plus resserrée en cas de traitement chronique (Chou et al., 2015; Rudd et al., 2016). Face à l'explosion de la consommation d'opiacés par la population américaine, la nécessité de composés moins dangereux au long terme devient urgente (Grosser et al., 2017; Olsen, 2016).

La capacité adaptative de l'organisme face à l'exposition répétée d'opiacés peut être expliquée par le recrutement de systèmes anti-opioïdes endogènes qui découle de cette sur-stimulation du système opioïde endogène (Ayachi and Simonin, 2014; Simonnet and Rivat, 2003). L'activation de ces systèmes anti-opioïdes conduirait au développement d'une hyperalgésie, qui en s'opposant à l'effet analgésique des opiacés, expliquerait la tolérance à l'analgésie.

Plusieurs systèmes ont été décrit comme possédant une composante anti-opioïde, parmi eux le neuropeptide FF (NPFF), capable de se fixer à deux récepteurs couplés aux protéines G_i : NPFF₁R et NPFF₂R. Dans des travaux précédents effectués par notre équipe, a été caractérisé

le premier antagoniste sélectif des récepteurs NPPF, capable de lier les deux sous-types de récepteurs au NPPF, NPPF₁R et NPPF₂R (Simonin et al., 2006). Lorsque cet antagoniste (RF9) est co-administré avec de la morphine, il bloque le développement de la tolérance analgésique à la morphine et empêche d'apparition de l'hyperalgésie. De plus, ce composé diminue l'intensité du syndrome de sevrage, précipité par la naloxone, consécutif à l'administration chronique de morphine (Elhabazi et al., 2012). Ces résultats montrent que le NPPF est un système anti-opioïde qui joue un rôle dans l'établissement d'une tolérance aux opiacés et de l'hyperalgésie induite par les opioïdes. Ces deux mécanismes étant responsables de la perte d'efficacité des opiacés en chronique, les récepteurs du NPPF apparaissent clairement comme une cible thérapeutique pertinente.

2. Objectifs

L'objectif principal de ce projet est de combiner au sein d'une seule molécule les propriétés analgésiques des opiacés et les propriétés d'antagonisme au NPPF afin de proposer une molécule analgésique tout en bloquant le développement de la tolérance analgésique et de l'hyperalgésie en cas d'administration répétée. Le concept de réunir deux activités pharmacologiques dans une seule molécule, appelée molécule à dualité d'action, connaît un intérêt grandissant, notamment dans le domaine de la douleur, avec la combinaison d'une activité opioïde et d'une activité non opioïde (Talevi, 2015; Turnaturi et al., 2016). Cette stratégie offre une pharmacocinétique et une toxicité unique pour les deux actions biologiques, diminue le risque d'interactions médicamenteuses et améliore la bonne observance du traitement. Le développement et l'usage d'une telle molécule en sont facilités. La difficulté de cette approche réside dans la synthèse de composés à dualité d'action et dans l'identification de ses différentes propriétés pharmacologiques.

3. Résumé

Afin de mener à bien ce projet nous avons pu compter sur l'expertise de deux équipes de chimistes : l'équipe de F.Bihel (Illkirch, France) possédant l'expertise sur la partie antagoniste au NPPF, et l'équipe de S.Ballet (Bruxelles, Belgique) apportant la maîtrise de la composante opioïde, avec laquelle ont déjà été réalisées des molécules à dualité d'action (Guillemyn et al., 2016). Notre collaboration avec ces équipes nous a permis d'obtenir une banque de 16 molécules que nous avons criblé *in vitro* sur les récepteurs opioïdes et les récepteurs à peptide RF-amide. Nous avons pu identifier une molécule, KGFF09, qui est un puissant agoniste MOR et présente également une bonne activité antagoniste des récepteurs NPPF₁R et NPPF₂R. A titre

de comparaison, nous avons également poursuivi cette étude avec deux autres molécules : KGFF03, présentant une puissance activité agoniste pour les récepteurs MOR, NPPF₁R et NPPF₂R ; et KGOP01, correspondant strictement au pharmacophore opioïde de KGFF03 et KGFF09, et qui a servi de référence. Chez la souris, l'administration sous-cutanée de KGFF09 produit un analgésie puissante et de longue durée (> 5 h) qui n'est pas atténuée par le développement de tolérance analgésique ou d'hyperalgésie après 1 semaine d'administration quotidienne, contrairement aux composés KGOP01 et KGFF03. Le syndrome de sevrage précipité par la naltrexone est réduit de moitié après l'administration chronique de KGFF09, comparé au KGOP01 et KGFF03 et grâce à son activité d'agoniste biaisé vers la protéine G sur MOR, KGFF09 induit une plus faible dépression respiratoire chez la souris que KGOP01. De plus, dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, KGFF09 garde son activité antinociceptive préservée de tolérance après administration répétée, et bloque durablement l'hyperalgésie inflammatoire.

L'ensemble de ce travail est regroupé dans une publication récemment acceptée dans la revue officielle de l'association internationale pour étude de la douleur (IASP, International Association for the Study of Pain), 'PAIN'. Le manuscrit de cette publication est présenté dans les pages suivantes.

Les composés développés au cours de ce travail ont également fait l'objet d'un dépôt de brevet dans lequel je suis co-inventeur.

A bifunctional biased mu opioid agonist - neuropeptide FF receptor antagonist as analgesic with improved acute and chronic side effects

Armand Drieu la Rochelle^{a#}, Karel Guillemyn^{b#}, Maria Dumitrascuta^{c#}, Charlotte Martin^b, Valérie Utard^a, Raphaëlle Quillet^a, Séverine Schneider^d, François Daubeuf^d, Tom Willemse^{b,e}, Pieter Mampuy^e, Bert U.W. Maes^e, Nelly Frossard^d, Frédéric Bihel^d, Mariana Spetea^{c**¶}, Frédéric Simonin^{a**¶} and Steven Ballet^{b**¶}

Affiliations :

^a Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch, France

^b Research Group of Organic Chemistry, Departments of Chemistry and Bioengineering Sciences, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

^c Opioid Research Group, Department of Pharmaceutical Chemistry, Institute of Pharmacy and Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), University of Innsbruck, Innsbruck, Austria

^d Laboratoire Innovation Thérapeutique, UMR 7200 CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch, France

^e Organic Synthesis, Department of Chemistry, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

Co-first authors

¶ Co-senior authors

E-mail addresses: adrieularochelle@unistra.fr (A. Drieu la Rochelle), karelguillemyn@gmail.com (K. Guillemyn), maria.dumitrascuta@uibk.ac.at (M. Dumitrascuta), charlotte3martin@gmail.com (C. Martin), valerie.utard@unistra.fr (V. Utard), rquillet@unistra.fr (R. Quillet), schneider@unistra.fr (S. Schneider), francois.daubeuf@unistra.fr (F. Daubeuf), tomwille@vub.ac.be (T. Willemse); pieter.mampuy@uantwerpen.be (P. Mampuy), bert.maes@uantwerpen.be (B. Maes), nelly.frossard@unistra.fr (N. Frossard), mariana.spetea@uibk.ac.at (M. Spetea), fbihel@unistra.fr (F. Bihel), simonin@unistra.fr (F. Simonin), steven.ballet@vub.be (S. Ballet)

Correspondence:

* *Corresponding author - Medicinal chemistry. Research Group of Organic Chemistry, Departments of Chemistry and Bioengineering Sciences, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Brussels, Belgium*

Tel: +32 2 6293292; Fax: +32 2 6293304; E-mail: steven.ballet@vub.be

** *Corresponding authors - Pharmacology*

Frédéric Simonin: *Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, UMR 7242 CNRS/Université de Strasbourg. Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 300, Boulevard Sébastien Brant - CS 10413 - 67412 Illkirch Cedex - France.*

Tel: +33 368 85 48 75; Fax: +33 368 85 46 83; E-mail: simonin@unistra.fr

[Mariana Spetea](#): *Opioid Research Group, Department of Pharmaceutical Chemistry, Institute of Pharmacy and Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), University of Innsbruck, Innsbruck, Austria*

Tel: +43 512 50758277; Fax: +43 512 50758299; E-mail: mariana.spetea@uibk.ac.at

Abbreviations:

AUC, area under the curve; CFA, Complete Freund's Adjuvant; CHO, Chinese hamster ovary; Dmt, 2,6-dimethyltyrosine; DOPr, delta opioid receptor; HEK, human epithelial kidney; KOPr, kappa opioid receptor; MOPr, mu opioid receptor; MPE, maximal possible effect; NOPr, nociceptin receptor; NPFF, neuropeptide FF; NPFFR, neuropeptide FF receptor; OIH, opioid-induced hyperalgesia; sc., subcutaneous.

Abstract:

Opioid analgesics, such as morphine, oxycodone and fentanyl, are the cornerstones for treating moderate to severe pain. However, upon chronic administration, their efficiency is limited by prominent side effects such as analgesic tolerance and dependence liability. Neuropeptide FF (NPFF) and its receptors (NPFF1R and NPFF2R) are recognized as an important pronociceptive system involved in opioid-induced hyperalgesia and analgesic tolerance. Herein, we report the design of multitarget peptidomimetic compounds that show high affinity binding to mu opioid receptor (MOPr) and NPFFRs. In vitro characterization of these compounds led to identification of KGFF03 and KGFF09 as G protein-biased MOPr agonists with full agonist or antagonist activity at NPFFRs, respectively. In agreement with their biased MOPr agonism, KGFF03/09 showed reduced respiratory depression in mice, as compared to the unbiased parent opioid agonist KGOP01. Chronic subcutaneous administration of KGOP01 and KGFF03 in mice rapidly induced hyperalgesia and analgesic tolerance, effects that were not observed upon chronic treatment with KGFF09. This favorable profile was further confirmed in a model of persistent inflammatory pain. In addition, we showed that KGFF09 also induced less physical dependence compared to KGOP01 and KGFF03. Altogether, our data establish that combining, within a single molecule, G protein-biased MOPr agonism and NPFFR antagonism have beneficial effects on both acute and chronic side effects of conventional opioid analgesics. This strategy can lead to the development of novel and potent antinociceptive drugs with limited side effects upon acute and chronic administration.

Keywords:

Opioid receptors ; NPFF receptors ; RF-amide peptides ; opioid analgesia ; opioid-induced hyperalgesia ; analgesic tolerance ; physical dependence

1. Introduction

Opioids analgesics, such as morphine, oxycodone and fentanyl, continue to be cornerstone drugs for treating moderate to severe pain. Despite their undeniable benefit for treating severe acute pain, opioids still lack effectiveness for long-term therapy [9; 40; 55]. Indeed, repeated administration of opioids exacerbates adverse effects, such as pain hypersensitivity, which in turn impairs the analgesic efficacy and triggers the need for dose-escalation. In addition to pain hypersensitivity, risks of respiratory depression, addiction potential and constipation considerably affect the patient's quality of life [15]. In pursuit of safer analgesics, two main strategies recently emerged: G protein-biased mu opioid receptor (MOPr) agonists and multifunctional drugs with mixed opioid and non-opioid activities [21; 24; 37].

Research aiming at understanding the cellular and molecular mechanisms underlying the physiological analgesic response unveiled multiple pathways for MOPr activation and signaling. The signaling pathway coupled to heterotrimeric $G_{\alpha i/o}$ proteins inhibits downstream cAMP production by adenylyl cyclases, modulates activity of ion channels, and is ultimately responsible for pain relief. In addition to G protein signaling, MOPr can activate parallel or distinct signaling pathways. β -Arrestin binding to the MOPr induces internalization, desensitization, as well as β -arrestin specific signaling, which is considered involved in opioid-induced respiratory depression, physical dependence, analgesic tolerance and constipation [7; 43; 44]. The potential of G protein-biased MOPr agonists, such as TRV130 and PZM21, has been extensively studied with promising preclinical and clinical results after acute administration [10; 25; 30; 31]. However, the consequences of chronic administration of such compounds have been poorly studied to date.

Another strategy to develop new analgesic drugs with an improved therapeutic profile has recently emerged, which consist in developing dual ligands acting both on the MOPr - to produce analgesia - as well as on other opioid or non-opioid receptors involved in pain processing and/or opioid-induced side effects [21; 37]. Examples include the MOP/DOP dual agonist MGM-16 [32], MOP/NOP dual agonist BU08028 [11] or dual MOP agonist/neurokinin-1 antagonist [52] shown to have an improved acute analgesic profile with reduced side effects in various acute and chronic pain models. Among the non-opioid receptors, neuropeptide FF 1 and 2 receptors (NPFF1/2R) are recognized to contribute to the development of opioid-induced analgesic tolerance and other adverse effects [2; 4; 47]. NPFF has been shown to produce transient hyperalgesia, to attenuate the analgesic effect of morphine [56] and to potentiate opioid dependence [54], while pharmacological blockade of NPFF1/2R efficiently

prevents the development of opioid-induced hyperalgesia (OIH), analgesic tolerance, and reduce the morphine-induced withdrawal syndrome [14; 35; 48].

In light of these findings, the aim of our study was to generate peptidomimetic ligands combining potent MOPr agonist activity with NPFF1/2R antagonist activity. We describe here the identification and characterization of two interesting compounds, KGFF03 with agonist activity for the MOPr and NPFF1/2R, and KGFF09, a mixed MOPr agonist and NPFF1/2R antagonist. In vivo characterization of these compounds, in comparison with the parent opioid moiety KGOP01 used for the design of the mixed ligands, clearly shows that chronic administration of KGOP01 and KGFF03 resulted in the development of OIH, analgesic tolerance and a strong withdrawal syndrome, while KGFF09 has considerably lower propensity for these side effects. Moreover, KGFF03 and KGFF09 displayed reduced respiratory depressive effects upon acute administration, a result probably related to their biased MOPr agonism as opposed to the unbiased KGOP01. Altogether, these results establish that KGFF09 is a potent analgesic drug with a reliable activity after chronic administration and a favorable safety profile, thus providing a promising therapeutic approach to tackle the present opioid epidemic [19].

2. Experimental procedures

2.1. Chemical Synthesis

Peptides KGFF01-KGFF07

Peptides KGFF01-KGFF07 were synthesized manually by standard Fmoc-SPPS on Rink amide AM resin. Standard couplings were performed with 3 equivalents (equiv.) of Fmoc-protected amino acid and 3 equiv. of coupling reagent (HCTU) in 0.4 NMM in DMF during 1.5 h. Fmoc-Aba- β -Ala-OH was coupled in only 1.5 equiv. excess of both Fmoc-dipeptide and coupling reagent for 3 h. Boc-Dmt-OH was coupled using 1.5 equiv. of amino acid and 1.5 equiv. of HOBt/DIC in DMF for 2 h, without addition of base to avoid coupling to the unprotected phenol group. For Fmoc-deprotection, the resin was treated with 20% 4-methylpiperidine in DMF for consecutively 5 and 15 min. Washing of the resin was performed after every coupling and after deprotection step with DMF (3x), iPrOH (3x) and CH₂Cl₂ (3x). Final cleavage and deprotection were done with the cleavage mixture (TFA/TES/H₂O 95:2.5:2.5) during 3 h. After filtration and concentration of TFA, the residue was added to cold ether to precipitate the peptide. The ether phase was decanted and the peptide was dissolved in acetonitrile/H₂O and lyophilized to obtain the crude peptides as a powder. The crude peptides were dissolved in H₂O and acetonitrile was

added until complete dissolving was observed. This solution was injected on a Gilson preparative RP-HPLC. Fractions containing the product were combined and lyophilized. The final peptides were obtained with a purity >95% as white powders. The compounds were characterized by high-resolution electrospray mass spectroscopy.

Peptides KGFF08-KGFF11

The couplings of these four peptides were carried out using 3 equiv. of the amino acid with 3 equiv. of DIC/HOBt for 1.5 h in DMF. Coupling of both Fmoc-Aba- β -Ala-OH, Fmoc-Apa-OH and Fmoc-Bpa-OH were performed with only 1.5 equiv. of amino acid and coupling reagent (DIC/HOBt) in DMF during 3 h. Boc-Dmt-OH was coupled with the same number of equivalents, but the reaction mixture was stirred only for 2 h.

Peptide KGFF12

The dipeptide Boc-Dmt-D-Arg(Pbf)-OH was first synthesized on 2-chlorotrityl chloride resin, using the same coupling and deprotection conditions as described above. Cleavage was performed with 1% TFA in CH₂Cl₂ to retain the side chain protective group. The solution was then evaporated and the dipeptide (1.1 equiv.) was dissolved in CH₂Cl₂. Two equiv. DIPEA and 1.5 equiv. DIC/HOBt were added and the mixture was stirred for 30 min at 0 °C. The free 4-amino-Aba-NH was added and stirred for another 30 min in an ice bath. The reaction was then left on stirring during 16 h at room temperature. After this coupling, the protective groups were removed with the same cleavage cocktail as described for the preparation of peptides KGFF01-KGFF07, and purification was performed analogously.

Peptide KGFF13

This synthesis was performed on FMPB-AM resin (4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butyrylaminoethyl resin). Methylamine hydrochloride (10 equiv.) was coupled to the aldehyde resin by a reductive amination with sodium cyanoborohydride (10 equiv.) in MeOH/DMF for 2.5 h at 80 °C. Complete coupling was determined by the DNPH-color test. Further standard SPPS coupling, cleavage and purification were performed as described for peptides KGFF01-KGFF07 (*vide infra*).

Peptides KGFF14-KGFF16

These 3 peptides were synthesized on MBHA-resin. The couplings (Boc-Dmt-OH, Boc-D-Arg(Tos)-OH, Boc-Phe-OH) were performed with 3 equiv. of amino acid and 3 equiv. of coupling reagent (HCTU) in 0.4 NMM in DMF for 1.5 h. Both the arginine mimetics and Boc-

Dmt-OH were coupled with DIC/HOBt in DMF with respectively 1.5 (Arg mimetics) and 2 equiv. of amino acid and coupling reagent. Fmoc-Aba- β -Ala-OH was coupled with 1.5 equiv. of HCTU in 0.4 NMM in DMF for 3 h. This Fmoc-group was removed as described above. The Boc-deprotection was performed with 50% TFA in CH₂Cl₂ for 5 and 15 min and washed as previously described. The neutralization step after every Boc-deprotection was realized with a solution of 20% triethylamine in CH₂Cl₂ during 10 min (2 times). Final cleavage was done with liquid HF (10 mL/g resin) and anisole (0.5 mL per 50 mg resin) as scavenger for 1 h at 0 °C. After HF distillation, cold ether was added to precipitate the peptides. The peptides were filtered and dissolved in acetic acid/H₂O, and lyophilized. The white powders could be purified by preparative RP-HPLC. Only in case of the paramethoxybenzyl-protected benzoimidazole-containing peptide (KGFF14), an extra step had to be performed to fully cleave the protective group: the peptide was treated with 10% triflic acid (0.5 mL) in TFA (4.5 mL) for 4 h, the solvent was evaporated and the product was purified by preparative RP-HPLC.

Peptide characterization and synthesis of the arginine mimetics and ornithine mimetics are described in *Materials and Methods Supplemental Digital Content 1*.

2.2. Receptor cDNA constructs, cell expression and membrane preparations

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells expressing Glo-sensor 20F were a gift from M.Hanson (GIGA, Liège, Belgium). Human MOPr, DOPr, KOPr, NOPr, NPFF1R, NPFF2R and GPR54 cDNAs were subcloned into the pCDNA3.1 expression vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and transfected into Chinese Hamster ovary (CHO) cells or HEK293-Glo-20F cells before selection for stable expression, as reported [13]. CHO cells expressing human GPR10 and GPR103 were a gift from M. Parmentier (IRIBHM, Brussels, Belgium). All cell membranes were prepared as described [13] and stored at -80°C as aliquots (1 mg prot/mL) until use.

2.3. Radioligand binding assays

Binding assay conditions were essentially performed as described [13]. Briefly, membranes from CHO cells stably expressing human GPR10, GPR54, GPR103, NPFF1R or NPFF2R were incubated with 0.6 nM [³H]-PrRP-20, 0.05 nM [¹²⁵I]-Kp-10, 0.03 nM [¹²⁵I]-43RFa, or 0.015 nM [¹²⁵I]-1-DMe-NPFF (for NPFF1R and NPFF2R), respectively. Membranes from HEK293 cells stably expressing human MOP, DOP and KOP receptors were incubated with 1 nM [³H]-diprenorphine. Membranes from HEK293 cells transiently expressing human NOP receptors were incubated with 0.2 nM [³H]-nociceptin. Competition binding experiments

were performed at 25°C, under equilibrium conditions (60 min, 0.25 mL final volume), in the presence of increasing concentrations of unlabeled peptides or test compounds. Membrane-bound radioactivity was separated from free radioligand by rapid filtration through a 96-well GF/B unifilter apparatus (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Courtaboeuf, France) and quantified using a TopCount scintillation counter (Perkin Elmer).

2.4. [³⁵S]-GTPγS binding assay

Stimulation by endogenous RF-amide peptides or test compounds for [³⁵S]-GTPγS binding to membranes from CHO cells expressing human NPFF1R or NPFF2R, were examined as reported [48].

2.5. Glo-sensor cAMP assay

cAMP accumulation assay was essentially done as described [45] with the following modifications: HEK293 cells stably expressing cAMP Glosensor-20F were used, with or without additional stable expression of each individual opioid receptor or NPFF1R. The cAMP responses were measured in presence of D-luciferin (1 mM). All peptides and test compounds were incubated in the presence of IBMX for 15 min before inducing cAMP production by forskolin. IBMX and forskolin concentrations were optimized for each receptor cell line: NPFF1R responses were recorded in presence of 0.1 mM IBMX and 0.4 μM forskolin, MOPr with 0.5 mM IBMX and 0.125 μM forskolin, DOPr responses with 0.1 mM IBMX and 0.125 μM forskolin; KOPr and NOPr with 0.5 mM IBMX and 1.5 μM forskolin.

2.6. Calcium mobilization assay

CHO cells expressing human NPFF2R were loaded with 2.5 μM Fluo-4 AM in the presence of 2.5 mM probenecid, as described previously [13]. Agonist-evoked increases in intracellular calcium were recorded over time (5 sec intervals over 220 sec) at 37 °C through fluorescence emission at 520 nm (excitation at 485 nm). Peak response amplitudes were normalized to basal and maximal (cells permeabilized with 20 μM digitonin) fluorescence levels.

□□□□□β-Arrestin-2 recruitment assay

The β-arrestin-2 recruitment assay was performed as described [34; 45] with minor modifications. Briefly, two days prior the experiment, HEK293 cells stably expressing eYFP-

tagged β -arrestin-2 were transfected with the plasmid encoding Rluc8-MOP receptor. β -Arrestin-2 recruitment was measured at 37°C in presence of 5 μ M Coelenterazine H, 5 min after agonist addition. A “BRET ratio” corresponding to the signal in the “acceptor channel” (band-pass filter 510-560 nm) divided by the signal in the “donor channel” (band-pass filter 435-485 nm) was calculated. Drug-induced BRET was determined (BRET1 ratio of drug-activated cells minus BRET1 ratio of buffer-treated cells) and normalized to the maximum of DAMGO-induced BRET, defined as 100%.

2.8. *In vivo* experiments

All experiments were carried out in accordance with the European guidelines for the care of laboratory animals (European Communities Council Directive 2010/63/EU) and were approved by the local ethical committee and authorized by the French Ministry for Research and the Committee of Animal Care of the Austrian Federal Ministry of Science and Research. All efforts were made to minimize animal discomfort and to reduce the number of animals used.

2.9. *Animals*

Animal experiments were performed on adult male C57BL/6N male mice (25-30 g weight; Janvier labs, France) and CD1 mice (30-35 g body weight; Center of Biomodels and Experimental Medicine (CBEM), Innsbruck, Austria). Animals were housed in groups of three to five per cage and kept under a 12 h/12 h light/dark cycle at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ with *ad libitum* access to food and water. Experiments were performed during the light-on phase of the cycle. Mice were habituated to the testing room and equipment before starting behavioral experiments. Control and treated group assignment as well as pain response measurements were performed in a blinded manner. Every animal was used only once.

2.10. *Drug administration*

All drugs were dissolved in physiological saline (0.9%) and administered subcutaneously (sc.) at 10 mL/kg (volume/body weight).

2.11. *Assessment of thermal nociception*

The nociceptive sensitivity to thermal stimulation was determined in mice using the radiant heat tail-flick and 47.5°C warm-water tail immersion tests as previously described [12; 36; 49]. The tail-flick test was performed in CD1 mice using the UB 37360 Ugo Basile analgesiometer (Ugo

Basile s.r.l., Varese, Italy), where the reaction time required by the mouse to remove its tail after application of the radiant heat was measured and defined as the tail-flick latency (in sec). A cut-off time of 10 sec was used in order to minimize tissue damage. In the tail immersion test, C57BN/6N mice were restrained in a grid pocket and their tail was immersed in a thermostated water bath. The latency (in sec) for tail withdrawal from hot water (47.5 ± 0.5 °C) was taken as a measure of the nociceptive response. In the absence of any nociceptive reaction, a cut-off value of 25 sec was set to avoid tissue damage.

Experiments for acute drug effect were designed according to a protocol enabling the evaluation of the time-course of the antinociception response of test compounds. Nociceptive latencies were determined before (baseline) and after drug or saline (control) sc. administration (i.e. 15 min, 30 min, and every hour up to 8 h, and 24 h). Dose-response curves were constructed for test compounds. Antinociceptive response was calculated as percent of Maximum Possible Effect (%MPE) according to the formula = [(test latency – baseline latency)/(cut-off time – baseline L)] x 100. The dose necessary to produce a 50% MPE (ED₅₀) and 95% confidence limits (95% CL) were calculated.

Experiments for chronic drug effects were designed according to a protocol enabling the evaluation of time-course of opioid-induced hyperalgesia and development of analgesic tolerance using the tail immersion test. C57BL/6N mice were sc. treated daily with 1.8 µmol/kg/d KGOP01, 1.2 µmol/kg/d KGFF03, 7.4 µmol/kg/d KGFF09 or saline (controls) for 8 days. For analgesic tolerance evaluation, nociceptive latencies were measured on day 1 and 8 according to the acute effect protocol. For the assessment of hyperalgesia, basal nociceptive latencies were measured every day, 30 min before drug or saline injection. Responses are expressed as latency times (in sec) of tail withdrawal from the hot water.

2.12. CFA-induced inflammatory pain model

Tail inflammation in C57BL/6N mice was induced by injecting subcutaneously 20 µl of a Complete Freund's Adjuvant (CFA) solution or saline (control mice) 3 cm from the tip of the tail [41]. Twenty-four hours after CFA injection (day 1), inflammation was confirmed by measuring thermal and mechanical hyperalgesia. Mice were then treated sc. daily for 7 days (from day 1 to day 7) with the test compounds or saline (control). Nociceptive threshold to heat stimulation was measured by tail immersion test (47.5 ± 0.5 °C) and tail pressure test [12] each hour for 5 h after the first drug administration in order to determine the peak of the anti-hyperalgesic response. During the following days, basal nociceptive thresholds were evaluated before injection and 2 h after drug injection. Antinociceptive response was calculated as percent

of Maximum Possible Effect (%MPE) according to the formula = [(test latency – CFA/saline mice latency)/(cut-off time – CFA/saline mice latency)] x 100. In order to limit behavioral sensitization, thermal nociception was evaluated on days 1 - 2 - 4 - 6 and mechanical nociception on days 1 - 3 - 5 - 7.

2.13. Naltrexone-precipitated withdrawal syndrome

Opioid physical dependence was induced in C57BL/6N mice by sc. administration of test compounds twice daily, 1.8 µmol/kg KGOP01, 1.2 µmol/kg KGFF03, 7.4 µmol/kg KGFF09 or saline (control) over a 7-days period. On day 7, two hours after the last drug injection, the withdrawal syndrome was precipitated by administration of naltrexone (5 mg/kg, sc.) and evaluated over 30 min. Jumping, paw tremors and wet dog shakes were recorded as number of events occurring during the total test time. Diarrhea was checked for 30 min with one point given for any signs of it during each 5 min period (maximum score: 6). Body weight was measured immediately before and after each 30 min test session, and percentage of body weight lost during the test was calculated. For each mouse, a global opiate withdrawal score was also calculated by summing the values obtained for each sign. For this purpose one point was assigned to every 3 jumps and 5 paw tremors, respectively, whereas all other signs were given the absolute values recorded during the test [39].

2.14. Respiratory depression measurement using whole body plethysmography

Ventilatory parameters were recorded in conscious C57BL/6N mice by whole body barometric plethysmography (Emka Technologies, Paris, France). Mice were acclimatized with the plethysmograph chamber for 30 min until a stable baseline was obtained. Then, the animal was gently removed from the chamber for sc. injection of the tested drug at T₀ and replaced in the chamber for the remaining measurements. Respiratory frequency (f) was recorded for 100 min and used as the index of respiratory depression [31].

2.15. Colonic bead exclusion test for assessment of gastrointestinal motility

Colonic bead expulsion test was used to assess the effect of test compounds on gastrointestinal motility in CD1 mice as described previously [26]. Thirty minutes after sc. administration of test compounds or saline (control), a single 2 mm glass bead was inserted 1.5 cm into the distal colon using a silicon pusher. After bead insertion, mice were placed in individual plastic boxes, and the time required for expulsion of the glass bead was determined for each animal. The time required to expel the bead was measured up to 120 min.

2.16. Rotarod test for assessment of motor coordination

Possible motor dysfunction or sedative effects of test compounds were assessed in CD1 mice using the rotarod test as described previously [51]. The accelerating rotarod treadmill (Acceler Rota-Rod 7650, Ugo Basile s.r.l., Varese, Italy) for mice (diameter 3.5 cm) was used. Animals were habituated to the equipment in two training sessions (30 min apart) one day before testing. On the experimental day, mice were placed on the rotarod, and the treadmill was accelerated from 4 to 40 rpm over a period of 5 min. The time spent on the rod was recorded for each mouse before and after test compound or saline (control) sc. administration (i.e. 30 min and every hour up to 8 h, and 24 h). Decreased latencies to fall from the rotarod indicate impaired motor performance. A 300 s cut-off time was used.

2.17. Statistics

For in vitro binding and functional experiments, two to four independent experiments were performed in duplicates and data were analyzed using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In vivo data are expressed as mean values \pm SEM for 6 to 12 mice per group. Antinociception was quantified as the area under the curve (AUC) calculated by the trapezoidal method [8]. Data were analyzed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA). Post-hoc analyses were performed with Bonferroni tests. The level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out using the StatView or GraphPad Prism softwares.

3. Results

3.1. Design strategy and biological screening of MOPr/NPFFR peptidomimetic ligands

In this study, we designed a series of bifunctional ligands that were based on a combination of the recently described MOPr peptidomimetic KGOP01 [20], found to display potent analgesic activity following systemic administration, and standard but also more evolved NPFF pharmacophores (Fig. 1 *A* and *B*). The sequences of synthesized peptidomimetics are shown in Table 1. As a standard NPFF pharmacophore, the *C*-terminal RF-NH₂ dipeptide segment of NPFF served as a minimal recognition motif (structure 2, Fig. 1*A*). Many of the reported NPFF analogues contain the *C*-terminal Arg-Phe-amide, derived with an apolar moiety linked at its *N*-terminus [16; 18; 23; 33; 48]. Combination of both pharmacophores (Table 1) afforded KGFF01 and KGFF03 that showed nanomolar affinity for MOPr and NPFF1/2R (Fig. 1*C* and Table Supplemental Digital Content 2, which summarize affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R). The amino-benzazepinone (Aba) scaffold could act as the apolar group that is often present in previously reported NPFF ligands. The insertion of a Gly (KGFF01) or a β -Ala (KGFF03) in position 4, i.e. between the RF-NH₂ dipeptide and the benzazepinone ring, provided good affinity for NPFF1/2R with preserved MOPr affinity, while eliminating a potential steric hindrance imposed by the NPFF pharmacophore onto the opioid part. The corresponding *C*-terminal carboxylic acid (KGFF02) confirmed the importance of the *C*-terminal amide in this type of hybrid with a strong decrease of affinity for both NPFF1/2R. Likewise, the substitution of the Arg residue by Orn (KGFF04, KGFF05) was not well tolerated, resulting in reduced binding affinities to both NPFF1/2R subtypes (Fig. 1*C* and Table Supplemental Digital Content 2, which summarize affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R).

Further truncation of KGFF01 gave way to tripeptides KGFF06 and KGFF07 with complete overlap of the opioid and NPFF pharmacophores, as the 2,6-dimethyl tyrosine (Dmt) side chain could efficiently serve as the apolar group. In this case, the opioid segment is cut down to three amino acids instead of four, with well-conserved MOPr binding affinity for KGFF07. In addition to the detrimental consequence on MOPr affinity, the stereochemistry of Arg (L-Arg for KGFF06 and D-Arg for KGFF07) seems to drive a selectivity switch between NPFF1R and NPFF2R (Fig. 1*C* and Table Supplemental Digital Content 2, which summarize affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R).

Following initial in vitro biological evaluation of the described hybrid peptidomimetics, the two peptide analogues, KGFF03 and KGFF07, with the most promising binding data on MOPr and NPFFR were used to design a second set of bifunctional peptides (Table 1). Within this second set, the Arg residues were replaced by both reported Orn-derivatives (Fig. 1B, **3**, **Apa** [2-amino-5-(piperidin-1-yl)pentanoic acid] and **4**, **Bpa** [2-amino-5-(4-benzylpiperidin-1-yl)pentanoic acid]) [46], as well as novel Arg mimetics (**5** to **7**, Fig. 1B; see Methods for synthetic details). Structural modifications on KGFF07 were first explored. Substitution of L- or D-Arg² by **3** and **4** using standard Fmoc-SPPS gave rise to tripeptide analogues KGFF10 and KGFF11, with a consequential dramatic loss of affinity for MOPr and NPFFR. In an attempt to lower the molecular flexibility of this tripeptide, the C-terminal Phe was constrained through incorporation of the amino-benzazepinone (Aba) core (KGFF12), resulting in a significant drop in binding affinity for NPFF1R and to a lesser extent for NPFF2R. In order to verify if the decrease in affinity was due to the incorporation of the methylene bridge providing the cycle or from the conversion of a primary to a secondary amide, the ‘open ring’ analogue KGFF13 was also synthesized. This compound displayed a partially restored affinity for the NPFF1R and NPFF2R (Fig. 1C and Table Supplemental Digital Content 2, which summarize affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R).

We have recently shown that the guanidine moiety of Arg can be advantageously replaced by tertiary amines in the sequence RF-NH₂, leading to new peptidomimetic ligands of NPFFRs [5]. Based on the promising biological data of KGFF01 and KGFF03, and in light of our previous work, the Arg⁵ residue was replaced by piperidine- and benzylpiperidine-bearing residues **3** and **4**, respectively (Fig. 1B), to give the hybrid products KGFF08 and KGFF09 (Table 1). The Arg mimetics (**5** to **7**) were incorporated at the same position in this sequence leading to KGFF14, KGFF15 and KGFF16 (Table 1). Substitution of Arg⁵ in KGFF03 with these Arg mimetics led in general to good binding affinity for both MOPr and NPFF1/2Rs (MOPr: $K_i < 10$ nM; NPFF1R: $K_i < 150$ nM; NPFF2R: $K_i < 15$ nM) with a globally better affinity for the NPFF2R over NPFF1R subtype, especially after incorporation of Apa, Bpa and Lys(Box) residues. Based on these data, hybrid peptidomimetics KGFF01/-03/-07/-08/-09/-14/-15/-16 were selected for further characterization of their activity on MOPr and NPFF1/2R in functional assays.

3.2. Identification of an MOPr/NPFFR agonist (KGFF03) and a mixed MOPr agonist / NPFFR antagonist (KGFF09)

We first evaluated the capacity of the selected compounds to inhibit forskolin-induced cAMP production from MOPr overexpressing HEK cells. All ligands displayed full agonist activity at the MOPr (EC_{50} values ranging from 1.5 to 18.2 nM, as compared to DAMGO, $EC_{50} = 80$ nM, Fig. 2A and Table Supplemental Digital Content 3, which summarize agonist activity constants (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R). We then evaluated the functional activity of the KGFF compounds on both NPFF1R and NPFF2R in the [35 S]-GTP γ S binding assay (Fig. 2 B and C, and Table Supplemental Digital Content 3, which summarize agonist activity constants (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R). KGFF03 was the most potent agonist for both NPFF1/2R (NPFF1R: $EC_{50} = 84.8$ nM; NPFF2R: $EC_{50} = 11$ nM), whereas KGFF09 was the only ligand to show no or weak agonist activity at both NPFF1R and NPFF2R. We further confirmed the absence of agonist activity of KGFF09 on NPFFRs by using integrated cellular assays (Figure Supplemental Digital Content 4 A and C, which shows in vitro characterization of KGFF03 and KGFF09 on NPFFRs). Finally, we showed that KGFF09 displayed potent antagonist activity at NPFF1/2Rs (Fig. 2 E and F, Figure Supplemental Digital Content 4 B and D, which shows in vitro characterization of KGFF03 and KGFF09 on NPFFRs) with pA_2 values of 7.25 ± 0.30 and 7.77 ± 0.21 , respectively, calculated from [35 S]-GTP γ S binding experiments.

Overall, these data allowed us to identify one molecule, KGFF03, that displays potent MOPr and NPFFR agonist activities, and a second ligand, KGFF09, that shows mixed MOPr agonist and NPFF1/2R antagonist activities. These two ligands underwent further in vitro and in vivo characterization, and their profiles were compared to the parent opioid ligand KGOP01.

3.3. KGFF03 and KGFF09 are G protein-biased MOPr agonists

While opioid-induced analgesia is attributed to MOPr signaling through the G protein G_i , β -arrestin-2 recruitment upon MOPr activation is suggested to be responsible for many acute side effects including respiratory depression and constipation [10; 31; 43]. To examine MOPr biased agonism of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 towards activation of G protein- over β -arrestin-2-mediated signaling, we compared their functional activity, i.e. potency and efficacy, across two cell-based assays that measure G protein coupling (the cAMP accumulation assay) and β -arrestin-2 translocation (the BRET1 β -arrestin-2 recruitment assay) at the human MOPr (Fig. 2 A and D, and Table Supplemental Digital Content 3, which summarize agonist activity constants (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R).

Both KGFF03 and KGFF09 elicited partial agonism for β -arrestin-2 recruitment, while being highly potent and fully efficacious in promoting MOPr-induced G protein activation. In contrast, KGOP01 robustly stimulated interaction between the MOPr with G protein and β -arrestin-2 with a full response and potency, as compared to DAMGO. These data indicate that the two newly designed MOPr/NPFFR hybrid ligands, KGFF03 and KGFF09, activate MOPr in a manner that is preferentially biased toward G protein signaling.

3.4. Selectivity of KGFF03 and KGFF09 at opioid and RF-amide receptors

We further investigated the binding affinity and functional activity of KGFF03, KGFF09 and KGOP01 at other opioid receptor types (Table Supplemental Digital Content 5, which summarize binding affinity constant (K_i) values and agonist activity constant (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for human DOPr, KOPr, and NOPr and Figure Supplemental Digital Content 6, which shows in vitro characterization of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on opioid receptors). KGFF03 showed good affinity at the DOPr, and lower affinity for KOPr and NOPr. It displayed potent agonist activity at DOPr ($EC_{50} = 0.34$ nM) and lower agonist activity at KOPr ($EC_{50} = 95$ nM), as well as very weak antagonist activity at NOPr ($pA_2 = 5.3 \pm 0.34$). KGFF09 showed lower affinity at the DOPr and relatively higher affinity for the KOPr, in comparison with KGOP01 and KGFF03. Its affinity for the NOPr was similar to KGFF03. Alike KGOP01 and KGFF03, KGFF09 displayed potent agonist activity at DOPr ($EC_{50} = 0.78$ nM). Moreover, KGFF09 displayed potent antagonist activity at the KOPr ($pA_2 = 8.16 \pm 0.13$), but low antagonist activity at the NOPr ($pA_2 = 5.94 \pm 0.12$).

Because NPFFRs belong to the family of RF-amide receptors, which include GPR10, GPR54 and GPR103 [13], we also evaluated selectivity of our compounds for these receptors. KGOP01, KGFF03 or KGFF09 displayed no or low affinity for GPR10, GPR54 and GPR103 (Table Supplemental Digital Content 7, which summarize affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for GPR10, GPR54 and GPR103).

3.5. Acute subcutaneous administration of KGFF03 and KGFF09 produces dose-dependent, long-lasting antinociception in mice

We then evaluated the acute antinociceptive activity of the new MOPr/NPFFR hybrid structures, KGFF03 and KGFF09, in two mouse models of thermal acute nociception after sc. administration and compared them to the parent opioid, KGOP01. All three peptides produced

time- and dose-dependent increase in tail withdrawal latencies in the tail immersion test (Fig. 3A) and the radiant heat tail-flick test (Fig. 3B), with KGFF03 and KGFF09 showing a prolonged antinociceptive response (Fig. 3B). The established profile in this study for KGOP01 following sc. administration is similar to that recently reported in the tail-flick test after intravenous administration in mice [20]. The ED₅₀ values of the tested peptidomimetics at the peak of action are shown in Table 2. When compared to KGOP01, KGFF03 was equipotent whereas KGFF09 was 4.5-fold less potent in inducing antinociception, in agreement with its slightly lower affinity for the MOPr (Fig. 1C). The activity of the three compounds were several fold higher than that of the gold-standard opioid analgesic morphine (Table 2).

3.6. Chronic subcutaneous administration of KGFF09 does not induce hyperalgesia nor analgesic tolerance in naïve mice

To evaluate if the blockade of the NPPF system prevents the development of hyperalgesia and analgesic tolerance, mice were chronically administered with equianalgesic doses of either KGOP01, KGFF03 or KGFF09, as shown in the time course of analgesia on day 1 of the chronic administration scheme (Fig. 4A). When sc. administered at a dose of 1.8 µmol/kg/d, KGOP01 produced a significant and progressive decrease of the basal thermal nociceptive threshold, compared with control saline-treated animals (Fig. 4B). This effect was significant from the fifth day of the daily administration and persisted until the end of the experiment. As shown in Figure 4 (A and B), chronic administration of KGFF03 (1.2 µmol/kg/d, sc.) resulted in a similar development of thermal hypersensitivity, a trend that was absent in mice treated with KGFF09 (7.4 µmol/kg/d, sc.). In the same study, we measured the antinociceptive effect of each compound on days 1 and 8 (Fig. 4 A and C). On day 1, KGOP01, KGFF03 and KGFF09 induced full antinociception (maximal response reaching almost the 25 s cut-off limit). On day 8, mice treated with either KGOP01 or KGFF03 showed a reduction of maximal response and a decrease in the antinociception efficacy (defined by the AUC) by more than 75% compared to day 1 (Fig. 4C), indicating that tolerance did develop upon chronic administration of these two compounds. Conversely, the maximal analgesia induced by KGFF09 was maintained from day 1 to day 8, with a decrease of analgesic efficacy (AUC) on day 8 by less than 25% as compared to day 1. These data clearly indicate that blocking NPPF1/2Rs in addition to the MOPr activation leads to potent analgesia without development of tolerance upon chronic administration.

3.7. KGFF09 displays reduced withdrawal syndrome and respiratory depression

We further studied the development of naloxone-precipitated withdrawal syndrome after chronic sc. administration to mice of KGOP01, KGFF03 and KGFF09. Mice were treated twice a day over a 7 days period with the same doses used in previous experiments. Administration of naltrexone (1 mg/kg, sc.), 2 h after the last injection of KGOP01, induced high scores on several somatic and vegetative signs in the drug-dependent mice, as compared to the control saline-treated animals (Figure Supplemental Digital Content 8, which shows effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on naltrexone-precipitated withdrawal signs after chronic exposure in mice). A similar withdrawal profile was observed for KGFF03, while all signs of withdrawal were reduced following chronic administration of KGFF09 (Figure Supplemental Digital Content 8, which shows effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on naltrexone-precipitated withdrawal signs after chronic exposure in mice). Analysis of the global opiate withdrawal score revealed that withdrawal was significantly reduced (to circa 50%) after KGFF09 chronic administration, in comparison to KGFF01 and KGFF03 (Fig. 4D). This result is in agreement with our previous report, showing reduced morphine withdrawal upon administration of the NPFF1/2R antagonist RF9 [14; 48].

We next studied respiratory depression and constipation, two of the main side effects that occur upon acute opiate administration. As shown by the measurement of respiratory frequency (Fig. 4E), KGOP01 produced significant respiratory depression compared to saline-treated animals, while KGFF03 and KGFF09 did not. This result is in agreement with previous reports suggesting that respiratory depression is strongly associated with the β -arrestin-2 recruitment by the MOPr [10; 31]. Conversely, neither KGFF03 nor KGFF09 were able to alleviate opioid-related constipation, as measured by an extended bead expulsion time in mice (Figure Supplemental Digital Content 9A, which shows effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on gastro-intestinal motility). Finally, other behavioral observations revealed that, unlike KGOP01 and KGFF03, at the first administration of the highest dose, KGFF09 (7.4 μ mol/kg, s.c.) induced a transitory lethargic state with an impaired motor coordination in mice (Figure Supplemental Digital Content 9B, which shows effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on motor coordination) that was not observed upon repeated administration.

3.8. KGFF09 chronic administration efficiently reverses CFA-induced hyperalgesia

Additionally, we sought to characterize the analgesic profile of our compounds in a mouse model of persistent inflammatory pain induced by sc. injection of CFA in the mouse tail on day 1. Animals were then daily sc. administered with equianalgesic doses of KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg/d}$), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg/d}$) or KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg/d}$) from day 2 to day 8, and their antinociceptive activity upon thermal or mechanical nociceptive stimulation was measured on days 2, 3, 5 and 7 for the thermal stimulus, and on days 2, 4, 6, 8 for the mechanical stimulus. Measurements were performed 2 h after each daily drug injection, when analgesia was maximal (Figure Supplemental Digital Content 10, which shows acute antinociceptive time-course of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 in CFA-induced pain model). As shown in Figure 5 (*A* and *B*), both thermal and mechanical antinociception induced by KGOP01 and KGFF03 rapidly decreased after repeated administrations, with a decreased analgesia compared to day 1 (> 75%), clearly showing that these two compounds led to the development of analgesic tolerance. In contrast, KGFF09 preserved a potent analgesic effect, with significantly less tolerance after 7 days of chronic administration (Fig. 5 *A* and *B*). Because KGFF09 alleviate opioid-induced hyperalgesia upon chronic administration (Fig. 4 *A* and *B*), we tested if this was also applying for CFA-induced hyperalgesia. To this purpose, basal nociceptive thresholds of the animals were also measured daily before injection of the compounds (Fig. 5 *C* and *D*). The thermal hypersensitivity induced by CFA was reduced after a single administration of KGFF09, and totally reversed after the third injection (Fig. 5*C*), which was not the case with KGOP01 and KGFF03. Likewise, the basal mechanical nociceptive threshold of mice gradually returned to normal after repeated administration of KGFF09 (Fig. 5*D*), but not after KGOP01 and KGFF03. Overall, our data demonstrate that in a model of persistent inflammatory pain, blockade of NPFF1/2Rs preserves opioid analgesia upon repeated administration and allows efficient reversal of CFA-induced hyperalgesia.

4. Discussion

The driving force over the years in the opioid field has been the search for an alternative to morphine that would produce effective analgesia and would be free of undesirable side effects. New chemical approaches including the design of G protein-biased MOPr agonists and/or multifunctional ligands with mixed opioid and non-opioid activities for creating analgesics with fewer adverse effects are sought, and such drugs with improved benefit/risk profile are likely to have a significant impact [21; 24; 30].

In this study, we report the successful design and a thorough *in vitro* and *in vivo* characterization of two G protein-biased MOPr agonists, KGFF03 and KGFF09, possessing additional agonist and antagonist activities at NPPF1/2Rs, respectively. *In vivo*, they display potent antinociception with reduced respiratory depression after acute systemic (sc.) administration. The major finding of this study is that following chronic administration, KGFF09 but not KGFF03 produces effective antinociception with limited OIH and analgesic tolerance, as well as a reduced withdrawal syndrome, thus demonstrating the benefits of NPPF system blockade towards MOPr agonists to limit the development of tolerance and dependence, the two major adverse effects associated with chronic administration of classical opiates.

Multitarget pharmacology, or polypharmacology, is defined as the specific binding of a compound to two or more molecular targets and relies on the observation that some biological networks are resilient to single-point perturbations, with redundant functions or compensatory mechanisms leading to the attenuation of the repeated perturbation (*i.e.* stimulation of the MOPr; [22; 53]). Here, our strategy aimed at developing a dual acting drug combining the analgesic efficacy of opioid agonists, while blocking the NPPF system. The latter system has previously been shown to be critically involved in neuroadaptive responses of the organism to repeated exposure to opiates, resulting in OIH and analgesic tolerance [14; 48]. To determine whether the NPPFR antagonist activity was responsible for the improved profile of KGFF09, we compared this MOPr-NPPFR hybrid peptidomimetic with its parent opioid agonist KGOP01, devoid of an NPPF pharmacophore (Fig. 1, Table S1). Both ligands show high affinity with a full agonist activity at MOPr, paralleled by effective and long-lasting acute analgesia. However, upon chronic administration to mice, KGOP01 rapidly induced analgesic tolerance and hyperalgesia, whereas KGFF09 did not. These results appear to oppose a recent report of a bifunctional MOP – NPPF agonist, BN9, that displayed acute and chronic analgesic efficacy [27]. However, this study also shows that when co-administered with BN9, the NPPF1/2R antagonist RF9 further potentiated the analgesic effect of BN9, thus questioning the

benefit of the NPFF1/2R agonist activity on opioid analgesia. In addition, we also describe KGFF03, a potent MOPr – NPFF1/2R agonist, which shows acute analgesia, while it also induces tolerance and hyperalgesia in an analogous manner to the parent opioid agonist KGOP01. Altogether, our data confirm the role of the NPFF system in the compensatory mechanisms triggered by the chronic opioid stimulation and further support the concept that blockade rather than activation of this system is beneficial to opioid analgesia following chronic administration.

We further demonstrated in a model of inflammatory pain the beneficial effect of NPFFRs inhibition on the development of analgesic tolerance and long-lasting inflammatory hyperalgesia, suggesting that the endogenous NPFF system could be activated upon administration of inflammatory agents, such as CFA. This result is in agreement with a recent report showing an upregulation of NPFF and NPFF2R mRNA in the spinal cord of mice treated with CFA or carrageenan [28]. Overall, our current data therefore indicate that activation of the NPFF system might represent a common feature in the development of hyperalgesia, whether induced by inflammation or repeated opioid stimulation.

Detailed in vitro characterization of the newly designed MOP-NPFF hybrids revealed that the addition of either -Arg-Phe-NH₂ (KGFF03) or -Bpa-Phe-NH₂ (KGFF09) to the C-terminus of the parent opioid structure KGOP01 not only conferred the expected NPFF1/2R affinity to the designed compounds, but also shows an advantageous switch of MOPr activity towards the G protein signaling over β -arrestin-2 recruitment. Studies on β -arrestin-2 knockout mice (β -arrestin-2 KO) report less opioid-associated adverse effects, such as respiratory depression, constipation, analgesic tolerance and physical dependence, as well as higher opioid antinociceptive effects [7]. Although KGFF03 and KGFF09 are not completely devoid of the β -arrestin-2 recruitment activity, their bias appeared sufficient for alleviating respiratory depression, compared to the unbiased MOPr agonist KGOP01. This result is in agreement with previous observations made with other G protein-biased MOPr agonists [10; 31]. KGOP01, KGFF03 and KGFF09 displayed similar gastrointestinal tract inhibitory effect, indicating that β -arrestin-2 is not involved in this adverse effect. Although we cannot exclude that this could be due to the residual β -arrestin-2 recruitment induced by KGFF03 and KGFF09, our observation is in agreement with recent reports questioning the effectiveness of G protein-biased MOPr agonists in such adverse effect [1; 25; 30]. The lower efficacy of KGFF09 to promote MOP-induced β -arrestin-2 recruitment over G protein activation could also be responsible for less analgesic tolerance and physical dependence. However, reports on the

development of analgesic tolerance induced by opioids in β -arrestin-2 KO mice or following chronic treatments with G protein-biased MOPr agonists are conflicting [1; 6; 25]. Concerning physical dependence, the severity of antagonist-precipitated withdrawal response in β -arrestin-2 KO mice was reduced only when animals were chronically treated with low doses of morphine [43] and the biased MOPr agonist TRV130 was reported to induce similar withdrawal symptoms than morphine [50]. In this study, we show that KGFF03, having a biased activity on the MOPr, produces similar analgesic tolerance and physical dependence to the unbiased KGOP01 parent opioid agonist, suggesting that β -arrestin-2 bias is not critical for the development of these side effects.

Similarly to other biased MOPr agonists [10; 31], KGFF09 also binds to DOPr and KOPr, with DOPr agonist and KOPr antagonist activities. DOP agonists have been described to play no or limited analgesic activity in naive animals, but display potent anti-hyperalgesic activity in neuropathic and inflammatory pain models in rodents [17]. Although DOPr agonist activity is an interesting characteristic to consider when developing multitarget analgesic drugs, tolerance to DOPr-mediated analgesia has a very fast onset [42], which could limit the utility of this activity in chronic treatment. We also found that KGFF09 displays potent KOPr antagonist activity, a property also shared by PZM21, the recently described biased MOPr agonist [31]. The KOPr has been shown to display anti-MOPr activity [3; 38], and its blockade could present synergism with MOP and DOP agonist activity, leading to the observed analgesic potency of KGFF09. Moreover, as DOPr agonists and KOPr antagonists have been shown to have an antidepressant potential [29], KGFF09 may also have beneficial effects on the affective component of chronic pain syndromes.

In summary, we report here for the first time a dual acting, G protein biased MOPr agonist - NPPFRs antagonist, KGFF09. The association of both properties within a single molecule gathers the beneficial effects of biased MOPr agonists on acute side effects (respiratory depression) and those of NPPFRs antagonists on chronic side effects (OIH, tolerance, withdrawal syndrome), altogether leading to a potent analgesic with an improved safety profile. Hence, our current findings pave the way to novel therapeutic strategies for the development of potent antinociceptive drugs with limited side effects upon both acute and chronic use.

Conflict of interest statement

A. Drieu la Rochelle, K. Guillemin, F. Bihel, M. Spetea, F. Simonin and S. Ballet have a related patent pending. The remaining authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

We are grateful to the Integrative Biological Chemistry Platform (UMS 3286 CNRS, Illkirch, France) for technical assistance. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, LABEX ANR-10-LABX-0034_Medalis funded by "Agence National de la Recherche" under "Programme d'investissement d'avenir", the Research Foundation Flanders (FWO Vlaanderen), the Strategic Research Program – Growth Funding of the VUB and the Austrian Science Fund (FWF: I 2463-B21).

References

- [1] Altarifi AA, David B, Muchhala KH, Blough BE, Akbarali H, Negus SS. Effects of acute and repeated treatment with the biased mu opioid receptor agonist TRV130 (oliceridine) on measures of antinociception, gastrointestinal function, and abuse liability in rodents. *J Psychopharmacol* 2017;31(6):730-739.
- [2] Ayachi S, Simonin F. Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. *Frontiers in endocrinology* 2014;5:158.
- [3] Bie B, Pan ZZ. Presynaptic mechanism for anti-analgesic and anti-hyperalgesic actions of kappa-opioid receptors. *J Neurosci* 2003;23(19):7262-7268.
- [4] Bihel F. Opioid adjuvant strategy: improving opioid effectiveness. *Future medicinal chemistry* 2016;8(3):339-354.
- [5] Bihel F, Humbert JP, Schneider S, Bertin I, Wagner P, Schmitt M, Laboureyras E, Petit-Demouliere B, Schneider E, Mollereau C, Simonnet G, Simonin F, Bourguignon JJ. Development of a peptidomimetic antagonist of neuropeptide FF receptors for the prevention of opioid-induced hyperalgesia. *ACS chemical neuroscience* 2015;6(3):438-445.
- [6] Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 2000;408(6813):720-723.
- [7] Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science (New York, NY)* 1999;286(5449):2495-2498.
- [8] Celerier E, Rivat C, Jun Y, Laulin JP, Larcher A, Reynier P, Simonnet G. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. *Anesthesiology* 2000;92(2):465-472.
- [9] Chou R, Turner JA, Devine EB, Hansen RN, Sullivan SD, Blazina I, Dana T, Bougatsos C, Deyo RA. The effectiveness and risks of long-term opioid therapy for chronic pain: a systematic review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop. *Annals of internal medicine* 2015;162(4):276-286.
- [10] DeWire SM, Yamashita DS, Rominger DH, Liu G, Cowan CL, Graczyk TM, Chen XT, Pitis PM, Gotchev D, Yuan C, Koblish M, Lark MW, Violin JD. A G protein-biased

- ligand at the mu-opioid receptor is potently analgesic with reduced gastrointestinal and respiratory dysfunction compared with morphine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2013;344(3):708-717.
- [11] Ding H, Czoty PW, Kiguchi N, Cami-Kobeci G, Sukhtankar DD, Nader MA, Husbands SM, Ko MC. A novel orvinol analog, BU08028, as a safe opioid analgesic without abuse liability in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016;113(37):E5511-5518.
- [12] Elhabazi K, Ayachi S, Ilien B, Simonin F. Assessment of morphine-induced hyperalgesia and analgesic tolerance in mice using thermal and mechanical nociceptive modalities. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014(89):e51264.
- [13] Elhabazi K, Humbert JP, Bertin I, Schmitt M, Bihel F, Bourguignon JJ, Bucher B, Becker JA, Sorg T, Meziane H, Petit-Demouliere B, Ilien B, Simonin F. Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPPF receptors. *Neuropharmacology* 2013;75C:164-171.
- [14] Elhabazi K, Trigo JM, Mollereau C, Mouldous L, Zajac JM, Bihel F, Schmitt M, Bourguignon JJ, Meziane H, Petit-demouliere B, Bockel F, Maldonado R, Simonin F. Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *British journal of pharmacology* 2012;165(2):424-435.
- [15] Eriksen J, Sjogren P, Bruera E, Ekholm O, Rasmussen NK. Critical issues on opioids in chronic non-cancer pain: an epidemiological study. *Pain* 2006;125(1-2):172-179.
- [16] Findeisen M, Rathmann D, Beck-Sickinger AG. Structure-activity studies of RFamide peptides reveal subtype-selective activation of neuropeptide FF1 and FF2 receptors. *ChemMedChem* 2011;6(6):1081-1093.
- [17] Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behavioural pharmacology* 2011;22(5-6):405-414.
- [18] Gealageas R, Schneider S, Humbert J-P, Bertin I, Schmitt M, Laboureyras E, Dugave C, Mollereau C, Simonnet G, Bourguignon J-J, Simonin F, Bihel F. Development of sub-nanomolar dipeptidic ligands of neuropeptide FF receptors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2012;22(24):7471-7474.

- [19] Grosser T, Woolf CJ, FitzGerald GA. Time for nonaddictive relief of pain. *Science* (New York, NY 2017;355(6329):1026-1027.
- [20] Guillemin K, Kleczkowska P, Lesniak A, Dyniewicz J, Van der Poorten O, Van den Eynde I, Keresztes A, Varga E, Lai J, Porreca F, Chung NN, Lemieux C, Mika J, Rojewska E, Makuch W, Van Duppen J, Przewlocka B, Vanden Broeck J, Lipkowski AW, Schiller PW, Tourwe D, Ballet S. Synthesis and biological evaluation of compact, conformationally constrained bifunctional opioid agonist - neurokinin-1 antagonist peptidomimetics. *European journal of medicinal chemistry* 2015;92:64-77.
- [21] Gunther T, Dasgupta P, Mann A, Miess E, Kliewer A, Fritzwanker S, Steinborn R, Schulz S. Targeting multiple opioid receptors - improved analgesics with reduced side effects? *British journal of pharmacology* 2017;in press.
- [22] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature chemical biology* 2008;4(11):682-690.
- [23] Journigan VB, Mesangeau C, Vyas N, Eans SO, Cutler SJ, McLaughlin JP, Mollereau C, McCurdy CR. Nonpeptide small molecule agonist and antagonist original leads for neuropeptide FF1 and FF2 receptors. *Journal of medicinal chemistry* 2014;57(21):8903-8927.
- [24] Kleczkowska P, Lipkowski AW, Tourwe D, Ballet S. Hybrid opioid/non-opioid ligands in pain research. *Current pharmaceutical design* 2013;19(42):7435-7450.
- [25] Koblisch M, Carr R, 3rd, Siuda ER, Rominger DH, Gowen-MacDonald W, Cowan CL, Crombie AL, Violin JD, Lark MW. TRV0109101, a G Protein-Biased Agonist of the micro-Opioid Receptor, Does Not Promote Opioid-Induced Mechanical Allodynia following Chronic Administration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2017;362(2):254-262.
- [26] Lattanzi R, Spetea M, Schullner F, Rief SB, Krassnig R, Negri L, Schmidhammer H. Synthesis and biological evaluation of 14-alkoxymorphinans. 22.(1) Influence of the 14-alkoxy group and the substitution in position 5 in 14-alkoxymorphinan-6-ones on in vitro and in vivo activities. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48(9):3372-3378.
- [27] Li N, Han ZL, Wang ZL, Xing YH, Sun YL, Li XH, Song JJ, Zhang T, Zhang R, Zhang MN, Xu B, Fang Q, Wang R. BN-9, a chimeric peptide with mixed opioid and

- neuropeptide FF receptor agonistic properties, produces nontolerance-forming antinociception in mice. *British journal of pharmacology* 2016;173(11):1864-1880.
- [28] Lin YT, Liu HL, Day YJ, Chang CC, Hsu PH, Chen JC. Activation of NPFFR2 leads to hyperalgesia through the spinal inflammatory mediator CGRP in mice. *Experimental neurology* 2017;291:62-73.
- [29] Lutz PE, Kieffer BL. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in neurosciences* 2013;36(3):195-206.
- [30] Madariaga-Mazon A, Marmolejo-Valencia AF, Li Y, Toll L, Houghten RA, Martinez-Mayorga K. Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug discovery today* 2017;22(11):1719-1729.
- [31] Manglik A, Lin H, Aryal DK, McCorvy JD, Dengler D, Corder G, Levit A, Kling RC, Bernat V, Hubner H, Huang XP, Sassano MF, Giguere PM, Lober S, Da D, Scherrer G, Kobilka BK, Gmeiner P, Roth BL, Shoichet BK. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 2016;537(7619):185-190.
- [32] Matsumoto K, Narita M, Muramatsu N, Nakayama T, Misawa K, Kitajima M, Tashima K, Devi LA, Suzuki T, Takayama H, Horie S. Orally active opioid mu/delta dual agonist MGM-16, a derivative of the indole alkaloid mitragynine, exhibits potent antiallodynic effect on neuropathic pain in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2014;348(3):383-392.
- [33] Mazarguil H, Gouarderes C, Tafani JA, Marcus D, Kotani M, Mollereau C, Roumy M, Zajac JM. Structure-activity relationships of neuropeptide FF: role of C-terminal regions. *Peptides* 2001;22(9):1471-1478.
- [34] Michel G, Matthes HW, Hachet-Haas M, El Baghdadi K, de Mey J, Pepperkok R, Simpson JC, Galzi JL, Lecat S. Plasma membrane translocation of REDD1 governed by GPCRs contributes to mTORC1 activation. *Journal of cell science* 2014;127(Pt 4):773-787.
- [35] Nguyen T, Decker AM, Langston TL, Mathews KM, Siemian JN, Li JX, Harris DL, Runyon SP, Zhang Y. Discovery of Novel Proline-Based Neuropeptide FF Receptor Antagonists. *ACS chemical neuroscience* 2017;8(10):2290-2308.
- [36] Novoa A, Van Dorpe S, Wynendaele E, Spetea M, Bracke N, Stalmans S, Betti C, Chung NN, Lemieux C, Zuegg J, Cooper MA, Tourwe D, De Spiegeleer B, Schiller PW, Ballet S. Variation of the net charge, lipophilicity, and side chain flexibility in Dmt(1)-

- DALDA: Effect on Opioid Activity and Biodistribution. *Journal of medicinal chemistry* 2012;55(22):9549-9561.
- [37] Olson KM, Lei W, Keresztes A, LaVigne J, Streicher JM. Novel Molecular Strategies and Targets for Opioid Drug Discovery for the Treatment of Chronic Pain. *The Yale journal of biology and medicine* 2017;90(1):97-110.
- [38] Pan ZZ. μ -Opposing actions of the kappa-opioid receptor. *Trends in pharmacological sciences* 1998;19:94-98.
- [39] Papaleo F, Contarino A. Gender- and morphine dose-linked expression of spontaneous somatic opiate withdrawal in mice. *Behavioural brain research* 2006;170(1):110-118.
- [40] Pasternak GW, Pan YX. μ opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological reviews* 2013;65(4):1257-1317.
- [41] Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. *PloS one* 2009;4(5):e5425.
- [42] Pradhan AA, Walwyn W, Nozaki C, Filliol D, Erbs E, Matifas A, Evans C, Kieffer BL. Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. *J Neurosci* 2010;30(49):16459-16468.
- [43] Raehal KM, Bohn LM. beta-arrestins: regulatory role and therapeutic potential in opioid and cannabinoid receptor-mediated analgesia. *Handbook of experimental pharmacology* 2014;219:427-443.
- [44] Raehal KM, Walker JK, Bohn LM. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005;314(3):1195-1201.
- [45] Roeckel LA, Utard V, Reiss D, Mouheiche J, Maurin H, Robe A, Audouard E, Wood JN, Goumon Y, Simonin F, Gaveriaux-Ruff C. Morphine-induced hyperalgesia involves μ opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. *Scientific reports* 2017;7(1):10406.
- [46] Schneider S, Ftouni H, Niu S, Schmitt M, Simonin F, Bihel F. Rapid and scalable synthesis of innovative unnatural alpha,beta or gamma-amino acids functionalized with tertiary amines on their side-chains. *Organic & biomolecular chemistry* 2015;13(25):7020-7026.

- [47] Simonin F. Neuropeptide FF receptors as therapeutic targets. *Drugs Future* 2006;31(7):603-609.
- [48] Simonin F, Schmitt M, Laulin J-P, Laboureyras E, Jhamandas JH, MacTavish D, Matifas A, Mollereau C, Laurent P, Parmentier M, Kieffer BL, Bourguignon J-J, Simonnet G. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(2):466-471.
- [49] Simonin F, Valverde O, Smadja S, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le Meur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL. Disruption of the κ -opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective κ -agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* 1998;17:886-897.
- [50] Siuda ER, Carr R, 3rd, Rominger DH, Violin JD. Biased mu-opioid receptor ligands: a promising new generation of pain therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2017;32:77-84.
- [51] Spetea M, Bohotin CR, Asim MF, Stuegger K, Schmidhammer H. In vitro and in vivo pharmacological profile of the 5-benzyl analogue of 14-methoxymetopon, a novel mu opioid analgesic with reduced propensity to alter motor function. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2010;41(1):125-135.
- [52] Starnowska J, Guillemyn K, Makuch W, Mika J, Ballet S, Przewlocka B. Bifunctional opioid/nociceptin hybrid KGNOP1 effectively attenuates pain-related behaviour in a rat model of neuropathy. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2017;104:221-229.
- [53] Talevi A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the "skeleton key approach" from a medicinal chemist perspective. *Frontiers in pharmacology* 2015;6:205.
- [54] Tan PP, Chen JC, Li JY, Liang KW, Wong CH, Huang EY. Modulation of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndromes in rats by neuropeptide FF analogs. *Peptides* 1999;20(10):1211-1217.

- [55] Von Korff M, Saunders K, Thomas Ray G, Boudreau D, Campbell C, Merrill J, Sullivan MD, Rutter CM, Silverberg MJ, Banta-Green C, Weisner C. De facto long-term opioid therapy for noncancer pain. *The Clinical journal of pain* 2008;24(6):521-527.
- [56] Yang HY, Fratta W, Majane EA, Costa E. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82(22):7757-7761.

Figures & Tables

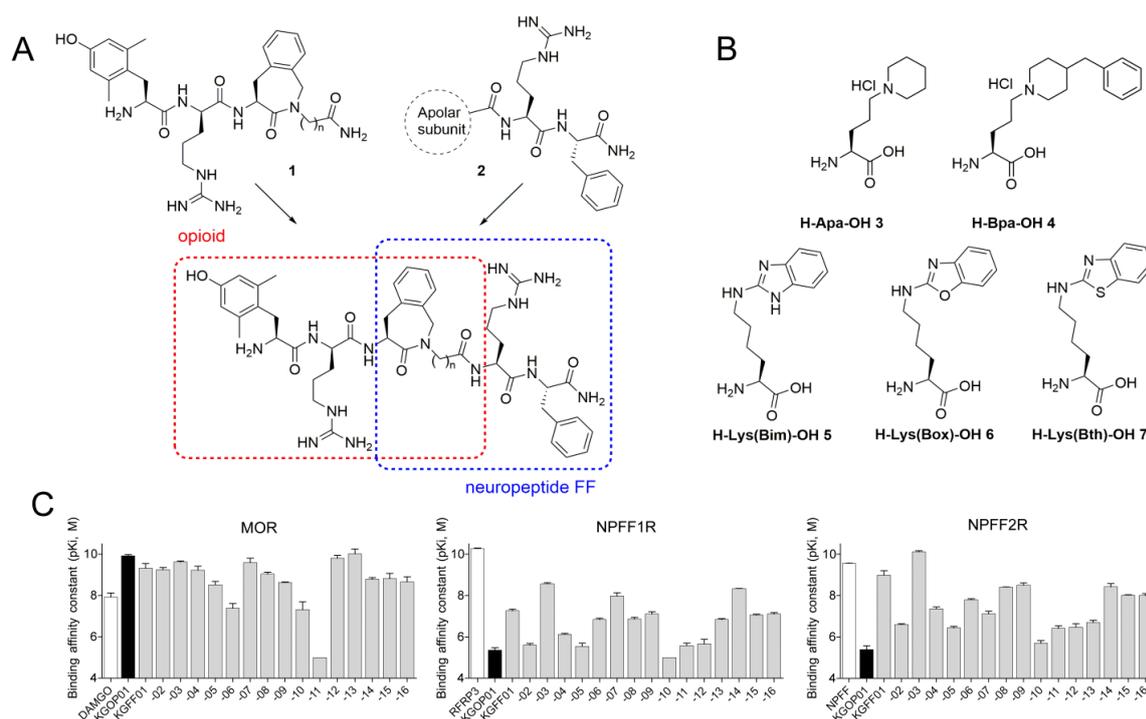


Figure 1: Design strategy and in vitro screening of KGFF peptidomimetics for affinity at MOPr, NPFF1R and NPFF2R.

A: KGFF compounds combining the opioid ligand KGOP01 and NPFF ligand pharmacophores. From this strategy, 16 compounds were synthesized and screened in vitro for their affinity for the MOPr, NPFF1R and NPFF2R.

B: Chemical diversity at the NPFF ligand pharmacophore with Arg mimetics / Orn derivatives serving as Arg mimetics for the NPFF ligand pharmacophore.

C: Binding affinity constants (pK_i values) were determined in radioligand competition binding assays with membranes from CHO cells expressing hMOPr, hNPFF1R or hNPFF2R. Values are mean \pm SEM of at least 2 independent experiments performed in duplicate. See also Table S1.

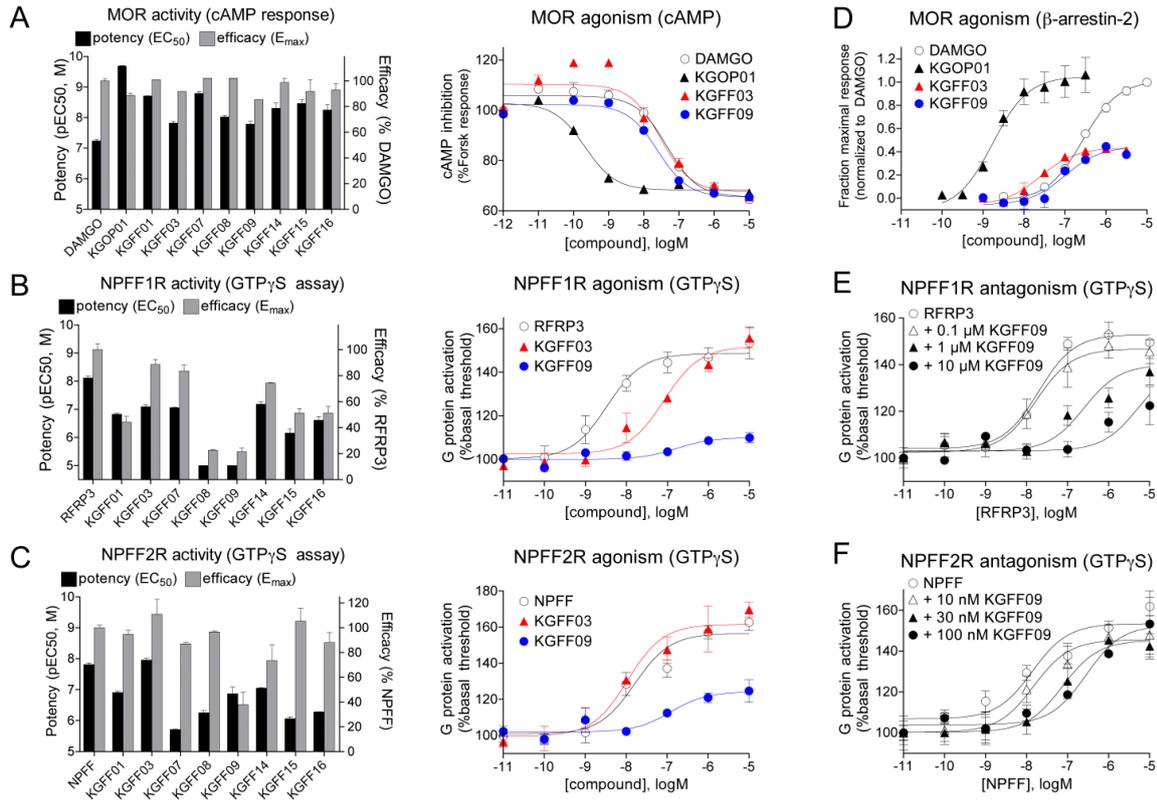


Figure 2: In vitro functional characterization of KGFF peptidomimetics.

A: Inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation in HEK293-Glo20F-hMOPr cells.

B, E: hNPFF1R activation measured by [³⁵S]-GTP_γS binding with membranes from CHO-hNPFF1R cells.

C, F: hNPFF2R activation measured by [³⁵S]-GTP_γS binding with membranes from CHO-hNPFF2R cells.

D: eYFP-labelled β-arrestin-2 translocation to Rluc-hMOPr in HEK293 cells. Agonist specific BRET1 ratio were determined by subtracting BRET1 ratio of non-activated cells, and normalized to the maximal effect of DAMGO.

(**A, B, C**) Potency constants (pEC₅₀) and efficacy values (E_{max}) are shown on left panels and representative experiments for KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on right panels, see also Table S2. Efficacy values (E_{max}) are relative to DAMGO (**A**), RFRP3 (**B**) or NPFF (**C**) response. NPFF1R (**E**) and NPFF2R (**F**) antagonisms were assessed with RFRP3 or NPFF dose-response curve, respectively, in the presence of increasing KGFF09 concentrations, see also Figure S1. Values are mean ± SEM of at least 2 independent experiments performed in duplicate or triplicate.

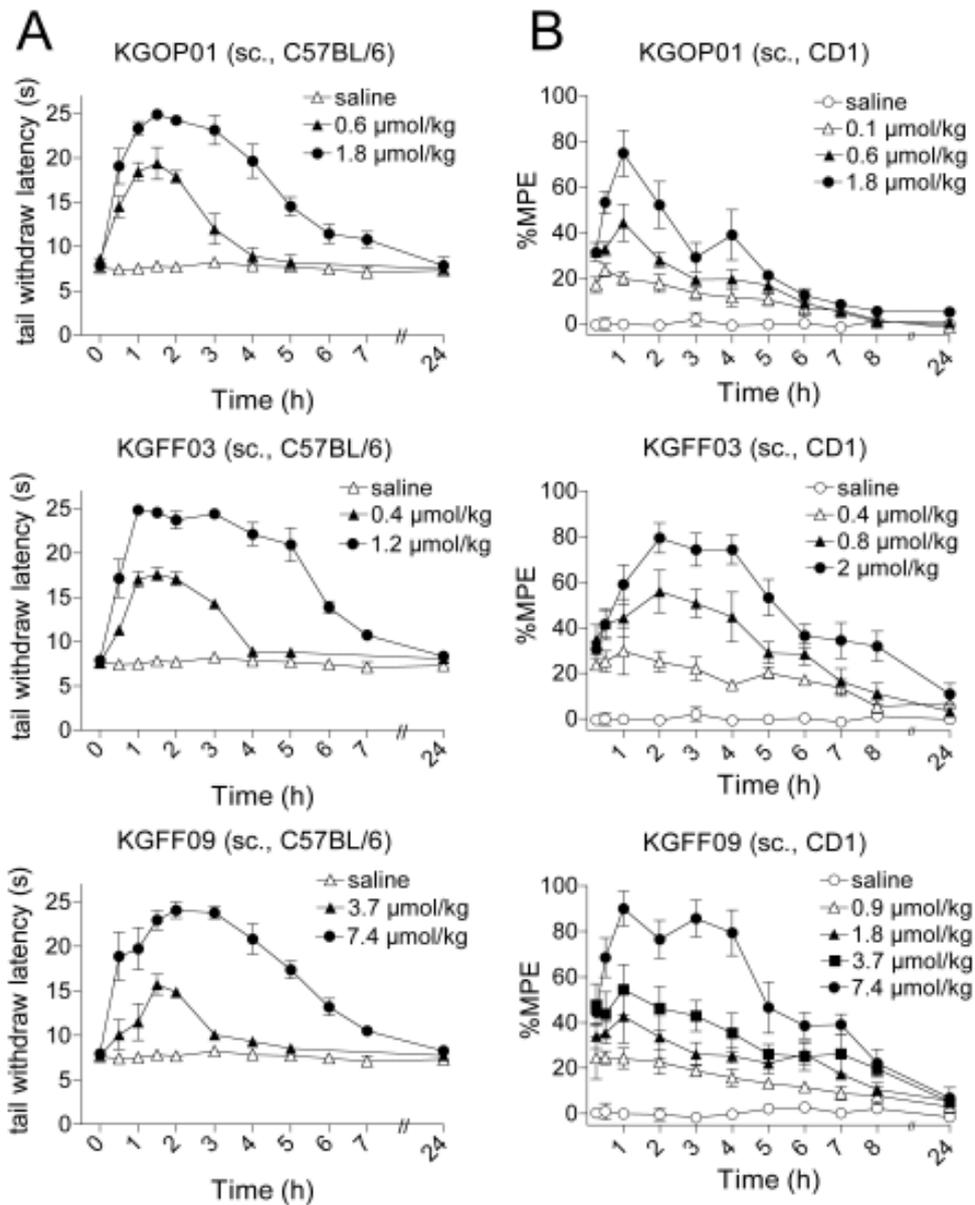


Figure 3: Antinociceptive effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 after acute sc. administration to mice.

A: Time- and dose-dependent analgesic effects of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 in the tail immersion test after sc. administration in C57BL/6N mice. Withdrawal latencies are expressed in seconds and presented as mean \pm SEM (n = 6-7).

B: Time- and dose-dependent analgesic effects of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 in the radiant tail-flick test after sc. administration in CD1 mice. Tail-flick latencies (as %MPE) are shown as mean \pm SEM (n = 6-8).

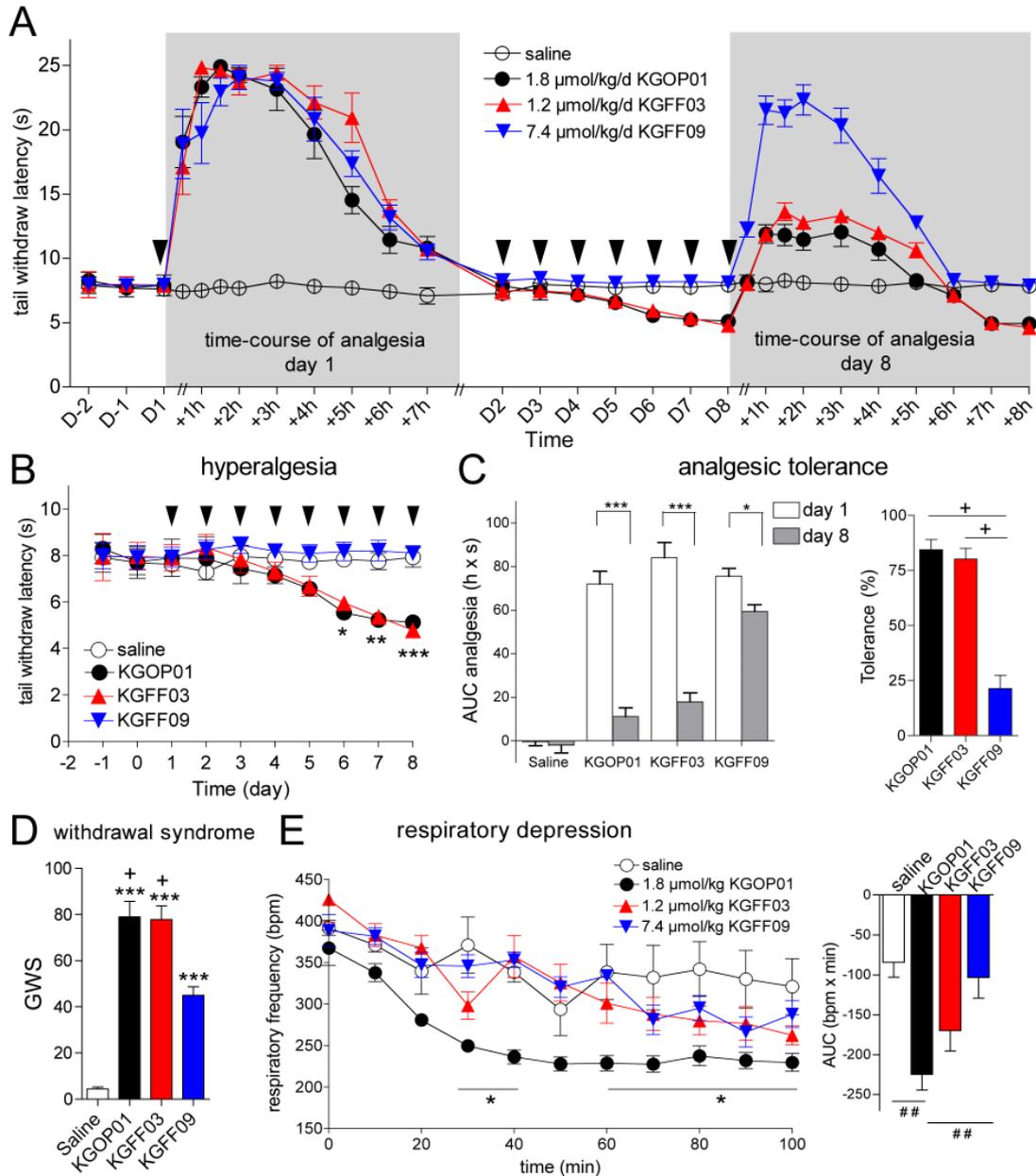


Figure 4: Adaptive responses induced by KGOP01, KGFF03 and KGFF09 after chronic sc. treatment of mice.

A: Development of hyperalgesia and analgesic tolerance upon chronic treatment with KGOP01, KGFF03 and KGFF09. C57BL/6N mice received daily (d1 to d8) injections of KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg}$, sc.) or saline (A, B, C).

B: Development of hyperalgesia upon chronic treatment of C57BL/6N mice with KGOP01, KGFF03 and KGFF09. Basal nociceptive values were measured for two days before drug treatment and once daily before drug administration (d1 to d8), using the tail immersion test. Each day of injection is shown with an arrowhead.

C: Development of analgesic tolerance upon chronic treatment of C57BL/6N mice with KGOP01, KGFF03 and KGFF09. Comparison between groups of area-under-the-curve (AUC) values over the 0-7h time course is shown on the left panel and development of tolerance (%) at day 8 relative to day 1 on the right panel.

D: Effect of KGOP01, KGFF03 or KGFF09 on naltrexone-precipitated withdrawal signs after chronic treatment of C57BL/6N mice. The different signs of withdrawal were measured over 30 min immediately after naltrexone injection (1 mg/kg, sc.) and a global withdrawal score (GWS) was calculated. KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg}$, sc.) and KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg}$, sc.) were administered twice daily for 7 days. See also Figure S3.

E: Effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on respiratory frequency after sc. administration to C57BL/6N mice, measured by whole body mouse plethysmography immediately after injection of KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg}$, sc.) or saline (sc.). Comparison between groups of respiratory frequency (left panel) and area-under-the curve (AUC, right panel) values over the 100 min kinetics are shown.

Data are expressed as mean \pm SEM. Groups were compared using one-way (C right panel, and D, E right panel) or two-way (B, C left panel, and E left panel) ANOVA with Bonferroni post hoc test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared to saline, ## $p < 0.01$ as compared to KGOP01, + $p < 0.001$ as compared to KGFF09.

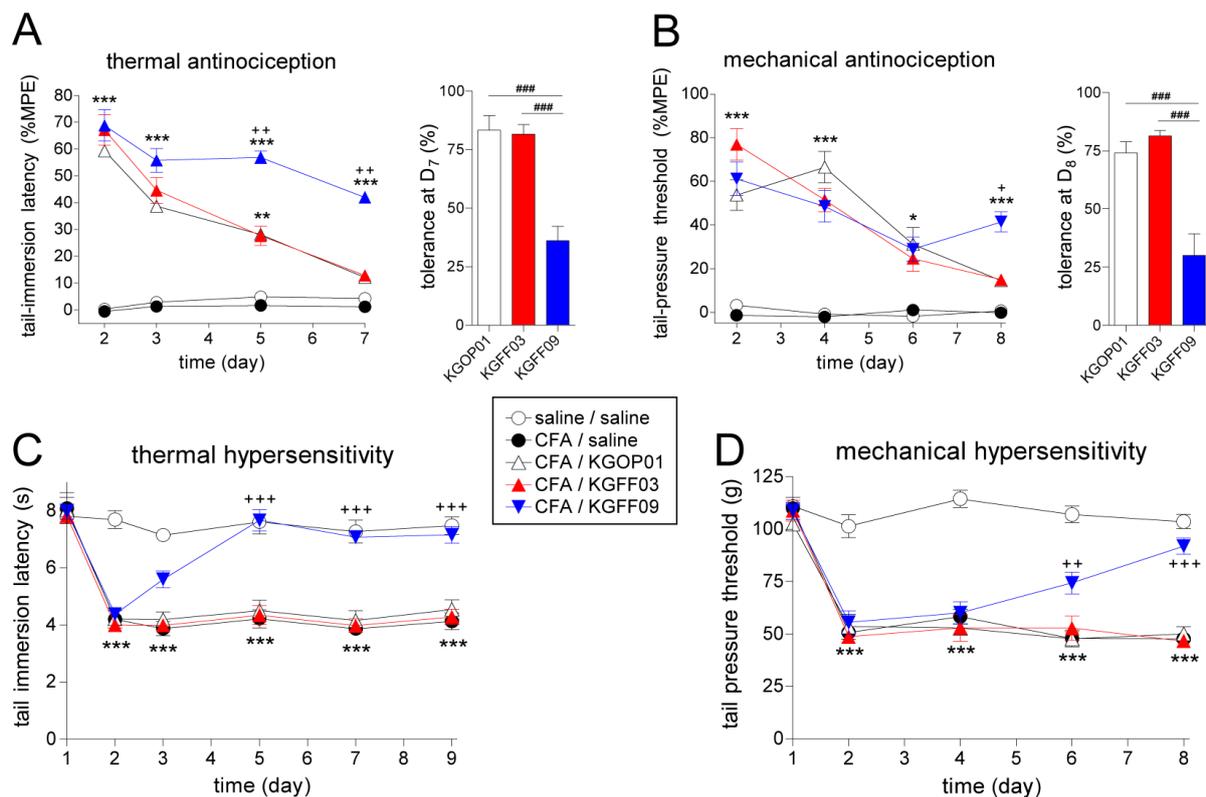


Figure 5: KGFF09 induces antinociception with reduced tolerance and anti-hyperalgesia in mice with inflammatory pain.

C57BL/6N mice were injected on day 1 with CFA or saline in the tail, and then daily administered with KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg/d}$, sc.), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg/d}$, sc.), KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg/d}$, sc.) or saline (sc., CFA/saline and saline/saline).

A: Analgesic tolerance to the thermal antinociceptive effect was measured 2 h after daily sc. administration on days 2 – 3 – 5 – 7 by the tail immersion test. Comparison between groups of the %MPE (left panel) and tolerance (%) at day 7 relative to day 2 (right panel) are shown.

B: Analgesic tolerance to the mechanical antinociceptive effect was measured 2 h after daily sc. injection on days 2 – 4 – 6 – 8 by the tail pressure test. Comparison between groups of percentage of the %MPE (left panel) and tolerance (%) at day 8 relative to day 2 (right panel) are shown.

C, D: Anti-hyperalgesic activity of KGOP01, KGFF03 and KGFF09. Basal nociceptive thresholds were measured by the tail immersion test (C) or tail pressure test (D) once daily before drug administration to visualize CFA-induced pain hypersensitivity.

Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 8-10$. Statistical significance was calculated with two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test $*p < 0.5$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs saline mice, $+p < 0.5$, $++p < 0.01$, $+++p < 0.001$ vs KGOP01, and with one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test $###p < 0.001$ vs KGFF09.

Supplemental Digital Content:

Materials and Methods Supplemental Digital Content 1, which describes peptide characterization and synthesis of the arginine mimetics and ornithine mimetics.

Table Supplemental Digital Content 2, which summarize affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R.

Table Supplemental Digital Content 3, which summarize agonist activity constants (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for MOPr, NPFF1R, and NPFF2R.

Figure Supplemental Digital Content 4, which shows in vitro characterization of KGFF03 and KGFF09 on NPFFRs.

Table Supplemental Digital Content 5, which summarize binding affinity constant (K_i) values and agonist activity constant (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for human DOPr, KOPr, and NOPr.

Figure Supplemental Digital Content 6, which shows in vitro characterization of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on opioid receptors.

Table Supplemental Digital Content 7, which summarize affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for GPR10, GPR54 and GPR103.

Figure Supplemental Digital Content 8, which shows effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on naltrexone-precipitated withdrawal signs after chronic exposure in mice.

Figure Supplemental Digital Content 9, which shows effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 on gastro-intestinal motility and motor coordination.

Figure Supplemental Digital Content 10, which shows acute antinociceptive time-course of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 in CFA-induced pain model.

SDC Material and Methods

Materials

Naltrexone hydrochloride, forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), [D-Ala²,Me-Phe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin (DAMGO), probenecid and Complete Freund's Adjuvant (CFA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Glass bead were purchased from SigmaAldrich Chemicals (St; Louis, MO, USA). [D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin (DPDPE) and dynorphin were obtained from Abcam (Paris, France), nociception from Polypeptide (Strasbourg, France), morphine hydrochloride from Francopia (Paris, France) and the Fluo-4 acetoxymethyl ester from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Human RF-amide peptides were obtained from Genecust (Luxembourg; Kp-10, NPFF, QRFP26 or 26RFa, PrRP-20 and RFRP-3). [¹²⁵I]-1-DMe-NPFF (2200 Ci/mmol) and [³H]-PrRP-20 (150 Ci/mmol) were obtained from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany). [³⁵S]Guanosine 5'-O-[γ-thio] triphosphate ([³⁵S]GTPγS; 1250 Ci/mmol), [³H]-diprenorphine (42.3Ci/mmol), [³H]-nociceptine (114.7Ci/mmol), [¹²⁵I]-Kp-10 (2200 Ci/mmol) and [¹²⁵I]-QRFP43 (2200 Ci/mmol) were purchased from Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Courtaboeuf, France) and Luciferin from Synchem UG & Co KG (Felsberg, Germany). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial sources.

Synthesis and compound characterization

General

Thin-layer chromatography (TLC) was performed on glass plates precoated with silica gel 60F254 (Merck, Darmstadt, Germany) using the mentioned solvent systems. Mass Spectrometry (MS) was done on a Micromass Q-ToF Micro spectrometer with electrospray ionisation (ESI). Data collection and spectrum analysis was done with Masslynx software. Analytical RP-HPLC was performed using a Waters 717plus Autosampler, a Waters 1525 Binary HPLC Pump and a Waters 2487 Dual Absorbance Wavelength Detector (Milford, MA), with a Grace (Deerfield, IL) Vydac RP C18 column (25 cm x 4.6 mm x 5 m) using UV detection at 215 nm. The mobile phase is a mixture of water and acetonitrile and contains 0.1% TFA. The used gradient runs from 3 to 100% acetonitrile in 20 minutes at a flow rate of 1 mL/min. Preparative RP-HPLC purification was done on a Gilson (Middleton, WI) HPLC system with Gilson 322 pumps, controlled by the software package Unipoint, and a reversed phase C18 column (Discovery®BIO SUPELCO Wide Pore C18 column, 25 cm x 2.21 cm, 5

mm) with a linear gradient of 1%/min increase of acetonitrile in water (both having 0.1% TFA). After purification, the purity of all compounds was evaluated as being more than 95% by analytical RP-HPLC. All fractions were lyophilized using a Flexy-Dry lyophilizer (FTS Systems, Warminster, PA). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 500 and 125 MHz on a Bruker Avance II 500 or at 400 and 100.62 MHz on a Bruker Avance 400 (Bruker Corp, Billerica, MA). Tetramethylsilane (TMS) or residual solvent signals are used as internal standard. The solvent used is mentioned in all cases, and the abbreviations used are as follows: s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quadruplet) and m (multiplet).

Peptide characterization

H-Dmt-D-Arg-Aba-Gly-Arg-Phe-NH₂ (**KGFF01**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 15%). HPLC: $t_{\text{R}} = 9.9$ min. TLC Rf 0.69 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 884.4915 [M+ H]⁺, [C₄₄H₆₁N₁₃O₇ + H⁺] required 884.4890.

H-Dmt-D-Arg-Aba-Gly-Arg-Phe-OH (**KGFF02**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 20%). HPLC: $t_{\text{R}} = 10.4$ min. TLC Rf 0.65 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 885.4764 [M + H]⁺, [C₄₄ H₆₀ N₁₂O₈ + H⁺] required 885.4730.

H-Dmt-D-Arg-Aba- β -Ala-Arg-Phe-NH₂ (**KGFF03**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 18%). HPLC: $t_{\text{R}} = 10.0$ min. TLC Rf 0.67 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 898.5076 [M + H⁺], [C₄₅H₆₃N₁₃O₇ + H⁺] required 898.5046.

H-Dmt-D-Arg-Aba-Gly-Orn-Phe-NH₂ (**KGFF04**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 17%). HPLC: $t_{\text{R}} = 9.9$ min. TLC Rf 0.67(EBAW). HRMS(ESP⁺) found m/z 842.4694 [M+ H]⁺, [C₄₃H₅₉N₁₁O₇ + H⁺] required 842.4672.

H-Dmt-D-Arg-Phe-Orn-Phe-NH₂ (**KGFF05**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 27%). HPLC: $t_{\text{R}} = 10.1$ min. TLC Rf 0.67 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 773.4477 [M + H]⁺, [C₄₀H₅₆N₁₀O₆ + H⁺] required 773.4457.

H-Dmt-Arg-Phe-NH₂ (**KGFF06**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 44%). HPLC: $t_{\text{R}} = 10.1$ min. TLC Rf 0.68 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 512.2994 [M + H⁺], [C₂₆H₃₇N₇O₄ + H⁺] required 512.2980.

H-Dmt-D-Arg-Phe-NH₂ (**KGFF07**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 63%). HPLC: $t_{\text{R}} = 8.9$ min. TLC Rf 0.71 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 512.2977 [M + H⁺], [C₂₆H₃₇N₇O₄ + H⁺] required 512.2980.

H-Dmt-D-Arg-Aba- β -Ala-Apa-Phe-NH₂ (**KGFF08**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 20%). HPLC: $t_R = 10.2$ min. TLC Rf 0.46 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 924.5476 [M + H⁺], [C₄₉H₆₉N₁₁O₇ + H⁺] required 924.5454.

H-Dmt-D-Arg-Aba- β -Ala-Bpa-Phe-NH₂ (**KGFF09**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 17%). HPLC: $t_R = 12.0$ min. TLC Rf 0.67 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 1014.5931 [M + H⁺], [C₅₆H₇₅N₁₁O₇ + H⁺] required 1014.5923.

H-Dmt-Apa-Phe-NH₂ (**KGFF10**). Preparative RP-HPLC yielded the desired powder, (25%). HPLC: $t_R = 10.0$ min. TLC Rf 0.43 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z [C₃₀H₄₃N₅O₄ + H⁺] required 538.3388.

H-Dmt-Bpa-Phe-NH₂ (**KGFF11**). Preparative RP-HPLC yielded the desired powder, (9%). HPLC: $t_R = 12.0$ min. TLC Rf 0.70 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z [C₃₇H₄₉N₅O₄ + H⁺] required 628.3857.

H-Dmt-D-Arg-Aba-NH (**KGFF12**). Preparative RP-HPLC yielded the desired powder, (15%). HPLC: $t_R = 9.0$ min. TLC Rf 0.66 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z [C₂₇H₃₇N₇O₄ + H⁺] required 524.2980.

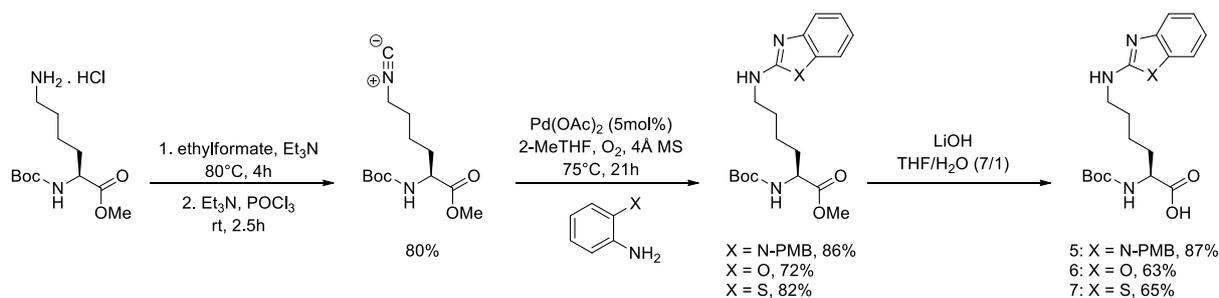
H-Dmt-D-Arg-Phe-NHMe (**KGFF13**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 8%). HPLC: $t_R = 9.0$ min. TLC Rf 0.66 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 526.3140 [M + H⁺], [C₃₁H₃₉F₆N₇O₆ + H⁺] required 526.3136.

H-Dmt-D-Arg-Aba- β -Ala-Lys(Bim)-Phe-NH₂ (**KGFF14**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 22%). HPLC: $t_R = 11.2$ min. TLC Rf 0.69 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 986.5317 [M + H⁺], [C₅₂H₆₇N₁₃O₇ + H⁺] required 986.5359.

H-Dmt-D-Arg-Aba- β -Ala-Lys(Box)-Phe-NH₂ (**KGFF15**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 43%). HPLC: $t_R = 11.3$ min. TLC Rf 0.74 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 987.5257 [M + H⁺], [C₅₂H₆₆N₁₂O₈ + H⁺] required 987.5200.

H-Dmt-D-Arg-Aba- β -Ala-Lys(Bth)-Phe-NH₂ (**KGFF16**). Preparative RP-HPLC yielded the desired compound (white powder, 39%). HPLC: $t_R = 11.4$ min. TLC Rf 0.70 (EBAW). HRMS (ESP⁺) found m/z 1003.4985 [M + H⁺], [C₅₂H₆₆N₁₂O₇S + H⁺] required 1003.4970.

Synthesis of the arginine mimetics



Synthesis of Boc-Lys(NC)-OMe

Boc-Lys-OMe hydrochloride (3.00 g, 10.1 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in ethylformate (28.8 mL, 35.5 mmol, 35 equiv.). To this solution, triethylamine (1.4 mL, 10.1 mmol, 1.0 equiv.) was added and stirred for 4 h at 80 °C. After cooling down to room temperature, the mixture was evaporated in vacuo. The crude formamide was obtained as a white solid and used without further purification. The formamide was dissolved in dry CH₂Cl₂ (20 mL) and triethylamine (7.0 mL, 50.5 mmol, 5.0 equiv.) was added to this solution. The solution was flushed with argon and cooled to 0 °C. Subsequently, phosphoryl chloride (1.4 mL, 15.2 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise while stirring. After the addition, the ice bath was removed and the mixture was stirred for an additional 2.5 h at room temperature. The mixture was poured in cold water (30 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). The combined organic layers were washed with water and brine (2 x 30 mL) and dried over MgSO₄. After concentration, the product was purified by flash chromatography using heptane/EtOAc (1/1) as eluent. (*S*)-methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-isocyano-hexanoate was obtained in 80 % yield. Yield: 80% (yellow oil, 3.64 g); Formula: C₁₃H₂₂N₂O₄; MW = 270.32 g/mol; TLC Rf: = 0.59 (EtOAc/heptane 1/1); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) in ppm δ: 1.44 (s, 9H), 1.48-1.55 (m, 2H), 1.63-1.72 (m, 3H), 1.82-1.89 (m, 1H), 3.39 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 4.31 (br s, 1H), 5.04 (br s, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) in ppm δ: 22.1, 28.3, 28.5, 32.0, 41.3 (t, J= 6.4 Hz), 52.4, 53.0, 80.1, 155.4, 156.4, 172.9.

Synthesis of Boc-Lys(Bim-PMB)-OMe

A 25 mL Kjeldahl flask was flame dried under vacuum and refilled with argon. Subsequently, the vial was charged with Pd(OAc)₂ (11 mg, 0.05 mmol, 0.05 equiv.), *N*-(*p*-methoxybenzyl)-*o*-phenylenediamine (228 mg, 1.00 mmol, 1.0 equiv.) and 4 Å molecular sieves (300 mg). The flask was equipped with a reflux condenser, evacuated and back filled with O₂ (three times). (*S*)-methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-isocyano-hexanoate (324 mg, 1.20 mmol, 1.2

equiv.) was dissolved in 2-MeTHF (1 mL) in a separate vial under argon. This mixture was added to the Kjeldahl flask followed by 2-MeTHF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at 75 °C under O₂ atmosphere for 21 h. After cooling down to room temperature, the solution was filtered through celite using EtOAc (50 mL) and concentrated in vacuo. The product was purified by automated flash chromatography applying a heptane/EtOAc gradient (from 100% heptane to 10% EtOAc, 25 mL/min). Methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-((1-(4-methoxybenzyl)-1H-benzimidazol-2-yl)amino)hexanoate was obtained in 86% (425 mg) yield. Yield: 86% (brown oil, 425 mg); Formula: C₂₇H₃₆N₄O₅; MW = 496.60 g/mol; TLC R_f = 0.61 (acetone/heptane 1/4); HPLC: t_R = 14.8 min; HRMS (ES⁺): found 497.2744, calculated 497.2758 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz) in ppm δ: 1.23-1.40 (m,4H), 1.43(s,9H), 1.57-1.67 (m,4H), 1.75-1.81 (m, 2H), 3.47 (q, J=6.5 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 4.01 (br s, 1H), 4.25 (br s, 1H), 5.02 (br s, 3H), 6.85-6.88 (m, 2H), 7.01-7.14 (m, 5H), 7.51 (d, J=7.8 Hz, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) in ppm δ: 22.5, 28.2, 29.1, 32.2, 42.9, 45.0, 52.0, 53.2, 55.1, 79.7, 107.1, 114.4, 116.2, 119.5, 121.1, 127.3, 127.7, 134.6, 142.1, 154.2, 155.3, 159.3, 173.1.

Synthesis of Boc-Lys(Box)-OMe

A 25 mL Kjeldahl flask was flame dried under vacuum and refilled with argon. Subsequently, the vial was charged with Pd(OAc)₂ (11 mg, 0.05 mmol, 0.05 equiv.), 2-aminophenol (109 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) and 4 Å molecular sieves (300 mg). The flask was equipped with a reflux condenser, evacuated and back filled with O₂ (three times). (S)-methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6- isocyanohexanoate (324 mg, 1.20 mmol, 1.2 equiv.) was dissolved in 2-MeTHF (1 mL) in a separate vial under argon. This mixture was added to the Kjeldahl flask followed by 2-MeTHF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at 75 °C under O₂ atmosphere for 21 h. After cooling down to room temperature, the solution was filtered through celite using EtOAc (50 mL) and concentrated in vacuo. The product was purified by an automated flash chromatography applying a heptane/EtOAc gradient (from 100% heptane to 10% EtOAc, 25 mL/min). Tert-butyl 6-(benzoxazol-2-ylamino)-2-((methoxycarbonyl)amino)hexanoate was obtained in 72% (270 mg) yield. Yield: 72% (brown solid, 270 mg); Formula: C₁₉H₂₇N₃O₅; MW = 377.43 g/mol; TLC R_f = 0.32 (EtOAc/heptane 1/1); HPLC t_R = 13.0 min; HRMS (ES⁺): found 378.2000, calculated 378.2023 [M+H]⁺; ¹H-NMR(CDCl₃,400MHz) in ppm δ =1.44-1.51(s,11H), 1.64-1.90(m,4H), 3.48(m,2H), 4.73(s,3H), 4.32 (br s, 1H), 5.08 (s, 2H), 7.02 (td, J=7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.15 (td, J=7.7, 0.8 Hz, 1H), 7.22 (d, J=7.9 Hz, 1H), 7.36 (d, J=7.7 Hz, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) in ppm δ:

22.6, 28.5, 29.2, 32.8, 43.0, 52.5, 53.2, 80.2, 108.8, 116.5, 121.0, 124.0, 143.2, 148.7, 155.7, 162.2, 173.3.

Synthesis of Boc-Lys(Bth)-OMe

A 25 mL Kjeldahl flask was flame dried under vacuum and refilled with argon. Subsequently, the vial was charged with Pd(OAc)₂ (11 mg, 0.05 mmol, 0.05 equiv.), 2-aminothiophenol (107 μl, 1.00 mmol, 1.0 equiv.) and 4 Å molecular sieves (300 mg). The flask was equipped with a reflux condenser, evacuated and back filled with O₂ (three times). (S)-methyl-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-isocyanoheptanoate (324 mg, 1.20 mmol, 1.2 equiv.) was dissolved in 2-MeTHF (1 mL) in a separate vial under argon. This mixture was added to the Kjeldahl flask followed by 2-MeTHF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred at 75 °C under O₂ atmosphere for 21 h. After cooling down to room temperature, the solution was filtered through celite using EtOAc (50 mL) and concentrated in vacuo. The product was purified by an automated flash chromatography applying a heptane / EtOAc gradient (from 100% heptane to 10% EtOAc, 25 mL/min). Tert-butyl 6-(benzothiazol-2-ylamino)-2-((methoxycarbonyl)amino)hexanoate was obtained in 80% yield. Yield: 80% (white solid, 316 mg); Formula: C₁₉H₂₇N₃O₄S; MW: 393.50 g/mol; TLC R_f: = 0.61 (EtOAc/heptane 1/2); HPLC: t_R = 13.1 min; HRMS (ES⁺): found 394.1779, calculated 394.1795 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) in ppm δ: 1.44-1.48 (m, 10H), 1.50-1.67 (m, 3H), 1.84-1.89 (m, 1H), 3.44 (t, J=6.8 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 4.32 (br s, 1H), 5.07 (br s, 1H), 5.41 (br s, 1H), 7.07 (td, J= 7.6, 0.9 Hz, 1H), 7.26-7.30 (m, 1H), 7.53 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.57 (d, J=7.8 Hz, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) in ppm δ: 22.8, 28.5, 29.1, 31.0, 32.8, 45.3, 52.5, 53.2, 80.2, 119.1, 120.9, 121.7, 126.1, 130.6, 152.7, 167.4, 173.3.

Boc-Lys(Bim-PMB)-OH

Boc-Lys(Bim,PMB)-OMe (250 mg, 0.50 mmol) was dissolved in a mixture of THF/H₂O (7:1, total 3.2 mL). Lithium hydroxide monohydrate (148 mg, 3.52 mmol, 7 equiv.) was added and continuously stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated by evaporation and resuspended in H₂O (10 mL). The aqueous phase was washed with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL) and carefully acidified to pH = 3, as indicated by pH paper, with 1N HCl. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). The combined organic layers were collected, washed with brine (1x 20 mL) and dried over MgSO₄, filtered and concentrated to obtain the

corresponding carboxylic acid as a pink solid in 87% yield. The building block was used in Boc-based SPPS without further purification. Yield: 87% (211 mg); HPLC: $t_R = 14.0$ min; HRMS: (ES^+): found 483.2580, calculated 493.2602 $[M+H]^+$.

Boc-Lys(Box)-OH

Boc-Lys(Box)-OMe (190 mg, 0.50 mmol) was dissolved in a mixture of THF/H₂O (7:1, total 3.2 mL). Lithium hydroxide monohydrate (148 mg, 3.52 mmol, 7 equiv.) was added and continuously stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated by evaporation and resuspended in H₂O (10 mL). The aqueous phase was washed with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL) and carefully acidified to pH = 3, as indicated by pH paper, with 1N HCl. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). The combined organic layers were collected and washed with brine (1 x 20 mL) and dried over MgSO₄, filtered and concentrated to obtain the corresponding carboxylic acid as a pink solid in 74% yield (135 mg). The building block was used in Boc-based SPPS without further purification. Yield: 74% (135 mg); HPLC: $t_R = 11.8$ min; HRMS (ES^+): found 364.1867, calculated 364.1867 $[M+H]^+$.

Boc-Lys(Bth)-OH

Boc-Lys(Bth)-OMe (198 mg, 0.50 mmol) was dissolved in a mixture of THF/H₂O (7:1, total 3.2 mL). Lithium hydroxide monohydrate (148 mg, 3.52 mmol, 7 equiv.) was added and continuously stirred for 16 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated by evaporation and resuspended in H₂O (10 mL). The aqueous phase was washed with CH₂Cl₂ (2 x 5 mL) and carefully acidified to pH = 3, as indicated by pH paper, with 1N HCl. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). The combined organic layers were collected and washed with brine (1 x 20 mL) and dried over MgSO₄, filtered and concentrated to obtain the corresponding carboxylic acid as a pink solid in 72% yield. The building block was used in Boc-based SPPS without further purification. Yield: 72% (138 mg); HPLC: $t_R = 12.1$ min; HRMS (ES^+): found 380.1617, calculated 380.1638 $[M+H]^+$.

Chiral derivatization of Boc-Lys(Bim,PMB)-OH, Boc-Lys(Box)-OH and Boc-Lys(Bth)-OH with Marfey's reagent (FDAA)

The chiral derivatization was performed starting from the *N*-Boc-protected substrates. Compounds (10 mg) are treated with a cocktail of TFA/CH₂Cl₂ (1:1) for 1 h and concentrated. The crude was redissolved in H₂O with a minimal amount of AcN and lyophilized to obtain the deprotected mimetics as white to off-white solids in quantitative yields. The samples were analyzed via LC/MS and used without further purification.

Subsequently, the enantiomeric purity was checked via chiral derivatization with Marfey's reagent (FDAA). For this, a stock solution of 20.0 mM FDAA in acetone was prepared (5.44 mg FDAA/1 mL acetone). The analyte (1 mg) was dissolved in 1 mL 1 M NaHCO₃. Two equiv. of the stock solution were added to 100 μL of the analyte solution and the mixture was incubated at 40°C overnight. After quenching with 100 μL of a 1 M HCl solution, the sample was diluted to 1 mL with water and analyzed by LC-MS. Integration of the peak area (340 nm) gave an estimate of the enantiomeric excess. The derivatized product was obtained as a single peak, indicating that no epimerization took place during the synthesis.

Further analysis of the enantiomeric excess was performed by coupling of Boc-Lys(Bim-PMB)-OH to HCl.H-Ala-OMe by use of EDC/HOAt (1.6 equiv.) to yield the dipeptide. Analysis via HPLC showed only one single peak and NMR did not show any trace of the other diastereomer.

Synthesis of 4-amino-tetrahydro-aminobenzazepinon (Aba)-NH

N-Boc-ortho-aminomethyl-L-Phe (507 mg, 1.72 mmol, 1 equiv.), was submitted to an intramolecular cyclization [1]. The product was dissolved in 172 mL of CH₂Cl₂ (10 mM) and EDC.HCl (495 mg, 2.58 mmol, 1.5 equiv.), Et₃N (601 μL, 4.31 mmol, 2.5 equiv.) and HOBT.H₂O (396 mg, 2.58 mmol, 1.5 equiv.) were added. The reaction was stirred for 16 h and then the organic phase was washed with 20% citric acid and sat. NaHCO₃-solution. The solvent was dried with MgSO₄ and evaporated. The product was purified by flash chromatography using ethyl acetate/petroleum ether (4/6) to give a white solid in 19% yield. Yield: 19% (92.4 mg); Formula: C₁₅H₂₀N₂O₃; MW = 276.15g/mol; TLC R_f = 0.34 (EtOAc/petroleum ether4/6); HPLC t_R = 13.9 min; MS (ES⁺): 277 [M + H]⁺, 299 [M + Na]⁺, 177 [M - Boc]⁺; Melting interval 149.0-150.5°C; ¹H-NMR (CDCl₃, 500MHz) in ppm δ: 1.46 (9H, s, Boc), 2.97 (1H, dd, ²J=16.7Hz, ³J=13.0Hz, H_δ), 3.41 (1H, dd, ²J= 16.9 Hz, ³J= 3.2 Hz, H_δ), 3.96 (1H, dd, ²J= 16.7 Hz, ³J= 7.1 Hz, H_δ), 4.85 (1H, dd, ²J= 16.5 Hz, ³J= 3.8 Hz, H_δ), 5.86 (1H, d, ²J= 5.8 Hz, NH), 7.01 (1H, d, ³J= 7.5 Hz, CH arom.), 7.10 (2H, m, CH arom.), 7.19 (1H, m, CH arom.); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) in ppm δ: 28.6 (Boc), 37.2 (η-CH₂), 46.0 (η-CH₂), 49.4 (η-CH), 79.9

(Cq Boc), 126.5 (CH arom.), 128.0 (CH arom.), 128.4 (CH arom.), 131.3 (CH arom.), 134.2 (Cq arom.), 135.7 (Cq arom.), 155.4 (C=O Boc), 174.4 (C=O Aba).

The product could be deprotected with 50% TFA in CH₂Cl₂ for 2 h and directly coupled to the dipeptide.

References

- [1] Van Rompaey K, Van den Eynde I, de Kimpe N, Tourwe D. A versatile synthesis of 2-substituted 4-amino-1,2,4,5-tetrahydro-2-benzazepine-3-ones. *Tetrahedron letters* 2003;59(24):4421-4432.

Table SDC2: Binding affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for human MOPr, NPFF1R and NPFF2R.

| compound | $K_i \pm \text{SEM}$ (nM) | | |
|----------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| | MOPr | NPFF1R | NPFF2R |
| DAMGO | 14.6 \pm 3.8 | nd | nd |
| RFRP3 | nd | 0.053 \pm 0.003 | nd |
| NPFF | nd | nd | 0.28 \pm 0.16 |
| KGOP01 | 0.12 \pm 0.02 | 4,600 \pm 1,300 | 4,500 \pm 1,800 |
| KGFF01 | 0.59 \pm 0.21 | 57 \pm 10 | 1.2 \pm 0.5 |
| KGFF02 | 0.59 \pm 0.15 | 2,540 \pm 460 | 251 \pm 25 |
| KGFF03 | 0.24 \pm 0.03 | 2.7 \pm 0.3 | 0.077 \pm 0.01 |
| KGFF04 | 0.67 \pm 0.29 | 780 \pm 90 | 45 \pm 8 |
| KGFF05 | 3.2 \pm 1.1 | 3,100 \pm 1,100 | 360 \pm 50 |
| KGFF06 | 46 \pm 22 | 147 \pm 20 | 15.9 \pm 1.8 |
| KGFF07 | 0.29 \pm 0.13 | 11.8 \pm 3.6 | 84 \pm 26 |
| KGFF08 | 0.94 \pm 0.19 | 136 \pm 26 | 3.9 \pm 0.1 |
| KGFF09 | 2.43 \pm 0.18 | 83 \pm 21 | 3.2 \pm 0.7 |
| KGFF10 | 68 \pm 48 | >10,000 | 2,100 \pm 600 |
| KGFF11 | >10,000 | 2,720 \pm 760 | 406 \pm 95 |
| KGFF12 | 0.17 \pm 0.05 | 2,490 \pm 1,170 | 375 \pm 108 |
| KGFF13 | 0.11 \pm 0.05 | 147 \pm 16 | 206 \pm 47 |
| KGFF14 | 1.6 \pm 0.3 | 4.54 \pm 0.01 | 4.15 \pm 1.35 |
| KGFF15 | 1.8 \pm 0.9 | 88 \pm 8 | 9.6 \pm 0.6 |
| KGFF16 | 2.6 \pm 1.3 | 80 \pm 13 | 10.4 \pm 2.3 |

Data are mean \pm SEM of at least 2 independent experiments performed in duplicate. K_i values were determined from competition binding curves using [^3H]-diprenorphine for MOPr, and [^{125}I]-1-DMe-NPFF for NPFF1R and NPFF2R.

Table SDC3: Agonist activity constant (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for human MOPr, NPFF1R and NPFF2R.

| compound | MOPr (cAMP) | | MOPr (β -arrestin-2) | | NPFF1R (GTP γ S) | | NPFF2R (GTP γ S) | |
|---------------|------------------|-------------|--------------------------------|-------------|----------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| | EC_{50} | E_{max} | EC_{50} | E_{max} | EC_{50} | E_{max} | EC_{50} | E_{max} |
| | (nM) | (%) | (nM) | (%) | (nM) | (%) | (nM) | (%) |
| DAMGO | 80.4 \pm 23.2 | 100 \pm 4 | 240 \pm 65 | 100 \pm 2 | nd | nd | nd | nd |
| RFRP3 | nd | nd | nd | nd | 10.1 \pm 2.8 | 100 \pm 10 | nd | nd |
| NPFF | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 18.2 \pm 6.4 | 100 \pm 4 |
| KGOP01 | 0.204 \pm 0.05 | 89 \pm 2 | 1.6 \pm 0.1 | 103 \pm 9 | > 10,000 | nd | > 10,000 | nd |
| KGFF01 | 2.4 \pm 1.0 | 101 \pm 7 | nd | nd | 155 \pm 25 | 44 \pm 8 | 128 \pm 23 | 95 \pm 6 |
| KGFF02 | 1.5 \pm 0.7 | 89 \pm 2 | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| KGFF03 | 12.0 \pm 2 | 92 \pm 1 | 33.9 \pm 8.8 | 41 \pm 11 | 84.8 \pm 22.2 | 88 \pm 7 | 11 \pm 2 | 111 \pm 17 |
| KGFF04 | 9.5 \pm 1.5 | 70 \pm 4 | nd | nd | >10,000 | 25 \pm 4 | 963 \pm 168 | 67 \pm 3 |
| KGFF05 | 59.3 \pm 24.5 | 94 \pm 2 | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| KGFF06 | 2,300 \pm 300 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| KGFF07 | 1.7 \pm 0.4 | 102 \pm 2 | nd | nd | 87 \pm 7 | 84 \pm 8 | 1,930 \pm 66 | 87 \pm 2 |
| KGFF08 | 9.9 \pm 2.0 | 102 \pm 3 | nd | nd | >10,000 | 23 \pm 1 | 574 \pm 129 | 97 \pm 2 |
| KGFF09 | 18.2 \pm 6.1 | 85 \pm 2 | 56.4 \pm 26.5 | 42 \pm 2 | 176 \pm 66 | 10 \pm 2 | 157 \pm 49 | 38 \pm 14 |
| KGFF10 | 598 \pm 35 | 91 \pm 10 | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| KGFF11 | >10,000 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| KGFF12 | 2.7 \pm 1.5 | 103 \pm 4 | nd | nd | >10,000 | 13 \pm 3 | >10,000 | 32 \pm 17 |
| KGFF13 | 1.0 \pm 0.4 | 97 \pm 2 | nd | nd | >10,000 | 39 \pm 2 | >10,000 | 68 \pm 8 |
| KGFF14 | 5.9 \pm 2.5 | 99 \pm 4 | nd | nd | 76 \pm 26 | 74 \pm 1 | 89 \pm 7 | 73 \pm 18 |
| KGFF15 | 4.1 \pm 1.7 | 92 \pm 13 | nd | nd | 1,020 \pm 610 | 51 \pm 5 | 930 \pm 210 | 105 \pm 15 |
| KGFF16 | 6.2 \pm 2.0 | 93 \pm 6 | nd | nd | 273 \pm 115 | 51 \pm 7 | 526 \pm 12 | 88 \pm 12 |

Efficacy (E_{\max}) is expressed as the percentage relative to the reference compound (DAMGO, RFRP3 and NPPF for MOPr, NPPF1R and NPPF2R, respectively). Values are mean \pm SEM of at least 2 independent experiments performed in duplicate. nd, not determined.

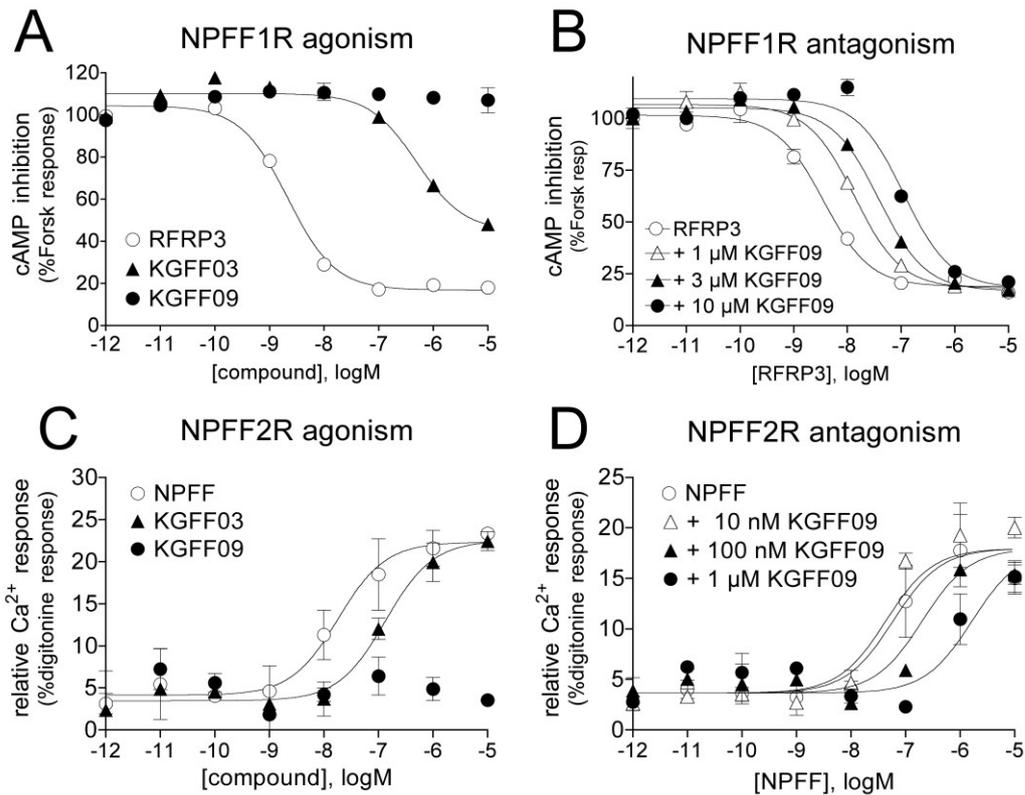


Figure SDC 4: in vitro characterization of KGFF03 and KGFF09 on NPFFRs.

Agonist (A) or antagonist (B) activity of KGFF03 and KGFF09 measured by inhibition of forskoline-induced cAMP accumulation (A, B) in HEK293-Glo20F cells stably expressing NPFF1R. Data are expressed as percentage of maximal cAMP levels. Agonist (C) or antagonist (D) activity of KGFF03 and KGFF09 measured by Ca²⁺ release (C, D) in HEK293-Glo20F cells stably expressing NPFF2R. Data are expressed as percentage of maximal digitonine-induced Ca²⁺ response, relative to basal. Data are mean ± SEM of at least 2 independent experiments performed in duplicate.

Table SDC 5: Binding affinity constant (K_i) values and activity agonist constant (EC_{50} and E_{max}) values of KGFF compounds for human DOPr, KOPr and NOPr.

| compound | DOPr | | | KOPr | | | NOPr | | |
|-------------|-------------|----------------|---------------|------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|
| | (cAMP) | | | (cAMP) | | | (cAMP) | | |
| | K_i (nM) | EC_{50} (nM) | E_{max} (%) | K_i (nM) | EC_{50} (nM) | E_{max} (%) | K_i (nM) | EC_{50} (nM) | E_{max} (%) |
| Naloxone | 15.9 ± 2.3 | | 8.4 ± 4.3 | | | | | | |
| DPDPE | 57.1 ± 18.8 | 0.8 ± 0.3 | 100 ± 11 | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| Dynorphin A | nd | nd | nd | nd | 1.0 ± 0.4 | 100 ± 14 | nd | nd | nd |
| Nociceptin | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 0.0013 ± 0.0002 | 0.568 ± 0.004 | 100 ± 3 |
| KGOP01 | 5.1 ± 0.5 | 0.16 ± 0.01 | 91 ± 2 | 37.3 ± 9.6 | > 10,000 | 18 ± 1 | > 10,000 | nd | nd |
| KGFF03 | 9.1 ± 0.7 | 0.34 ± 0.12 | 89 ± 6 | 108 ± 28 | 95 ± 3 | 34 ± 11 | 289 ± 3 | > 10,000 | 15 ± 2 |
| KGFF09 | 186 ± 77 | 0.78 ± 0.01 | 90 ± 3 | 3.2 ± 0.8 | > 10,000 | 15 ± 1 | 209 ± 2 | > 10,000 | 7 ± 3 |

K_i values were determined from competition binding curves using [3 H]-diprenorphine for DOP and KOP receptor and [3 H]-nociceptin for NOP receptor. Efficacy (E_{max}) is expressed as the percentage relative to the referent compound (DPDPE, dynorphin A and nociceptin respectively for DOP, KOP and NOP receptors). Data are mean ± SEM of at least two independent experiments performed in duplicate. nd, not determined.

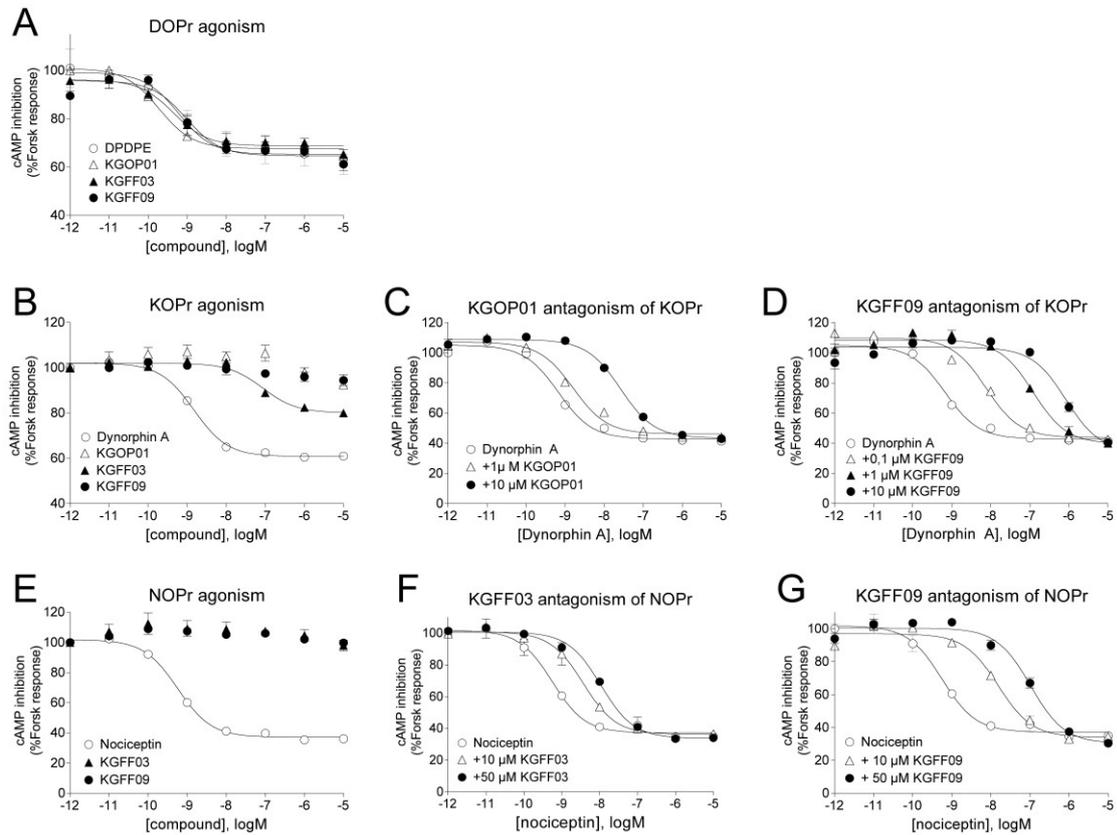


Figure SDC 6: In vitro characterization and selectivity of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 for activity at DOPr, DOPr and NOPr.

Agonist (A, B and E) or antagonist (C, D, F and G) activity of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 measured by inhibition of forskoline-induced cAMP accumulation in HEK293-Glo20F cells stably expressing human DOPr (A), KOPr (B, C and D) or NOPr (E, F and G). Data are expressed as percentage of maximal cAMP levels and shown as mean \pm SEM of at least 2 independent experiments performed in duplicate.

Table SDC 7: Binding affinity constant (K_i) values of KGFF compounds for GPR10, GPR54 and GPR103.

| $K_i \pm \text{SEM (nM)}$ | | | |
|---------------------------|---------------|-------------------|-----------------|
| compound | GPR10 | GPR54 | GPR103 |
| PrRP20 | 2.1 ± 0.4 | nd | nd |
| Kp10 | nd | 0.062 ± 0.009 | nd |
| 26RFa | nd | nd | 2.04 ± 0.58 |
| KGOP01 | > 10,000 | > 10,000 | > 10,000 |
| KGFF03 | > 10,000 | $4,370 \pm 960$ | > 10,000 |
| KGFF09 | > 10,000 | $2,000 \pm 300$ | $1,200 \pm 340$ |

Data are mean \pm SEM of at least two independent experiments performed in duplicate. K_i values were determined from competition binding curves using [^3H]-PrRP-20, [^{125}I]-Kp-10 and [^{125}I]-43RFa for GPR10, GPR54 and GPR103, respectively. nd, not determined.

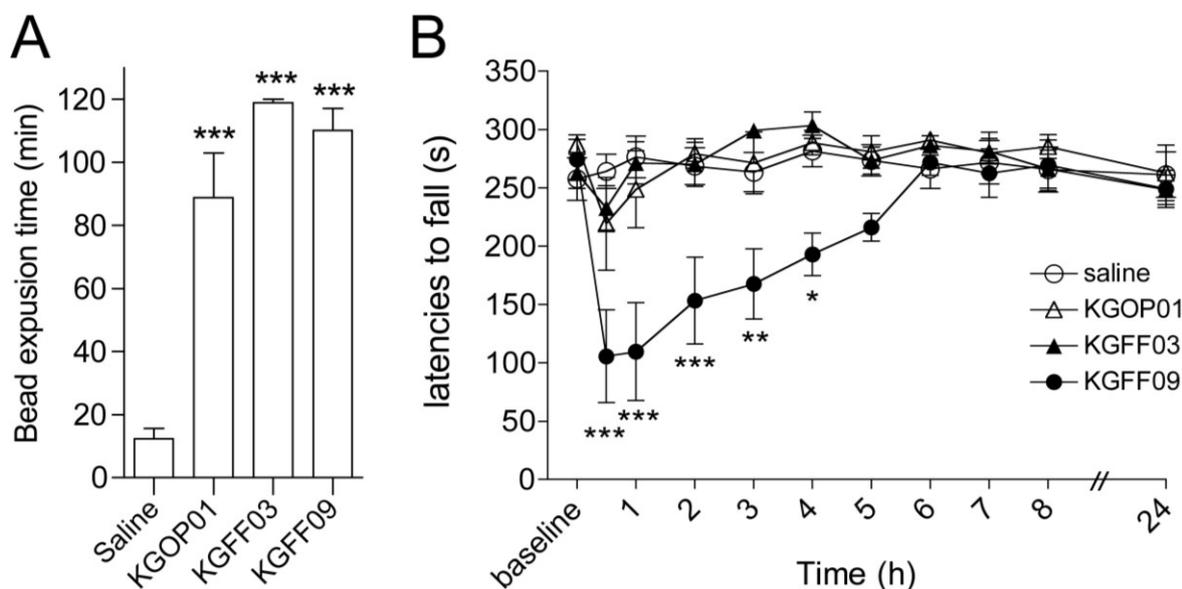


Figure SDC 9: Effect of KGOP01, KGFF03 or KGFF09 on gastro-intestinal motility and motor coordination.

(A) The gastrointestinal motility was evaluated in CD1 mice by measuring the colonic bead expulsion time over 120 min, 30 min after administration of KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg}$, sc.) or saline (control) injection. Data are mean \pm SEM, $n = 5-6$. One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test *** $p < 0.001$ compared to saline. **(B)** Motor coordination was evaluated in CD1 mice by measuring the time spent on the rotarod before and after KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg}$, sc.), KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg}$, sc.) or saline (control). Data are mean \pm SEM, $n = 5-7$. Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to saline.

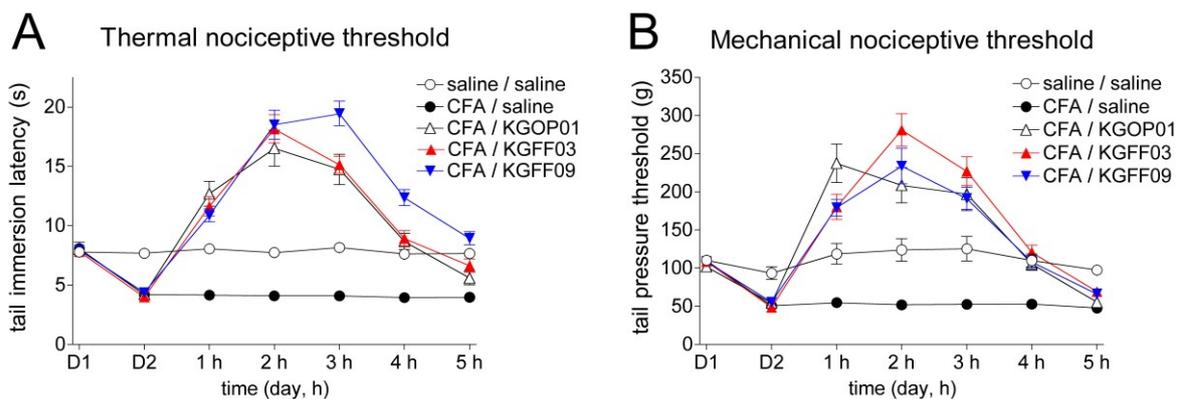


Figure SDC 10: Acute antinociceptive effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 in the CFA-induced inflammatory pain model.

Time-dependent antinociceptive effect of KGOP01, KGFF03 and KGFF09 sc. administration in C57BL/6 mice in the tail immersion test (**A**) and in the tail pressure test (**B**). KGOP01 (1.8 $\mu\text{mol/kg/d}$, sc.), KGFF03 (1.2 $\mu\text{mol/kg/d}$, sc.), KGFF09 (7.4 $\mu\text{mol/kg/d}$, sc.) or saline (control) were administered 24 h after CFA (or saline) injection in the tail. Data are mean \pm SEM, n = 9-10.

III. Résultats complémentaires et discussion

Dans ce travail, nous avons identifié et caractérisé des ligands peptidomimétiques à pluralité d'action combinant un pharmacophore opioïde avec un pharmacophore NPPF. Nous avons pu combiner au sein d'une même molécule les propriétés analgésiques des opiacés et les propriétés d'antagonisme au NPPF afin de proposer une molécule analgésique plus sûre et plus efficace que les opiacés standards dans la prise en charge de douleurs chroniques. Certains résultats de ce travail sont repris et approfondis dans les paragraphes suivants.

1. Caractérisation de l'activité antagoniste sur le récepteur NPPF₂R

La mesure de l'activité agoniste ou antagoniste des molécules KGFF sur le récepteur NPPF₂R a nécessité une étape de mise au point. Dans un premier temps, nous avons utilisé le test mis au point sur NPPF₁R de mesure cinétique de la production d'AMPc avec le système Glosensor. En effet ce test nous a permis d'établir le profil agoniste ou antagoniste des différents ligands KGFF sur NPPF₁R avec une bonne sensibilité. Nous avons choisi d'utiliser le NPPF comme contrôle positif de l'activité agoniste et le RF9 comme contrôle positif de l'activité antagoniste (Simonin et al., 2006),.

1.1. Mesure de la production d'AMPc

Les composés KGFF testés en modalité agoniste sur NPPF₂R montrent deux types de profils (Figure 35A) : certains composés, comme KGFF03, montrent une activité agoniste, tandis que d'autres, comme KGFF09, sont dépourvus d'activité agoniste. Le RF9 montre une légère activité agoniste à partir de 10 μ M (Figure 35A). Comme le composé KGFF09 présente une forte affinité pour le récepteur NPPF₂R ($K_i = 0,077$ nM) mais pas d'activité agoniste, nous avons évalué sa capacité à bloquer l'activation de ce récepteur par son agoniste endogène, le NPPF (Figure 35B). Ni le RF9 à 10 μ M, ni le KGFF09 à 100 nM ne modifient la dose-réponse de NPPF, ces deux composés ne présentent donc pas d'activité antagoniste sur le récepteur NPPF₂R dans ce test. L'absence d'effet antagoniste du RF9 est en contradiction avec la caractérisation *in vitro* publiée du RF9, qui montre qu'à une concentration de 7,5 μ M ce composé décale fortement la dose réponse de NPPF sur NPPF₂R, mesuré par liaison de [³⁵S]-GTP γ S (Simonin et al., 2006).

Pour essayer de comprendre l'origine de cette différence, nous avons essayé de mesurer l'activité du récepteur NPPF₂R à différents niveaux et dans des conditions expérimentales variées. Pour cela, nous avons mesuré l'activité de NPPF₂R en cellule vivante en CHO de deux manières : en utilisant une protéine G chimérique G_{qi5} et en mesurant directement la réponse calcique de faible amplitude dépendante de G_{i/o} (mis en évidence dans le Chapitre « Etude des interactions fonctionnelles entre récepteurs RF-amide »). Nous nous sommes également rapprochés des conditions de caractérisation du RF9 (Simonin et al., 2006) en mesurant la liaison de [³⁵S]-GTPγS sur des préparations membranaires de CHO surexprimant NPPF₂R.

1.2. Mesure de la réponse calcique par activation de G_{qi5}

Pour visualiser l'activité de NPPF₂R dans des cellules vivantes avec un système différent du Glosensor, nous avons utilisé une protéine G chimérique, G_{qi5}, qui permet de visualiser d'activité G_{i/o} sous la forme d'une réponse calcique de grande amplitude (Conklin et al., 1993). Dans des cellules CHO co-exprimant de manière stable NPPF₂R et G_{qi5}, le NPPF donne une réponse calcique avec une EC₅₀ de 7,4 nM (Figure 36A), cohérente avec les données de la littérature (Quillet et al., 2016). Dans cet essai, le RF9 donne une réponse agoniste de même amplitude que le NPPF avec une EC₅₀ d'environ 2 μM (Figure 36A). La pré-incubation de RF9 avant l'ajout de NPPF en dose-réponse permet de bloquer la réponse calcique de manière dose dépendante (Figure 36B), un effet qui pourrait être attribué à la composante agoniste du RF9 avec soit un épuisement des stocks de calcium intracellulaire lors de la pré-incubation du RF9, soit une désensibilisation du récepteur. Cette action à la fois agoniste et antagoniste a déjà été observée avec le récepteur GPR103 (Figures 30H et 30I). Ce test nous a permis d'évaluer l'activité agoniste des différents composés KGFF par criblage en deux concentrations et de mettre en évidence le caractère agoniste de KGFF03 en particulier (Figure 36C). Nous n'avons pas pu évaluer proprement l'activité antagoniste des composés KGFF dans la mesure où les composés agonistes apparaissaient systématiquement antagoniste, à l'instar du RF9.

1.3. Mesure de la liaison de [³⁵S]-GTPγS

Les tests réalisés jusque là n'ayant pas permis de confirmer le caractère antagoniste du RF9, nous avons choisi de nous rapprocher des conditions de caractérisation de cette molécule en utilisant le test d'activité des protéines G par liaison du [³⁵S]-GTPγS. Sur les membranes de CHO exprimant NPPF₂R, le NPPF provoque une liaison de [³⁵S]-GTPγS de manière dose-dépendante avec une EC₅₀ de 18,2 nM (Figure 37, Table SDC3), tandis que le RF9 provoque une réponse d'amplitude semblable au NPPF avec EC₅₀ d'environ 420 nM (Figure 37). Le RF9

ayant été par trois fois trouvé agoniste du récepteur NPFF₂R, nous avons décidé de ne pas chercher à l'utiliser comme contrôle positif dans la mesure de l'activité antagoniste sur ce récepteur, et de tester l'activité antagoniste des composés KGFF possédant une bonne affinité pour NPFF₂R et ne présentant pas d'activité agoniste. L'activité des composés KGFF a été évaluée par ce test (Figure 2 de la publication), l'activité agoniste de KGFF03 a pu être confirmée et le composé KGFF09 a montré une activité agoniste partielle accompagnée d'une activité antagoniste (Figure 2 de la publication).

1.4. Mesure de la réponse calcique sans G_{qi5}

Avant de tester ce composé dans la modulation de la douleur *in vivo* chez la souris, nous avons souhaité consolider le profil pharmacologique de KGFF09 sur NPFF₂R. En effet, ce composé a été mesuré une première fois sans activité agoniste ni antagoniste dans un essai d'AMPc, il n'a pas montré non plus d'activité dans les CHO-NPFF₂R-G_{qi5}, et apparaît agoniste partiel et antagoniste en GTP γ S. En parallèle de ces travaux, nous avons pu observer que l'activation du récepteur NPFF₂R était détectable en mesurant le calcium intracellulaire (Figure 27D) sans utiliser de protéine G chimérique. Nous avons pu montrer que dans ce test, le composé KGFF09 ne présente pas d'activité agoniste, et nous avons pu confirmer son caractère antagoniste du récepteur NPFF₂R (Figures SDC4C et 4D de la publication).

1.5. Discussion sur la pharmacologie de NPFF₂R

Ce travail a permis de mettre en avant la difficulté de caractériser *in vitro* des molécules antagonistes pour le récepteur NPFF₂R. Nous n'avons notamment pas pu reproduire les résultats connus et publiés par notre équipe avec le RF9 (Simonin et al., 2006), en particulier avec la mesure d'activité par GTP γ S dans laquelle le KGFF09 est antagoniste et le RF9 agoniste. Cette contradiction est d'autant plus difficile à comprendre que la capacité du RF9 à bloquer l'effet du NPFF a été confirmée par plusieurs équipes et avec différentes techniques, aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Buffel et al., 2015; Jhamandas et al., 2007; Sun et al., 2013; Yu et al., 2016). Une étude cependant rapporte une activité agoniste du RF9 sur le récepteur NPFF₂R murin avec une EC₅₀ de 1,7 μ M (Talmont et al., 2010).

Ensemble, ces observations laissent penser que la pharmacologie du récepteur NPFF₂R pourrait être complexe, et il serait intéressant pour mieux comprendre ce récepteur de développer des outils robustes pour mesurer les différentes voies de signalisation intracellulaire de ce récepteur afin de pouvoir détecter de possibles biais de signalisation selon le ligand utilisé (Kenakin and

Christopoulos, 2013). Nous avons utilisé plusieurs tests pour évaluer l'activité de nos composés et les résultats obtenus pour certains composés, comme KGFF09, sont variables d'un essai à l'autre sans que nous ne puissions l'expliquer au niveau mécanistique. En diversifiant les paramètres mesurés pour évaluer l'activité de NPPF₂R (recrutement de la β -arrestine, phosphorylation de kinases, réponse cellulaire globale) nous pourrions peut être mieux comprendre l'activité pharmacologique de composés tels que KGFF09 ou RF9. Il serait d'autre part important de prendre en compte les cinétiques de liaison de ces différents composés, et d'adapter le type de test d'activité en fonction (Herenbrink et al., 2016). De plus, il serait intéressant d'évaluer la pharmacologie de NPPF₂R dans un contexte plus physiologique en utilisant dans des lignées cellulaires présentant une expression endogène de ce récepteur. Plusieurs lignées ont ainsi été décrites dans la littérature comme la lignée J774A.1 dérivée de macrophages (Waqas et al., 2017), la lignée neurale Neuro2A (Yu et al., 2016) ou la lignée RAW264.7 également dérivée de macrophage (Sun et al., 2013).

2. Mise au point de la mesure de la dépression respiratoire induite par les opiacés chez la souris

La dépression respiratoire est un effet indésirable associé aux antalgiques opioïdes de survenue rare avec une incidence estimée inférieure à 1% (Cashman and Dolin, 2004) mais potentiellement létale. L'étude de souris KO a permis de mettre en évidence l'implication du récepteur MOR (Dahan et al., 2001) ainsi que celle de la β -arrestine (Raehal et al., 2005) dans la dépression respiratoire associée aux opiacés. Le développement d'agonistes biaisés du récepteur MOR pour la voie de signalisation $G_{i/o}$ aux dépens du recrutement de la β -arrestine a confirmé le rôle de l'activation de la β -arrestine par le récepteur MOR dans la survenue de cette dépression respiratoire (DeWire et al., 2013; Schmid et al., 2017).

2.1. Pléthysmographie sur animal entier

Nous avons pu mesuré *in vitro* que les composés KGFF03 et KGFF09 présentaient une activité d'agoniste partiel, comparé au DAMGO et à KGOP01, sur le recrutement de la β -arrestine par le récepteur MOR tout en conservant une activité d'agoniste entier sur la voie $G_{i/o}$. Il nous a donc paru intéressant de comparer la capacité de ces composés à provoquer une dépression respiratoire, comparé à KGOP01. Nous avons donc développé une collaboration avec le Pr. Nelly Frossard et Dr. François Daubeuf (UMR7200, Université de Strasbourg) pour mesurer la fonction respiratoire chez la souris à l'aide d'un pléthysmographe sur animal entier (whole-

body plethysmography). Nous allons dans ce paragraphe détailler la mise au point qui nous a permis d'obtenir les résultats décrits dans cette publication.

En effet, le pléthysmographe est un appareil de mesure qui permet d'enregistrer et de calculer de nombreux paramètres :

- le temps d'inspiration (T_i , exprimé en ms),
- le temps d'expiration (T_e , ms),
- le pic de flux d'air à l'inspiration (PIF, mL/s),
- le pic de flux d'air à l'expiration (PEF, mL/s),
- le volume courant ou volume tidal (TV, mL), qui correspond au volume d'air déplacé entre une inspiration et une expiration dans un cycle respiratoire normal
- le volume d'air expiré (EV, mL),
- le temps de relaxation (RT, msec), correspond au temps nécessaire pour expirer 36% du volume courant
- le volume minute (MV, mL), correspond au volume total respiré pendant 1 minute, calculé à partir du volume courant et de la fréquence de respiration
- la fréquence respiratoire (f, resp/min), calculée à partir de T_i et T_e ,
- le temps de pause augmenté (penh) paramètre sans unité calculé à partir de l'équation suivante $(T_e/RT - 1) * (PEF/PIF)$ avec $(T_e/RT - 1)$ le temps de pause
- la résistance respiratoire spécifique (S_r , kPa/s) indique le travail de respiration nécessaire pour générer un flux d'air respiré de 1L/s.

2.2. Mesure de l'effet du composé KGOP01

La dépression respiratoire induite par les opiacés est le plus souvent décrite dans la littérature (Tableau 14) par une diminution de la fréquence respiratoire et du volume minute, mais des changements sont également mesurés sur le temps d'inspiration ou d'expiration, le volume tidale, ainsi que sur le PIF, le PEF et la résistance respiratoire spécifique.

En l'absence de consensus, nous avons réalisé une expérience préliminaire visant à déterminer les paramètres les plus adaptés pour visualiser l'effet de nos composés sur la fonction respiratoire. Pour cela nous avons choisi d'utiliser KGOP01 comme molécule de référence, car bien que ce composé n'ait pas encore été caractérisé sur la fonction respiratoire il s'agit de la molécule la plus proche de KGFF03 et KGFF09 qui ait une activité MOR non biaisée. Nous

avons confronté les résultats obtenus avec les données de la littérature, résumé après une recherche non exhaustive dans le tableau 14.

La mesure du temps d'inspiration sur les deux heures qui suivent l'administration de KGOP01 à une dose analgésique (s.c., 1,8 $\mu\text{mol/kg}$) montre un allongement du temps d'inspiration (Figure 38A), en accord avec la littérature (Tableau 14). Cependant, le temps d'inspiration des souris traitées avec de la saline n'est pas stable, ce qui conduit à ne pas observer de différences entre les deux groupes. En détaillant le temps d'inspiration de chaque souris, il apparaît que celui des souris traitées au KGOP01 évolue de manière relativement stable alors que chez les souris salines ce temps d'inspiration fluctue de manière abrupte, avec soit des valeurs similaires au seuil basal, soit des valeurs élevées (Figure 38B). Ce phénomène est corrélé avec un assoupissement des souris du groupe saline, qui conduit à un ralentissement de la fonction respiratoire et qui mime une dépression respiratoire. Les mesures réalisées au pléthysmographe sont sensibles à l'état d'éveil des animaux (Bastianini et al., 2017), ce qui semble cohérent avec les variations observées chez les souris salines (Figure 38B). Les souris traitées avec le composé KGOP01 ne sont pas sujettes à ces phases de sommeil, probablement à cause de la composante psychostimulante opioïde. On observe donc une augmentation du temps d'inspiration dans les deux groupes mais vraisemblablement pour des raisons différentes.

L'administration de KGOP01 augmente également le temps d'expiration et le volume tidale (Figures 38C et 38D), tandis que le volume minute et la fréquence respiratoire semblent diminuer (Figures 38E et 38F). Les tendances observées en T_i , MV et f sont en accord avec les résultats décrits dans la littérature avec la morphine (Tableau 14).

D'autres paramètres de la fonction respiratoire qui ne sont habituellement pas ou peu associés à la dépression respiratoire induite par les opiacés sont modifiés suite à l'administration de KGOP01. On peut observer un effet biphasique du KGOP01 sur le temps de relaxation avec une diminution pendant les 30 premières minutes après administration suivi d'une augmentation (Figure 39A), ainsi qu'une augmentation du temps de pause augmenté (penh) et de la résistance spécifique respiratoire dans les 30 minutes qui suivent l'administration de KGOP01 (Figures 39B et 39C). Les variations de ces trois paramètres sont distinctes au niveau cinétique des effets observés sur la fréquence respiratoire, le T_i , et le MV qui voient leur effet être maximum à partir de 30 min et durer jusqu'à 2 h après l'administration de KGOP01, ce qui semble plus correspondre à la dépression respiratoire induite par les opiacés (Manglik et al.,

2016; Raehal et al., 2005). Pour ces raisons, ces paramètres n'ont pas été utilisés par la suite pour évaluer la dépression respiratoire induite par les opiacés.

2.3. Optimisation et amélioration de l'état d'éveil

Pour maintenir les souris du groupe saline dans un état éveillé nous avons choisi d'actionner le nébulisateur (sans diffusion de composé) pendant 30 secondes toutes les 20 minutes. Ce procédé a donné des résultats mitigés en améliorant les données pour le temps d'inspiration (Figure 40A) et la fréquence respiratoire (Figure 40B), mais ne modifie pas le volume minute (Figure 40C). Compte tenu de l'utilisation prédominante de la fréquence respiratoire par rapport au temps d'inspiration pour évaluer la dépression respiratoire induite par les opiacés dans la littérature (Tableau 14), nous avons décidé d'utiliser ce paramètre pour comparer l'effet des différents composés KGFF (voir Figure 4E de la publication). La préservation de la fonction respiratoire avec les composés KGFF03 et KGFF09 comparée à KGOP01, qui est observée avec la fréquence respiratoire, est retrouvée avec l'analyse des temps d'inspiration (Figure 41A) et d'expiration (Figure 41B).

2.4. Discussion

Nous avons pu montrer que KGOP01 provoquait une perturbation des paramètres respiratoires semblable à aux effets décrits de la morphine (Tableau 14) avec une inhibition de la respiration qui se traduit par une diminution de la fréquence respiratoire, du volume minute et une augmentation du temps d'inspiration et du volume tidale. KGOP01 semble avoir une action distincte sur le temps la résistance spécifique respiratoire et le temps de relaxation avec un effet d'apparition précoce et qui ne dure pas dans le temps. Afin de mieux comprendre cette réponse transitoire il aurait été intéressant de mesurer en parallèle l'effet de la morphine, et d'utiliser un antagoniste opioïde comme la naloxone, pour confirmer l'implication des récepteurs opioïdes dans l'effet du KGOP01 sur le temps de relaxation et la résistance spécifique respiratoire.

La principale limite que nous avons rencontrée dans l'utilisation de la pléthysmographie sur animal entier pour évaluer la fonction respiratoire aura été la détermination des paramètres respiratoires à l'état basal avec notre groupe contrôle. La grande variabilité observée dans le groupe des souris salines diminue la précision des observations et limite l'interprétation des données. Ainsi, il est difficile déterminer si les composés KGFF03 et KGFF09 ont une action sur la fréquence respiratoire ou le temps d'inspiration, car bien qu'entraînant une augmentation de ces deux paramètres, nous ne mesurons pas de différences significatives avec le groupe

saline. Il serait intéressant d'évaluer la fonction respiratoire à travers des paramètres moins dépendants de l'état d'éveil des souris, comme la saturation artérielle en oxygène. La mesure de la saturation pulsée en oxygène (SpO₂) est réalisée par un examen non invasif d'oxymétrie colorimétrique et permet une bonne estimation de la saturation artérielle en oxygène. Une étude a mesuré ce paramètre conjointement à la fréquence respiratoire pour évaluer la dépression respiratoire induite par les opiacés comme la morphine et le fentanyl (Schmid et al., 2017). Les résultats de cette étude montre que les souris salines ne présentent pas une fréquence respiratoire stable, contrairement à la saturation en oxygène qui reste constante. La mesure de la saturation en oxygène dans le sang apparaît donc comme une alternative intéressante aux mesures de pléthysmographie.

IV. Conclusion

Cette étude nous a permis d'identifier un composé bifonctionnel agoniste du récepteur MOR et antagoniste des récepteurs NPPF qui présente des propriétés prometteuses notamment au regard de plusieurs effets secondaires indésirables associés aux opiacés. En particulier, l'administration chronique de ce composé induit beaucoup moins de tolérance analgésique et d'hyperalgésie ainsi qu'un syndrome de sevrage atténué.

Cette approche polypharmacologique pourrait donc présenter une alternative tout à fait intéressante aux ligands MOR biaisés dont on sait finalement assez peu de choses aujourd'hui quant aux effets indésirables associés à leur administration prolongée. De manière encore plus intéressante, la combinaison des deux stratégies, agoniste MOR biaisé et composés bifonctionnels, pourrait s'avérer dans le futur comme une stratégie gagnante pour accéder au développement d'un analgésique opioïde ne présentant pas ou peu d'effets secondaires aigus et chroniques.

Il faut néanmoins rester prudent quant à la portée de ces premiers résultats. En effet, la recherche de nouveaux analgésiques opiacés dépourvus d'effets indésirables est jalonnée depuis des décennies d'espairs déçus.

Bibliographie

- Acosta-Galvan, G., Yi, C.-X., van der Vliet, J., Jhamandas, J.H., Panula, P., Angeles-Castellanos, M., Del Carmen Basualdo, M., Escobar, C., and Buijs, R.M. (2011). Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 5813–5818.
- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., et al. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J. Reprod. Dev.* *53*, 367–378.
- Ahow, M., Min, L., Pampillo, M., Nash, C., Wen, J., Soltis, K., Carroll, R.S., Glidewell-Kenney, C.A., Mellon, P.L., Bhattacharya, M., et al. (2014). KISS1R signals independently of Gαq/11 and triggers LH secretion via the β-arrestin pathway in the male mouse. *Endocrinology* *155*, 4433–4446.
- Aktories, K. (2011). Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 487–498.
- Albertazzi, L., Arosio, D., Marchetti, L., Ricci, F., and Beltram, F. (2009). Quantitative FRET analysis with the EGFP-mCherry fluorescent protein pair. *Photochem. Photobiol.* *85*, 287–297.
- Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., et al. (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 587–594.
- Alexander, S.P.H., Christopoulos, A., Davenport, A.P., Kelly, E., Marrion, N. V., Peters, J.A., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A.J., Sharman, J.L., et al. (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* *174*, S17–S129.
- Allard, M., Labrousche, S., Nosjean, A., and Laguzzi, R. (1995). Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPFF in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *274*, 577–583.
- Allen, J.A., Yost, J.M., Setola, V., Chen, X., Sassano, M.F., Chen, M., Peterson, S., Yadav, P.N., Huang, X. -p., Feng, B., et al. (2011). Discovery of β-Arrestin-Biased Dopamine D2 Ligands for Probing Signal Transduction Pathways Essential for Antipsychotic Efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18488–18493.
- Alonso, N., Fernandez, N., Notcovich, C., Monczor, F., Simaan, M., Baldi, A., Gutkind, J.S., Davio, C., and Shayo, C. (2013). Cross-desensitization and cointernalization of H1 and H2 histamine receptors reveal new insights into histamine signal integration. *Mol. Pharmacol.* *83*, 1087–1098.
- Andersson, D.A., Gentry, C., Alenmyr, L., Killander, D., Lewis, S.E., Andersson, A., Bucher, B., Galzi, J.-L.L., Sterner, O., Bevan, S., et al. (2011). TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Δ9-tetrahydrocannabinol. *Nat. Commun.* *2*, 551.
- Anjum, S., Krishna, A., and Tsutsui, K. (2014). Inhibitory roles of the mammalian GnIH ortholog RFRP3 in testicular activities in adult mice. *J. Endocrinol.* *223*, 79–91.
- Araldi, D., Ferrari, L.F., and Levine, J.D. (2015). Repeated Mu-Opioid Exposure Induces a Novel Form of the Hyperalgesic Priming Model for Transition to Chronic Pain. *J. Neurosci.* *35*, 12502–12517.
- Araldi, D., Ferrari, L.F., and Levine, J.D. (2017). Hyperalgesic priming (type II) induced by repeated opioid exposure: Maintenance mechanisms. *Pain* *158*, 1204–1216.
- Arendt-Nielsen, L., Olesen, A.E., Staahl, C., Menzaghi, F., Kell, S., Wong, G.Y., and Drewes, A.M. (2009). Analgesic Efficacy of Peripheral κ-Opioid Receptor Agonist CR665 Compared to Oxycodone in a Multi-modal, Multi-tissue Experimental Human Pain Model. *Anesthesiology* *111*, 616–624.
- Arima, H., Murase, T., Kondo, K., Iwasaki, Y., and Oiso, Y. (1996). Centrally administered neuropeptide FF inhibits arginine vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology* *137*, 1523–1529.
- Armando, S., Quoyer, J., Lukashova, V., Maiga, A., Percherancier, Y., Heveker, N., Pin, J.P., Prézeau, L., and Bouvier, M. (2014). The chemokine CXCL4 and CXCR2 receptors form homo- and heterooligomers that can engage their signaling G-protein effectors and β-arrestin. *FASEB J.* *28*, 4509–4523.
- Armstead, W.M. (2011). Nociceptin/Orphanin Phenylalanine Glutamine (FQ) Receptor and Cardiovascular Disease. *Cardiovasc. Ther.* *29*, 23–28.
- Ashton, N., Balment, J., and Blackburn, T.P. (1989). K-Opioid-induced changes in renal water and electrolyte management and endocrine secretion. *769–776*.
- Aslanidis, C., and de Jong, P.J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.* *18*, 6069–6074.
- Atici, S., Cinel, I., Cinel, L., Doruk, N., Eskandari, G., and Oral, U. (2005). Liver and kidney toxicity in chronic use of opioids: an experimental long term treatment model. *J. Biosci.* *30*, 245–252.
- Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., and Straiker, A. (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray

- analysis. *BMC Genomics* 12, 14.
- Ayachi, S., and Simonin, F. (2014). Involvement of Mammalian RF-Amide Peptides and Their Receptors in the Modulation of Nociception in Rodents. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 158.
- Babwah, A. V., Navarro, V.M., Ahow, M., Pampillo, M., Nash, C., Fayazi, M., Calder, M., Elbert, A., Urbanski, H.F., Wettschureck, N., et al. (2015). GnRH Neuron-Specific Ablation of G q/11 Results in Only Partial Inactivation of the Neuroendocrine-Reproductive Axis in Both Male and Female Mice: In Vivo Evidence for Kiss1r-Coupled G q/11-Independent GnRH Secretion. *J. Neurosci.* 35, 12903–12916.
- Bahouth, S.W., and Nooh, M.M. (2017). Barcoding of GPCR trafficking and signaling through the various trafficking roadmaps by compartmentalized signaling networks. *Cell. Signal.* 36, 42–55.
- Bao, Y., Gao, Y., Yang, L., Kong, X., Yu, J., Hou, W., and Hua, B. (2015). The mechanism of μ -opioid receptor (MOR)-TRPV1 crosstalk in TRPV1 activation involves morphine anti-nociception, tolerance and dependence. *Channels* 9, 235–243.
- Bardoni, R., Tawfik, V.L., Wang, D., François, A., Solorzano, C., Shuster, S.A., Choudhury, P., Betelli, C., Cassidy, C., Smith, K., et al. (2014). Delta opioid receptors presynaptically regulate cutaneous mechanosensory neuron input to the spinal cord dorsal horn. *Neuron* 81, 1312–1327.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267–284.
- Bastianini, S., Alvente, S., Berteotti, C., Lo Martire, V., Silvani, A., Swoap, S.J., Valli, A., Zoccoli, G., and Cohen, G. (2017). Accurate discrimination of the wake-sleep states of mice using non-invasive whole-body plethysmography. *Sci. Rep.* 7, 1–10.
- Beardsley, P.M., Howard, J.L., Shelton, K.L., and Carroll, F.I. (2005). Differential effects of the novel kappa opioid receptor antagonist, JD1c, on reinstatement of cocaine-seeking induced by footshock stressors vs cocaine primes and its antidepressant-like effects in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 183, 118–126.
- Beavo, J. a (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 75, 725–748.
- Bebawy, D., Marquez, P., Samboul, S., Parikh, D., Hamid, A., and Lutfy, K. (2010). Orphanin FQ/nociceptin not only blocks but also reverses behavioral adaptive changes induced by repeated cocaine in mice. *Biol. Psychiatry* 68, 223–230.
- Bechtold, D.A., and Luckman, S.M. (2006). Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice. *Endocrinology* 147, 4723–4729.
- Bell, T.J., Panchal, S.J., Miaszkowski, C., Bolge, S.C., Milanova, T., and Williamson, R. (2009). The prevalence, severity, and impact of opioid-induced bowel dysfunction: Results of a US and European patient survey (PROBE 1). *Pain Med.* 10, 35–42.
- Bellot, M., Galandrin, S., Boullaran, C., Matthies, H.J., Despas, F., Denis, C., Javitch, J., Mazères, S., Sanni, S.J., Pons, V., et al. (2015). Dual agonist occupancy of AT1-R- α 2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling. *Nat. Chem. Biol.* 11, 271–279.
- Benoit-lamy, S., Bisserbe, -C, Bouvard, M., Chaillat, G., Crocq, M.-A., Dreyfus, J.-F., Dugas, M., Flament, M., Gaillac, V., Granger, B., et al. (2005). MANUEL DIAGNOSTIQUE ET STATISTIQUE DES TROUBLES MENTAUX DSM-IV.
- Bernard, C. (1865). Introduction à l'étude de la Médecine Expérimentale. J.B.Baillière Fils 1–313.
- Bhattacharyya, S., Luan, J., Challis, B., Schmitz, C., Clarkson, P., Franks, P.W., Middelberg, R., Keogh, J., Farooqi, I.S., Montague, C., et al. (2003). Association of polymorphisms in GPR10, the gene encoding the prolactin-releasing peptide receptor with blood pressure, but not obesity, in a U.K. Caucasian population. *Diabetes* 52, 1296–1299.
- Bie, B., and Pan, Z.Z. (2003). Presynaptic mechanism for anti-analgesic and anti-hyperalgesic actions of kappa-opioid receptors. *J. Neurosci.* 23, 7262–7268.
- Birdsall, N.J.M. (2010). Class A GPCR heterodimers: evidence from binding studies. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 499–508.
- Bodnar, R.J. Endogenous Opiates and Behavior: 2016. *Peptides* 101, 167–212.
- Boer, H.H., Schot, L.P., Veenstra, J.A., and Reichelt, D. (1980). Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide. *Cell Tissue Res.* 213, 21–27.
- Bonini, J.A., Jones, K.A., Adham, N., Forray, C., Artymyshyn, R., Durkin, M.M., Smith, K.E., Tamm, J.A., Boteju, L.W., Lakhani, P.P., et al. (2000). Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J. Biol. Chem.* 275, 39324–39331.

- Borges, J.P., Verdoorn, K.S., Daliry, A., Powers, S.K., Ortenzi, V.H., Fortunato, R.S., Tibiric, á, E., and Lessa, M.A. (2014). Delta opioid receptors: The link between exercise and cardioprotection. *PLoS One* 9, 1–21.
- Bosch, F., and Rosich, L. (2008). The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: A tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* 82, 171–179.
- Bowe, J.E., King, A.J., Kinsey-Jones, J.S., Foot, V.L., Li, X.F., O'Byrne, K.T., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2009). Kisspeptin stimulation of insulin secretion: mechanisms of action in mouse islets and rats. *Diabetologia* 52, 855–862.
- Boyer, S.B., and Slesinger, P.A. (2010). Probing novel GPCR interactions using a combination of FRET and TIRF. *Commun. Integr. Biol.* 3, 343–346.
- Bruneton, J., and Poupon, E. (2016). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (Éd. Tec & doc).
- Bubnell, J., Pfister, P., Sapor, M.L., Rogers, M.E., and Feinstein, P. (2013). β 2 Adrenergic Receptor Fluorescent Protein Fusions Traffic to the Plasma Membrane and Retain Functionality. *PLoS One* 8, e74941.
- Buffel, I., Meurs, A., Portelli, J., Raedt, R., De Herdt, V., Sioncke, L., Wadman, W., Bihel, F., Schmitt, M., Vonck, K., et al. (2015). Neuropeptide FF and prolactin-releasing peptide decrease cortical excitability through activation of NPFF receptors. *Epilepsia* 56, 489–498.
- Burmeister, M.A., and Kapusta, D.R. (2007). Centrally Administered Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) Evokes Bradycardia, Hypotension, and Diuresis in Mice via Activation of Central N/OFQ Peptide Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 324–331.
- Cahill, C.M., Morinville, a, Lee, M.C., Vincent, J.P., Collier, B., and Beaudet, a (2001). Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J. Neurosci.* 21, 7598–7607.
- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Gagliani, M.C., De Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., and Lohse, M.J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol.* 7, e1000172.
- Camilleri, M., and Boeckxstaens, G. (2017). Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS. *Gut* 66, 966–974.
- Cashman, J.N., and Dolin, S.J. (2004). Respiratory and haemodynamic effects of acute postoperative pain management: evidence from published data. *Br. J. Anaesth.* 93, 212–223.
- Cassel, D., and Pfeuffer, T. (1978). Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2669–2673.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Castaño, J.P., Malagón, M.M., Aguilar, E., Dieguez, C., Magni, P., Pinilla, L., and Tena-Sempere, M. (2006). Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 257–258, 75–83.
- Champion, H.C., and Kadowitz, P.J. (1997). Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has novel hypotensive activity in the rat. *Life Sci* 60, PL 241–245.
- Chao, C.C., Hu, S., Shark, K.B., Sheng, W.S., Gekker, G., and Peterson, P.K. (1997). Activation of mu opioid receptors inhibits microglial cell chemotaxis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 998–1004.
- Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Régo, J.-C., Vandesande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., et al. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15247–15252.
- Chartrel, N., Alonzeau, J., Alexandre, D., Jeandel, L., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Boutin, J., Vaudry, H., Anouar, Y., and Llorens-Cortes, C. (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 387–397.
- Chen, W., Ennes, H.S., McRoberts, J.A., and Marvizón, J.C. (2018). Mechanisms of μ -opioid receptor inhibition of NMDA receptor-induced substance P release in the rat spinal cord. *Neuropharmacology* 128, 255–268.
- Chen, Y., Chen, Y., Mestek, a, Mestek, a, Liu, J., Liu, J., Hurley, J. a, Hurley, J. a, Yu, L., and Yu, L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44, 8–12.
- Chey, W.D., Webster, L., Sostek, M., Lappalainen, J., Barker, P.N., and Tack, J. (2014). Naloxegol for Opioid-Induced Constipation in Patients with Noncancer Pain. *N. Engl. J. Med.* 370, 2387–2396.
- Choi, S.-I., Lim, J.Y., Yoo, S., Kim, H., and Hwang, S.W. (2016). Emerging Role of Spinal Cord TRPV1 in Pain Exacerbation. *Neural Plast.* 2016, 1–10.
- Chou, R., Turner, J.A., Devine, E.B., Hansen, R.N., Sullivan, S.D., Blazina, I., Dana, T., Bougatsos, C., and Deyo,

- R.A. (2015). The effectiveness and risks of long-term opioid therapy for chronic pain: A systematic review for a national institutes of health pathways to prevention workshop. *Ann. Intern. Med.* *162*, 276–286.
- Chuang, T.T., LeVine 3rd, H., and De Blasi, A. (1995). Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem* *270*, 18660–18665.
- Clarke, I.J., Sari, I.P., Qi, Y., Smith, J.T., Parkington, H.C., Ubuka, T., Iqbal, J., Li, Q., Tilbrook, A., Morgan, K., et al. (2008). Potent Action of RFamide-Related Peptide-3 on Pituitary Gonadotropes Indicative of a Hypophysiotropic Role in the Negative Regulation of Gonadotropin Secretion. *Endocrinology* *149*, 5811–5821.
- Clarke, I.J., Smith, J.T., Henry, B.A., Oldfield, B.J., Stefanidis, A., Millar, R.P., Sari, I.P., Chng, K., Fabre-Nys, C., Caraty, A., et al. (2012). Gonadotropin-Inhibitory Hormone Is a Hypothalamic Peptide That Provides a Molecular Switch between Reproduction and Feeding. *Neuroendocrinology* *95*, 305–316.
- Comps-Agrar, L., Kniazeff, J., Nørskov-Lauritsen, L., Maurel, D., Gassmann, M., Gregor, N., Prézeau, L., Bettler, B., Durrroux, T., Trinquet, E., et al. (2011). The oligomeric state sets GABA(B) receptor signalling efficacy. *EMBO J.* *30*, 2336–2349.
- Cong, M., Perry, S.J., Lin, F.T., Fraser, I.D., Hu, L.A., Chen, W., Pitcher, J.A., Scott, J.D., and Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J. Biol. Chem.* *276*, 15192–15199.
- Conklin, B.R., Farfel, Z., Lustig, K.D., Julius, D., and Bourne, H.R. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq α to that of Gi α . *Nature* *363*, 274–276.
- Convertino, M., Samoshkin, A., Gauthier, J., Gold, M.S., Maixner, W., Dokholyan, N. V., and Diatchenko, L. (2015). μ -Opioid receptor 6-transmembrane isoform: A potential therapeutic target for new effective opioids. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* *62*, 61–67.
- Costa-neto, C.M., Parreiras-e-silva, L.T., and Bouvier, M. (2016). MINIREVIEW — A LATIN AMERICAN PERSPECTIVE ON G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS A Pluridimensional View of Biased Agonism. *587–595*.
- Cotter, G., Davison, B.A., Butler, J., Collins, S.P., Ezekowitz, J.A., Felker, G.M., Filippatos, G., Levy, P.D., Metra, M., Ponikowski, P., et al. (2017). Relationship between baseline systolic blood pressure and long-term outcomes in acute heart failure patients treated with TRV027: an exploratory subgroup analysis of BLAST-AHF. *Clin. Res. Cardiol.*
- Dahan, A., Sarton, E., Teppema, L., Olivevier, C., Nieuwenhuijs, D., Matthes, H.W., and Kieffer, B.L. (2001). Anesthetic potency and influence of morphine and sevoflurane on respiration in mu-opioid receptor knockout mice.[Erratum appears in *Anesthesiology* 2001 Sep;95(3):819]. *Anesthesiology* *94*, 824–832.
- Dahlman, I., Dicker, A., Jiao, H., Kere, J., Blomqvist, L., van Harmelen, V., Hoffstedt, J., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Hansen, T., et al. (2007). A common haplotype in the G-protein-coupled receptor gene GPR74 is associated with leanness and increased lipolysis. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 1115–1124.
- Dang, V.C., Chieng, B., Azriel, Y., and Christie, M.J. (2011). Cellular Morphine Tolerance Produced by Arrestin-2-Dependent Impairment of μ -Opioid Receptor Resensitization. *J. Neurosci.* *31*, 7122–7130.
- Davies, J., Chen, J., Pink, R., Carter, D., Saunders, N., Sotiriadis, G., Bai, B., Pan, Y., Howlett, D., Payne, A., et al. (2015). Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Sci. Rep.* *5*, 12584.
- Day, R.N., and Davidson, M.W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* *38*, 2887.
- Devillers, J.P., Boisserie, F., Laulin, J.P., Larcher, A., and Simonnet, G. (1995). Simultaneous activation of spinal antiopioid system (neuropeptide FF) and pain facilitatory circuitry by stimulation of opioid receptors in rats. *Brain Res.* *700*, 173–181.
- DeWire, S.M., Yamashita, D.S., Rominger, D.H., Liu, G., Cowan, C.L., Graczyk, T.M., Chen, X.-T., Pitis, P.M., Gotchev, D., Yuan, C., et al. (2013). A G Protein-Biased Ligand at the μ -Opioid Receptor Is Potently Analgesic with Reduced Gastrointestinal and Respiratory Dysfunction Compared with Morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *344*, 708–717.
- Dickson, E.W., Hogrefe, C.P., Ludwig, P.S., Ackermann, L.W., Stoll, L.L., and Denning, G.M. (2008). Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *294*, H402–H408.
- DiRaddo, J.O., Miller, E.J., Hathaway, H.A., Grajkowska, E., Wroblewska, B., Wolfe, B.B., Liotta, D.C., and Wroblewski, J.T. (2014). A Real-Time Method for Measuring cAMP Production Modulated by Gai/o-Coupled Metabotropic Glutamate Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *349*, 373–382.
- Dockray, G.J., Vaillant, C., and Williams, R.G. (1981). New vertebrate brain-gut peptide related to a molluscan

- neuropeptide and an opioid peptide. *Nature* 293, 656–657.
- Dosakaakita, K., Tortella, F.C., Holaday, J.W., and Long, J.B. (1993). The kappa opioid agonist U-50,488h antagonizes respiratory effects of mu opioid receptor agonists in conscious rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 631–637.
- Drdla-Schutting, R., Benrath, J., Wunderbaldinger, G., and Sandkühler, J. (2012). Erasure of a spinal memory trace of pain by a brief, high-dose opioid administration. *Science* 335, 235–238.
- Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Parsons, A., Yang, J., Zeng, Q., Chen, X., Chang, J.K., and Dun, N.J. (2003). Metastin-like immunoreactivity in the rat medulla oblongata and spinal cord. *Neurosci. Lett.* 335, 197–201.
- Eason, M.G., Jacinto, M.T., and Liggett, S.B. (1994). Contribution of ligand structure to activation of α_2 -adrenergic receptor subtype coupling to G_s . *Mol. Pharmacol.* 45, 696–702.
- Egido, E.M., Hernández, R., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H., Marco, J., and Silvestre, R.A. (2007). 26RFa, a novel orexigenic neuropeptide, inhibits insulin secretion in the rat pancreas. *Peptides* 28, 725–730.
- Ehsan, Z., Mahmoud, M., Shott, S.R., Amin, R.S., and Ishman, S.L. (2016). The effects of Anesthesia and opioids on the upper airway: A systematic review. *Laryngoscope* 126, 270–284.
- Eisenach, J.C., Carpenter, R., and Curry, R. (2003). Analgesia from a peripherally active kappa-opioid receptor agonist in patients with chronic pancreatitis. *Pain* 101, 89–95.
- Elhabazi, K., Trigo, J.M., Mollereau, C., Moulédous, L., Zajac, J.-M., Bihel, F., Schmitt, M., Bourguignon, J.J., Meziane, H., Petit-demoulière, B., et al. (2012). Involvement of neuropeptide FF receptors in neuroadaptive responses to acute and chronic opiate treatments. *Br. J. Pharmacol.* 165, 424–435.
- Elhabazi, K., Humbert, J.J.-P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J.-J., Bucher, B., Becker, J. a J., Sorg, T., Meziane, H., et al. (2013). Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPFF receptors. *Neuropharmacology* 75, 164–171.
- Ellacott, K.L.J., Lawrence, C.B., Pritchard, L.E., and Luckman, S.M. (2003). Repeated administration of the anorectic factor prolactin-releasing peptide leads to tolerance to its effects on energy homeostasis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R1005–R1010.
- Ellis, C. (2004). the State of GPCR Research in 2004. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 577–626.
- Elshourbagy, N. a, Ames, R.S., Fitzgerald, L.R., Foley, J.J., Chambers, J.K., Szekeres, P.G., Evans, N. a, Schmidt, D.B., Buckley, P.T., Dytko, G.M., et al. (2000). Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 25965–25971.
- Engström, M., Brandt, A., Wurster, S., Savola, J.-M., Panula, P., Engstrom, M., Brandt, A., Wurster, S., Savola, J.-M., and Panula, P. (2003). Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 825–832.
- Erbs, E., Faget, L., Scherrer, G., Matifas, A., Filliol, D., Vonesch, J.L., Koch, M., Kessler, P., Hentsch, D., Birling, M.C., et al. (2015). A mu-delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct. Funct.* 220, 677–702.
- Faklaris, O., Cottet, M., Falco, A., Villier, B., Laget, M., Zwier, J.M., Trinquet, E., Mouillac, B., Pin, J.-P., and Durroux, T. (2015). Multicolor time-resolved Förster resonance energy transfer microscopy reveals the impact of GPCR oligomerization on internalization processes. *FASEB J.* 29, 2235–2246.
- Fallon, M.T., and Hanks, G.W. (1999). Morphine, constipation and performance status in advanced cancer patients. *Palliat. Med.* 13, 159–160.
- Fan, F., Binkowski, B.F., Butler, B.L., Stecha, P.F., Lewis, M.K., and Keith V Wood (2008). Novel Genetically Encoded Biosensors Using Firefly Luciferase. *ACS Chem. Biol.* 3, 346–351.
- Fang, Q., Liu, Q., Li, N., Jiang, T.-N., Li, Y.-L., Yan, X., and Wang, R. (2009). Cardiovascular effects of intravenous administered 26RFa, a novel RFamide peptide ligand for GPR103, in anaesthetised rats. *Eur. J. Pharmacol.* 621, 61–66.
- Fang, Q., Jiang, T., Li, N., Han, Z., and Wang, R. (2011). Central administration of neuropeptide FF and related peptides attenuate systemic morphine analgesia in mice. *Protein Pept. Lett.* 18, 403–409.
- Feng, Y., Zhao, H., An, X.-F., Ma, S.-L., and Chen, B.-Y. (2007). Expression of brain prolactin releasing peptide (PrRP) changes in the estrous cycle of female rats. *Neurosci. Lett.* 419, 38–42.
- Ferrandon, S., Feinstein, T.N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J.T., Gardella, T.J., and Vilardaga, J.P. (2009). Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat. Chem. Biol.* 5, 734–742.
- Ferré, S. (2015). The GPCR heterotetramer: challenging classical pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 145–

- Ferré, S., Casadó, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J.-P., and Guitart, X. (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* *66*, 413–434.
- Filliol, D., Ghazizadeh, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W.D., Simonin, F., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (2000). Mice deficient for δ - and μ -opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* *25*, 195–200.
- Franklin, C., Fortepiani, L., Nguyen, T., Rangel, Y., Strong, R., and Gottlieb, H.B. (2015). Renal responses produced by microinjection of the kappa opioid receptor agonist, U50-488H, into sites within the rat lamina terminalis. *Pharmacol. Res. Perspect.* *3*, 1–11.
- Franks, P.W., Bhattacharyya, S., Luan, J., Montague, C., Brennand, J., Challis, B., Brage, S., Ekelund, U., Middelberg, R.P.S., O'Rahilly, S., et al. (2004). Association Between Physical Activity and Blood Pressure Is Modified by Variants in the G-Protein Coupled Receptor 10. *Hypertension* *43*, 224–228.
- Fraser, I.D.C., Cong, M., Kim, J., Rollins, E.N., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J., and Scott, J.D. (2000). Assembly of an A kinase-anchoring protein- β 2 -adrenergic receptor complex facilitates receptor phosphorylation and signaling. *Curr. Biol.* *10*, 409–412.
- Fukusumi, S., Yoshida, H., Fujii, R., Maruyama, M., Komatsu, H., Habata, Y., Shintani, Y., Hinuma, S., and Fujino, M. (2003). A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J. Biol. Chem.* *278*, 46387–46395.
- Galandrin, S., Onfroy, L., Poirot, M.C., Sénard, J.M., and Galés, C. (2016). Delineating biased ligand efficacy at 7TM receptors from an experimental perspective. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *77*, 251–263.
- Ganguly, S., Clayton, A.H.A., and Chattopadhyay, A. (2011). Organization of higher-order oligomers of the serotonin_{1A} receptor explored utilizing homo-FRET in live cells. *Biophys. J.* *100*, 361–368.
- Gavériaux-Ruff, C., and Kieffer, B.L. (2011). Delta opioid receptor analgesia: Recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav. Pharmacol.* *22*, 405–414.
- Gavériaux-Ruff, C., Karchewski, L.A., Hever, X., Matifas, A., and Kieffer, B.L. (2008). Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* *27*, 2558–2567.
- Gendron, L., Pintar, J.E., and Chavkin, C. (2007). Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience* *150*, 807–817.
- Gendron, L., Cahill, C.M., Zastrow, M. Von, Schiller, P.W., and Pineyro, G. (2016). Molecular Pharmacology of δ -Opioid Receptors. *68*, 631–700.
- Geng, X., Zhao, H., Zhang, S., Li, J., Tian, F., Feng, N., Fan, R., Jia, M., Guo, H., Cheng, L., et al. (2017). K-Opioid Receptor Is Involved in the Cardioprotection Induced By Exercise Training. *PLoS One* *12*, 1–16.
- Gerena-López, Y., Nolan, J., Wang, L., Gaigalas, A., Schwartz, A., and Fernández-Repollet, E. (2004). Quantification of EGFP expression on Molt-4 T cells using calibration standards. *Cytometry* *60A*, 21–28.
- Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C.D., Wang, S., Eckhardt, A.E., Cowan, C.L., Spurney, R.F., Luttrell, L.M., et al. (2006). Distinct β -arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* *281*, 10856–10864.
- Gesty-Palmer, D., Flannery, P., Yuan, L., Corsino, L., Spurney, R., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2009). A β -arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. *Sci. Transl. Med.* *1*.
- Gherardi, N., and Zajac, J.M. (1997). Neuropeptide FF receptors of mouse olfactory bulb: binding properties and stimulation of adenylate cyclase activity. *Peptides* *18*, 577–583.
- Gilissen, J., Geubelle, P., Dupuis, N., Laschet, C., Pirotte, B., and Hanson, J. (2015). Forskolin-free cAMP assay for Gi-coupled receptors. *Biochem. Pharmacol.* *98*, 381–391.
- Gomes, I., Ayoub, M.A., Fujita, W., Jaeger, W.C., Pflieger, K.D.G., and Devi, L.A. (2016). G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *56*, 403–425.
- González-Rodríguez, S., Quadir, M.A., Gupta, S., Walker, K.A., Zhang, X., Spahn, V., Labuz, D., Rodríguez-Gaztelumendi, A., Schmelz, M., Joseph, J., et al. (2017). Polyglycerol-opioid conjugate produces analgesia devoid of side effects. *Elife* *6*, 1–24.
- Goodman, A. (1990). Addiction: definition and implications. *Br. J. Addict.* *85*, 1403–1408.
- Goodman, J., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2- adrenergic receptor. *Nature* *383*, 447–450.

- Goswami, C., Rademacher, N., Smalla, K.-H., Kalscheuer, V., Ropers, H.-H., Gundelfinger, E.D., and Hucho, T. (2010). TRPV1 acts as a synaptic protein and regulates vesicle recycling. *J. Cell Sci.* *123*, 2045–2057.
- Gouardères, C., Sutak, M., Zajac, J.M., and Jhamandas, K. (1993). Antinociceptive effects of intrathecally administered F8Famide and FMRFamide in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* *237*, 73–81.
- Gouardères, C., Jhamandas, K., Sutak, M., and Zajac, J.M. (1996). Role of opioid receptors in the spinal antinociceptive effects of neuropeptide FF analogues. *Br. J. Pharmacol.* *117*, 493–501.
- Gouardères, C., Quelven, I., Mollereau, C., Mazarguil, H., Rice, S.Q.J., and Zajac, J.M. (2002). Quantitative autoradiographic distribution of NPFF1 neuropeptide FF receptor in the rat brain and comparison with NPFF2 receptor by using [¹²⁵I]YVP and [(¹²⁵I)]EYF as selective radioligands. *Neuroscience* *115*, 349–361.
- Gouardères, C., Faura, C.C., and Zajac, J.-M. (2004a). Rodent strain differences in the NPFF1 and NPFF2 receptor distribution and density in the central nervous system. *Brain Res.* *1014*, 61–70.
- Gouardères, C., Puget, A., and Zajac, J.-M. (2004b). Detailed distribution of neuropeptide FF receptors (NPFF1 and NPFF2) in the rat, mouse, octodon, rabbit, guinea pig, and marmoset monkey brains: a comparative autoradiographic study. *Synapse* *51*, 249–269.
- Gouardères, C., Mazarguil, H., Mollereau, C., Chartrel, N., Leprince, J., Vaudry, H., and Zajac, J.-M. (2007). Functional differences between NPFF1 and NPFF2 receptor coupling: high intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [³⁵S]GTPγ binding. *Neuropharmacology* *52*, 376–386.
- Greife, A., Felekyan, S., Ma, Q., Gertzen, C.G.W., Spomer, L., Dimura, M., Peulen, T.O., Wöhler, C., Häussinger, D., Gohlke, H., et al. (2016). Structural assemblies of the di- and oligomeric G-protein coupled receptor TGR5 in live cells: an MFIS-FRET and integrative modelling study. *Sci. Rep.* *6*, 36792.
- Grimm, M.C., Ben-Baruch, A., Taub, D.D., Howard, O.M., Resau, J.H., Wang, J.M., Ali, H., Richardson, R., Snyderman, R., and Oppenheim, J.J. (1998). Opiates transdeactivate chemokine receptors: delta and mu opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *J. Exp. Med.* *188*, 317–325.
- Gris, P., Gauthier, J., Cheng, P., Gibson, D.G., Gris, D., Laur, O., Pierson, J., Wentworth, S., Nackley, A.G., Maixner, W., et al. (2010). A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: Functional antagonism. *Mol. Pain* *6*, 1–10.
- Grosser, T., Woolf, C.J., and FitzGerald, G.A. (2017). Time for nonaddictive relief of pain. *Science* (80-.). *355*, 1026–1027.
- Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Rüttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N.K., et al. (2018). Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat. Commun.* *9*, 341.
- Gu, W., Geddes, B.J., Zhang, C., Foley, K.P., and Stricker-Krongrad, A. (2004). The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice. *J. Mol. Neurosci.* *22*, 93–103.
- Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., and Javitch, J.A. (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* *27*, 2293–2304.
- Guo, W., Miyoshi, K., Dubner, R., Gu, M., Li, M., Liu, J., Yang, J., Zou, S., Ren, K., Noguchi, K., et al. (2014). Spinal 5-HT₃ receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a reciprocal neuron-glia signaling cascade. *Mol. Pain* *10*, 35.
- Gutknecht, E., Vauquelin, G., and Dautzenberg, F.M. (2010). Corticotropin-releasing factor receptors induce calcium mobilization through cross-talk with Gq-coupled receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *642*, 1–9.
- Han, L., Zhao, Y., Zhang, X., Peng, J., Xu, P., Huan, S., and Zhang, M. (2014). RFP tags for labeling secretory pathway proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *447*, 508–512.
- Han, S.-K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., and Herbison, A.E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.* *25*, 11349–11356.
- Hanack, C., Moroni, M., Selbach, M., Siemens, J., Hanack, C., Moroni, M., Lima, W.C., Wende, H., Kirchner, M., and Adelfinger, L. (2015). Article GABA Blocks Pathological but Not Acute TRPV1 Pain Article GABA Blocks Pathological but Not Acute TRPV1 Pain Signals. *Cell* *160*, 759–770.
- van Harmelen, V., Dicker, A., Sjölin, E., Blomqvist, L., Wirén, M., Hoffstedt, J., Rydén, M., and Arner, P. (2010). Effects of pain controlling neuropeptides on human fat cell lipolysis. *Int. J. Obes. (Lond)*. *34*, 1333–1340.
- HAS (2015). Avis de la Commission de la Transparence sur l'inscription du Naloxéol.
- Hasbi, A., Perreault, M.L., Shen, M.Y.F., Zhang, L., To, R., Fan, T., Nguyen, T., Ji, X., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2014). A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D1-D2 receptor heteromer to block signaling and function in vitro and in vivo: effective selective antagonism. *FASEB J.* *28*, 4806–4820.

- Hauge-Evans, A.C., Richardson, C.C., Milne, H.M., Christie, M.R., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2006). A role for kisspeptin in islet function. *Diabetologia* 49, 2131–2135.
- Hayakawa, J.U.N., Ohmichi, M., Tasaka, K., Kanda, Y., Adachi, K., Nishio, Y., Hisamoto, K., Mabuchi, S., Hinuma, S., and Murata, Y. (2002). Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein. *Endocrinology* 143, 13–22.
- Hayhurst, C.J., and Durieux, M.E. (2016). Differential Opioid Tolerance and Opioid-induced Hyperalgesia: A Clinical Reality. *Anesthesiology* 124, 483–488.
- Headrick, J.P., See Hoe, L.E., Du Toit, E.F., and Peart, J.N. (2015). Opioid receptors and cardioprotection - "opioidergic conditioning" of the heart. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2026–2050.
- Herenbrink, C.K., Sykes, D.A., Donthamsetti, P., Canals, M., Coudrat, T., Shonberg, J., Scammells, P.J., Capuano, B., Sexton, P.M., Charlton, S.J., et al. (2016). The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. *Nat Commun* 7, 1–14.
- Hermans, E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 99, 25–44.
- Hilairt, S., Bouaboula, M., Carrière, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (2003). Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *J. Biol. Chem.* 278, 23731–23737.
- Hilger, D., Masureel, M., and Kobilka, B.K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 4–12.
- Hill, S.J., Williams, C., and May, L.T. (2010). Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1266–1275.
- Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., et al. (1998). A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393, 272–276.
- Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M., Fujii, R., Watanabe, T., Kikuchi, K., Terao, Y., et al. (2000). New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat. Cell Biol.* 2, 703–708.
- Horiuchi, J., Saigusa, T., Sugiyama, N., Kanba, S., Nishida, Y., Sato, Y., Hinuma, S., and Arita, J. (2002). Effects of prolactin-releasing peptide microinjection into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats. *Brain Res.* 958, 201–209.
- Hsu, M.-C., Wang, J.-Y., Lee, Y.-J., Jong, D.-S., Tsui, K.-H., and Chiu, C.-H. (2014). Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. *Reproduction* 147, 835–845.
- Huggins, R.A., Glass, W.G., and Bryan, A.R. (1951). The cardiovascular effects of some narcotics. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 86, 112–120.
- Ikeda, K., Kobayashi, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Kumanishi, T., Kishida, H., Yano, R., and Manabe, T. (1997). Functional coupling of the nociceptin/orphanin FQ receptor with the G-protein-activated K^+ (GIRK) channel. *Brain Res Mol Brain Res* 45, 117–126.
- Ilien, B., Franchet, C., Bernard, P., Weill, C.O., Bourguignon, J., Hibert, M., and Galzi, J. (2003). Fluorescence resonance energy transfer to probe human M1 muscarinic receptor structure and drug binding properties. 768–778.
- Imam, M.Z., Kuo, A., Ghassabian, S., and Smith, M.T. (2017). Progress in understanding mechanisms of opioid-induced gastrointestinal adverse effects and respiratory depression. *Neuropharmacology* 131, 238–255.
- Irannejad, R., Tomshine, J.R.J.C.J.R.J.C., Tomshine, J.R.J.C.J.R.J.C., Chevalier, M., Mahoney, J.P., Steyaert, J., Rasmussen, S.G.F.F., Sunahara, R.K., El-Samad, H., Huang, B., et al. (2013). Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* 495, 534–538.
- Irannejad, R., Pessino, V., Mika, D., Huang, B., Wedegaertner, P.B., Conti, M., and Von Zastrow, M. (2017). Functional selectivity of GPCR-directed drug action through location bias. *Nat. Chem. Biol.* 13, 799–806.
- Jagla, C., Martus, P., and Stein, C. (2014). Peripheral opioid receptor blockade increases postoperative morphine demands - A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain* 155, 2056–2062.
- Jean-Alphonse, F.G., Wehbi, V.L., Chen, J., Noda, M., Taboas, J.M., Xiao, K., and Vilardaga, J.P. (2017). β 2 -adrenergic receptor control of endosomal PTH receptor signaling via G β 3. *Nat. Chem. Biol.* 13, 259–261.
- Jhamandas, J.H., and Goncharuk, V. (2013). Role of neuropeptide FF in central cardiovascular and neuroendocrine regulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4, 8.
- Jhamandas, J.H., and MacTavish, D. (2003). Central administration of neuropeptide FF causes activation of

- oxytocin paraventricular hypothalamic neurones that project to the brainstem. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 24–32.
- Jhamandas, J.H., Simonin, F., Bourguignon, J.-J., and Harris, K.H. (2007). Neuropeptide FF and neuropeptide VF inhibit GABAergic neurotransmission in parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* *292*, R1872–R1880.
- Ji, R.R., Chamessian, A., and Zhang, Y.Q. (2016). Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* (80-.). *354*, 572–577.
- Jiang, M., and Bajpayee, N.S. (2009). Molecular mechanisms of Gq signaling. *Neurosignals.* *17*, 23–41.
- Johnson, M.A., and Fraley, G.S. (2008). Rat RFRP-3 alters hypothalamic GHRH expression and growth hormone secretion but does not affect KiSS-1 gene expression or the onset of puberty in male rats. *Neuroendocrinology* *88*, 305–315.
- Johnson, M.A., Tsutsui, K., and Fraley, G.S. (2007). Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm. Behav.* *51*, 171–180.
- Jonas, K.C., and Hanyaloglu, A.C. (2017). Impact of G protein-coupled receptor heteromers in endocrine systems. *Mol. Cell. Endocrinol.* *449*, 21–27.
- Kalliomäki, M.-L., Pertovaara, A., Brandt, A., Wei, H., Pietilä, P., Kalmari, J., Xu, M., Kalso, E., and Panula, P. (2004). Prolactin-releasing peptide affects pain, allodynia and autonomic reflexes through medullary mechanisms. *Neuropharmacology* *46*, 412–424.
- Kamal, M., and Jockers, R. (2011). Biological Significance of GPCR Heteromerization in the Neuro-Endocrine System. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. *2*, 2.
- Kamal, M., Gbahou, F., Guillaume, J.-L., Daulat, A.M., Benleulmi-Chaachoua, A., Luka, M., Chen, P., Kalbasi Anaraki, D., Baroncini, M., Mannoury la Cour, C., et al. (2015). Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT2/5-HT2C receptor heteromers. *J. Biol. Chem.* *290*, 11537–11546.
- Kapusta, D.R., Sezen, S.F., Chang, J.K., Lipton, H., and Kenigs, V.A. (1997). Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life Sci.* *60*, L15–L21.
- Kataoka, Y., Iijima, N., Yano, T., Kakihara, K., Hayashi, S., Hinuma, S., Honjo, H., Hayashi, S., Tanaka, M., and Ibata, Y. (2001). Gonadal regulation of PrRP mRNA expression in the nucleus tractus solitarius and ventral and lateral reticular nuclei of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *87*, 42–47.
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R.C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *53*, 531–556.
- Kenakin, T., and Christopoulos, A. (2013). Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 205–216.
- Kersanté, F., Mollereau, C., Zajac, J.-M., and Roumy, M. (2006). Anti-opioid activities of NPFF1 receptors in a SH-SY5Y model. *Peptides* *27*, 980–989.
- Kersanté, F., Moulédous, L., Zajac, J.-M., and Mollereau, C. (2010). Modulation by neuropeptide FF of the interaction of mu-opioid (MOP) receptor with G-proteins. *Neurochem. Int.* *56*, 768–773.
- Kim, B.-J., Ghil, S.-H., Kim, M.-J., Yun Park, S., Kim, D.-S., Hwan Kim, S., Chin, H., Birnbaumer, L., Jiang, M., Hong, S.Y., et al. (2003). Modulation of the N-type calcium channel gene expression by the α subunit of Go. *Mol. Brain Res.* *112*, 95–102.
- Kim, I.-M., Tilley, D.G., Chen, J., Salazar, N.C., Whalen, E.J., Violin, J.D., and Rockman, H. a (2008). Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14555–14560.
- Kim, Y.S., Chu, Y., Han, L., Li, M., Li, Z., LaVinka, P.C., Sun, S., Tang, Z., Park, K., Caterina, M.J., et al. (2014). Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. *Neuron* *81*, 873–887.
- Kimura, A., Ohmichi, M., Tasaka, K., Kanda, Y., Ikegami, H., Hayakawa, J., Hisamoto, K., Morishige, K.I., Hinuma, S., Kurachi, H., et al. (2000). Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 3667–3674.
- Knapp, R.J., Malatynska, E., Collins, N., Fang, L., Wang, J.Y., Hruby, V.J., Roeske, W.R., and Yamamura, H.I. (1995). Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *FASEB J.* *9*, 516–525.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., and Verkman, A.S. (1998). Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Intracellular pH Indicator. *Biophys. J.* *74*, 1591–1599.

- Kniazeff, J., Prézeau, L., Rondard, P., Pin, J.P., and Goudet, C. (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol. Ther.* *130*, 9–25.
- Koch-Weser, J., and Schechter, P.J. (1978). Schmiedeberg in Strassburg 1872–1918: The making of modern pharmacology. *Life Sci.* *22*, 1361–1371.
- Kohout, T.A. (2003). Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization. *Mol. Pharmacol.* *63*, 9–18.
- Kolesnikov, Y., Jain, S., Wilson, R., and Pasternak, G.W. (1996). Peripheral kappa 1-opioid receptor-mediated analgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* *310*, 141–143.
- Kónyi, A., Skoumal, R., Kubin, A.-M., Füredi, G., Perjés, Á., Farkasfalvi, K., Sárszegi, Z., Horkay, F., Horváth, I.G., Tóth, M., et al. (2010). Prolactin-releasing peptide regulates cardiac contractility. *Regul. Pept.* *159*, 9–13.
- Koppert, W. (2007). Opioid-induced hyperalgesia—Pathophysiology and clinical relevance. *Acute Pain* *9*, 21–34.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, a, Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., et al. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* *276*, 34631–34636.
- Kotlińska, J., Suder, P., Legowska, A., Rolka, K., and Silberring, J. (2000). Orphanin FQ/nociceptin inhibits morphine withdrawal. *Life Sci.* *66*, 119–123.
- Kotowski, S.J., Hopf, F.W., Seif, T., Bonci, A., and von Zastrow, M. (2011). Endocytosis Promotes Rapid Dopaminergic Signaling. *Neuron* *71*, 278–290.
- Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., and Silver, R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 2410–2415.
- Van Der Laan, J.W., Krajnc, E.I., Krajnc-Franken, M.A.M., and Van Loveren, H. (1995). Immunotoxicological screening of morphine and methadone in an extended 28 day study in rats. *Int. J. Immunopharmacol.* *17*, 535–543.
- LaBuda, C.J., Sora, I., Uhl, G.R., and Fuchs, P.N. (2000). Stress-induced analgesia in mu-opioid receptor knockout mice reveals normal function of the delta-opioid receptor system. *Brain Res.* *869*, 1–5.
- Labuz, D., Mousa, S.A., Schäfer, M., Stein, C., and Machelska, H. (2007). Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. *Brain Res.* *1160*, 30–38.
- Land, B.B., Bruchas, M.R., Lemos, J.C., Xu, M., Melief, E.J., and Chavkin, C. (2008). The Dysphoric Component of Stress Is Encoded by Activation of the Dynorphin -Opioid System. *J. Neurosci.* *28*, 407–414.
- Langmead, C.J., Szekeres, P.G., Chambers, J.K., Ratcliffe, S.J., Jones, D.N., Hirst, W.D., Price, G.W., and Herdon, H.J. (2000). Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br. J. Pharmacol.* *131*, 683–688.
- Lanza, A.M., Kim, D.S., and Alper, H.S. (2013). Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. *Biotechnol. J.* *8*, 811–821.
- Laurent, P., Becker, J. a J., Valverde, O., Ledent, C., de Kerchove d'Exaerde, A., Schiffmann, S.N., Maldonado, R., Vassart, G., and Parmentier, M. (2005). The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10. *Nat. Neurosci.* *8*, 1735–1741.
- Lawrence, C.B., Celsi, F., Brennand, J., and Luckman, S.M. (2000). Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat. Neurosci.* *3*, 645–646.
- Lectez, B., Jeandel, L., El-Yamani, F.-Z., Arthaud, S., Alexandre, D., Mardargent, A., Jégou, S., Mounien, L., Bizet, P., Magoul, R., et al. (2009). The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology* *150*, 2342–2350.
- Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., et al. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* *446*, 103–107.
- Lee, M.G., Udem, B.J., Brown, C., and Carr, M.J. (2006). Effect of nociceptin in acid-evoked cough and airway sensory nerve activation in guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 271–275.
- Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lan??a, A.J., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2004). Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J. Biol. Chem.* *279*, 35671–35678.
- León, S., García-Galiano, D., Ruiz-Pino, F., Barroso, A., Manfredi-Lozano, M., Romero-Ruiz, A., Roa, J., Vázquez,

- M.J., Gaytan, F., Blomenrohr, M., et al. (2014). Physiological Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone Signaling in the Control of Mammalian Reproductive Axis: Studies in the NPFF1 Receptor Null Mouse. *Endocrinology* 155, en20141030.
- Levitt, E.S., Purington, L.C., and Traynor, J.R. (2010). Gi/o-Coupled Receptors Compete for Signaling to Adenylyl Cyclase in SH-SY5Y Cells and Reduce Opioid-Mediated cAMP Overshoot. *Mol. Pharmacol.* 79, 461–471.
- Levitz, J., Habrian, C., Bharill, S., Fu, Z., Vafabakhsh, R., Isacoff Correspondence, E.Y., and Isacoff, E.Y. (2016). Mechanism of Assembly and Cooperativity of Homomeric and Heteromeric Metabotropic Glutamate Receptors. *Neuron* 92, 1–17.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.-L., Couturier, C., Delagrang, P., and Jockers, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J.* 25, 3012–3023.
- Liebel, J.T., Swandulla, D., and Zeilhofer, H.U. (1997). Modulation of excitatory synaptic transmission by nociceptin in superficial dorsal horn neurones of the neonatal rat spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 121, 425–432.
- Lin, Y., Liu, H., Day, Y., Chang, C., Hsu, P., and Chen, J. (2017). Activation of NPFFR2 leads to hyperalgesia through the spinal inflammatory mediator CGRP in mice. *Exp. Neurol.* 291, 62–73.
- Liu, X., and Sandkühler, J. (1997). Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J. Neurophysiol.* 78, 1973–1982.
- Liu, Q., Guan, X.-M.M., Martin, W.J., McDonald, T.P., Clements, M.K., Jiang, Q., Zeng, Z., Jacobson, M., Williams, D.L., Yu, H., et al. (2001). Identification and Characterization of Novel Mammalian Neuropeptide FF-like Peptides That Attenuate Morphine-induced Antinociception. *J. Biol. Chem.* 276, 36961–36969.
- Liu, X., Lee, K., and Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin Excites Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons through a Phospholipase C/Calcium-Dependent Pathway Regulating Multiple Ion Channels. *Endocrinology* 149, 4605–4614.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547–1550.
- Lucido, A.L., Morinville, A., Gendron, L., Stroh, T., and Beaudet, A. (2005). Prolonged morphine treatment selectively increases membrane recruitment of δ -opioid receptors in mouse basal ganglia. *J. Mol. Neurosci.* 25, 207–213.
- Lutz, P., and Kieffer, B.L. (2013). Opioid receptors : distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci.* 36, 195–206.
- Ma, L., MacTavish, D., Simonin, F., Bourguignon, J.-J., Watanabe, T., and Jhamandas, J.H. (2009). Prolactin-releasing peptide effects in the rat brain are mediated through the Neuropeptide FF receptor. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1585–1593.
- Magalhaes, A.C., Dunn, H., and Ferguson, S.S.G. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1717–1736.
- Maguire, J.J., Kirby, H.R., Mead, E.J., Kuc, R.E., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., and Davenport, A.P. (2011). Inotropic Action of the Puberty Hormone Kisspeptin in Rat, Mouse and Human: Cardiovascular Distribution and Characteristics of the Kisspeptin Receptor. *PLoS One* 6, e27601.
- Malin, D.H., Lake, J.R., Hammond, M. V, Fowler, D.E., Rogillio, R.B., Brown, S.L., Sims, J.L., Leecraft, B.M., and Yang, H.Y.T. (1990). FMRF-NH2-like mammalian octapeptide: Possible role in opiate dependence and abstinence. *Peptides* 11, 969–972.
- Mallick-Searle, T., and Fillman, M. (2017). The pathophysiology, incidence, impact, and treatment of opioid-induced nausea and vomiting. *J. Am. Assoc. Nurse Pract.* 29, 704–710.
- Manchikanti, L., Kaye, A.M., Knezevic, N.N., Mcanally, H., Slavin, K. V, Trescot, A.M., Blank, S., Pampati, V., Abdi, S., Grider, J.S., et al. (2017). Responsible , Safe , and Effective Prescription of Opioids for Chronic Non-Cancer Pain : American Society of Interventional Pain Physicians (ASIPP) Guidelines. 3–92.
- Manglik, A., Lin, H., Aryal, D.K., McCorvy, J.D., Dengler, D., Corder, G., Levit, A., Kling, R.C., Bernat, V., Hübner, H., et al. (2016). Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537, 185–190.
- Marchese, A., Heiber, M., Nguyen, T., Heng, H.H., Saldivia, V.R., Cheng, R., Murphy, P.M., Tsui, L.C., Shi, X., and Gregor, P. (1995). Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 29, 335–344.
- Marrone, G.F., Le Rouzic, V., Varadi, A., Xu, J., Rajadhyaksha, A.M., Majumdar, S., Pan, Y.X., and Pasternak, G.W. (2017). Genetic dissociation of morphine analgesia from hyperalgesia in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 234, 1891–1900.

- Martin, M., Matifas, A., Maldonado, R., and Kieffer, B.L. (2003). Acute antinociceptive responses in single and combinatorial opioid receptor knockout mice: Distinct mu, delta and kappa tones. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 701–708.
- Martinez, V., Attal, N., Bouhassira, D., and Lanteri-Minet, M. (2010). Les douleurs neuropathiques chroniques : diagnostic, évaluation et traitement en médecine ambulatoire. *Recommandations pour la pratique clinique de la Société française d'étude et de traitement de la douleur. Douleurs Eval. - Diagnostic - Trait.* *11*, 3–21.
- Masri, B., Salahpour, A., Didriksen, M., Ghisi, V., Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2008). Antagonism of dopamine D2 receptor/ -arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 13656–13661.
- Masuoka, T., Kudo, M., Yoshida, J., Ishibashi, T., Muramatsu, I., Kato, N., Imaizumi, N., and Nishio, M. (2016). Long-term activation of group I metabotropic glutamate receptors increases functional TRPV1-expressing neurons in mouse dorsal root ganglia. *Front. Cell. Neurosci.* *10*, 1–12.
- Matthes, H.W.D., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. *Nature* *383*, 819–823.
- McCarthy, L., Wetzel, M., Sliker, J.K., Eisenstein, T.K., and Rogers, T.J. (2001). Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend.* *62*, 111–123.
- Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E., and Davenport, A.P. (2007). Kisspeptins Are Novel Potent Vasoconstrictors in Humans, with a Discrete Localization of Their Receptor, G Protein-Coupled Receptor 54, to Atherosclerosis-Prone Vessels. *Endocrinology* *148*, 140–147.
- Melzack, R., and Wall, P.D. (1965). Pain Mechanisms: A New Theory. *Science* (80-). *150*, 971–978.
- Mezei, Z., Zamani-Forooshani, O., Csabafi, K., Szikszai, B., Papp, E., Ónodi, Á., Török, D., Leprán, Á., Telegdy, G., and Szabó, G. (2015). The effect of kisspeptin on the regulation of vascular tone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *93*, 787–791.
- Mi, W.-L., Mao-Ying, Q.-L., Liu, Q., Wang, X.-W., Li, X., Wang, Y.-Q., and Wu, G.-C. (2009). The distribution of kisspeptin and its receptor GPR54 in rat dorsal root ganglion and up-regulation of its expression after CFA injection. *Brain Res. Bull.* *78*, 254–260.
- Milligan, G., and Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: A short history. *Br. J. Pharmacol.* *147*.
- Mogil, J.S., Grisel, J.E., Zhangs, G., Belknap, J.K., and Grandy, D.K. (1996). Functional antagonism of μ -, δ - and κ -opioid antinociception by orphanin FQ. *Neurosci. Lett.* *214*, 131–134.
- Mollereau, C., Mazarguil, H., Marcus, D., Quélven, I., Kotani, M., Lannoy, V., Dumont, Y., Quirion, R., Detheux, M., Parmentier, M., et al. (2002). Pharmacological characterization of human NPFF(1) and NPFF(2) receptors expressed in CHO cells by using NPY Y(1) receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* *451*, 245–256.
- Mollereau, C., Mazarguil, H., Zajac, J.-M., and Roumy, M. (2004). Neuropeptide FF (NPFF) Analogs Functionally Antagonize Opioid Activities in NPFF2 Receptor-Transfected SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Mol. Pharmacol.* *67*, 965–975.
- Molnár, C.S., Kalló, I., Liposits, Z., and Hrabovszky, E. (2011). Estradiol down-regulates RF-amide-related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* *152*, 1684–1690.
- Morgan, A.J., Murray, K.J., and Challiss, R.A.J. (1993). Comparison of the effect of isobutylmethylxanthine and phosphodiesterase-selective inhibitors on cAMP levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* *45*, 2373–2380.
- Moriya, R., Sano, H., Umeda, T., Ito, M., Takahashi, Y., Matsuda, M., Ishihara, A., Kanatani, A., and Iwaasa, H. (2006). RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* *147*, 2916–2922.
- Moulédous, L., Barthas, F., and Zajac, J.M. (2010). Opposite control of body temperature by NPFF1 and NPFF2 receptors in mice. *Neuropeptides* *44*, 453–456.
- Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., et al. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.* *276*, 28969–28975.
- Müller-Taubenberger, A., and Anderson, K.I. (2007). Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *77*, 1–12.
- Multispan, I. GPCR Protocols, GPCR HTS | Multispan Inc.
- Mulumba, M., Jossart, C., Granata, R., Gallo, D., Escher, E., Ghigo, E., Servant, M.J., Marleau, S., and Ong, H. (2010). GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Mol. Endocrinol.* *24*, 1615–1625.

- Nakaya, M., Chikura, S., Watari, K., Mizuno, N., Mochinaga, K., Mangmool, S., Koyanagi, S., Ohdo, S., Sato, Y., Ide, T., et al. (2012). Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent and G protein-coupled receptor kinase 5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways. *J. Biol. Chem.* *287*, 35669–35677.
- Nanmoku, T., Takekoshi, K., Isobe, K., Kawakami, Y., Nakai, T., and Okuda, Y. (2003). Prolactin-releasing peptide stimulates catecholamine release but not proliferation in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci. Lett.* *350*, 33–36.
- Nanmoku, T., Takekoshi, K., Fukuda, T., Ishii, K., Isobe, K., and Kawakami, Y. (2005). Stimulation of catecholamine biosynthesis via the PKC pathway by prolactin-releasing peptide in PC12 rat pheochromocytoma cells. *J. Endocrinol.* *186*, 233–239.
- Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Nogueiras, R., Vigo, E., Tovar, S., Chartrel, N., Le Marec, O., Leprince, J., Aguilar, E., Pinilla, L., et al. (2006). Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J. Physiol.* *573*, 237–249.
- Nguyen, T.L., Nam, Y.S., Lee, S.Y., Kim, H.C., and Jang, C.G. (2010). Effects of capsazepine, a transient receptor potential vanilloid type 1 antagonist, on morphine-induced antinociception, tolerance, and dependence in mice. *Br. J. Anaesth.* *105*, 668–674.
- Nichols, R., Demers, L.A., Larsen, B.M., Robinson, D., Converso, K., Russell, M.W., and Westfall, M. V. (2010). Human RFamide-related peptide-1 diminishes cellular and integrated cardiac contractile performance. *Peptides* *31*, 2067–2074.
- Nichols, R., Bass, C., Demers, L., Larsen, B., Li, E., Blewett, N., Converso-Baran, K., Russell, M.W., and Westfall, M. V. (2012). Structure-activity studies of RFamide-related peptide-1 identify a functional receptor antagonist and novel cardiac myocyte signaling pathway involved in contractile performance. *J. Med. Chem.* *55*, 7736–7745.
- Nicholson, C.D., Jackman, S.A., and Wilke, R. (1989). The ability of denbufylline to inhibit cyclic nucleotide phosphodiesterase and its affinity for adenosine receptors and the adenosine re-uptake site. *Br. J. Pharmacol.* *97*, 889–897.
- Nicklous, D.M., and Simansky, K.J. (2003). Neuropeptide FF exerts pro- and anti-opioid actions in the parabrachial nucleus to modulate food intake. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* *285*, R1046–R1054.
- Nieminen, M.L., Brandt, A., Pietilä, P., and Panula, P. (2000). Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat. *Peptides* *21*, 1695–1701.
- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.-Y., Bressler, E.A., Hara, M.R., et al. (2011). Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci. Signal.* *4*, ra51.
- Nordemann, U., Wifling, D., Schnell, D., Bernhardt, G., Stark, H., Seifert, R., and Buschauer, A. (2013). Luciferase Reporter Gene Assay on Human, Murine and Rat Histamine H4 Receptor Orthologs: Correlations and Discrepancies between Distal and Proximal Readouts. *PLoS One* *8*, 1–12.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., et al. (2013). The dynamic process of $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation. *Cell* *152*, 532–542.
- Nystedt, J.M., Lemberg, K., Lintunen, M., Mustonen, K., Holma, R., Kontinen, V.K., Kalso, E., and Panula, P. (2004). Pain- and morphine-associated transcriptional regulation of neuropeptide FF and the G-protein-coupled NPFF2 receptor gene. *Neurobiol. Dis.* *16*, 254–262.
- Oberling, P., Stinus, L., Le Moal, M., and Simonnet, G. (1993). Biphasic effect on nociception and antinociceptive activity of the neuropeptide FF (FLFQQRamide) in the rat. *Peptides* *14*, 919–924.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., et al. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* *411*, 613–617.
- Oladosu, F.A., Conrad, M.S., O'Buckley, S.C., Rashid, N.U., Slade, G.D., and Nackley, A.G. (2015). Mu Opioid Splice Variant MOR-1K Contributes to the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia. *PLoS One* *10*, e0135711.
- Olsen, Y. (2016). The CDC guideline on opioid prescribing: Rising to the challenge. *J. Am. Med. Assoc.* *315*, 1577–1579.
- Onaran, H.O., Ambrosio, C., Ugur, Ö., Madaras Koncz, E., Grò, M.C., Vezzi, V., Rajagopal, S., and Costa, T. (2017). Systematic errors in detecting biased agonism: Analysis of current methods and development of a new model-free approach. *Sci. Rep.* *7*, 1–17.
- Ossipov, M.H., Lai, J., Vanderah, T.W., and Porreca, F. (2003). Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: Relationship to opioid antinociceptive tolerance. *Life Sci.* *73*, 783–800.

- Overton, M.C., and Blumer, K.J. (2000). G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr. Biol.* *10*, 341–344.
- Pan, Z.Z., Tershner, S.A., and Fields, H.L. (1997). Cellular mechanism for anti-analgesic action of agonists of the kappa - opioid receptor. *Nature* *389*, 382–385.
- Pang, P.S., Butler, J., Collins, S.P., Cotter, G., Davison, B.A., Ezekowitz, J.A., Filippatos, G., Levy, P.D., Metra, M., Ponikowski, P., et al. (2017). Biased ligand of the angiotensin II type 1 receptor in patients with acute heart failure: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIB, dose ranging trial (BLAST-AHF). *Eur. Heart J.* *38*, 2364–2373.
- Paradis, J.S., Ly, S., Blondel-Tepaz, É., Galan, J.A., Beautrait, A., Scott, M.G.H., Enslin, H., Marullo, S., Roux, P.P., and Bouvier, M. (2015). Receptor sequestration in response to β -arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, E5160–E5168.
- Pasternak, G.W., and Pan, Y.-X. (2013). Mu Opioids and Their Receptors: Evolution of a Concept. *Pharmacol. Rev.* *65*, 1257–1317.
- Patel, S.R., Murphy, K.G., Thompson, E.L., Patterson, M., Curtis, A.E., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2008). Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* *149*, 4747–4754.
- Perry, S.J., Yi-Kung Huang, E., Cronk, D., Bagust, J., Sharma, R., Walker, R.J., Wilson, S., and Burke, J.F. (1997). A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPPF and FMRFamide. *FEBS Lett.* *409*, 426–430.
- Peterson, Y.K., and Luttrell, L.M. (2017). The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein–Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol. Rev.* *69*, 256–297.
- Peterson, C.D., Kitto, K.F., Akg, E., Wilcox, G.L., Portoghese, P.S., Akgün, E., Lunzer, M.M., Riedl, M.S., Vulchanova, L., Wilcox, G.L., et al. (2017). Bivalent ligand that activates mu opioid receptor and antagonizes mGluR5 receptor reduces neuropathic pain in mice. *Pain* *158*, 2431–2441.
- Philip, F., Kadamur, G., Silos, R.G., Woodson, J., and Ross, E.M. (2010a). Synergistic activation of phospholipase C- β 3 by G α q and G β γ describes a simple two-state coincidence detector. *Curr. Biol.* *20*, 1327–1335.
- Philip, F., Kadamur, G., Silos, R.G., Woodson, J., and Ross, E.M. (2010b). Synergistic activation of phospholipase C-beta3 by Galpha(q) and Gbetagamma describes a simple two-state coincidence detector. *Curr. Biol.* *20*, 1327–1335.
- Post, A., Smart, T.S., Krikke-Workel, J., Dawson, G.R., Harmer, C.J., Browning, M., Jackson, K., Kakar, R., Mohs, R., Statnick, M., et al. (2016). A Selective Nociceptin Receptor Antagonist to Treat Depression: Evidence from Preclinical and Clinical Studies. *Neuropsychopharmacology* *41*, 1803–1812.
- Pradhan, A., Smith, M., McGuire, B., Evans, C., and Walwyn, W. (2013). Chronic Inflammatory Injury Results in Increased Coupling of Delta Opioid Receptors to Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. *Mol. Pain* *9*, 1744–8069 – 9–8.
- Prezeau, L., Rives, M.-L., Comps-Agrar, L., Maurel, D., Kniazeff, J., and Pin, J.-P. (2010). Functional crosstalk between GPCRs: with or without oligomerization. *Curr. Opin. Pharmacol.* *10*, 6–13.
- Price, D., and Greenberg, M. (1977). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* (80-).
- Primeaux, S., Barnes, M., and Braymer, H. (2013). Hypothalamic QRFP: Regulation of Food Intake and Fat Selection. *Horm. Metab. Res.* *45*, 967–974.
- Proméga GloSensor(TM) cAMP Assay Technical Manual, TM076.
- Pugsley, M., Penz, W., Walker, M., and Wong, T. (1992). Cardiovascular actions of the K-agonist, U-50,488H, in the absence and presence of opioid receptor blockade. *Br. J. Pharmacol.* *105*, 521–526.
- Puthenveedu, M.A., and von Zastrow, M. (2006). Cargo Regulates Clathrin-Coated Pit Dynamics. *Cell* *127*, 113–124.
- Quelven, I., Roussin, A., and Zajac, J. (2005). Comparison of pharmacological activities of Neuropeptide FF1 and Neuropeptide FF2 receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* *508*, 107–114.
- Quillet, R., Ayachi, S., Bihel, F., Elhabazi, K., Ilien, B., and Simonin, F. (2016). RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol. Ther.* *160*, 84–132.
- Raehal, K.M., Walker, J.K.L., and Bohn, L.M. (2005). Morphine side effects in beta-arrestin-2 knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *314*, 1195–1201.
- Rajagopal, K., Whalen, E.J., Violin, J.D., Stiber, J.A., Rosenberg, P.B., Premont, R.T., Coffman, T.M., Rockman, H.A., and Lefkowitz, R.J. (2006). β -arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A in

- receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103.
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., and Lefkowitz, R.J. (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 373–386.
- Ramaesh, T., Logie, J.J., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Walker, B.R., Hadoke, P.W.F., and Reynolds, R.M. (2010). Kisspeptin-10 Inhibits Angiogenesis in Human Placental Vessels *ex Vivo* and Endothelial Cells *in Vitro*. *Endocrinology* 151, 5927–5934.
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 654–659.
- Rasmussen, S.G.F., Devree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011). Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–557.
- do Rego, J.-C., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H., and Costentin, J. (2006). Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides* 27, 2715–2721.
- Richards, E.M., Mathews, D.C., Luckenbaugh, D.A., Ionescu, D.F., Machado-Vieira, R., Niciu, M.J., Duncan, W.C., Nolan, N.M., Franco-Chaves, J.A., Hudzik, T., et al. (2016). A randomized, placebo-controlled pilot trial of the delta opioid receptor agonist AZD2327 in anxious depression. *Psychopharmacology (Berl.)* 233, 1119–1130.
- Risdahl, J.M., Peterson, P.K., Chao, C.C., Pijoan, C., and Molitor, T.W. (1993). Effects of morphine dependence on the pathogenesis of swine herpesvirus infection. *J. Infect. Dis.* 167, 1281–1287.
- Rivat, C., Vera-Portocarrero, L.P., Ibrahim, M.M., Mata, H.P., Stagg, N.J., De Felice, M., Porreca, F., and Malan, T.P. (2009). Spinal NK-1 receptor-expressing neurons and descending pathways support fentanyl-induced pain hypersensitivity in a rat model of postoperative pain. *Eur. J. Neurosci.* 29, 727–737.
- Rives, M.-L., Vol, C., Fukazawa, Y., Tinel, N., Trinquet, E., Ayoub, M.A., Shigemoto, R., Pin, J.-P., and Prézeau, L. (2009). Crosstalk between GABAB and mGlu1a receptors reveals new insight into GPCR signal integration. *EMBO J.* 28, 2195–2208.
- Rizwan, M.Z., Poling, M.C., Corr, M., Cornes, P. a, Augustine, R. a, Quennell, J.H., Kauffman, A.S., and Anderson, G.M. (2012). RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* 153, 3770–3779.
- Rizzi, a, Marzola, G., Bigoni, R., Guerrini, R., Salvadori, S., Mogil, J.S., Regoli, D., and Calò, G. (2001). Endogenous nociceptin signaling and stress-induced analgesia. *Neuroreport* 12, 3009–3013.
- Roeckel, L.A., Le Coz, G.M., Gavériaux-Ruff, C., and Simonin, F. (2016). Opioid-induced hyperalgesia: Cellular and molecular mechanisms. *Neuroscience* 338, 160–182.
- Rogoz, K., Andersen, H.H., Kullander, K., and Lagerstrom, M.C. (2014). Glutamate, Substance P, and Calcitonin Gene-Related Peptide Cooperate in Inflammation-Induced Heat Hyperalgesia. *Mol. Pharmacol.* 85, 322–334.
- Rojavin, M., Szabo, I., Bussiere, J.L., Rogers, T.J., Adler, M.W., and Eisenstein, T.K. (1993). Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sci.* 53, 997–1006.
- Roland, B.L., Sutton, S.W., Wilson, S.J., Luo, L., Pyati, J., Huvar, R., Erlander, M.G., and Lovenberg, T.W. (1999). Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 140, 5736–5745.
- Roth, B.L., Disimone, J., Majane, E.A., and Yang, H.Y. (1987). Elevation of arterial pressure in rats by two new vertebrate peptides FLFQPQRF-NH₂ and AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH₂ which are immunoreactive to FMRF-NH₂ antiserum. *Neuropeptides* 10, 37–42.
- Roumy, M., and Zajac, J.-M. (2001). Neuropeptide FF receptors couple to a cholera toxin-sensitive G-protein in rat dorsal raphe neurones. *Eur. J. Pharmacol.* 417, 45–49.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., and Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10972–10976.
- Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., Lim, M.P., Gomes, I., Lee-Ramos, D., Nieto, N., and Devi, L.A. (2011). AT1R-CB1 R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.* 30, 2350–2363.
- Rudd, R.A., Seth, P., David, F., and Scholl, L. (2016). Increases in Drug and Opioid-Involved Overdose Deaths — United States, 2010 – 2015. *65*, 2010–2015.
- Saadeldin, I.M., Koo, O.J., Kang, J.T., Kwon, D.K., Park, S.J., Kim, S.J., Moon, J.H., Oh, H.J., Jang, G., and Lee,

- B.C. (2012). Paradoxical effects of kisspeptin: it enhances oocyte in vitro maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture. *Reprod. Fertil. Dev.* *24*, 656–668.
- Sakoori, K., and Murphy, N.P. (2008). Endogenous nociceptin (orphanin FQ) suppresses basal hedonic state and acute reward responses to methamphetamine and ethanol, but facilitates chronic responses. *Neuropsychopharmacology* *33*, 877–891.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 1.
- Samer, C.F., and Dayer, P. (2005). Regional Anesthesia and Pain Polymorphisme génétique et interactions médicamenteuses : leur importance dans le traitement de la douleur. *PubMed* 1–16.
- Samson, W.K., and Taylor, M.M. (2006). Prolactin releasing peptide (PrRP): An endogenous regulator of cell growth. *Peptides* *27*, 1099–1103.
- Samson, W.K., Resch, Z.T., and Murphy, T.C. (2000). A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res.* *858*, 19–25.
- Sandkühler, J., and Gruber-Schoffnegger, D. (2012). Hyperalgesia by synaptic long-term potentiation (LTP): An update. *Curr. Opin. Pharmacol.* *12*, 18–27.
- Sato, K., Shirai, R., Hontani, M., Shinooka, R., Hasegawa, A., Kichise, T., Yamashita, T., Yoshizawa, H., Watanabe, R., Matsuyama, T., et al. (2017). Potent Vasoconstrictor Kisspeptin-10 Induces Atherosclerotic Plaque Progression and Instability: Reversal by its Receptor GPR54 Antagonist. *J. Am. Heart Assoc.* *6*, e005790.
- Schmid, C.L., Kennedy, N.M., Ross, N.C., Lovell, K.M., Yue, Z., Morgenweck, J., Cameron, M.D., Bannister, T.D., and Bohn, L.M. (2017). Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics. *Cell* *171*, 1165.e13–e1170.
- Schulz, H.L., Stoehr, H., White, K., van Driel, M.A., Hoyng, C.B., Cremers, F., and Weber, B.H.F. (2002). Genomic structure and assessment of the retinally expressed RFamide-related peptide gene in dominant cystoid macular dystrophy. *Mol. Vis.* *8*, 67–71.
- Seal, L.J., Small, C.J., Kim, M.S., Stanley, S.A., Taheri, S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2000). Prolactin releasing peptide (PrRP) stimulates luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) via a hypothalamic mechanism in male rats. *Endocrinology* *141*, 1909–1912.
- Seamon, K., and Daly, J.W. (1981). Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* *256*, 9799–9801.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwino, K.M., Hendrick, A.G., et al. (2004). The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *Obstet. Gynecol. Surv.* *59*, 351–353.
- Sezen, S.F., Kenigs, V.A., and Kapusta, D.R. (1998). Renal Excretory Responses Produced by the Delta Opioid Agonist, BW373U86, in Conscious Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *287*, 238–245.
- Shah, S., Page, C.P., and Spina, D. (1998). Nociceptin inhibits non-adrenergic non-cholinergic contraction in guinea-pig airway. *Br. J. Pharmacol.* *125*, 510–516.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P. a, Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1567–1572.
- Shannon, H.E., and Lutz, E.A. (2002). Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* *42*, 253–261.
- Shenoy, S.K., Drake, M.T., Nelson, C.D., Houtz, D.A., Xiao, K., Madabushi, S., Reiter, E., Premont, R.T., Lichtarge, O., and Lefkowitz, R.J. (2006). β -arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the β 2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *281*, 1261–1273.
- Shirasaka, T., Kunitake, T., Kato, K., Takasaki, M., and Kannan, H. (1999). Nociceptin modulates renal sympathetic nerve activity through a central action in conscious rats. *Am J Physiol* *277*, R1025–R1032.
- Shivnaraine, R. V., Fernandes, D.D., Ji, H., Li, Y., Kelly, B., Zhang, Z., Han, Y.R., Huang, F., Sankar, K.S., Dubins, D.N., et al. (2016). Single-Molecule Analysis of the Supramolecular Organization of the M2 Muscarinic Receptor and the G α i1 Protein. *J. Am. Chem. Soc.* *138*, 11583–11598.
- Simonin, F., Gavériaux-Ruff, C., Befort, K., Matthes, H., Lannes, B., Micheletti, G., Mattéi, M.G., Charron, G., Bloch, B., and Kieffer, B. (1995). kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 7006–7010.
- Simonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Slowe, S., Kitchen, I., Meur, M. Le, Roques, B.P., Maldonado, R., and Kieffer, B.L. (1998). Disruption of the κ -opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective κ -agonist U-50,488H and attenuates morphine. *EMBO*

- Simonin, F., Schmitt, M., Laulin, J.-P., Laboureyras, E., Jhamandas, J.H., MacTavish, D., Matifas, A., Mollereau, C., Laurent, P., Parmentier, M., et al. (2006). RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 466–471.
- Singh, S.R., Sullo, N., Matteis, M., Spaziano, G., McDonald, J., Saunders, R., Woodman, L., Urbanek, K., De Angelis, A., De Palma, R., et al. (2016). Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) modulates immunopathology and airway hyperresponsiveness representing a novel target for the treatment of asthma. *Br. J. Pharmacol.* *173*, 1286–1301.
- Siuciak, J.A., Chapin, D.S., Harms, J.F., Lebel, L.A., McCarthy, S.A., Chambers, L., Shrikhande, A., Wong, S., Menniti, F.S., and Schmidt, C.J. (2006). Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: A novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology* *51*, 386–396.
- Smrcka, a V (2008). G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2191–2214.
- Solt, A.S., Bostock, M.J., Shrestha, B., Kumar, P., Warne, T., Tate, C.G., and Nietlispach, D. (2017). Insight into partial agonism by observing multiple equilibria for ligand-bound and Gs-mimetic nanobody-bound $\beta 1$ -Adrenergic receptor. *Nat. Commun.* *8*, 1–12.
- Spampinato, S., Trabucco, A., Biasiotta, A., Biagioni, F., Cruccu, G., Copani, A., Colledge, W.H., Sortino, M.A., Nicoletti, F., and Chiechio, S. (2011). Hyperalgesic activity of kisspeptin in mice. *Mol. Pain* *7*, 90.
- Spanagel, R., Herz, A., and Shippenberg, T.S. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 2046–2050.
- Spaziano, G., Sorrentino, R., Matteis, M., Malgieri, G., Sgambato, M., Russo, T.P., Terlizzi, M., Roviezzo, F., Rossi, F., Pinto, A., et al. (2017). Nociceptin reduces the inflammatory immune microenvironment in a conventional murine model of airway hyperresponsiveness. *Clin. Exp. Allergy* *47*, 208–216.
- Starec, M., Rouveix, B., Sinet, M., Chau, F., Desforges, B., Pocidalo, J.J., and Lechat, P. (1991). Immune status and survival of opiate- and cocaine-treated mice infected with Friend virus. *J Pharmacol Exp Ther* *259*, 745–750.
- Stengel, A., Wang, L., Goebel-Stengel, M., and Taché, Y. (2011). Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. *Neuroreport* *22*, 253–257.
- Stinus, L., Allard, M., Gold, L., and Simonnet, G. (1995). Changes in CNS neuropeptide FF-like material, pain sensitivity, and opiate dependence following chronic morphine treatment. *Peptides* *16*, 1235–1241.
- Stone, L.S., and Molliver, D.C. (2009). in search of analgesia. *Mol. Interv.* 234–251.
- Su, Y.S., Chiu, Y.Y., Lin, S.Y., Chen, C.C., and Sun, W.H. (2015). Serotonin Receptor 2B Mediates Mechanical Hyperalgesia by Regulating Transient Receptor Potential Vanilloid 1. *J. Mol. Neurosci.* 1–13.
- Sullivan, M.D., and Howe, C.Q. (2013). Opioid therapy for chronic pain in the United States: promises and perils. *Pain* *154 Suppl*, S94–S100.
- Sun, Y.-L., Zhang, X.-Y., Sun, T., He, N., Li, J.-Y., Zhuang, Y., Zeng, Q., Yu, J., Fang, Q., and Wang, R. (2013). The anti-inflammatory potential of neuropeptide FF in vitro and in vivo. *Peptides* *47*, 124–132.
- Sundblom, D.M., Panula, P., and Fyhrquist, F. (1995). Neuropeptide FF-like immunoreactivity in human plasma. *Peptides* *16*, 347–350.
- Sunter, D., Hewson, A.K., Lynam, S., and Dickson, S.L. (2001). Intracerebroventricular injection of neuropeptide FF, an opioid modulating neuropeptide, acutely reduces food intake and stimulates water intake in the rat. *Neurosci. Lett.* *313*, 145–148.
- Szabo, I., Rojavin, M., Bussiere, J.L., Eisenstein, T.K., Adler, M.W., and Rogers, T.J. (1993). Suppression of peritoneal macrophage phagocytosis of *Candida albicans* by opioids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *267*, 703–706.
- Szabo, M., Klein Herenbrink, C., Christopoulos, A., Lane, J.R., and Capuano, B. (2014). Structure-activity relationships of privileged structures lead to the discovery of novel biased ligands at the dopamine D2 receptor. *J. Med. Chem.* *57*, 4924–4939.
- Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S.C., Iguchi, H., Kawasaki, Y.I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., et al. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7438–7443.
- Takita, K., Herlenius, E.A.P., Lindahl, S.G.E., and Yamamoto, Y. (1997). Actions of opioids on respiratory activity via activation of brainstem mu-, delta- and kappa-receptors; an in vitro study. *Brain Res.* *778*, 233–241.

- Talmont, F., Moulédous, L., Piedra-Garcia, L., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J.J., Zajac, J.M., and Mollereau, C. (2010). Pharmacological characterization of the mouse NPFF2receptor. *Peptides* 31, 215–220.
- Teles, M.G., Bianco, S.D.C., Brito, V.N., Trarbach, E.B., Kuohung, W., Xu, S., Seminara, S.B., Mendonca, B.B., Kaiser, U.B., and Latronico, A.C. (2008). A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N. Engl. J. Med.* 358, 709–715.
- Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Iii, T.J.C., Skinotis, G., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Iii, T.J.C., Shukla, A.K., et al. (2016). GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* 166, 907–919.
- Tian, J.H., Xu, W., Fang, Y., Mogil, J.S., Grisel, J.E., Grandy, D.K., and Han, J.S. (1997). Bidirectional modulatory effect of orphanin FQ on morphine-induced analgesia: Antagonism in brain and potentiation in spinal cord of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 120, 676–680.
- Tilley, D.G. (2011). G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function. *Circ. Res.* 109, 217–230.
- Toll, L., Bruchas, M.R., Calo', G., Cox, B.M., and Zaveri, N.T. (2016). Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure , Signaling , Ligands , Functions , and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacol. Rev.* 68, 419–457.
- Tramier, M., Zahid, M., Mevel, J.-C., Masse, M.-J., and Coppey-Moisan, M. (2006). Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microsc. Res. Tech.* 69, 933–939.
- Treede, R.D., Meyer, R.A., Raja, S.N., and Campbell, J.N. (1992). Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog. Neurobiol.* 38, 397–421.
- Tripathi, A., Vana, P.G., Chavan, T.S., Brueggemann, L.I., Byron, K.L., Tarasova, N.I., Volkman, B.F., Gaponenko, V., and Majetschak, M. (2015). Heteromerization of chemokine (C-X-C motif) receptor 4 with α 1A/B-adrenergic receptors controls α 1-adrenergic receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1659–E1668.
- Tsvetanova, N.G., and von Zastrow, M. (2014). Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis. *Nat. Chem. Biol.* 10, 1061–1065.
- Ubuka, T., Son, Y.L., Tobar, Y., Narihiro, M., Bentley, G.E., Kriegsfeld, L.J., and Tsutsui, K. (2014). Central and Direct Regulation of Testicular Activity by Gonadotropin-Inhibitory Hormone and Its Receptor. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 8.
- Usui, S., Iso, Y., Sasai, M., Mizukami, T., Mori, H., Watanabe, T., Shioda, S., and Suzuki, H. (2014). Kisspeptin-10 induces endothelial cellular senescence and impaired endothelial cell growth. *Clin. Sci.* 127, 47–55.
- Valtschanoff, J.G., Rustioni, A., Guo, A., and Hwang, S.J. (2001). Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *J. Comp. Neurol.* 436, 225–235.
- Vardanyan, A., Wang, R., Vanderah, T.W., Ossipov, M.H., Lai, J., Porreca, F., and King, T. (2009). TRPV1 Receptor in Expression of Opioid-Induced Hyperalgesia. *J. Pain* 10, 243–252.
- Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Heydenreich, F.M., Flock, T., Miljus, T., Balaji, S., Bouvier, M., Vepintsev, D.B., Tate, C.G., et al. (2016). Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature* 536, 484–487.
- Villardaga, J.-P., Nikolaev, V.O., Lorenz, K., Ferrandon, S., Zhuang, Z., and Lohse, M.J. (2008). Conformational cross-talk between α 2A-adrenergic and μ -opioid receptors controls cell signaling. *Nat. Chem. Biol.* 4, 126–131.
- Vilim, F.S., Aarnisalo, A.A., Nieminen, M.L., Lintunen, M., Karlstedt, K., Kontinen, V.K., Kalso, E., States, B., Panula, P., and Ziff, E. (1999). Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol. Pharmacol.* 55, 804–811.
- Violin, J.D., Dewire, S.M., Yamashita, D., Rominger, D.H., Nguyen, L., Schiller, K., Whalen, E.J., Gowen, M., and Lark, M.W. (2010). Selectively Engaging B-Arrestins at the Angiotensin II Type 1 Receptor Reduces Blood Pressure and Increases Cardiac Performance. *Pharmacol. Ther.* 335, 572–579.
- Wahab, F., Riaz, T., and Shahab, M. (2011). Study on the Effect of Peripheral Kisspeptin Administration on Basal and Glucose-induced Insulin Secretion Under Fed and Fasting Conditions in the Adult Male Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*). *Horm. Metab. Res.* 43, 37–42.
- Walker, R.J., Papaioannou, S., and Holden-Dye, L. (2009). A review of FMRFamide- and RFamide-like peptides in metazoa. *Invert. Neurosci.* 9, 111–153.
- Wang, J., Hanada, K., Staus, D.P., Makara, M.A., Dahal, G.R., Chen, Q., Ahles, A., Engelhardt, S., and Rockman, H.A. (2017). G α is required for carvedilol-induced β 1adrenergic receptor β -arrestin biased signaling. *Nat. Commun.* 8, 1–13.

- Wang, Y., Kong, Y., Shei, G.J., Kang, L., and Cvijic, M.E. (2011). Development of a cyclic adenosine monophosphate assay for Gi-coupled G protein-coupled receptors by utilizing the endogenous calcitonin activity in Chinese hamster ovary cells. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 522–531.
- Wang, Y., Wang, C.Y., Wu, Y., Huang, G., Li, J., and Leung, F.C. (2012). Identification of the receptors for prolactin-releasing peptide (PrRP) and Carassius RFamide peptide (C-RFa) in chickens. *Endocrinology* **153**, 1861–1874.
- Wang, Z., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., Vanderah, T.W., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U., Hruby, V.J., Jr, T.P.M., Lai, J., and Porreca, F. (2001). Pronociceptive Actions of Dynorphin Maintain Chronic Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **21**, 1779–1786.
- Waqas, S.F.H., Hoang, A.C., Lin, Y.T., Ampem, G., Azegrouz, H., Balogh, L., Thuróczy, J., Chen, J.C., Gerling, I.C., Nam, S., et al. (2017). Neuropeptide FF increases M2 activation and self-renewal of adipose tissue macrophages. *J. Clin. Invest.* **127**, 2842–2854.
- Watanobe, H. (2001). In vivo release of prolactin-releasing peptide in rat hypothalamus in association with luteinizing hormone and prolactin surges. *Neuroendocrinology* **74**, 359–366.
- Weber, E., Evans, C.J., Samuelsson, S.J., and Barchas, J.D. (1981). Novel peptide neuronal system in rat brain and pituitary. *Science* **214**, 1248–1251.
- Weber, M.L., Farooqui, M., Nguyen, J., Ansonoff, M., Pintar, J.E., Hebbel, R.P., and Gupta, K. (2008). Morphine induces mesangial cell proliferation and glomerulopathy via kappa-opioid receptors. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**, F1388–F1397.
- Webster, L., Chey, W.D., Tack, J., Lappalainen, J., Diva, U., and Sostek, M. (2014). Randomised clinical trial: The long-term safety and tolerability of naloxegol in patients with pain and opioid-induced constipation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **40**, 771–779.
- Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2003). Independent -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10782–10787.
- Weibel, R., Reiss, D., Karchewski, L., Gardon, O., Matifas, A., Filliol, D., Becker, J.A.J., Wood, J.N., Kieffer, B.L., and Gaveriaux-Ruff, C. (2013). Mu Opioid Receptors on Primary Afferent Nav1.8 Neurons Contribute to Opiate-Induced Analgesia: Insight from Conditional Knockout Mice. *PLoS One* **8**, 1–18.
- Werry, T.D., Christie, M.I., Dainty, I.A., Wilkinson, G.F., and Willars, G.B. (2002). Ca²⁺ signalling by recombinant human CXCR2 chemokine receptors is potentiated by P2Y nucleotide receptors in HEK cells. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 1199–1208.
- Werry, T.D., Wilkinson, G.F., and Willars, G.B. (2003). Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. *Biochem. J.* **374**, 281–296.
- West, A., Vojta, P.J., Welch, D.R., and Weissman, B.E. (1998). Chromosome localization and genomic structure of the KISS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* **54**, 145–148.
- van der Westhuizen, E.T., Breton, B., Christopoulos, A., and Bouvier, M. (2014). Quantification of ligand bias for clinically relevant β 2-adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. *Mol. Pharmacol.* **85**, 492–509.
- Weston, M.C., Anderson, N., and Peachell, P.T. (1997). Effects of phosphodiesterase inhibitors on human lung mast cell and basophil function. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 287–295.
- Williams, J.T., Ingram, S.L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C.J., and Christie, M.J. (2013). Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol. Rev.* **65**, 223–254.
- Winstel, R., Freund, S., Krasel, C., Hoppe, E., and Lohse, M.J. (1996). Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2105–2109.
- Wisler, J.W., DeWire, S.M., Whalen, E.J., Violin, J.D., Drake, M.T., Ahn, S., Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2007). A unique mechanism of beta-blocker action: Carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16657–16662.
- Wisler, J.W., Xiao, K., Thomsen, A.R., and Lefkowitz, R.J. (2014). Recent developments in biased agonism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **27C**, 18–24.
- Witkin, J.M., Statnick, M.A., Rorick-kehn, L.M., Pintar, J.E., Ansonoff, M., Chen, Y., Tucker, R.C., and Ciccocioppo, R. (2014). Pharmacology & Therapeutics The biology of Nociceptin / Orphanin FQ (N / OFQ) related to obesity , stress , anxiety , mood , and drug dependence ☆. *Pharmacol. Ther.* **141**, 283–299.
- Woodcock, A., McLeod, R.L., Sadeh, J., and Smith, J.A. (2010). The efficacy of a nop1 agonist (SCH486757) in subacute cough. *Lung* **188**, 47–53.

- Wouters, M.M., Balemans, D., Van Wanrooy, S., Dooley, J., Cibert-Goton, V., Alpizar, Y.A., Valdez-Morales, E.E., Nasser, Y., Van Veldhoven, P.P., Vanbrabant, W., et al. (2016). Histamine Receptor H1-Mediated Sensitization of TRPV1 Mediates Visceral Hypersensitivity and Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *150*, 875–887.e9.
- Xu, J., Lu, Z., Narayan, A., Le Rouzic, V.P., Xu, M., Hunkele, A., Brown, T.G., Hoefer, W.F., Rossi, G.C., Rice, R.C., et al. (2017). Alternatively spliced mu opioid receptor C termini impact the diverse actions of morphine. *J. Clin. Invest.* *127*, 1561–1573.
- Xu, M., Petraschka, M., McLaughlin, J.P., Westenbroek, R.E., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Czyzyk, T.A., Pintar, J.E., Terman, G.W., and Chavkin, C. (2004). Neuropathic Pain Activates the Endogenous Opioid System in Mouse Spinal Cord and Induces Opioid Receptor Tolerance. *J. Neurosci.* *24*, 4576–4584.
- Xu, X.J., Hao, J.X., and Wiesenfeld-Hallin, Z. (1996). Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of orphanin FQ/nociceptin in the rat. *Neuroreport* *7*, 2092–2094.
- Yamada, T., Mochiduki, A., Sugimoto, Y., Suzuki, Y., Itoi, K., and Inoue, K. (2009). Prolactin-Releasing Peptide Regulates the Cardiovascular System Via Corticotrophin-Releasing Hormone. *J. Neuroendocrinol.* *21*, 586–593.
- Yamamoto, T., Wada, T., and Miyazaki, R. (2008). Analgesic effects of intrathecally administered 26RFA, an intrinsic agonist for GPR103, on formalin test and carrageenan test in rats. *Neuroscience* *157*, 214–222.
- Yamamoto, T., Miyazaki, R., Yamada, T., and Shinozaki, T. (2011). Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered 26RFA, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. *Peptides* *32*, 1262–1269.
- Yang, H.-Y.T., Tao, T., and Iadarola, M.J. (2008). Modulatory role of neuropeptide FF system in nociception and opiate analgesia. *Neuropeptides* *42*, 1–18.
- Yang, H.Y., Tang, J., Iadarola, M., Panula, P., and Costa, E. (1985). Are Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ immunoreactive peptides endocoids modulating opiate antinociception? *Prog. Clin. Biol. Res.* *192*, 313–322.
- Ye, K., Ke, Y., Keshava, N., Shanks, J., Kapp, J. a, Tekmal, R.R., Petros, J., and Joshi, H.C. (1998). Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 1601–1606.
- Yoshida, H., Habata, Y., Hosoya, M., Kawamata, Y., Kitada, C., and Hinuma, S. (2003). Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim. Biophys. Acta* *1593*, 151–157.
- Yu, H., Zhang, N., Zhang, T., Wang, Z., Li, N., Tang, H., Zhang, R., Zhang, M., Xu, B., D, Q.F.P., et al. (2016). Peptides Activation of NPFF 2 receptor stimulates neurite outgrowth in Neuro 2A cells through activation of ERK signaling pathway. *Peptides* *86*, 24–32.
- Yu, Y.J., Arttamangkul, S., Evans, C.J., Williams, J.T., and von Zastrow, M. (2009). Neurokinin 1 Receptors Regulate Morphine-Induced Endocytosis and Desensitization of μ -Opioid Receptors in CNS Neurons. *J. Neurosci.* *29*, 222–233.
- Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., and Kastin, A.J. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature* *386*, 499–502.
- Zhang, C., Bosch, M.A., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2009). γ -Aminobutyric Acid B Receptor Mediated Inhibition of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Is Suppressed by Kisspeptin-G Protein-Coupled Receptor 54 Signaling. *Endocrinology* *150*, 2388–2394.
- Zhang, C., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2013). Kisspeptin inhibits a slow afterhyperpolarization current via protein kinase C and reduces spike frequency adaptation in GnRH neurons. *Am. J. Physiol. Metab.* *304*, E1237–E1244.
- Zhang, X., Li, L., and McNaughton, P.A. (2008). Proinflammatory Mediators Modulate the Heat-Activated Ion Channel TRPV1 via the Scaffolding Protein AKAP79/150. *Neuron* *59*, 450–461.
- Zhang, Y., Hou, Y., Wang, X., Ping, J., Ma, Z., Suo, C., Lei, Z., Li, X., Zhang, Z., Jia, C., et al. (2017). The effects of kisspeptin-10 on serum metabolism and myocardium in rats. *PLoS One* *12*, e0179164.
- Zhou, H.-Y., Chen, S.-R., Chen, H., and Pan, H.-L. (2010). Opioid-Induced Long-Term Potentiation in the Spinal Cord Is a Presynaptic Event. *J. Neurosci.* *30*, 4460–4466.

Interactions fonctionnelles entre récepteurs à peptide RF-amide et caractérisation de ligands bifonctionnels des récepteurs mu opioïde et NPFF.

Résumé

Les opiacés demeurent des molécules incontournables dans le traitement des douleurs moyennes à sévères. Si leur efficacité dans le traitement de la douleur aiguë est incontestable, leur utilisation chronique est responsable de nombreux effets indésirables comprenant une hypersensibilité à la douleur et une tolérance à leurs effets analgésiques. Une partie de ces effets secondaires résulteraient de l'activation de systèmes anti-opioïdes endogènes, comme les neuropeptides RF-amide, dont des études précédentes suggèrent une complémentarité de fonctionnement dans la modulation de la douleur. Le premier axe de travail de cette thèse fut de développer les outils moléculaires afin d'étudier la possibilité d'interactions fonctionnelles et d'hétérodimerisation de ces récepteurs, en particulier GPR103 et NPFF₁R. Nous avons ainsi pu générer et caractériser des lignées cellulaires exprimant les différents récepteurs à peptide RF-amide avec un fluorophore fusionné à leur extrémité amino-terminale.

En parallèle, nous avons pu développer au cours d'une collaboration fructueuse avec deux équipes de chimistes un ligand à dualité d'action, agoniste opioïdérique et antagoniste des récepteurs NPFF₁R et NPFF₂R. Chez la souris, nous avons montré que l'administration sous-cutanée de ce composé produit une analgésie longue durée, qui n'est pas atténuée par le développement de tolérance analgésique ou d'hyperalgésie après une semaine d'administration quotidienne. Le syndrome de sevrage, précipité par la naltrexone est plus faible après l'administration chronique de ce composé qu'avec l'agoniste opioïdérique de référence. De plus, grâce à ses caractéristiques d'agoniste biaisé sur le récepteur MOR, cette molécule induit une plus faible dépression respiratoire chez la souris.

Mot-clefs : RCPG, récepteurs RF-amide, récepteurs opioïdes, interaction fonctionnelle, douleur, tolérance analgésique

Résumé en anglais

Opioid analgesics continue to be the cornerstones for treating moderate to severe pain. However, upon chronic administration, their efficiency is limited because of prominent side effects, such as tolerance and dependence. One hypothesis for the occurrence of these side effects is that the chronic stimulation of the opioid system may trigger its endogenous counterparts, anti-opioid systems, producing hyperalgesia and analgesic tolerance. Previous data from our lab and others suggest that RF-amide peptide receptors can modulate pain signalling through cross-interactions. We developed cell lines expressing fluorescent RF-amide receptors for the study of functional crosstalk and heterodimerization between RF-amide peptide receptors, i.e. GPR103 and NPFF₁R.

Through a productive collaboration with two teams of chemists, we identified and characterized multitarget peptidomimetic compounds that combined G protein-biased agonism and NPFFR antagonism. In accordance with in vitro results, we observed that acute subcutaneous administration of this compound produced long-lasting antinociceptive effects with less respiratory depression in mice. No hypersensitivity nor analgesic tolerance developed after chronic administration. Altogether, this molecule showed potent antinociceptive effect with limited side effects upon acute and chronic administration.

Keywords : GPCR, RF-amide receptors, functional cross-talk, opioid receptors, pain, analgesic tolerance.